

# Las colinesterasas del suero humano

POR

JUAN RAMON MEDINA

## SUMARIO

Farmacogenética.—Las colinesterasas humanas.—Distribución en el organismo. — Papel fisiológico. — Hipersensibilidad al suxametonio. — Medida de la actividad pseudocolinesterásica.—Variantes heredables de la pseudocolinesterasa.—La enzima normal.—Multiplicidad de formas moleculares de la enzima normal.—La enzima atípica.— Identificación del alelo atípico.—Interacción de los alelos atípico y usual.—Semejanzas moleculares entre la enzima usual y la atípica.—El alelo resistente a fluoruro.—El alelo silencioso.—Interacción del alelo silencioso con los otros alelos.—Identificación del alelo silencioso.—Heterogeneidad del fenotipo silencioso.—Otros alelos del gen  $E_1$ .—El fenotipo Cynthiana.—Heterogeneidad genética de los individuos normales.—Ligamiento al gen de la transferrina.—El gen  $E_2$ .—Interacción entre los genes  $E_1$  y  $E_2$ .—Otros alelos del gen  $E_2$ .—La pseudocolinesterasa y las enfermedades.—Cambios durante el desarrollo.—La pseudocolinesterasa en las poblaciones.—Mecanismos evolutivos del polimorfismo.—Variación continua de la actividad pseudocolinesterásica.—Nomenclatura.—Agradecimientos. Bibliografía.

## FARMACOGENETICA

Aunque la idea de que existen errores congénitos del metabolismo se remonta al trabajo de Garrod, habiéndose demostrado posteriormente que tales defectos congénitos se deben con mucha frecuencia a la cons-



titución genética del individuo que los sufre y que son, por tanto, heredables; la idea de que puede existir una variabilidad hereditaria en las reacciones de los individuos frente a los fármacos es mucho más reciente, datando de alrededor de 1950.

Inicialmente se descubrió que la dosis de un fármaco debía ser apropiada al sexo, edad, peso, estado general, etc, del individuo receptor. Pero aún teniendo en cuenta todos esos factores, algunos individuos diferían de los demás en sus respuestas a dosis, teóricamente apropiadas, de ciertos fármacos.

La farmacogenética nace y se desarrolla con el descubrimiento de que, en muchas ocasiones, tales diferencias en la respuesta a los fármacos son hereditarias.

Desde hace mucho tiempo se sabía que individuos con enfermedades metabólicas hereditarias respondían anormalmente a ciertas sustancias. Así, los individuos con síndrome de Down, por poner sólo un ejemplo, son hipersensibles a la atropina. Sin embargo, estos casos no llamaron mucho la atención puesto que la respuesta anormal se producía en un organismo que, ya antes de la administración del fármaco, tenía el metabolismo alterado.

Mucho más llamativos son los casos en los que el individuo se halla perfectamente sano antes de la administración de un compuesto, que normalmente ayuda y no perjudica al organismo, y enferma a raíz de la administración. Un ejemplo típico es la deficiencia heredable en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Los individuos deficientes, perfectamente sanos, sufren una anemia hemolítica grave si reciben sulfamidas u otras sustancias. Este caso ya tiene un sabor típicamente farmacogenético.

En muchos casos, la respuesta hereditaria normal no es patológica, es sencillamente diferente. Por ejemplo, se sabe que algunos de los individuos que reciben el compuesto antituberculoso isoniazida lo acetilan rápidamente, mientras que otros lo hacen más lentamente. La acetilación de la isoniazida se halla controlada por un gen, el gen R, que codifica para la enzima N-acetiltransferasa. Los individuos que acetilan lentamente la isoniazida son homocigotos para un alelo, r, recesivo, del gen R y sintetizan menos cantidad de dicha enzima. Que se sepa, ninguno de los tres genotipos RR, Rr y rr, produce síntomas de enfermedad ni en presencia ni en ausencia de isoniazida. Posiblemente sea un caso de variante hereditaria "neutral" tan de moda actualmente en la teoría de la evolución.

La situación que nos proponemos discutir en este trabajo cae de lleno en el campo de la farmacogenética. Se trata de la hipersensibilidad hereditaria al suxametonio, una condición relacionada con una de las colines-

terasas presentes en el organismo humano. La información sobre este asunto es muy amplia, tratándose de una situación en la que los datos genéticos, bioquímicos, clínicos y evolutivos confluyen, haciendo de la pseudocolinesterasa un interesantísimo objeto de investigación.

LAS COLINESTERASAS HUMANAS

Todas las enzimas conocidas que catalizan la hidrólisis de colina catalizan, además, la hidrólisis de ésteres que carecen de colina. Por tanto, en

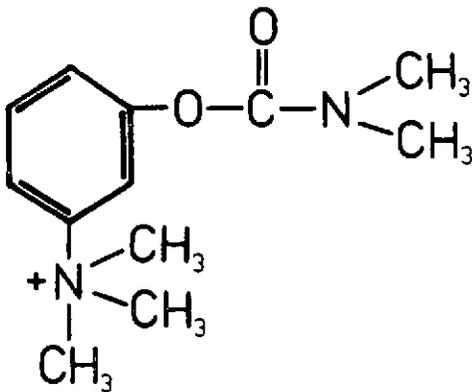
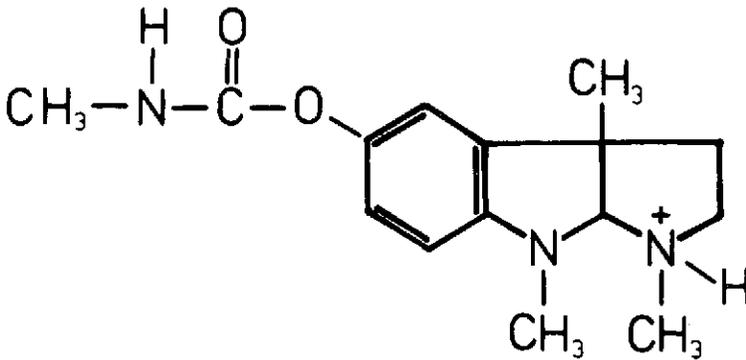
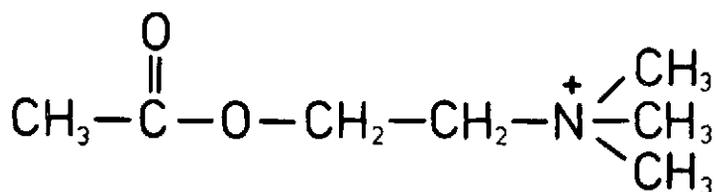


Figura 1.—Estructura química de la eserina (fórmula superior) y de la neostigmina.

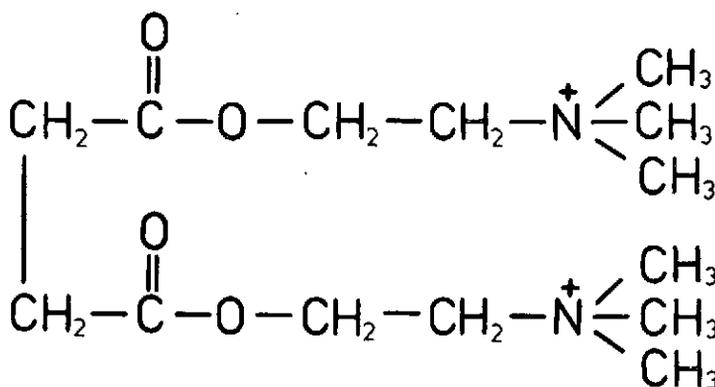


lo que a especificidad de sustrato se refiere, aún no se conoce ninguna colinesterasa verdadera. Sin embargo, el término colinesterasa tiene un significado bien preciso: se denominan colinesterasas aquellas enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de colina y son sensibles al efecto inhibitorio de la eserina (fisoestigmina), (Fig. 1), en concentraciones de  $10^{-5}$ M. En el organismo humano hay dos enzimas distintas que cumplen los requisitos exigidos por la definición anterior, acetilcolinesterasa y pseudocolinesterasa.

La acetilcolinesterasa (acetilcolina-acetilhidrolasa E.C. 3.1.1.7) es un enzima que cumple un importante papel en el sistema nervioso. Como se sabe, la acetilcolina es el agente transmisor del impulso nervioso desde la membrana de la neurona motora a la del músculo esquelético y, tam-



I



II

Figura 2.—Estructura química de la acetilcolina (I) y del suxametonio (II).

bién, de la membrana presináptica a la postsináptica en las sinapsis colinérgicas. La acetilcolina es sintetizada en la zona del axón próxima a la membrana presináptica, (fig. 2), por la enzima colina-acetil-transferasa. A continuación, es englobada en el interior de vesículas membranosas, cada una de las cuales contiene unas 10.000 moléculas de acetilcolina, llamadas vesículas sinápticas. La llegada del impulso nervioso a la membrana presináptica origina la liberación de las vesículas sinápticas al espacio intersináptico. La acetilcolina, así liberada, reacciona con una proteína receptora específica situada en la membrana postsináptica, abriendo así un canal catiónico por el que entra mucho más  $\text{Na}^+$  que  $\text{K}^+$  sale. Los flujos iónicos son causa de la despolarización de la membrana postsináptica, pasando el potencial de membrana de  $-75$  mV a  $0$  mV. Si la membrana postsináptica no recupera su potencial de membrana no podría transmitir el siguiente impulso presináptico. La acetilcolinesterasa, situada en la membrana postsináptica, tiene el importante papel de hidrolizar la acetilcolina intersináptica, dando acetato y colina, que no interaccionan con la proteína receptora, lo que permite a la membrana postsináptica repolarizarse. Todos los inhibidores de la acetilcolinesterasa son venenos violentos porque bloquean la transmisión del impulso nervioso, provocando una despolarización prolongada de la membrana postsináptica. Entre ellos, cabría mencionar los "gases de los nervios", que podrían utilizarse con fines militares.

La acetilcolinesterasa es una enzima cuyo sustrato preferente es acetilcolina. Hidroliza mucho más lentamente los demás ésteres de colina, por ejemplo, la butirilcolina, pero frente a la acetilcolina es tremendamente rápida: hidroliza 25.000 moléculas de acetilcolina por segundo. Esta alta velocidad permite que la membrana postsináptica pueda transmitir hasta 1.000 impulsos por segundo.

La acetilcolinesterasa se encuentra en la sustancia gris del sistema nervioso, en los ganglios colinérgicos, en las placas neuromotoras colinérgicas y en los eritrocitos. Su función en los glóbulos rojos es totalmente desconocida.

