

Colinesterasas séricas

POR

CECILIO J. VIDAL MORENO

*Departamento Interfacultativo de Bioquímica
Ciencias-Medicina. Murcia*

1. DEFINICION Y ESPECIFICIDAD DE LAS COLINESTERASAS

Un elevado número de ésteres son hidrolizados por enzimas, genéricamente denominados esterasas. La definición y posterior clasificación de las colinesterasas tuvo su origen en el descubrimiento hecho por Galehr y Plattner (1927) de la distinta especificidad de sustrato que poseían las esterasas de sangre completa y de suero. Posteriormente, Stedman y Easson (1932) prepararon un enzima de suero de caballo que se consideró específico para hidrolizar ésteres de colina y se encontró que este enzima era capaz de hidrolizar a la butirilcolina más rápidamente que a la acetilcolina (fig. 1).

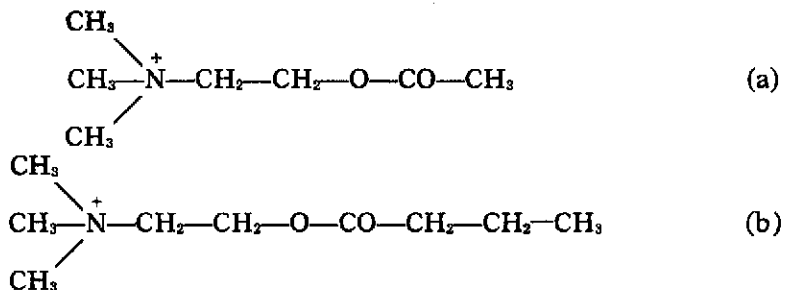


FIG. 1. Estructuras de la Acetilcolina (a) y Butirilcolina (b).

Glick (1938-1941) investigó la especificidad de sustrato del enzima de suero humano y comprobó que la actividad aumentaba a medida que progresaba la longitud de la cadena acilo, en la dirección $C_2 \rightarrow C_4$, para disminuir cuando la longitud de la cadena era más larga. Vahlquist (1935) demostró también que los colinesteres no eran los únicos sustratos hidrolizados por el plasma humano, si bien estos ésteres se hidrolizaban más rápidamente que los ésteres no colínicos. Alles y Hawes (1940) encontraron diferencias fundamentales entre las colinesterasas de eritrocito y suero: mientras que la colinesterasa de eritrocito mostraba inhibición por exceso de sustrato, acetilcolina, la correspondiente de suero no mostraba tal efecto, y además, a diferencia del enzima de eritrocito, el enzima de suero no era capaz de hidrolizar un sustrato sintético, acetil- β -metilcolina.

Mendel y Rudney (1943) estudiaron los efectos de inhibidores sobre ambos tipos de colinesterasas y acuñaron los términos de colinesterasa real y pseudocolinesterasa para los enzimas de eritrocito y suero respectivamente. Aunque la clasificación de colinesterasas, según la especificidad de sustrato, se ha conservado hasta nuestros días (se habla de acetilcolinesterasa y de butirilcolinesterasa, para referirse a los enzimas de eritrocito y suero respectivamente), este criterio resulta claramente impreciso, pues si bien es cierto que el sustrato preferente para la colinesterasa de suero de caballo, perro y hombre es la butirilcolina, para el enzima de suero de rata, conejo, pollo y rana lo es la propionilcolina. La cuestión se complica aún más al estudiar las propiedades del enzima de suero de elasmobranchios y teleosteos que presenta como sustrato óptimo acetilcolina, pero no sufre inhibición por exceso de sustrato. Ante todo esto, Augustinsson (1963) definió las colinesterasas como «un grupo de esterazas que hidrolizan ésteres de colina a mayor velocidad que a otros ésteres, cuando las velocidades de hidrólisis se comparan en condiciones óptimas de concentración de sustrato, pH, fuerza iónica, etc..., usando preparaciones libres de otro tipo de esterazas. Todas las esterazas que presentan esta especificidad se inhiben por eserina 10^{-5} M».

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica (IUB), en 1964, acordó recomendar las denominaciones de colinesterasa (acilcolina, acilhidrolasa, EC: 3.1.1.8) para los enzimas de suero y de otros tejidos que hidrolizaran más rápidamente butirilcolina o propionilcolina (o sus tioanálogos) y acetilcolinesterasa (acetilcolina, acetilhidrolasa EC: 3.1.1.7) para los enzimas que actuaran más rápidamente sobre la acetilcolina (o sus tioanálogos). La clasificación de las

denominadas esterasas fue racionalizada y completada por la Comisión de Enzimas, proponiendo las denominaciones de:

- A) Carboxilesterasas (EC: 3.1.1.1) para esterasas sensibles a organofosfatos pero no a eserina 10^{-5} M.
- B) Arilesterasas (EC: 3.1.1.2) para esterasas resistentes a eserina y organofosfatos y que tienen como sustrato preferente ésteres aromáticos.
- C) Acetilesterasas (EC: 3.1.1.6) para esterasas que actúan preferentemente sobre ésteres del ácido acético y que no son sensibles a eserina ni organofosfatos.

Las propiedades generales de ambos tipos de colinesterasas quedan resumidas en la tabla 1.

TABLA I
PROPIEDADES Y NOMENCLATURA DE COLINESTERASAS

	Acetilcolinesterasa	Colinesterasa
Nombre sistemático	Acetilcolina-acetil hidrolasa	Acilcolina-acilhidrolasa
Número de la E.C.	3.1.1.7	3.1.1.8.
Sustrato óptimo	Acetilcolina	Butiril o propionilcolina
Exceso de sustrato	Inhibición	No inhibición
Butiril o benzoilcolina	No sustrato	Sustrato
Acetil- β -metilcolina	Sustrato	No sustrato
pH óptimo	7,5-8	8,5
Inhibición por BW62c47	Inhibición fuerte	Inhibición débil
Inhibición por etopropazina	Inhibición débil	Inhibición fuerte
Tejidos con alta actividad	Organo eléctrico Eritrocito Tejido nervioso Timo	Suero Páncreas Corazón Hígado

2. CENTRO ACTIVO Y MECANISMO DE ACCION DE COLINESTERASAS

Las colinesterasas son serín-hidrolasas con ciertas propiedades catalíticas parecidas a esterasas y peptidasas. El enzima cataliza la reacción que se expresa en la figura 2.