Además de acetilcolinesterasa en los glóbulos rojos, la sangre humana contiene, en el suero, una segunda colinesterasa: la pseudocolinesterasa (acetilcolina-acilhidrolasa, E. C. 3.1.1.8). La pseudocolinesterasa es una enzima que tiene preferencia por los ésteres de la colina con los ácidos alifáticos de más de dos carbonos. Así, hidroliza mucho más rápidamente la butirilcolina que la acetilcolina. La especificidad de sustrato de la pseudocolinesterasa es muy amplia, hidrolizando los ésteres de la colina con los ácidos acético, propiónico, butírico y otros; benzoilcolina; suc-

cinildicolina; tioésteres de colina y otros ésteres que no tienen colina como el  $\alpha$ -naftilacetato y el salicilacetato. Se ignora cuál es su sustrato fisiológico.

La distinción entre las dos colinesterasas se logra claramente utilizando acetil- $\beta$ -metilcolina como sustrato: la acetilcolinesterasa cataliza la hidrólisis del isómero D de esta sustancia pero no la del L; la pseudocolinesterasa no cataliza la hidrólisis de ninguno de los dos isómeros.

## DISTRIBUCION EN EL ORGANISMO

La pseudocolinesterasa plasmática es sintetizada en el hígado (Hammer y La Du, 1968). La enzima puede detectarse tanto en los lóbulos como en el citoplasma de las células hepáticas (Gürther et al, 1963). La enzima también se encuentra en otros órganos y tejidos: materia blanca del sistema nervioso central, páncreas, corazón y mucosa intestinal.

Su concentración en el suero de los individuos normales, como revelan los estudios inmunológicos, es de unos 0,9 mg/ml, lo que constituye alrededor del 0,01% de las proteínas plasmáticas totales (Surgenor y Ellis, 1954).

Aparece en el suero como una  $\alpha$ -2-globulina de elevado peso molecular. A partir del suero ha sido posible purificarla, obteniéndose un material que exhibe 10.000 veces más actividad que un volumen equivalente de suero (Haupt et al, 1966).

Su catabolismo no ha sido estudiado en detalle. Su vida media es alrededor de 10 días, como demuestran los experimentos de regeneración de la actividad enzimática tras inhibición por compuestos órgano-fosforados, como el DFP, (Neitlich, 1966), y de desaparición de la actividad enzimática tras la transfusión de plasma normal a un individuo carente de actividad pseudocolinesterásica (Jenkins et al, 1967).

## PAPEL FISIOLÓGICO

Hasta el momento no ha sido posible asignar a la pseudocolinesterasa ningún papel fisiológico concreto. Puesto que hidroliza acetilcolina podría pensarse que colabora con la acetilcolinesterasa en el metabolismo de este importante neurotransmisor. Sin embargo, la mayoría de las observaciones revelan que la hidrólisis de la acetilcolina "in vivo" es realizada únicamente por la acetilcolinesterasa.

Puesto que hidroliza la butirilcolina y la propionilcolina mucho más rápidamente que la acetilcolina, se ha sugerido que la butirilcolina sería

su sustrato fisiológico. La acetilcolinesterasa es prácticamente ineficaz frente a los dos primeros ésteres. La butirilcolina se sintetiza en el hígado y tiene una acción nicotínica perjudicial (Clitherow et al, 1963). La función de la pseudocolinesterasa sería impedir la acumulación de butirilcolina en el hígado, hidrolizando en ese órgano dicha sustancia rápidamente.

También se ha sugerido que el papel de la pseudocolinesterasa sería regular los niveles de colina libre en el plasma (Funel y Oliver, 1965).

Sin embargo, la pseudocolinesterasa no debe cumplir ninguna función indispensable o, alternativamente, su función debe poder ser llevada a cabo también por otras enzimas, puesto que algunos individuos, si bien poco frecuentes, carecen totalmente de actividad pseudocolinesterásica y se hallan perfectamente sanos, no mostrando síntoma alguno de enfermedad.

El que la anenzimia no sea normalmente perjudicial al organismo no quiere decir que no lo sea en alguna circunstancia excepcional. Dado que la pseudocolinesterasa tiene una amplia especificidad de sustrato, se ha sugerido que su función sería desintoxicar al organismo de posibles análogos de acetilcolina de origen ambiental. Estos análogos podrían, de no ser inactivados por la pseudocolinesterasa, interferir con la transmisión adecuada de los impulsos nerviosos. En tal caso, la anenzimia sólo sería perjudicial en presencia de tales análogos.

Existen algunas pruebas experimentales de que la pseudocolinesterasa podría realmente cumplir una función de desintoxicación. Por un lado, se han detectado en gasterópodos algunos ésteres de colina no hidrolizables por la acetilcolinesterasa pero sí por la pseudocolinesterasa. Se podrían mencionar la imidazolacrililcolina de *Murex trunculus* y la dimetilacrililcolina de *Thais floridana*. No se tiene noticia, sin embargo, de ningún caso de intoxicación por ésteres de colina provocada por ingestión de animales o plantas. Por otro lado, se sabe que el catabolismo de algunos ésteres de colina, como la benzoilcolina, inyectados por vía intravenosa, se halla controlado por la pseudocolinesterasa. Se conoce ya una sustancia derivada de la colina cuya presencia en la sangre de los individuos carentes de actividad pseudocolinesterásica provoca grandes daños al organismo y, en ocasiones, incluso la muerte. Dicha sustancia es el suxametonio (Fig. 2). La hipersensibilidad del suxametonio es la primera situación en la que ha podido ser demostrada una función fisiológica clara e importante para la pseudocolinesterasa.

## HIPERSENSIBILIDAD AL SUXAMETONIO

El suxametonio, también llamado Anectina y Scolina, en términos químicos, puede ser visto como dos moléculas de acetilcolina unidas por sus grupos de acetato; es decir, se trata de la succinildicolina.

El suxametonio es hidrolizado muy lentamente por la acetilcolinesterasa. Como otros malos sustratos, el suxametonio inhibe a la acetilcolinesterasa, puesto que se une a su centro activo y lo bloquea debido a la lentitud de la reacción de hidrólisis. Además, precisamente por no ser hidrolizado con rapidez, las moléculas de suxametonio que alcancen la placa motora de los músculos esqueléticos permanecerán allí suficiente tiempo para unirse a la proteína receptora de la acetilcolina y despolarizar prolongadamente la membrana postsináptica, causando relajación muscular. Se trata de un mecanismo de acción distinto del curare. El principio activo del curare, la *d*-tubocurarina, inhibe la despolarización de la placa terminal, compitiendo con la acetilcolina por la proteína receptora.

Estas propiedades farmacológicas han sido aprovechadas en la práctica clínica. El suxametonio se emplea como relajante muscular, como anestésico general y, en ocasiones, ha sido empleado en el tratamiento del tétanos (Evans et al, 1952; Bourne et al, 1952).

La relajación afecta también a los músculos respiratorios y, en consecuencia, el suxametonio produce apnea. La dosis terapéutica se halla calculada de modo que la apnea sólo dure unos minutos. Suelen inyectarse entre 30 y 100 mg de suxametonio. En los individuos normales la mayor parte de esta dosis es rápidamente inactivada por hidrólisis por la pseudocolinesterasa a través del intermediario relativamente inactivo succinilmonocolina. La placa motora sólo se ve expuesta a las pocas moléculas de suxametonio que escapan a la inactivación y la apnea resultante sólo dura unos tres minutos. En algunos raros individuos, la apnea subsiguiente a la dosis normal de suxametonio dura entre dos y tres horas, muriendo el paciente si no recibe el tratamiento adecuado.

En algo más de la mitad de los casos, exactamente en un 53% de ellos, la prolongada parálisis muscular causante de la apnea se debe a alteraciones en la pseudocolinesterasa. En estos pacientes, el suxametonio es hidrolizado muy lentamente o no es hidrolizado en absoluto a su paso por la sangre y, en consecuencia, la placa neuromuscular se ve expuesta a concentraciones anormalmente altas de suxametonio, lo que origina una despolarización postsináptica prolongada. Estos pacientes pueden ser tratados mediante transfusiones de plasma normal (Goedde et al, 1968). Se ignora totalmente la causa de la hipersensibilidad al suxametonio de los

individuos que tienen normal la pseudocolinesterasa (Lehmann y Liddell, 1965; Kalow, 1965; Thompson y Wittaker, 1966). Convendría no olvidar que las pruebas de actividad colinesterásica no se realizan directamente con suxametonio sino con otros sustratos, generalmente benzoilcolina. Cabría, por tanto, la posibilidad de que estos pacientes, en los que la pseudocolinesterasa es aparentemente normal, tengan una molécula que hidrolice defectuosamente al suxametonio pero normalmente a otros sustratos. Otra posibilidad sería que la pseudocolinesterasa de estos pacientes se hallase inhibida por otras drogas en el momento de la administración del suxametonio.

¿Cuál es la causa precisa de la hipersensibilidad al suxametonio en los pacientes de pseudocolinesterasa anormal? La hipótesis más sencilla sería la de suponer que esos individuos carecen de actividad pseudocolinesterásica o la tienen muy reducida. Efectivamente, la actividad pseudocolinesterásica de los individuos hipersensibles suele ser menor que la media de la población. No obstante, no son raros los individuos hipersensibles que tienen actividades pseudocolinesterásicas iguales o superiores a la media de la población. El problema, por tanto, no puede ser zanjado postulando una reducción cuantitativa de la actividad pseudocolinesterásica frente a los sustratos habituales en los individuos hipersensibles (Kalow y Davies 1958).

La medida de la actividad pseudocolinesterásica de un suero no es un buen método de predecir la sensibilidad al suxametonio del individuo porque, como antes señalábamos, la actividad pseudocolinesterásica no se calcula directamente con suxametonio sino, normalmente, con acetilcolina o benzoilcolina.

## MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PSEUDOCOLINESTERASICA

Los métodos de medida de la actividad pseudocolinesterásica pueden clasificarse en gasométricos y espectrofotométricos. En el método gasométrico de Ammon (1933) y Callaway (1951) se mide el  $\text{CO}_2$  liberado de un tampón bicarbonato por el ácido acético proveniente de la hidrólisis de la acetilcolina. Se define como unidad de actividad enzimática la necesaria para librar 1 ul de  $\text{CO}_2$  en un minuto a  $37^\circ\text{C}$ . El rango normal de actividades va de 60 a 120 unidades por mililitro de suero. En el método espectrofotométrico de Kalow y Lindsay (1955), se mide el descenso de densidad óptica a 240 nm que acompaña a la hidrólisis de la benzoilcolina. Recientemente, se han introducido métodos espectrofotométricos basados en el descenso de la densidad óptica producido por la hidrólisis de tio-

ésteres (Ellman et al, 1961; Das y Liddell, 1970) de colina, método aún más sensible que el de la benzoilcolina.