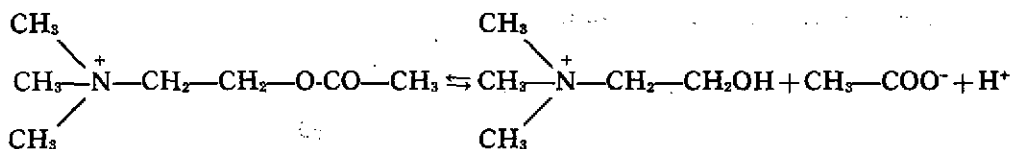


FIG. 2. Hidrólisis de la acetilcolina por la colinesterasa.

La cadena peptídica en la región de esa serina se ha comprobado que es similar al centro activo de enzimas como quimotripsina y elastasa. La estructura del centro activo de las colinesterasas es muy complementaria con la de la acetilcolina. El sustrato tiene un nitrógeno cuaternario, cargado positivamente, y un enlace éster. El centro catalítico contiene dos sitios activos, denominados centro del éster y centro aniónico. El centro aniónico orienta la cabeza del amonio cuaternario del sustrato, y el centro del éster es el responsable del fenómeno hidrolítico propiamente dicho.

Basándose en estudios sobre las posibles conformaciones de acetilcolina y N,N-tripropil-butirilcolina, Hopff y colaboradores (1975) proponen las siguientes estructuras (fig. 3) para los centros aniónicos y esterásicos (o centros del éster) para las colinesterasas: a) de pez eléctrico (EC: 3.1.1.7) y b) de suero de caballo (EC: 3.1.1.8).

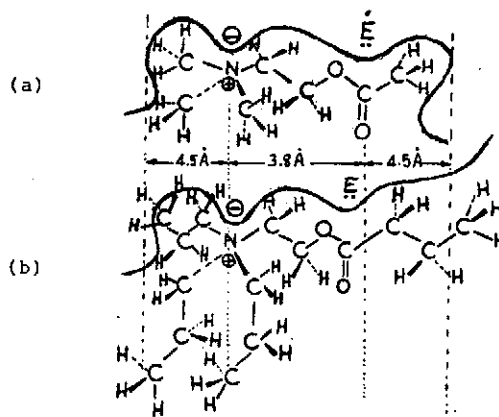
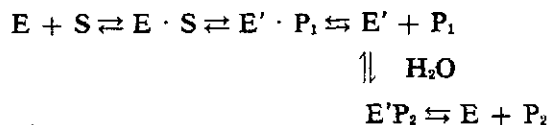


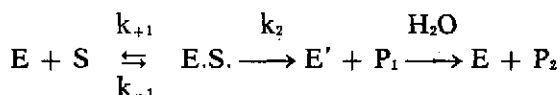
Fig. 3

El proceso hidrolítico tiene lugar en dos etapas. El enzima se une al sustrato para formar el complejo enzima-sustrato, que luego es hidrolizado, dando los productos finales. Froede y Wilson (1971) explicaron el mecanismo como sigue:



Donde S = Sustrato
 E.S = Complejo de Michaelis
 E'P₁ = Complejo de Michaelis
 E' = Enzima acetilado
 E'P₂ = Complejo de Michaelis acetato-enzima
 P₁ = Colina
 P₂ = Acetato

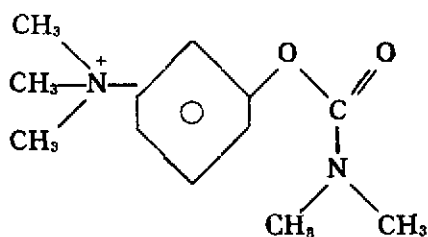
Cuando las concentraciones de P₁ y P₂ son lo suficientemente pequeñas como para no afectar a la cinética, la disociación de los complejos es rápida y se puede escribir:



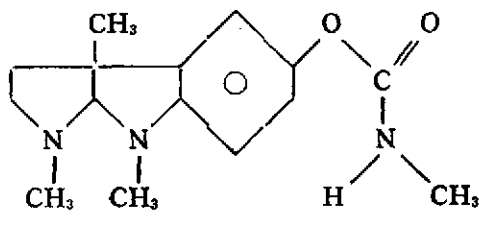
3. INHIBICION DE COLINESTERASAS

a) INHIBIDORES DEL CENTRO ANIÓNICO

Dada la estructura del centro activo, Froede y Wilson (1971) reportaron que cualquier ion amónico sustituido, especialmente amonio terciario o cuaternario, era un inhibidor potencial de las colinesterasas al unirse al centro aniónico. Por otra parte, se comprobó que la presencia de largas cadenas hidrocarbonadas o anillos aromáticos incrementaba notablemente la posibilidad de enlace, lo que apoyaba la existencia de una zona hidrofóbica en el centro aniónico. Esta fue la base de la inhibición de colinesterasas por fisostigmina y prostigmina (eserina).

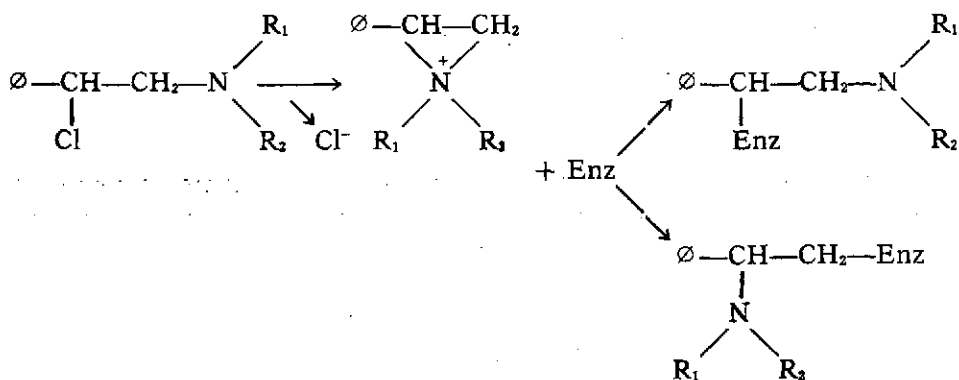


Prostigmina



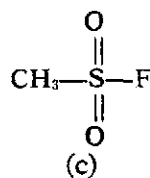
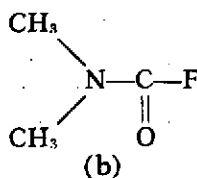
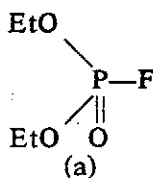
Fisostigmina