En cualquier caso, los métodos citados no permiten, por sí solos, predecir la sensibilidad al suxametonio. Para ello es preciso caracterizar cualitativamente la pseudocolinesterasa del individuo. En efecto, estudiando la afinidad por diversos sustratos e inhibidores de sueros de individuos normales e hipersensibles a suxametonio, se ha demostrado que los individuos hipersensibles difieren de los normales por la clase de enzima que sintetizan.

### VARIANTES HEREDABLES DE LA PSEUDOCOLINESTERASA

Los trabajos iniciales (Forbat et al, 1953) tendentes a comprobar si las diferencias entre individuos normales e hipersensibles son hereditarias chocaron con la dificultad del empleo, como parámetro a investigar, de la actividad pseudocolinesterásica en suero, cuyos inconvenientes acabamos de explicar. No obstante, ya en estos trabajos pioneros pudo comprobarse que la incidencia de la hipersensibilidad al suxametonio y de la habitual, aunque no obligada, reducción de actividad pseudocolinesterásica acompañante es más frecuente en familiares de individuos afectados que en la población normal (Lehmann y Ryan, 1956). Incluso se llegó a elaborar un modelo de herencia de la reducción de actividad: se suponía que se debía a un alelo autosómico codominante con el normal.

La cuestión quedó definitivamente aclarada a partir de las investigaciones del equipo de Kalow (Kalow y Davies, 1958), quienes investigaron las propiedades cualitativas de las enzimas presentes en los sueros de los individuos hipersensibles. Estos y otros estudios (Davies et al, 1960) han permitido concluir que existen variantes heredables de pseudocolinesterasa.

Las clases de pseudocolinesterasa que un individuo sintetiza dependen de su genotipo en dos genes,  $E_1$  y  $E_2$ , ambos polimórficos. Se conocen sólo dos alelos del gen  $E_2$ , llamados respectivamente  $E_2^+$  y  $E_2^-$ . Se conocen más de cuatro alelos del gen  $E_1$ , siendo los alelos llamados  $E_1^U$  (usual),  $E_1^A$  (atípico),  $E_1^F$  (resistente a fluoruro) y  $E_1^S$  (silencioso) los más frecuentes.

### LA ENZIMA NORMAL

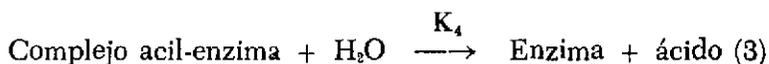
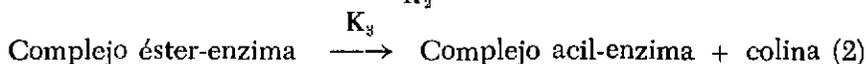
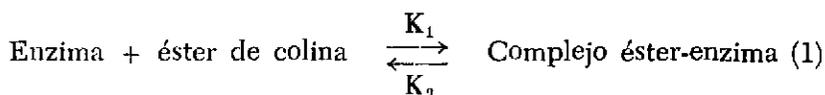
La mayoría de los individuos de todas las poblaciones estudiadas son dobles homocigotos  $E_1^U E_1^U E_2^- E_2^-$ . En consecuencia, conviene considerar a éstos como los individuos normales.

Los individuos normales sólo sintetizan una clase de pseudocolinesterasa, llamada enzima usual. Se trata de una  $\alpha$ -globulina que contiene varios restos de ácido siálico; es, por tanto, una glicoproteína. La adición de neuraminidasa al suero provoca la liberación de los restos de ácido siálico con lo que la movilidad electroforética de la pseudocolinesterasa así tratada disminuye, aunque su actividad enzimática permanece inalterada (Svensmark, 1961).

La pseudocolinesterasa no contiene ningún grupo prostético ni átomos metálicos. No es sensible a agentes quelantes y su hidrólisis por enzimas proteolíticas conduce a la formación de péptidos exclusivamente. El hecho de que carezca de grupo prostético dificulta notablemente el estudio de su centro activo y de su mecanismo de reacción.

La enzima purificada tiene una zona amplia de pH óptimo, siendo el valor central de la zona óptima 6. Su coeficiente térmico para la hidrólisis de acetilcolina es 1,5. Se activa con  $Mg^{++}$ , aunque no lo contiene.

La cinética de la hidrólisis por la pseudocolinesterasa de diferentes sustratos ha sido estudiada en detalle. Esta enzima no presenta el fenómeno de inhibición por exceso de sustrato que caracteriza a la acetilcolinesterasa. Así mismo, la pseudocolinesterasa no sigue la sencilla cinética de Michaelis-Menten, sino una más complicada en la que intervendrían al menos tres reacciones consecutivas:



La característica más notable de esta cinética es la formación de un complejo acil-enzima. Este mecanismo de reacción permite hacer algunas predicciones experimentalmente contrastables. Por ejemplo, permite predecir que en presencia de algunos ácidos la pseudocolinesterasa debería formar complejos acil-enzima. También permite predecir que la pseudocolinesterasa, en presencia de acetilcolina, debería promover el intercambio de algunos átomos de oxígeno entre el ácido y el agua.

Aunque el agua es el aceptor más corriente del ácido del complejo acil-enzima también otras sustancias pueden actuar como aceptores, por ejemplo la hidroxilamina.

Si un éster puede formar complejo acil-enzima con la pseudocolines-

terasa pero dicho complejo no es hidrolizado, el éster inicial se comportaría como un inhibidor de la pseudocolinesterasa, puesto que bloquearía su centro activo. En ocasiones, la hidroxilamina puede servir de aceptor del ácido proveniente del complejo acil-enzima formado a partir del éster inhibidor. En tales casos, la hidroxilamina se comporta como un antídoto contra la inhibición de la pseudocolinesterasa por el éster. Todas estas predicciones han sido verificadas con acetilcolinesterasa, aunque no con pseudocolinesterasa. No obstante, se ha comprobado que la pseudocolinesterasa se inhibe en presencia de carbamil-ésteres, y se piensa que la inhibición se produce según el mecanismo propuesto, es decir, formación de un complejo acil-enzima no hidrolizable.

La cinética de la reacción global catalizada por la pseudocolinesterasa dependería fundamentalmente de dos factores: la afinidad de la enzima por el sustrato (reacción 1) y la facilidad de hidrólisis del complejo acil-enzima (reacción 3). Este último paso sería el paso limitante del proceso global.

La pseudocolinesterasa, al igual que la acetilcolinesterasa, tendría dos centros activos (Wilson, 1954) uno esteárico y otro aniónico, cada uno de los cuales reaccionaría con una parte diferente del sustrato (fig. 3).

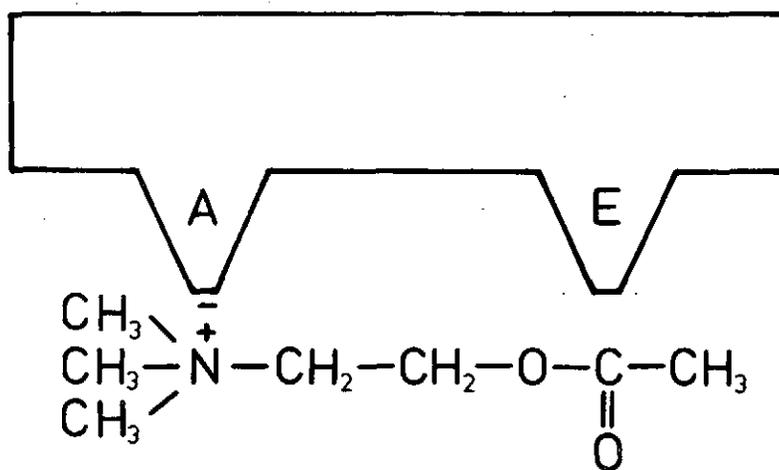


Figura 3.—Centros aniónico (A) y esteárico (E) de la pseudocolinesterasa.

El centro esteárico formaría un enlace covalente débil con el grupo carbonilo del enlace éster del sustrato (Fig. 3). Sería este centro, por tanto, el responsable de la formación del complejo acil-enzima y de la catálisis de la hidrólisis del sustrato. Muchos compuestos organo-fosforados, como el DFP o diisopropilfluorofosfato y el TEPP o tetraetilpirofosfato, son in-



Tras la adición a la pseudocolinesterasa de DFP<sup>32</sup>, es decir, marcado radiactivamente, es posible hidrolizar la proteína y, por cromatografía, aislar el péptido portador del fosfato radiactivo proveniente del inhibidor. Dicho grupo fosfato siempre aparece fosforilando el hidroxilo de una serina. Esto indicaría que el centro activo contiene una serina.

La secuencia del péptido correspondiente al sitio esteárico ha podido ser reconstruida marcando la enzima con DFP<sup>32</sup>, hidrolizando la enzima, cromatografiando los péptidos, aislando los portadores de radiactividad y someténdolos al método Edman de análisis de secuencias de aminoácidos. La secuencia del centro esteárico de la enzima de caballo es la siguiente: Phe-Gly-Glu-Ser-Ala-Gly. La Pseudocolinesterasa normal humana tiene una secuencia muy parecida a la del centro activo de otras enzimas hidrolíticas: serina con glutámico o aspártico a un lado y glicocola o alanina al otro (Cohen et al, 1959). Como se ve en ambos casos aparece la serina predicha.

No obstante, existen numerosos indicios de que el grupo hidroxilo de la serina no es el grupo activo en la catálisis. Por ejemplo, el modo como depende la cinética de la hidrólisis del pH no apoya la idea de que el grupo activo es el hidroxilo de la serina. Estudios detallados de dicha dependencia indican que el centro esteárico contiene un grupo básico nucleofílico de  $pK_a$  comprendido entre 5,8 y 7, y un grupo ácido electrofílico, de  $pK_a$  comprendido entre 8,9 y 9,5. Entre los aminoácidos el único grupo compatible con el  $pK_a$  del grupo nucleofílico del centro esteárico es el anillo imidazólico de la histidina, cuyo  $pK_a$  se halla comprendido entre 5,6 y 7,1. Además, el calor de ionización de la pseudocolinesterasa, que ha sido evaluado en 6,5 Kcal/mol, es compatible con la ionización del grupo imidazol de la histidina. Como, por otra parte, la radiactividad introducida bajo forma de DFP<sup>32</sup> nunca ha sido recuperada en una histidina, ni se ha detectado tal aminoácido entre los del péptido radiactivo y se hace difícil pensar que la radiactividad aparece en la serina por transfosforilación secuencial durante el aislamiento del péptido radiactivo, la hipótesis más verosímil sería admitir que el centro esteárico contiene un residuo de serina y que dicho aminoácido se halla, debido a la estructura terciaria de la proteína, cerca de un residuo de histidina, colaborando ambos aminoácidos en la catálisis. Dicha histidina no caería cerca de la serina una vez desnaturalizada la proteína, porque ambos aminoácidos, serina e histidina, se hallarían separados por otros muchos en cuanto a estructura primaria de la pseudocolinesterasa se refiere. Conviene no olvidar, en todo caso, que las pruebas a favor de la intervención del aminoácido histidina en el centro esteárico son todas indirectas.