Otros inhibidores bloquearon irreversiblemente al enzima por su acción alquilante en o próxima al centro activo. Este fue el caso del N,N-dimetil-2,cloro-2, feniletilamina.



b) INHIBIDORES DEL CENTRO DEL ÉSTER

El conocimiento de la participación de este centro en el mecanismo catalítico se ha debido en gran parte al establecimiento del modelo de inhibición de organofosfatos (a), carbamatos (b) y sulfonatos (c), que posteriormente condujeron al desarrollo de potentes insecticidas y gases letales.



Todos estos inhibidores actúan transfiriendo al hidroxilo de la serina del centro activo un resto fosforilo, carbamilo o sulfonilo. Conviene señalar que en los últimos años se están utilizando toneladas de organofosfatos y carbamatos como insecticidas, lo que ha repercutido notablemente en los niveles de colinesterasa sérica de las poblaciones rurales.

4. FILOGENIA DE COLINESTERASAS

En 1968 Augustinsson observó la estrecha relación entre carboxilesterasas y colinesterasas y dado que ambos tipos de enzimas contienen

un resto de serina en el centro activo, y debido a sus similitudes en el mecanismo catalítico y a sus diferentes especificidades de sustrato, sugirió una interesante teoría por la que ambos tipos de enzimas podrían haber evolucionado de un serín-enzima común. Durante el proceso evolutivo, ambas enzimas sensibles a organofosforados se separaron al adquirir las colinesterasas el centro aniónico, lo que capacitó a éstas para ligarse a sustratos preferentemente catiónicos, tales como colinésteres. Augustinsson demostró también que las pseudocolinesterasas tipo propionil, de diferentes especies animales, mostraron amplias discrepancias en cuanto a especificidad por colinésteres y sensibilidad frente a inhibidores. Por el contrario, las butirilcolinesterasas de diferentes especies fueron homogéneas respecto a esas propiedades.

A partir de estos datos, Augustinsson concluyó afirmando que las diferencias en cuanto al comportamiento de estas colinesterasas se debían a cambios mutacionales, siendo la butirilcolinesterasa la forma más especializada de pseudocolinesterasas. Parece probable que los centros activos de acetil y butirilcolinesterasas sean similares respecto al centro del éster, aunque bien la propia naturaleza del centro aniónico, o bien los restos aminoacídicos que rodean a este centro podrían ser diferentes (fig. 2).

En 1970 Kingsbury, incluso admitió la posibilidad de un desarrollo filogenético común para todas las esterasas, a partir de una esterasa ancestral común.

Más recientemente, Koelle (1977) admitió que las especificidades de acetil y butirilcolinesterasa podrían obtenerse por alguna modificación post-transcripcional, alterándose la subunidad básica sencilla sin modificar su participación en las diferentes interacciones cuaternarias, resultantes de la heterogeneidad macromolecular del enzima. Vigny (1978) sugirió que esta hipótesis carecía de fundamento al comprobar la ausencia de reacciones inmunológicas cruzadas entre los dos sistemas enzimáticos y, por lo tanto, consideró la necesidad de la existencia de dos genes diferentes para la codificación de acetil y butirilcolinesterasa. Sin embargo, se ha podido comprobar la estrecha homología que existe en cuanto al número y valores de coeficientes de sedimentación de las formas múltiples de acetil y butirilcolinesterasa cuando se estudian en un tejido donde ambas formas coexisten (por ejemplo, en los ganglios del simpático). Finalmente, Koelle (1979) insiste en su hipótesis y tras descubrir, mediante microscopía electrónica, la ausencia de butirilcolinesterasa en el retículo endoplásmico y elementos presinápticos y su presencia en las membranas dendríticas y del pericarion,

concluye considerando que la butirilcolinesterasa, sintetizada en el retículo endoplásmico, se convierte en acetilcolinesterasa muy rápidamente de manera que es imposible su detección por métodos histológicos.

5. DETERMINACION DE ACTIVIDAD COLINESTERASA

Desde que a principios de este siglo se confirmó la participación de la acetilcolina en el proceso de la neurotransmisión, numerosos investigadores se dedicaron a poner a punto técnicas para establecer la concentración del neurotransmisor en los distintos tejidos neuronales y, naturalmente, se diseñaron también métodos para medir la actividad de los enzimas responsables de la síntesis (colinacetiltransferasa) e hidrólisis (acetilcolinesterasa) de este colín-éster. Si se tiene en cuenta que la diferencia fundamental entre acetil y butirilcolinesterasa es su especificidad de sustrato, resulta obvio que cualquier método es aplicable a ambos enzimas, utilizando el sustrato y condiciones apropiadas para cada uno de ellos. En aquellos tejidos en que ambos enzimas coexistan, siempre será posible inhibir selectivamente a uno de ellos y determinar la actividad del que interese. Augustinsson (1971) realizó una revisión muy completa de los distintos métodos de determinación de colinesterasas, y de ellos destacan, por su empleo generalizado, los siguientes:

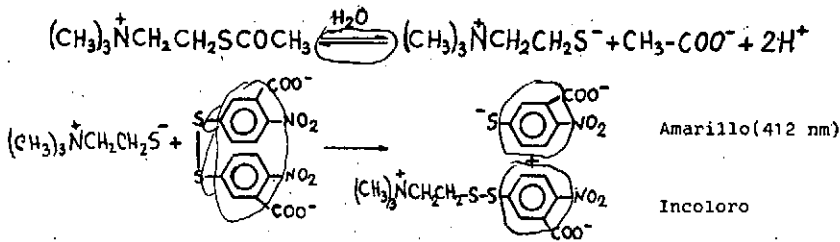
a) MÉTODOS BASADOS EN LA DETERMINACIÓN DEL ÁCIDO ACÉTICO PRODUCIDO EN LA REACCIÓN