El grupo electrofílico del centro estéarico permanece todavía sin poder ser explicado. Estudios con ésteres tiólicos de colina sugieren que el grupo ácido forma un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del éster pero no con el de azufre de los ésteres tiólicos. El grupo ácido no tendría mucha importancia desde el punto de vista catalítico, pero estas conclusiones son sólo provisionales.

El centro aniónico, cargado negativamente, se uniría por atracción electrostática con los radicales cargados positivamente de la molécula de sustrato, como el  $N^+$  cuaternario de la colina. Además, interaccionaría mediante fuerzas de Van der Waals con los grupos metilo unidos a dicho  $N^+$  cuaternario.

La función del centro aniónico sería orientar adecuadamente en el espacio la molécula de sustrato, facilitando así la actuación del centro estéarico.

La existencia de un centro aniónico se ha demostrado claramente en el caso de la acetilcolinesterasa, pero aún no se ha demostrado inequívocamente en el caso de la pseudocolinesterasa.

La acetilcolinesterasa muestra una cinética de reacción en función de la concentración de sustrato muy peculiar: la enzima es inhibida por un exceso de sustrato. Esta inhibición podría deberse a la formación de un complejo entre cada dos moléculas de sustrato y cada molécula de enzima y el centro aniónico se hallaría implicado en el proceso de formación del complejo. La pseudocolinesterasa no muestra inhibición por exceso de sustrato, lo que se ha interpretado como una prueba a favor de que carece de centro aniónico. También sería posible que la acetilcolinesterasa tuviera dos centros aniónicos y la pseudocolinesterasa sólo uno. A favor de esta idea está el que la inhibición de la acetilcolinesterasa por compuestos que tienen dos átomos de  $N^+$  cuaternario sea mayor que la correspondiente inhibición producida por compuestos similares pero monocuaternarios y, en cambio, la pseudocolinesterasa sea igualmente inhibida por compuestos bicuaternarios que por los monocuaternarios. En contraste con la acetilcolinesterasa, que hidroliza mucho más rápidamente la acetilcolina que su análogo carbonado neutro dimetilbutirilacetato, la afinidad de la pseudocolinesterasa por ambos sustratos es muy similar, lo que también habla en contra de la existencia de un centro aniónico en la pseudocolinesterasa. Asimismo, observaciones realizadas con fosforilcolina sugieren que el centro aniónico, si existe, no juega un papel tan importante en la pseudocolinesterasa como en la acetilcolinesterasa.

A pesar de todo, el problema no se puede considerar resuelto. También hay pruebas a favor de la existencia de un centro aniónico. Así, los com-

puestos iónicos de amonio cuaternario inhiben a la pseudocolinesterasa más que los correspondientes compuestos neutros. Además, la colina reactiva a la acetilcolinesterasa inhibida por DFP, posiblemente facilitando la hidrólisis del éster fosfórico del centro esteárico, al unirse al centro aniónico. Pues bien, la colina también reactiva, si bien a mayores concentraciones, a la pseudocolinesterasa inhibida por DFP.

Finalmente conviene señalar que la pseudocolinesterasa es inhibida por los compuestos de nitrógeno cuaternario, como la dibucaina, neostigmina, RO<sub>2</sub>-0683 etc., (fig. 1), presumiblemente porque esos compuestos se unen reversiblemente al centro aniónico por interacción electrostática.

Resumiendo lo dicho hasta ahora: la pseudocolinesterasa es una enzima que hidroliza ésteres de colina a través de un complejo acil-enzima. En la hidrólisis interviene un centro esteárico y presumiblemente otro aniónico. Existen inhibidores de la pseudocolinesterasa que se unen irreversiblemente al centro esteárico y otros que se unen reversiblemente al centro aniónico: son, respectivamente, los compuestos organofosforados y los que contienen átomos de nitrógeno positivamente cargados.

### MULTIPLICIDAD DE FORMAS MOLECULARES DE LA ENZIMA NORMAL

Tras la electroforesis del suero de los individuos de genotipo  $E_1^U E_1^U E_2^- E_3^-$  en gel de almidón a  $PH=5$  se detecta una única banda de actividad pseudocolinesterásica (Fig. 5), es decir, una banda tingible por el sistema  $\alpha$ -naftilacetato-5-cloro-O-toluidina (Fast Red TR salt) e inhibible por eserina. Cuando la electroforesis se realiza a  $pH=8,7$ , se detectan cuatro bandas de actividad pseudocolinesterásica (Harris et al, 1962). Estas bandas se denominan por orden de movilidad decreciente hacia el ánodo  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  y  $C_4$  (fig. 6). El componente  $C_4$  contiene más del 90% de la actividad colinesterásica total del suero. Si se realiza una electroforesis en dos dimensiones, primero en papel de filtro y después en gel de almidón, el orden es el representado en la figura 7.

Nuestros propios trabajos con gel poliácridamida confirman la presencia de cuatro isoenzimas de la pseudocolinesterasa en el suero de los individuos normales (Fig. 8). (Tortolero y Medina, 1976).

Las diferencias de movilidad entre las cuatro isoenzimas no se deben a diferencias en el contenido de ácido siálico: la adición de neuraminidasa al suero, al liberar los restos de ácido siálico, causa una reducción de la movilidad de las cuatro isoenzimas pero las diferencias de movilidad entre ellas se mantienen (Harris et al, 1962).

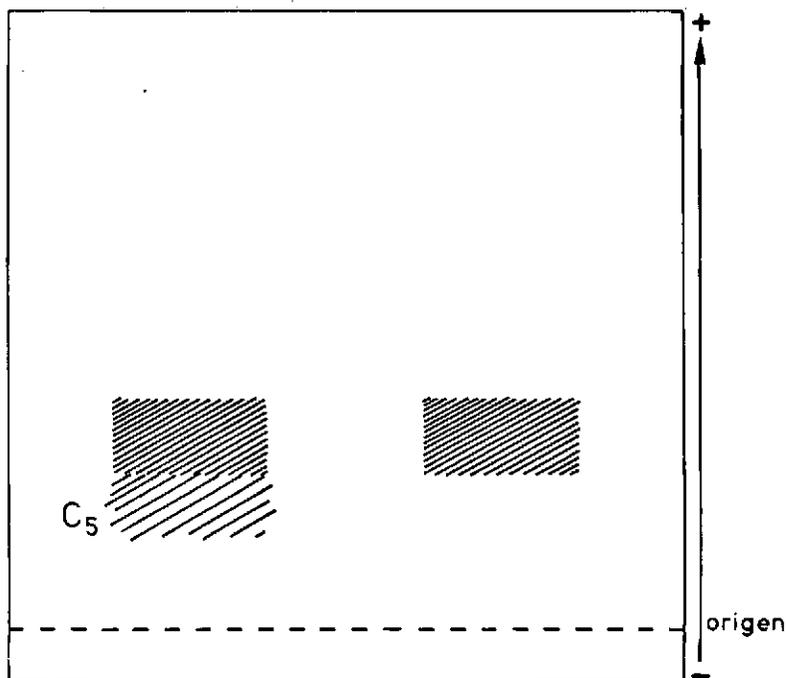


Figura 5.—Electroforesis en gel de almidón a pH=5 de un suero normal y uno  $C_6+$ .

La diferencia de movilidad de los isoenzimas no se reduce a diferencias en su carga eléctrica a pH=8,7. En la velocidad de emigración de las moléculas de proteína hacia el ánodo influyen, además, otras características como la forma de la molécula o el peso molecular. En nuestro caso, los datos electroforéticos podrían hacer pensar que el componente  $C_4$  es el más pesado y el  $C_1$  el más ligero.

Efectivamente, las isoenzimas pueden ser separadas fraccionando el suero en columna de Sephadex G-200, que separa las proteínas según su tamaño, eluyendo antes las de mayor tamaño. El orden de elución de las isoenzimas de la pseudocolinesterasa en columnas de Sephadex G-200 (Harris y Robson, 1963) es: primero el componente  $C_4$ , luego los componentes  $C_3$  y  $C_2$  mezclados y finalmente el  $C_1$  (La Du y Dewald, 1971) (fig. 9).

Los estudios de centrifugación en gradiente de sacarosa confirman que las cuatro isoenzimas se diferencian por su tamaño (La Motta et al, 1970). El peso de la isoenzima  $C_4$  estaría, según estos y otros experimentos, entre 300.000 y 340.000 daltons (Dewald y La Du, 1970); el peso de las isoenzi-

mas  $C_3$  y  $C_2$  se hallaría entre 150.000 y 250.000 daltons y el componente  $C_1$  pesaría alrededor de 80.000 daltons (Das y Liddell, 1970).

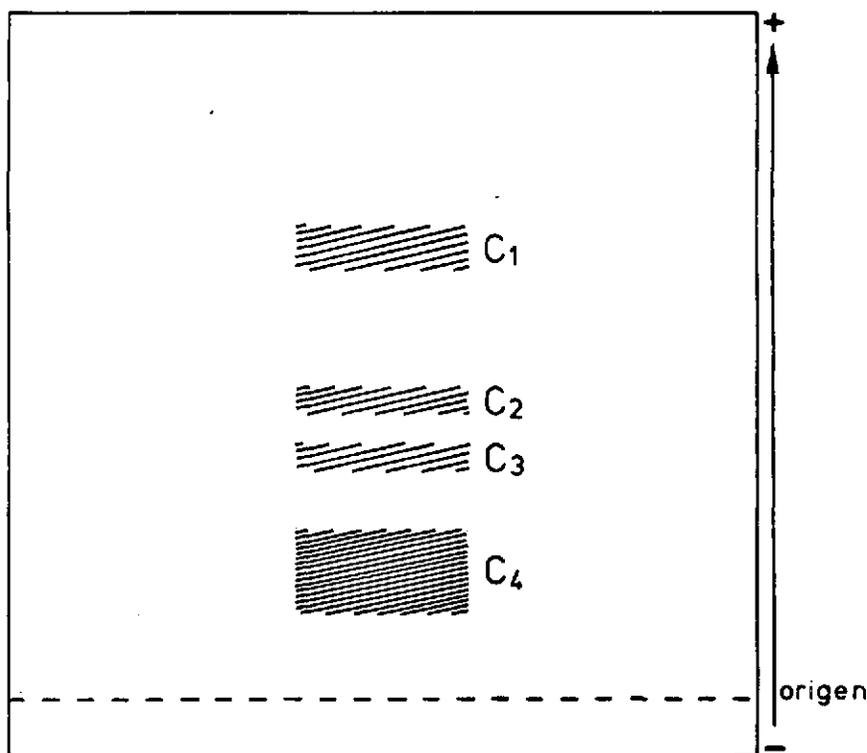


Figura 6.—Electroforesis unidimensional en gel de almidón a  $\text{pH}=8,7$  de un suero normal.

El estudio de las isoenzimas aisladas ha permitido llegar a una conclusión muy interesante: la afinidad de cada una de las isoenzimas por los diferentes sustratos e inhibidores es igual que la de las otras y muy parecida a la del suero en su conjunto (tabla I). El cinética de reacción tampoco varía de una isoenzima a otra. Estos datos sugieren la idea de que, en todas ellas, el polipéptido activo es el mismo.

Si así fuera, las cuatro isoenzimas serían distintos estados de agregación de un único polipéptido activo, el codificado por el alelo  $E_1^U$  y, en tal caso, deberían ser interconvertibles por agentes como la urea y/o los reactivos de sulfhidrilo.

Tras la electroforesis del suero se pueden aislar las zonas del gel que contengan cada una de las cuatro isoenzimas. Estos trozos de gel pueden

ser tratados con los citados agentes y vueltos a someter a electroforesis. En esta clase de estudios se demostró que la isoenzima  $C_4$  puede convertirse, al menos parcialmente, en  $C_3$  mediante el tratamiento con urea, que, como se sabe, separa las subunidades protéicas no unidas por enlaces covalentes. Las isoenzimas  $C_3$  y  $C_2$  pueden ser convertidas en  $C_1$  por tratamiento con reactivos de los grupos sulfhidrido, que sirven para romper posibles enlaces disulfuro (Lehman et al, 1961). Las isoenzimas nuevas obtenidas de ese modo tienen la movilidad electroforética y las propiedades de afinidad por sustratos e inhibidores características de las correspondientes isoenzimas de sueros sin tratar (Dewald y La Du, 1970).

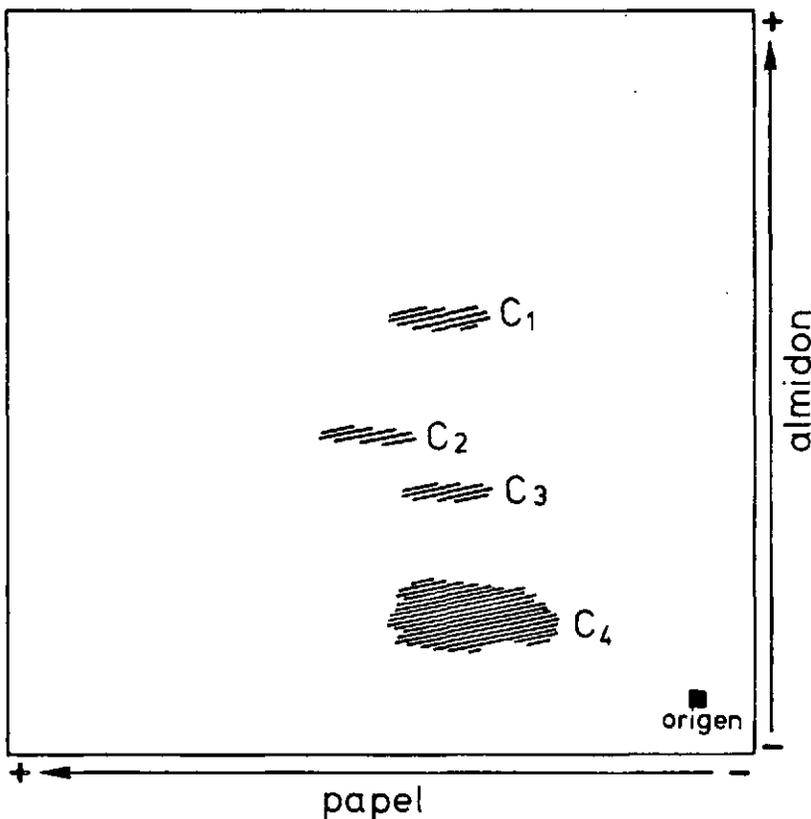


Figura 7.—Electroforesis bidimensional de un suero normal.

Los estudios de interconversión de unas isoenzimas en otras confirman la hipótesis de que las cuatro isoenzimas son diferentes estados de agregación de un único polipéptido activo (Dewald y La Du, 1970), aunque no de-

muestran que algunas o todas ellas tengan otros polipéptidos, enzimáticamente inactivos.

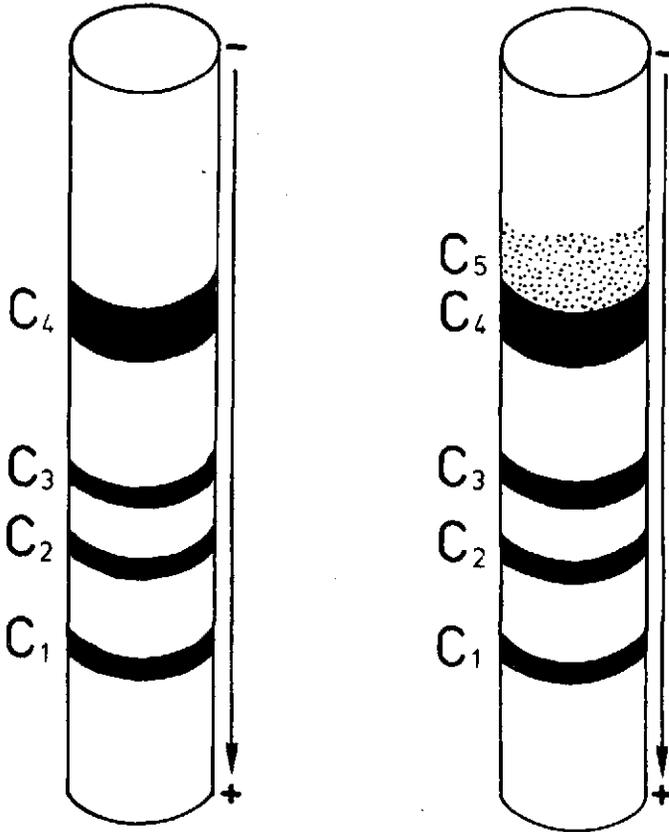


Figura 8.—Electroforesis unidimensional vertical en gel de poliacrilamida a pH=8,7 de un suero normal y uno  $C_5+$ .

Nuestros propios trabajos (Tortolero y Medina, 1976) con enzima purificada apoyan fuertemente la idea de que las cuatro isoenzimas son diferentes estados de agregación de una única subunidad protéica. La enzima purificada se detecta tanto con reactivos de la actividad pseudocalinesterásica como con reactivos de proteínas. La enzima purificada, disuelta en tampón, origina en gel de poliacrilamida cuatro bandas de actividad enzimática y otras tantas de proteína (fig. 11). No aparecen bandas protéicas carentes de actividad enzimática. Más demostrativo es aún el tratamiento con urea y cisteína simultáneamente. Si, tras este tratamiento,

la electroforesis se lleva a cabo en gel de poliacrilamida carente de urea no se detecta ninguna diferencia con la enzima sin tratar posiblemente porque, si ha ocurrido disociación, las distintas subunidades se reconstruyen durante la electroforesis. En cambio, si llevamos a cabo la electroforesis en gel de poliacrilamida que contiene urea, ninguna banda de actividad enzimática aparece y tan sólo una banda de proteína es detectable (fig. 10). En presencia de urea no se detecta ninguna banda de actividad enzimática porque la urea inhibe a la pseudocolinesterasa. La banda proteica visible tras el tratamiento y electroforesis en presencia de urea indica que muy posiblemente la pseudocolinesterasa es un homopolímero.

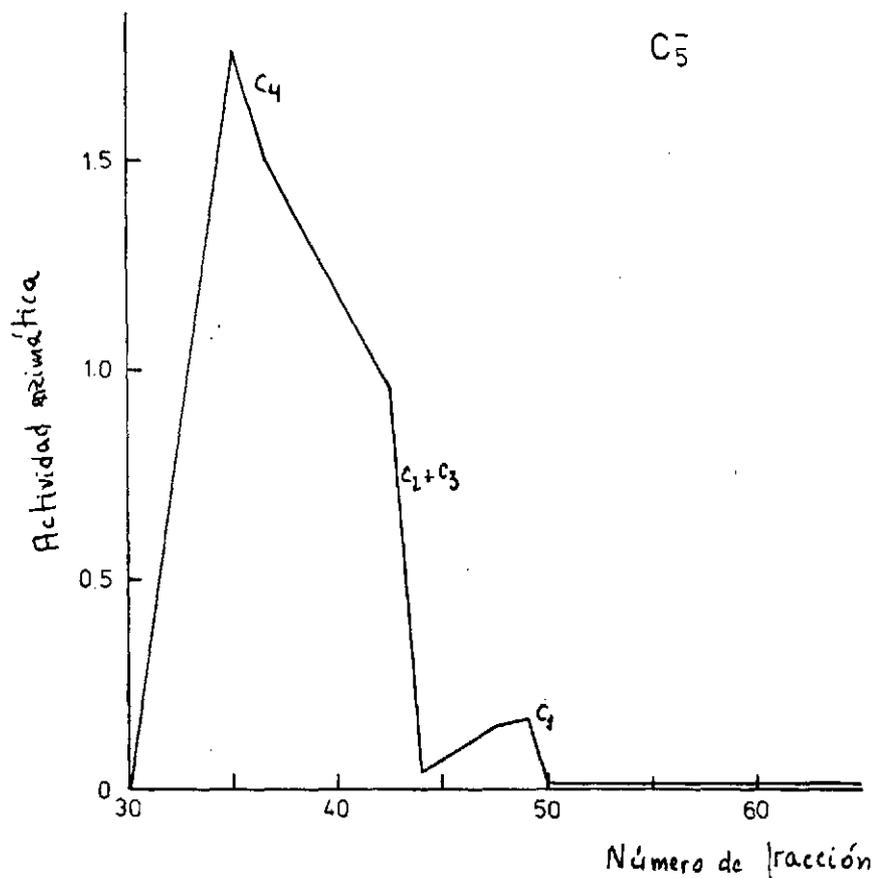


Figura 9.—Perfil de la elución en una columna de Sephadex G-200 de las isoenzimas de la pseudocolinesterasa de un individuo  $C_5^-$ .

TABLA I

Afinidad de las distintas isoenzimas de la pseudocolinesterasa normal por benzoilcolina, dibucaína y FNa

Preparación enzimática	$K_M$ (umoles/litro) para benzoilcolina	Número de dibucaína	Número de fluoruro
Suero	4.5	81.7	58.1
$C_1$	4.1	81.7	58.7
$C_2 + C_3$	5.1	80.6	57.9
$C_1$ nativo	4.7	81,1	61.2
$C_1$ derivado de $C_4$	5.0	81.4	60.8

Comportamiento de las isoenzimas de la pseudocolinesterasa normal frente a un sustrato y dos inhibidores.