Estos métodos caen en dos categorías. En la primera (i) se deja actuar al enzima sobre el sustrato, en un medio convenientemente tamponado, durante un tiempo suficientemente largo (1-2 horas) para que exista una variación apreciable de pH. La variación del pH ($\Delta\text{pH}/\text{h}$) desde el principio al final del período de incubación proporciona una medida de la actividad enzimática (Michel, 1949). Los inconvenientes de este método son su larga duración y el efecto que la creciente acidez del medio tiene sobre la actividad del enzima. Las ventajas son su simplicidad, tanto por el instrumental (pH-metro) como por el grado de preparación necesario para interpretar los resultados. Corrigiendo los resultados mediante tablas la variación de actividad con el pH del medio, el método se utiliza ampliamente en centros sanitarios como técnica rutinaria para la determinación de colinesterasa en eritrocitos y

suero. Un segundo método (ii), más sofisticado que el anterior, consiste en la valoración continua del ácido liberado en la hidrólisis del colín-éster con una disolución alcalina estándar, de forma que a lo largo de todo el tiempo de reacción el pH se mantiene constante (Wilson, 1954). Para esta técnica se requiere un instrumental costoso (valorador automático Radiometer, autobureta automática y accesorios de valoración), y si bien se utiliza frecuentemente para trabajos de investigación dada su precisión y reproducibilidad, no se utiliza como método rutinario.

b) MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

De entre los que utilizan esta técnica, el más utilizado es el de Ellman (1961). Empleando como sustrato acetiltiocolina, se produce un mercaptano tras la hidrólisis enzimática, el cual reacciona con el ácido 5,5'-ditiobis-nitrobenzoico, desdoblándolo en dos productos, uno de los cuales, el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico, absorbe a 412 nm. La reacción que tiene lugar es



Este método se ha aplicado ampliamente en la determinación de colinesterasa de cualquier tejido y de plasma y es muy adaptable para análisis de rutina mediante procedimientos automatizados.

Otro método espectrofotométrico muy utilizado para la determinación de colinesterasa de suero ha sido el registro de la disminución de absorbancia a 240 nm de la benzoilcolina, utilizada como sustrato (Kallow y Lindsay, 1955). Su aplicación está limitada al estudio de butirilcolinesterasas, pues la benzoilcolina es sustrato específico de este enzima.



c) MÉTODOS RADIOMÉTRICOS

Se basan en el empleo de un sustrato marcado (acetil-1-¹⁴C-colina o butiril-1-¹⁴C-colina), de suerte que el ácido producido durante la hidrólisis enzimática puede ser evaluado mediante un contador de radiactividad (Siakotos, 1969). Estas técnicas son muy caras, y naturalmente muy sensibles. Se reservan, por lo tanto, para microdeterminaciones de actividad en casos muy particulares.

6. PROPIEDADES MOLECULARES DE COLINESTERASAS

Las propiedades de colinesterasa de suero de caballo han sido intensamente investigadas por el equipo de Teng y colaboradores (1976). Según estos estudios, el enzima purificado hasta homogeneidad presentó un peso molecular para el enzima nativo de 315.000-440.000, según el método utilizado para su determinación. La naturaleza glicoproteica del enzima (3,2 por 100 de ácido siálico y 17-20 por 100 de carbohidrato) probablemente sea la causa de estas discrepancias en la estimación del peso molecular. El peso molecular mínimo, determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida y en presencia de SDS, fue de 77.000-81.000. Se conoce la composición porcentual de aminoácidos y se ha comprobado su bajo contenido en cisteína/cistina, histidina y metionina. Manosa, galactosa y N-acetilglucosamina son sus componentes carbohidrato. A este respecto, el enzima resultó ser similar a otras glicoproteínas séricas como α_1 -glicoproteína ácida y transferrina. Parece que el enzima nativo consiste en cuatro subunidades de pesos moleculares parecidos (~ 80.000). La unidad monomérica activa contiene dos subunidades y un peso molecular de 144.000. Cuando se usó butirilcolina como sustrato, el valor de K_m fue de $290\mu M$ y el número de recambio fue 171.000 min^{-1} , y utilizando acetiltiocolina K_m fue $530\mu M$ y el número de recambio 61.020 min^{-1} . Mediante el empleo de electroforesis preparativa y filtración molecular se purificó 10.000 veces, y a partir del análisis de los parámetros hidrodinámicos se ha intentado establecer la forma de la molécula que parece ser un elipsoide prolata con un radio axial de 13, aunque esta estructura no es definitiva en vista de su naturaleza glicoproteica, lo que podría alterar profundamente los resultados de las propiedades hidrodinámicas.

Por lo que se refiere a las propiedades moleculares de la acetilcolinesterasa de tejido neuronal se sabe que el enzima está, en su mayor parte, ligado a membrana. Powell y colaboradores (1973) establecieron

la naturaleza glicoproteica del enzima cuya composición aminoacídica es también conocida.

Según Vidal (1979), el enzima de cerebro de rata existe en diferentes agregados o formas múltiples moleculares de dos monómeros distintos de pesos moleculares 75.000 y 100.000, y así se comprobó la existencia de formas con pesos moleculares de 150.000, 167.000, 200.000, 250.000, 350.000 y 450.000. Parece, sin embargo, probable que el enzima nativo exista en un estado tetramérico con peso molecular 450.000 y constituido por un dímero de dímeros ($\alpha \cdot \beta$). Utilizando como sustrato acetilcolina, el enzima nativo, ligado a membrana, mostró un valor de K_m de 80 μM , y muy débil capacidad de hidrólisis de butirilcolina (2 por 100 de la correspondiente a acetilcolina).

7. SIGNIFICADO FISIOLÓGICO DE LAS COLINESTERASAS

Es un hecho perfectamente establecido la participación de la acetilcolinesterasa en la hidrólisis de la acetilcolina, después de la interacción neurotransmisor-receptor, colaborando así en el restablecimiento de la situación inicial de la membrana postsináptica, una vez que se ha producido un potencial de acción. Dada la importancia de este enzima en el ciclo de la acetilcolina es natural que la atención de numerosos investigadores se haya centrado en el estudio del enzima procedente de tejido neural (cerebro, músculo, ganglios del simpático, etc.). Sin embargo, la exacta función fisiológica de la colinesterasa de suero no ha sido plenamente establecida. Se sabe que este enzima se sintetiza en el hígado (Sawyer, 1947) y que en el hombre tiene una vida media de unos nueve días (Jenkins, 1967). No existe información sobre el catabolismo de la colinesterasa sérica. Sin embargo, se han comprobado incrementos o descensos del nivel de colinesterasa sérica bajo determinadas condiciones patológicas. Así, en pacientes urémicos los niveles de enzima fueron más bajos que en pacientes normales (Simon, 1969). Según Zarday (1975), la explicación podría ser la disminución de la velocidad de síntesis del enzima en hígado, debido a la acumulación de sustancias tóxicas en pacientes urémicos. Después de hemodiálisis crónica, la actividad colinesterasa sérica se incrementó en un 40 por 100, lo que se podría explicar por una mayor eficacia del sistema de síntesis de proteínas en el hígado. También se ha comprobado que en pacientes que sufrieron quemaduras, el nivel de colinesterasa sérica disminuyó (Price, 1970). Se piensa que esta disminución pudo ser debida a una lesión hepatocelular (Arturson, 1963), a un incremento

del catabolismo del enzima, o a la presencia de sustancias inhibidoras en el plasma, liberadas desde el tejido dañado (Viby-Mongensen, 1975). Parece claro que una total falta de enzima es bien tolerada, al menos, por el hombre (Gürtner, 1967). Existen pruebas que sugieren la participación de este enzima en el metabolismo de ácidos grasos (Cucuianu, 1975), en la regulación de los niveles de colina en plasma (Funnel, 1965) y en el metabolismo de lipoproteínas (Kutty, 1973). Chu reportó en 1978 la estrecha relación existente entre los niveles de triglicéridos y colinesterasa en suero en pacientes hiperlipidémicos. Parece muy probable la participación de la colinesterasa sérica en la síntesis y estructura de las lipoproteínas séricas a través de interacciones colinesterasa-fosforilcolina de las lecitinas.

8. NIVELES DE COLINESTERASA SERICA Y SEXO

Ha sido reportado por Sidell (1975) que el nivel de colinesterasa sérica en hombres (4.21 U.I.) fue significativamente más alto que en mujeres (3.6 U.I.), y en aquéllas que utilizaban contraceptivos orales el nivel de colinesterasa también disminuyó (3.1 U.I.). Se encontró que el nivel de colinesterasa creció proporcionalmente con la edad en hombres y mujeres, excepto en aquéllas que utilizaban la píldora anticonceptiva. En ratas, sin embargo, Schmidt (1978) encontró que a los 35 días los animales tenían la misma actividad, pero a los 280 días la actividad en las hembras había aumentado 549 por 100 respecto al nivel del enzima en machos. Esta relación 5:1 para las colinesterasas de ambos sexos podría estar relacionada con los efectos de estrógenos sobre la estimulación de la síntesis de lipoproteínas de baja densidad en hígado. También se ha comprobado que el nivel de colinesterasa sérica disminuyó en mujeres durante el primer trimestre de embarazo, reduciéndose su actividad entre 20 y 45 por 100, y recuperándose íntegramente después (Howard, 1978). Comparando los niveles de colinesterasa de hombres de 30 y 60 años se encontró que el nivel de colinesterasa fue considerablemente más alto en jóvenes, atribuyendo esta variación al nivel decreciente de testosterona en hombre maduro respecto a jóvenes (Howard, 1978). Así, mientras que niveles altos de andrógenos estimulan la síntesis y liberación de colinesterasa desde el hígado, altas concentraciones de estrógenos la deprimen. Esto explica por qué las mujeres premenopáusicas tienen menor actividad enzimática que las postmenopáusicas.

9. ACCION DE GLUCOCORTICOIDES

Según Foldes (1974), la inyección de metilprednisolona y dexametasona en perros disminuyó el nivel de colinesterasa sérica, volviendo a los valores originales tras la interrupción del tratamiento. «In vitro», no se comprobó inhibición de colinesterasa por dichos agentes. Se sabe que glucocorticoides estimulan síntesis de ARN y proteínas en hígado, pero en este caso, lo que se comprueba es una notable represión de la síntesis de este enzima. Estos resultados constituyen el primer caso demostrado de inhibición de síntesis de una proteína en hígado por glucocorticoides. El efecto es de considerable importancia a la hora de administrar relajantes musculares a personas tratadas con glucocorticoides, pues disminución de colinesterasa sérica repercutirá en la intensidad y duración de acción de dichos anestésicos.

10. ACCION DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS SOBRE COLINESTERASA SERICA

Insecticidas organofosforados tales como paratión, malatión y diazinón han desplazado al DDT como pesticida. En 1975 se aplicaron unas 11 Tm de este material en una zona muy restringida del Canadá. Los resultados expuestos por Brown (1976) demuestran que los niveles de colinesterasa sérica disminuyeron notablemente durante la época de mayor riesgo de exposición a organofosfatos (abril/junio 0.84 U.A.; agosto/octubre 0.75 U.A.; noviembre/diciembre 0.92 U.A.).

11. POLIMORFISMO GENETICO DE LAS COLINESTERASAS SERICAS

En 1952, Bourne describió el polimorfismo genético de la colinesterasa sérica, como causante de la apnea prolongada que se había observado en algunos pacientes, tras inyección de succinilcolina como relajante de corta duración. Kalow y Genest (1957) demostraron que la aparición de apnea prolongada después de la administración de suxametonio, podía ser debida a la presencia de una colinesterasa anormal de carácter hereditario. Esta variante enzimática resultó ser más resistente a la inhibición por dibucaína que el enzima normal (fig. 4).