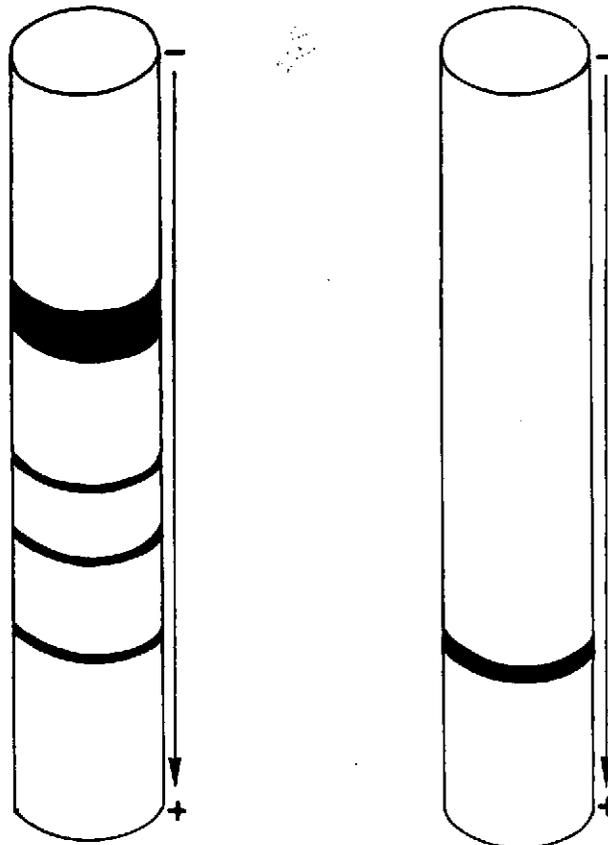


Figura 10.—Electroforesis en gel de poliacrilamida sin (izquierda) y con (derecha) urea de enzima purificada teñida con reactivos de proteínas.

Si la pseudocolinesterasa es un homopolímero, es decir, si las cuatro isoenzimas tienen el mismo polipéptido activo, la mayor actividad de la isoenzima  $C_4$  se debe deber a que hay un mayor número de moléculas  $C_4$  que de las otras isoenzimas, o lo que es lo mismo, que en las condiciones fisiológicas la reacción de polimerización está desplazada hacia la formación de polímeros. Esto estaría de acuerdo con el hecho de que las subunidades parecen agregarse espontáneamente para formar isoenzima  $C_4$ . Si esto fuera cierto, la isoenzima  $C_4$  sería un binito ejemplo de molécula cuya estructura cuaternaria viene determinada por las correspondientes estructuras terciarias de sus componentes. Sería muy interesante investigar si tras la desnaturalización por calor se reconstruyen espontáneamente o no las distintas isoenzimas de la pseudocolinesterasa.

La isoenzima  $C_2$  ocuparía, no obstante, un lugar especial en la serie polimérica (Atland y Goedde, 1970). Como hemos visto en los experimentos de electroforesis bidimensional, su carga es diferente a la del componente  $C_1$  y sin embargo no deben tener tamaños muy diferentes puesto que eluyen mezclados de la columna de Sephadex. Además, en algunos individuos poco frecuentes que casi carecen de actividad pseudocolinesterásica se encuentran trazas de la isoenzima  $C_2$  aunque no de las otras tres. El problema planteado por la isoenzima  $C_2$  está sin resolver. Igualmente, se desconoce el papel que juegan los ácidos siálicos en la molécula de la pseudocolinesterasa.

Los individuos normales no son sensibles habitualmente al suxametonio. Si lo son, la causa no reside en la pseudocolinesterasa, siendo, por el momento, desconocida.

## LA ENZIMA ATÍPICA

Los primeros estudios con individuos hipersensibles a suxametonio demostraron que la mayoría de ellos, aunque no todos, tienen actividades pseudocolinesterásicas inferiores a las de los individuos normales. (fig. 11). Dada la incidencia familiar de la reducción de actividad pseudocolinesterásica se postuló que la hipersensibilidad al suxametonio se debe a la presencia, en homocigosis, de un alelo atípico, el  $E_1^*$ , causante de la reducción de la actividad pseudocolinesterásica. No obstante, dada la amplia variabilidad que dicha actividad pseudocolinesterásica muestra en individuos genotípicamente idénticos, la comprobación de la hipótesis del alelo atípico no siempre era posible. Así, el análisis de 93 miembros de 26 familias, escogidas porque en cada una un miembro era sensible al suxametonio, demostró que todos los individuos por los que se había es-

cogido la familia tenían una actividad pseudocolinesterásica inferior a 36 unidades de Ammon, mientras que sus padres e hijos tenían actividades que oscilaban entre 26 y 90 unidades. Como el rango normal de actividades es de 60-125 unidades no fue posible identificar a los heterocigotos (Kaufman et al, 1960).

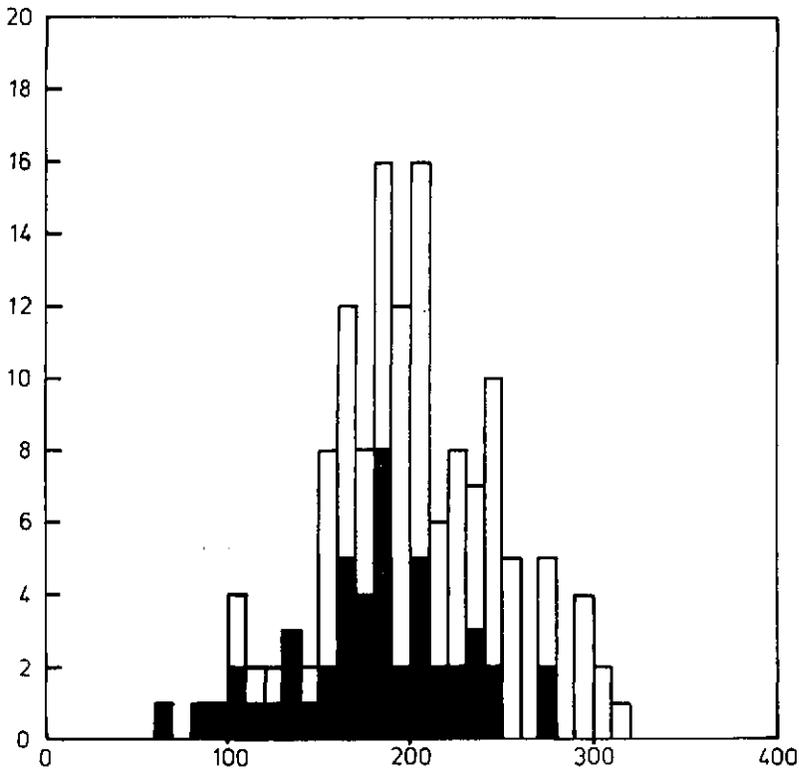


Figura 11.—Distribución de actividades pseudocolinesterásicas en individuos no sensibles (blanco) y sensibles (negro) a suxametonio. En abscisas el número de unidades de actividad pseudocolinesterásica en suero; en ordenadas el número de individuos con una actividad determinada.

La reducción media de actividad pseudocolinesterásica en sueros atípicos puede deberse "a priori" a dos causas que pueden actuar, por lo demás, conjuntamente. Una es la reducción del número de moléculas en el suero atípico respecto del normal. Otra es la presencia en el suero atípico de una enzima normal que desarrolle menos actividad que la normal.

Numerosos estudios e investigaciones han demostrado que la primera posibilidad no es cierta y la segunda sí lo es; es decir, que la reducción

de actividad en los sueros atípicos se debe a la presencia, en concentraciones normales, de una enzima normal.

Que los sueros con reducida actividad pseudocolinesterásica contienen una enzima anormal se demostró estudiando la cinética de hidrólisis por el suero atípico y el normal de diferentes sustratos y el comportamiento de ambos tipos de suero frente a diversos inhibidores (Davies et al, 1960).

El suero de los individuos hipersensibles a suxametonio, presuntamente de genotipo  $E_1^+ E_1^+ E_2^- E_2^-$ , muestra menos afinidad por todos los sustratos, salvo el  $\alpha$ -naftil-acetato, que el suero de los individuos normales (tabla II); es decir, posee una constante de Michaelis más alta para todos ellos. Esto quiere decir que la reacción 1 del proceso de hidrólisis catalizado por la pseudocolinesterasa se halla alterado en la enzima atípica. La reducción de actividad es más acentuada frente a unos sustratos que frente a otros. De hecho, frente al  $\alpha$ -naftil-acetato la  $K_m$  de la enzima atípica es menor que la de la enzima normal. (Bainford y Harris, 1964).

La reacción 1 no es la única para la que difieren la enzima atípica y la normal. También la velocidad de la reacción 3 se halla alterada, siendo menor frente a todos los sustratos en la enzima atípica que en la usual. Así, a pesar de la mayor afinidad de la enzima atípica por el  $\alpha$ -naftil-acetato la velocidad máxima de hidrólisis de ese sustrato es mayor si opera la enzima normal que si opera la enzima atípica; o sea que, las diferencias en la velocidad de la reacción 3, proceso limitante de la reacción global, compensan con creces la mayor afinidad de la enzima atípica hacia el  $\alpha$ -naftil-acetato.

TABLA II

Afinidad de las distintas isoenzimas de la pseudocolinesterasa atípica por benzoilcolina, dibucaína y FNa

Preparación enzimática	$K_m$ (umoles/litro) para benzoilcolina	Número de dibucaína	Número de fluoruro
Suero	21.1	22.7	22.2
C <sub>1</sub>	24.1	17.8	21.9
C <sub>2</sub> + C <sub>3</sub>	24.2	15.6	22.9
C <sub>1</sub> nativo	18.3	23.4	22.6

Comportamiento de las isoenzimas de un suero atípico frente a benzoilcolina y dos inhibidores.

Otra prueba de que también para la reacción 3 difieren ambas enzimas se obtuvo estudiando el comportamiento de la enzima usual y de la atípica frente a colina (Clark et al, 1968). En el caso de la enzima usual la colina es un inhibidor competitivo de la benzoilcolina, presumiblemente porque ambas sustancias compiten por el centro aniónico. Además, la colina es un activador no competitivo de la hidrólisis de la benzoilcolina por la enzima usual porque incrementa la velocidad de la reacción 3, facilitando la disociación del complejo acil-enzima. En cambio, frente a la enzima atípica la colina sólo se comporta como inhibidor competitivo de la hidrólisis de benzoilcolina y no muestra el efecto de activación no competitiva de la reacción 3, prueba clara de que ambas enzimas difieren para dicha reacción.