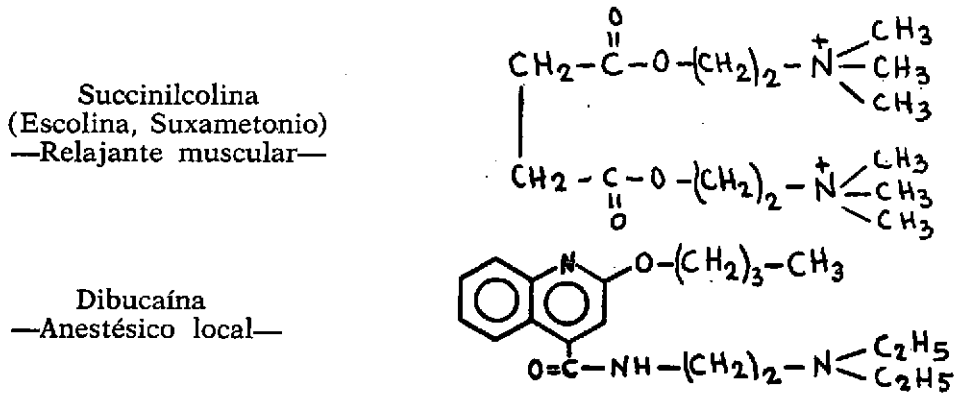


FIG. 4

Estudios posteriores sobre colinesterasa sugirieron la existencia de cuatro genes alélicos en el locus E_1 , controlando la síntesis de las cuatro variantes del enzima. Estos genes fueron denominados por Motulsky (1964) E^u_1 (normal), E^a_1 (atípico), E^f_1 (resistente al fluoruro) y E^s_1 («silencioso», no productor de actividad colinesterasa). La combinación de estos genes da lugar a los 10 posibles genotipos del locus E_1 .

Estudios genéticos de poblaciones sobre el polimorfismo de colinesterasa, sugieren que las variantes enzimáticas son raras en la población negroide. El alelo E^a_1 es frecuente en los pueblos del Cáucaso (Morrow y Motulsky, 1965). Frecuencia alta de E^a_1 se ha reportado en varios grupos de esquimales (Gutsche, 1967; Scott, 1970), mientras que la variante E^f_1 fue común en el nordeste de Inglaterra (Whittaker y Berry, 1977).

Un estudio de la distribución geográfica de las variantes de colinesterasas fue hecho por Steegmüller en 1975, encontrando, en una muestra de la población alemana, un 96,1 por 100 de colinesterasa normal ($E^u_1 E^u_1$), valores que coinciden con los de una muestra de población inglesa: 96,4 por 100 (Whittaker, 1968^b), y con los de la población danesa: 97,2 por 100 (Hanel, 1978). Por el contrario, la incidencia del genotipo $E^a_1 E^a_1$ fue muy pequeña —uno de cada 1.000 alemanes— (Prokop, 1971).

Resulta muy difícil predecir por qué los pacientes presentan apnea prolongada al exponerse al suxametonio. Las complicaciones produci-

das por la aparición de apnea, van desde un nivel de inconsciencia ligera, de duración variable, hasta paro cardíaco y muerte, en casos de hipersensibilidad. El 65 por 100 de los casos conocidos de apnea prolongada son debidos a variantes de colinesterasa sérica. Pacientes homocigotos para el enzima atípico $E^a_1 E^a_1$ son extremadamente sensibles al suxametonio. Pacientes heterocigotos para el enzima normal y atípico $E^u_1 E^a_1$ reaccionan anormalmente. Pacientes con genotipo $E^u_1 E^f_1$ reaccionan normal o casi normalmente al suxametonio. Las respuestas anormales en pacientes con el genotipo $E^u_1 E^a_1$ varían entre 1:400 (Das, 1975) y 1:480 (Lehmann y Liddell, 1969). En estos casos, se desconoce cuál es el factor de anormalidad. Pacientes que tenían fenotipo para colinesterasa normal y sin embargo tenían baja actividad, presentaron apnea, cuya duración fue inferior a 12 minutos.

El grado de inhibición de colinesterasa sérica por suxametonio (10^{-5} M) se establece mediante el denominado número de dibucaína (DN) (Kalow y Genest, 1957). Un DN de 80 indica un homocigoto normal $E^u_1 E^u_1$; un individuo con un DN de 60 se sospecha que será heterocigoto tipo $E^u_1 E^a_1$, y un DN de 20 sería indicativo de heterocigoto $E^a_1 E^a_1$. Posteriormente, se comprobó que el fluoruro también era un inhibidor de colinesterasas (Harris y Whittaker, 1961), y se definió el número de fluoruro como el grado de inhibición expresado como porcentaje ejercido por una concentración de fluoruro sódico 5.10^{-5} M. Este número de fluoruro (FN) se encontró asociado a la expresión del gen E^f_1 , resistente al fluoruro. El cuarto gen alélico E^a_1 , gen silencioso, fue identificado en 1963 por Liddell. Homocigotos para este gen, $E^a_1 E^a_1$, carecen o tienen muy baja actividad colinesterasa. El comportamiento de un heterocigoto $E^u_1 E^a_1$ es el mismo de un homocigoto normal sólo que en este caso la actividad colinesterasa será menor. Por lo tanto, a menos que un paciente sea homocigoto respecto al gen E^a_1 , éste sólo podrá ser identificado mediante estudios de familias (Viby-Mogensen, 1977).

En 1971, Hanel y Viby-Mogensen definieron el número de urea (U.N.) como el porcentaje de inhibición de colinesterasa tras incubarla un minuto con urea 5M, y de forma parecida se definieron los números de cloruro (Whittaker, 1968) y el de escolina (King y Griffin, 1973).

En los últimos años se han creado Unidades de Investigación de Colinesterasas en distintas capitales europeas para determinar genotipos y actividades de colinesterasas séricas, suministrar tarjetas de «alerta» a los pacientes con riesgo de sensibilidad al suxametonio y para evaluar métodos de tratamiento cuando se presenta la apnea. Los resulta-

dos obtenidos por Viby-Mogensen en 1977 en un estudio sobre la población danesa se recogen en la tabla 2.

12. PROPIEDADES MOLECULARES DE COLINESTERASA NORMAL Y ATIPICA

Lockridge y La-Du (1978) purificaron mediante cromatografía por afinidad la colinesterasa normal ($E^{\text{n}}_1 E^{\text{n}}_1$) y atípica ($E^{\text{a}}_1 E^{\text{a}}_1$) de dos pacientes no relacionados. Utilizando benzoilcolina como sustrato, se encontraron valores de K_m de $5 \mu\text{M}$ para el enzima normal y $24 \mu\text{M}$ para el atípico, pero utilizando o-nitrofenilbutirato como sustrato, los valores de K_m para ambas enzimas fueron idénticos, $140 \mu\text{M}$. De sus experimentos concluyeron admitiendo la posibilidad de que el enzima atípico hubiera sufrido una alteración que modificase sólo al centro aniónico. Atribuyeron la distinta afinidad para sustratos marcados, como la benzoilcolina, a la sustitución de un aminoácido cargado (a. glutámico) del centro aniónico por un aminoácido neutro. Señalemos que de las 200 variantes de hemoglobinas identificadas, la gran mayoría difieren en la sustitución de un solo aminoácido. Estos resultados vienen a corroborar los de Altland y colaboradores (1971) quienes encontraron distintos modelos electroforéticos para colinesterasas sérica normal ($E^{\text{n}}_1 E^{\text{n}}_1$) y atípica ($E^{\text{a}}_1 E^{\text{a}}_1$). Ambas colinesterasas se purificaron unas 5.000-6.000 veces, y por marcaje con DF^{32}P y posterior digestión con tripsina, se encontró que los péptidos procedentes de la colinesterasa normal emigraban al ánodo en una electroforesis de alto voltaje a pH 3.5, y por el contrario, en las mismas condiciones los péptidos procedentes de las colinesterasas atípicas emigraban hacia el cátodo.

TABLA 2

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE VARIANTES EN EL LOCUS E₁ DE COLINESTERASA SÉRICA.
NOMENCLATURA DE MOTULSKY

(Estudio sobre la población danesa) (Viby-Mogensen, 1977)

Genotipo	Núm. de pacientes	Actividad colinesterasa U/L	Núm. de dibucaina	Núm. de fluoruro	Núm. de cloruro	Núm. de escolina	Núm. de urea
E ₁ ^a E ₁ ^a	453	677-1560	78-86	55-65	1-22	89-95	41-52
E ₁ ^a E ₁ ^b	338	474-1110	53-72	40-54	13-34	56-77	53-70
E ₁ ^b E ₁ ^b	104	166-757	13-27	15-30	41-59	4-25	84-100
E ₁ ^b E ₁ ^c	33	385-870	78-85	56-64	7-17	86-93	42-53
E ₁ ^c E ₁ ^c	19	96-489	12-30	20-35	43-60	4-28	87-100
E ₁ ^c E ₁ ^d	3	0	—	—	—	—	—
E ₁ ^d E ₁ ^d	13	611-1150	74-79	46-51	16-30	84-91	63-68
E ₁ ^d E ₁ ^e	5	475-648	48-52	25-33	30-42	54-60	84-95
E ₁ ^e E ₁ ^e	2	351-509	63-64	26-38	25-26	80-81	90-91

13. COLINESTERASAS Y ANESTESICOS VOLATILES

Al contrario que la dibucaína y otros anestésicos no volátiles, el éter, tricloroetileno, cloroformo y halotano no inhiben a la colinesterasa sérica pero sí a la de cerebro. Este tipo de inhibición, según Braswell y Kitz (1977), está más relacionado con el tamaño y forma del anestésico que con la solubilidad en lípidos o su carácter hidrofóbico. Puesto que la colinesterasa de suero no se altera por estos anestésicos volátiles, se puede pensar que las áreas hidrofóbicas de la colinesterasa no se adaptarán al tamaño o forma de las moléculas de éter y demás anestésicos.

BIBLIOGRAFIA

- ALLES, G. A., y HAWES, R. C., *J. Biol. Chem.*, 133 (1940), págs. 375-390.
- ARTURSSON, G., y WALLENIUS, G., *Acta chir. scand.*, 126 (1963), pág. 34.
- ATLAND, G.; GOEDDE, H. W.; HELD, K.; JENSEN, M.; MÜNSCHEN, H., y SOLEM, E., *Humangenetik*, 14 (1971), págs. 56-60.
- AUGUSTINSSON, K. B., *Handb. d. Experiment Pharmakologie Sub.*, Ed. Koelle, G. 15, Springer: Berlin-Göttingen, Heidelberg, 1963, págs. 89-128.
- AUGUSTINSSON, K. B., *Homologous Enzymes and Biochemical Evolution* Ed. Thoai, N. Van and Roche J. NATO, Advanced Study Group, Paris, 1968, págs. 299-311.
- AUGUSTINSSON, K. B., *Methods of Biochemical Analysis* (Glick, D. ed.), supplement volume, Interscience, New York, 1971, págs. 217-273.
- BOURNE, J. G.; COLLIER, H. O. J., y SOMERS, F. G., *Lancet*, i (1952), pág. 1225.
- BRASWELL, L. M., y KITZ, R. J., *J. Neurochem.*, 29 (1977), págs. 665-671.
- BROWN, J. R.; CHAI, F. C.; CHOW, L. Y., y STOPPS, G. J., *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 19 (1978), págs. 617-623.
- CHU, M. I.; FONTAINE, P.; KUTTY, K. M.; MURPHY, D., y REDHEENDRAN, R., *Clin. Chim. Acta*, 85 (1978), págs. 55-59.
- CUCUIANU, M.; POPESCU, T. A.; OPINCARU, A., y HARAGUS, S., *Clin. Chim. Acta*, 59 (1975), pág. 19.
- DAS, P. K., *Hum. Hered.*, 25 (1975), pág. 461.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D., y otros, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961), págs. 88-95.
- FOLDES, F. F.; ARAI, T.; GENTSH, H. H., y ZARDAY, Z., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146 (1974), págs. 918-920.
- FROEDE, H. C., y WILSON, I. B., *The Enzymes*, V, 3rd. edition, Ed. Boyer, P.D. Academic Press, 1971, págs. 87-114.
- FUNNEL, H. S., y OLIVER, W. T., *Nature*, 208 (1965), pág. 689.
- GALEHR, O., y PLATTNER, F., *Arch. Ges. Physiol.*, 218 (1927), págs. 488-505.
- GLICK, D., *J. Biol. Chem.*, 125 (1938), págs. 729-739.
- *J. Biol. Chem.*, 130 (1939), págs. 527-534.
- *J. Biol. Chem.*, 137 (1941), págs. 357-362.
- GÜRTNER, Th., «Über Differenzierung und Herkunft der Serumcolinesterase des Menschen», *Fortschr. Med.*, 85 (1967), págs. 471-476.
- GUTSCHE, B. B.; SCOTT, E. M., y WRIGHT, R. C., *Nature* (Lond.), 215 (1967), pág. 322.
- HANEL, H. K., y VIBY-MOGENSEN, J., *Brit. J. Anaesth.*, 43 (1971), pág. 51.
- HANEL, H. K.; VIBY-MOGENSEN, J., y SCHAFFALITZKY, O. B., *Acta Anaesth. scand.*, 22 (1978), págs. 505-507.
- HARRIS, H., y WHITTAKER, M., *Nature*, 191 (1961), pág. 496.
- HOPFF, W. H.; RIGGIO, G.; HOFMANN, A., y WASER, P. G., *Croatia Chemica Acta*, 47 (1975), págs. 309-319.
- HOWARD, J. K.; EAST, N. J., y CHANEY, J. L., *Archives of Environmental Health* (sep.-oct. 1978), págs. 277-279.
- IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. «The nomenclature of Multiple Forms of Enzymes Recommendations», *Biochem. J.*, 126 (1971), págs. 769-771.
- JENKINS, T.; BALINSKY, D., y PATENT, D. W., *Science*, 156 (1967), pág. 1748.
- KALOW, W., y LINDSAY, H. A., *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 33 (1955), págs. 568-574.
- KALOW, W., y GENEST, K., *Canad. J. Biochem.*, 35 (1957), pág. 339.
- KALOW, W., y STARON, N., *Canad. J. Biochem.*, 35 (1957), pág. 1305.
- KING, J., y GRIFFIN, D., *Brit. J. Anaesth.*, 45 (1973), pág. 450.
- KINGSBURY, N., y MASTERS, C. J., *Biochim. Biophys. Acta*, 200 (1970), págs. 58-69.
- KOELLE, G. B.; RICKARD, K. K., y RUCH, G. A., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, US 76 (1979), págs. 6012-6016.