En resumen, el suero de los individuos atípicos contiene una enzima anormal que difiere de la normal por su afinidad y su velocidad de reacción 3 frente a distintos sustratos. Ambas diferencias, actuando conjuntamente, son causa de que la actividad pseudocolinesterásica del suero atípico frente a distintos sustratos difiera de la del suero normal, siendo, por lo general, menor que ésta. Ahora bien, como las diferencias en las reacciones 1 y 3 entre ambas enzimas tienen distinta magnitud según el sustrato de que se trate, no se pueden extrapolar las diferencias de actividad de un sustrato a cualquier otro.

En el caso del suxametonio las diferencias de actividad son tan marcadas que el suero atípico no hidroliza en absoluto dicha sustancia a las concentraciones terapéuticas (fig. 12), y de ahí la hipersensibilidad al suxametonio, aunque sí lo hace a concentraciones superiores (Kalow, 1960; Goedde et al, 1968). (fig. 12).

Que el suero de los individuos atípicos contiene una enzima anormal también puede ponerse de manifiesto mediante estudios con inhibidores (Kalow y Davies, 1958), los cuales dan además algunas pistas sobre las posibles alteraciones moleculares que sufre la enzima atípica y que son la base de las diferencias de actividad enzimática con la enzima usual.

Como sabemos, los compuestos organofosforados, del tipo del DFP, inhiben irreversiblemente a la enzima usual fosforilando irreversiblemente y en la misma medida, a la enzima atípica. Esto se ha interpretado como una prueba a favor de que la enzima atípica no tiene alterado su centro esteárico. Sin embargo, también se han obtenido algunas pruebas de que el centro esteárico de la enzima atípica no es normal (Clark et al, 1968). Por ejemplo, el paraoxon es un compuesto organofosforado (dietil-O-nitrofenilfosfato) que inhibe a la pseudocolinesterasa por el mecanismo descrito para este tipo de compuestos; el FNa reactiva a la enzima inhibida por el

paraoxón, facilitando la hidrólisis del complejo fosforil-enzima; pues bien, la cinética de reactividad por FNa de la enzima atípica inhibida por paraoxón es diferente de la correspondiente cinética de la enzima usual. La enzima atípica se reactiva rápidamente lo que indica que el enlace fosforil-enzima es más lábil, en presencia de FNa, en la enzima atípica que en la usual y, por tanto, que ambas enzimas difieren en sus centros esteéricos. No obstante, el centro esteérico de la enzima atípica es perfectamente funcional, puesto que, si bien a concentraciones superiores, hidroliza los mismos sustratos que la usual.

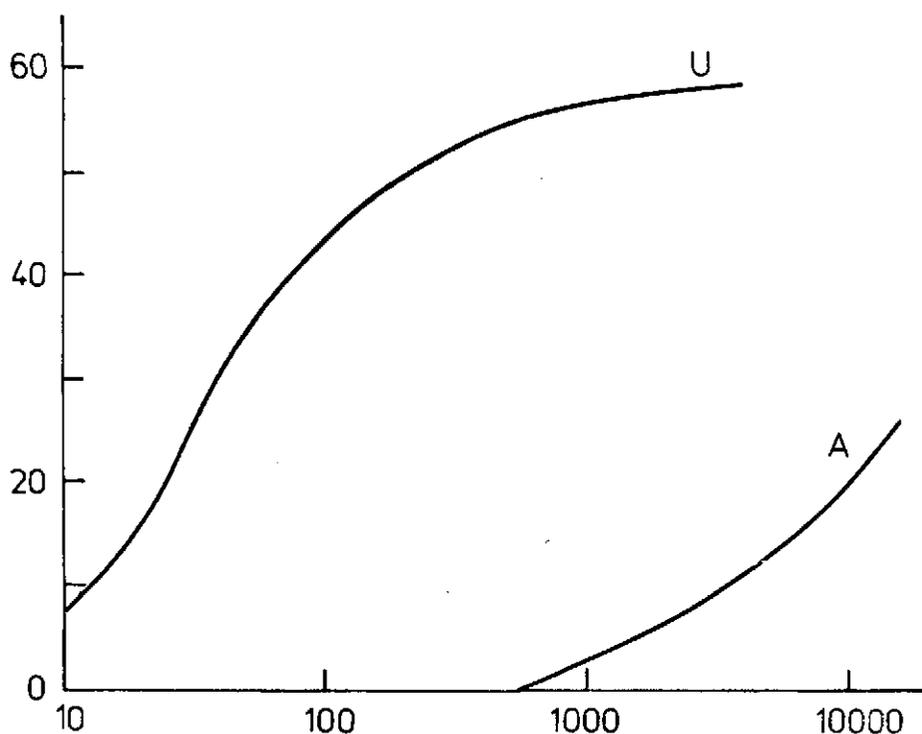


Figura 12.—Actividad pseudocolinesterásica frente a suxametonio de un suero normal (U) y de uno atípico (A). En abscisas los mg de suxametonio, en ordenadas la actividad enzimática.

Una fuerte prueba a favor de que la enzima atípica se halla alterada en el centro aniónico proviene de su comportamiento frente a sustratos e inhibidores que contienen uno o dos  $N^+$  cuaternarios o  $N^+$  en grupos amina sustituidos (Kalow y Davies, 1958). Ya dijimos que el  $N^+$  posiblemente interacciona electrostáticamente con el centro aniónico cargado

negativamente de la enzima usual. La afinidad de la enzima atípica por sustratos o inhibidores que contienen N cargado positivamente es menor que la de la usual, lo que prueba que el centro aniónico de la enzima atípica se halla alterado.

Otras pruebas de que el centro aniónico de la enzima atípica no es normal son que el pK de la enzima atípica es menor que el de la usual y que la colina altera del pK en la enzima usual pero no en la atípica.

Las enzimas atípicas y usual deben diferir en algo más que en el centro aniónico. De otro modo sería difícil explicar por qué la enzima atípica es mucho menos sensible al efecto inhibitor de una molécula cargada negativamente como el fluoruro sódico (Harris y Wittaker, 1961). Asimismo, hay pruebas de que el n-butanol al 1% es un activador de la enzima usual, a la que activa en un 170%, y un inhibidor de la enzima atípica, inhibiéndola en un 50%. En general, el comportamiento de ambas enzimas frente a alquil-alcoholes en distintas concentraciones no es el mismo (Whittaker, 1968). También difieren ambas enzimas en su respuesta a la activación por pequeñas concentraciones de ClNa y a la inhibición por concentraciones mayores de dicho producto (Swaiift y La Du, 1966). A la vista del conjunto de datos expuestos podemos concluir que el suero de los individuos atípicos contiene una enzima anormal que muestra menor afinidad por los sustratos e inhibidores con nitrógeno positivamente cargado y es más resistente al efecto inhibitor del FNa.

#### IDENTIFICACION DE LOS GENOTIPOS $E_1^a E_1^U$ y $E_1^a E_1^a$

El que la enzima atípica tenga menos afinidad por los inhibidores con nitrógeno cargado positivamente provoca el que dicho enzima sea menos sensible al efecto inhibitor de esos compuestos. Dicho de otro modo, puesto que la afinidad de la enzima atípica por los inhibidores con nitrógeno cargado positivamente es menor que la de la enzima usual, la concentración de inhibidor necesaria para producir determinado grado de inhibición en la enzima atípica será mayor que la necesaria para producir la misma inhibición en la enzima usual.

Esta propiedad, a diferencia de las medidas de actividad enzimática, permite discriminar inequívocamente el producto del alelo  $E_1^a$  del del  $E_1^U$ . Por ejemplo, el número que resulta de multiplicar por cien el cociente entre las actividades pseudocolinesterásicas de un suero frente a benzoilcolina en presencia y en ausencia de dibucaína  $10^{-5}M$  respectivamente es característico del genotipo del individuo en el gen  $E_1$  (Kalow y Genest, 1957). Dicho número, llamado número de dibucaína, no depende

de la actividad global del suero frente a la benzoilcolina puesto que es el resultado de un cociente. El número de dibucaína es una medida del grado de sensibilidad del suero a la dibucaína.

El análisis de muchos individuos demostró que el número de dibucaína sigue en la población una distribución claramente trimodal (Kalow y Staron, 1957; Kalow y Gunn, 1959), distinguiéndose tres clases de individuos cuyos números de dibucaína son respectivamente,  $80 \pm 2$ ,  $62 \pm 4$  y  $20 \pm 4$ , (fig. 13) (fig. 14).

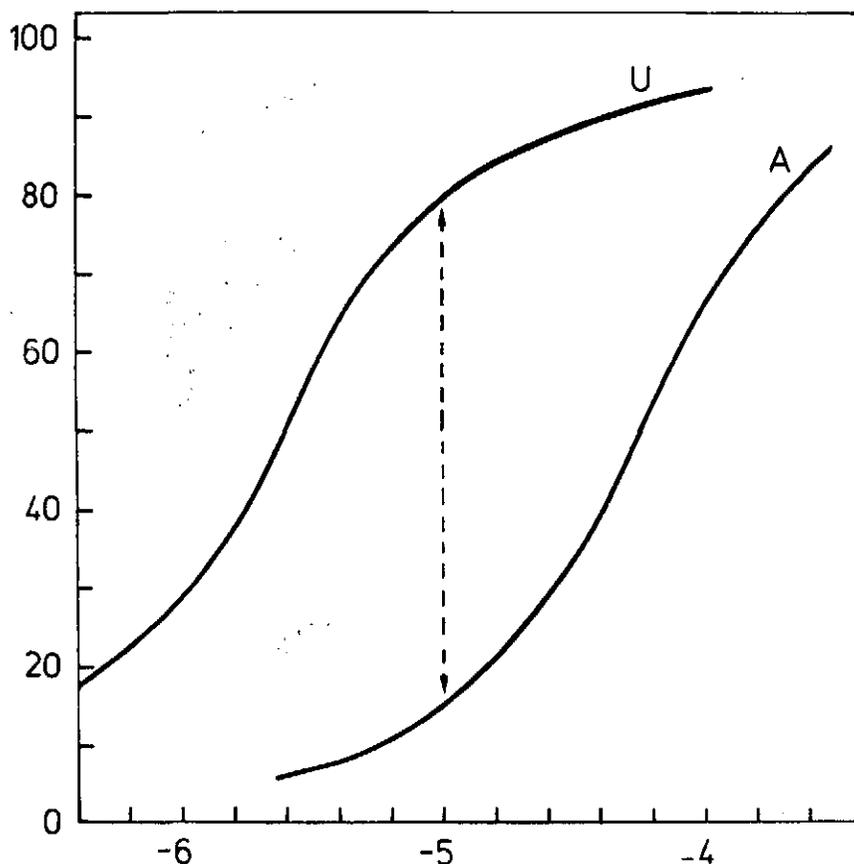


Figura 13.—Porcentaje de inhibición producida por la dibucaína en un suero normal (U) y en uno atípico (A). En abscisas el logaritmo de la concentración molar de dibucaína; en ordenadas, el porcentaje de inhibición.