- KOELLE, W. A.; SMYRL, E. G.; SIDONS, V. E., y KOELLE, G. A., *J. Neurochem.*, 28 (1977), págs. 307-311.
- KOELLE, G. B.; KOELLE, W. A., y SMYRL, E. G., *J. Neurochem.*, 28 (1977), págs. 313-319.
- KUTTY, K. M.; ROWDEN, G., y COX, A. R., *Can. J. Biochem.*, 51 (1973), pág. 883.
- LEHMANN, H., y LIDDELL, *Brit. J. Anaesth.*, 41 (1969), pág. 235.
- LIDDELL, J.; LEHMANN, H., y DAVIES, P., *Acta Genet. (Basel)*, 13 (1963), pág. 95.
- LOCKRIDGE, O., y LA-DU, B. N., *J. Biol. Chem.*, 253 (1978), págs. 361-366.
- MENDEL, B., y RUDNEY, H., *Biochem. J.*, 37 (1943), págs. 59-63.
- *Science*, 98 (1943), págs. 201-292.
- MICHEL, H. A., *J. Lab. Clin. Med.*, 34 (1949), pág. 1564.
- MORROW, A. C., y MOTULSKY, A. G., *Clin. Res.*, 13 (1965), pág. 266.
- MOTULSKY, A. G., *Progress in medical genetics. Pharmacogenetics*, Ed. Seinberg and Bean, Grune and Stratton, New York y London, 1964.
- POWELL, J. T.; BON, S.; RIEGER, F., y MASSOULIÉ, J., *FEBS Lett.*, 36 (1973), páginas 17-22.
- PRICE, W. R.; WOOD, Mc. D.; COOK, F., y GARODIMOSE, B., *Amer. J. Surg.*, 120 (1970), pág. 671.
- PROKOP, O., *Die Menschlichen Blut-und Serumgruppen*, Fischer, Stuttgart, 1971.
- SAWYER, C. H., y EVERETT, J. W., *Amer. J. Physiol.*, 148 (1947), pág. 675.
- SCOTT, E. M.; WEAVER, D. D., y WRIGHT, R. C., *Amer. J. Hum. Genet.*, 22 (1970), pág. 363.
- SITAKOTOS, A. N.; FILBERT, M., y HESTER, R., *Biochem. Med.*, 3 (1969), págs. 1-12.
- SCHMIDT, E., y SCHMIDT, F. W., *Enzyme*, 23 (1978), págs. 52-55.
- SIDELL, F. R., y KAMINSKIS, A., *Clin. Chem.*, 21 (1975), págs. 1393-1395.
- SIMON, N. M.; DEL GRECO, F., y DIETZ, A. A., *Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. O.*, 15 (1969), págs. 328-331.
- STEDMAN, E.; STEDMAN, E., y EASSON, L. H., *Biochem. J.*, 26 (1932), págs. 2056-2066.
- STEGMÜLLER, H., *Hum. Genet.*, 26 (1975), pág. 167.
- TENG, T. L.; HARPST, J. A.; LEE, J. C., y CARLSON, D. M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 176 (1976), págs. 71-81.
- VAHLQUIST, B., *Skand. Arch. Physiol.*, 72 (1935), págs. 133-160.
- VIBY-MOGENSEN, J.; HANEL, H. K., *et al*, *Acta Anaesth. Scand.*, 19 (1975), págs. 159-168.
- VIBY-MOGENSEN, J., y HANEL, H. K., *Acta Anaesth. Scand.*, 21 (1977), págs. 405-412.
- VIDAL, C. J., *Ph. D. Thesis. Univ. of London*, 1979.
- VIGNY, M.; GISIGER, V., y MASSOULIÉ, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 75 (1978), páginas 2588-2592.
- WHITTAKER, M., *Acta Genet. (Basel)*, 18 (1968a), pág. 556.
- *Acta Genet. (Basel)*, 18 (1968b), pág. 567.
- WHITTAKER, M., y BERRY, M., *Brit. J. Psychiat.*, 130 (1977), pág. 397.
- WILSON, I. B., y CABIB, E., *J. Amer. Chem. Soc.*, 76 (1954), págs. 5154-5156.
- ZARDAY, Z.; DEERY, A.; TELLIS, I.; SOBERMAN, R., y FOLDES, F., *Journal of Medicine*, 6 (1975), págs. 337-349.