Inicialmente, se pensó que las tres clases de individuos correspondían respectivamente a los genotipos  $E_1^U E_1^U$ ,  $E_1^U E_1^A$  y  $E_1^A E_1^A$ , pero el descubrimiento del alelo  $E_1^f$  complicó la cuestión (Harris y Wittaker, 1961).

Como más adelante veremos en detalle, los genotipos  $E_1^f E_1^u$  y  $E_1^u E_1^u$ , conducen a números de dibucaína tan semejantes que no pueden ser fiablemente distinguidos por el método expuesto. En consecuencia, conviene averiguar, a efectos de identificación genotípica, el número de fluoruro del suero además del de dibucaína (Harris y Wittaker, 1962; Harris y Wittaker, 1963).

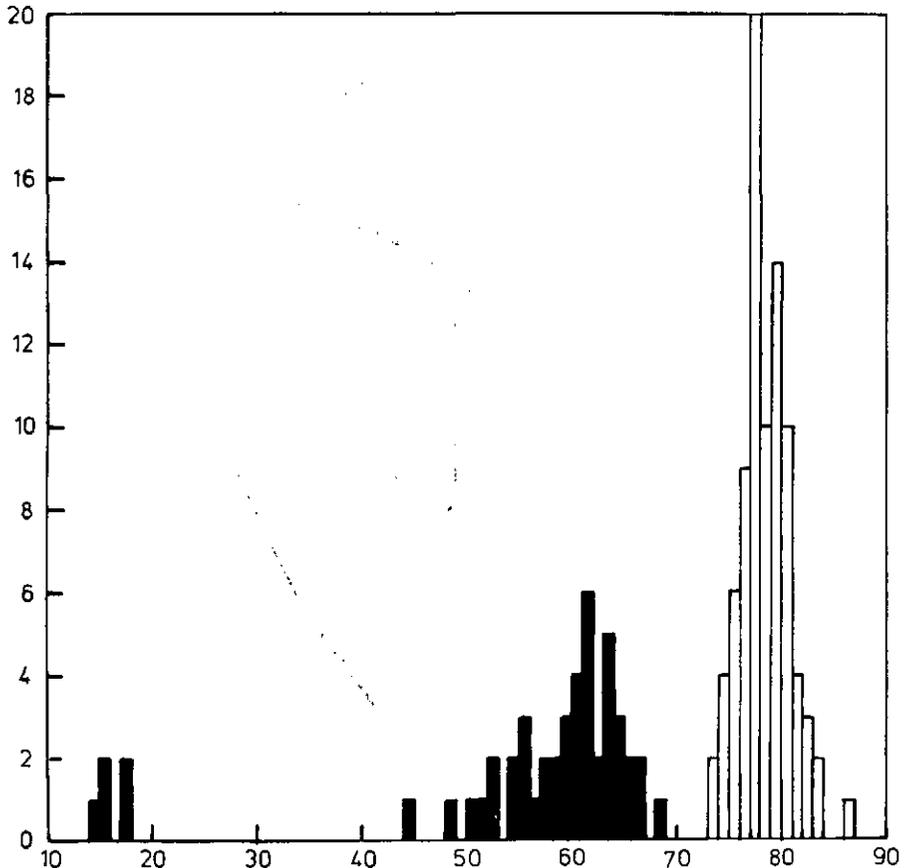


Figura 14.—Distribución de números de dibucaína en sueros de individuos normales (blanco) y sensibles parcial o totalmente a suxametonio (negro). En abscisas el número de dibucaína; en ordenadas, el número de individuos.

El número de fluoruro se define del mismo modo que el de dibucaína pero utilizando  $5 \times 10^{-2}M$  de FNa como inhibidor (Liddell et al, 1963). Como mencionamos en el apartado anterior, la enzima atípica es más resistente al efecto inhibitor del FNa que la usual, aunque se desconoce la base molecular de la diferencia entre ambas enzimas. Por tanto, los nú-

meros de fluoruro de los individuos  $E_1^a E_1^a$  serán menores que los de los  $E_1^a E_1^u$  y los de éstos, a su vez, menores que los de los  $E_1^u E_1^u$ .

Recientemente, la casa Hoffman-La Roche ha introducido un nuevo inhibidor llamado en código RO<sub>2</sub>-0683 y que es el bromuro del dimetil-carbamato del 2-hidroxi-5-fenilbenzil trimetil amonio. Este inhibidor permite discriminar claramente entre los distintos genotipos en el gen  $E_1$ . El número de RO<sub>2</sub>-0683 se define como los otros dos, pero utilizando una concentración  $10^{-7}M$  de dicha sustancia como inhibidor (Kalow y Davies, 1958).

En la tabla III se resume el comportamiento de los distintos sueros frente a los tres inhibidores.

Como se ve, el genotipo de un individuo puede ser averiguado sin posibilidad de error mediante el empleo de inhibidores, lo que ha permitido realizar estudios familiares detallados de la herencia de las variantes de la pseudocolinesterasa. Dichos estudios han confirmado, fuera de toda duda, que existen varios alelos del gen  $E_1$  y que el alelo  $E_1^a$  determina una proteína anormal con las características descritas (Kalow y Staron, 1957; Harris y Whittaker, 1962).

### INTERACCION DE LOS ALELOS $E_1^a$ y $E_1^u$

Con la determinación de los números de dibucaína, fluoruro y RO<sub>2</sub>-0683 los tres genotipos  $E_1^u E_1^u E_2^-$  y  $E_2^-$ ,  $E_1^u E_1^a E_2^- E_2^-$  y  $E_1^a E_1^a E_2^- E_2^-$  pueden ser limpiamente ser limpiamente caracterizados. Conviene ahora comparar las actividades frente a distintos sustratos de los individuos de bajo, intermedio y alto número de dibucaína. En general, las actividades enzimáticas de las tres clases de individuos son respectivamente bajas, intermedias y altas, pero la distinción no es tan clara como con el número de dibucaína. Así, algunos individuos normales tienen las actividades tan bajas como los individuos atípicos característicos. Posiblemente esto se deba a que el parámetro "actividad enzimática" es mucho más sensible a las diferencias ambientales que las propiedades cinéticas de la enzima. En cuanto a actividad frente a benzoilcolina, el alelo  $E_1^a$  es ligeramente recesivo frente al  $E_1^u$  (tabla III).

TABLA III

Comportamiento de los productos de los alelos activos del gen  $E_1$  frente a diversos inhibidores

Genotipo	Porcentaje de actividad	Núm. de dibucafna	Núm. de fluoruro	Núm. de RO <sub>2</sub> -0683
$E_1^u E_1^u$	100	71-85	57-68	95
$E_1^a E_1^a$	25	14-25	18-28	10
$E_1^f E_1^f$	60	64-67	32-40	75-86
$E_1^u E_1^a$	78	50-68	42-55	58-76
$E_1^u E_1^f$	80	71-78	50-55	87-95
$E_1^a E_1^f$	60	30-38	30-38	40-60

#### COMPORTAMIENTO DE LOS ALELOS ACTIVOS DEL GEN $E_1$ FRENTE A INHIBIDORES

Los individuos  $E_1^a E_1^a$  son hipersensibles al suxametonio, los individuos  $E_1^u E_1^a$  no lo son porque la actividad del alelo  $E_1^u$  es suficiente para hidrolizar la succinildicolina a la velocidad apropiada.

También, en cuanto a resistencia e inhibidores el alelo  $E_1^a$  es ligeramente recesivo frente al  $E_1^u$ .

En los tres casos los resultados pueden ser fácilmente explicados admitiendo que los homocigotos  $E_1^u E_1^u$  y  $E_1^a E_1^a$  sintetizan tan sólo y, respectivamente, las enzimas normal y atípica y que los heterocigotos sintetizan ambas enzimas normal y atípica, simultáneamente.

Del suero de los individuos heterocigotos se han podido aislar ambas clases de enzimas por procedimientos físico-químicos (Liddell et al, 1962). Previamente, se había demostrado por electroforesis a alto pH que ambas enzimas coexisten en el suero de los heterocigotos  $E_1^u E_1^a$ .

La presencia de la enzima atípica en los homo y heterocigotos portadores del alelo  $E_1^a$  no se limita al suero; los análisis post-mortem de diferentes tejidos, demuestran que la enzima atípica se halla también distribuida por todo el organismo.

Se han acumulado numerosas pruebas de que la mutación del alelo  $E_1^a$ , si bien afecta a la estructura de la proteína que codifica dicho alelo, no altera la cantidad de proteína sintetizada. La concentración de moléculas de pseudocolinesterasa normal presente en el suero de los homo-

cigotos  $E_1^U E_1^U$  es la misma que la concentración de moléculas atípicas en el suero de los homocigotos  $E_1^A E_1^A$ . El suero de los heterocigotos  $E_1^U E_1^A$  consta de un 50% de moléculas usuales y un 50% de atípicas, siendo la concentración total de moléculas de pseudocolinesterasa, usuales y atípicas consideradas conjuntamente, la misma que en los homocigotos. Se ignora si se forman multímeros híbridos con unas subunidades usuales y otras atípicas.

Que la mutación  $E_1^A$  no afecta a la concentración de proteína se deduce de experimentos de inhibición con compuestos organofosforados. El DFP reacciona estequiométricamente con el centro estérico de las moléculas de pseudocolinesterasa, sean éstas usuales o atípicas (Kalow y Davies, 1958). Si el suero de un individuo  $E_1^A E_1^A$  tuviera, por término medio, una concentración diferente de pseudocolinesterasa que el de un individuo  $E_1^U E_1^U$  se necesitaría una cantidad diferente de DFP para producir el mismo grado de inhibición en ambos sueros y, sin embargo, el suero atípico y el usual muestran la misma dependencia concentración de inhibidor-grado de inhibición.

Una prueba de que la igualdad de concentraciones de pseudocolinesterasa no se limita a los homocigotos, sino que se da en los sueros de los tres genotipos que estamos discutiendo, consiste en que la curva concentración-inhibición con RO<sub>2</sub>-0683 del suero de un heterocigoto  $E_1^U E_1^A$  es exactamente la misma que la de una mezcla al 50% de sueros  $E_1^U E_1^U$  y  $E_1^A E_1^A$ .

Las pruebas definitivas provienen de experimentos inmunológicos. La pseudocolinesterasa usual ha sido purificada casi totalmente, lo que permite preparar anticuerpos específicos contra ella. Con el antisuero apropiado es posible titular la concentración de pseudocolinesterasa en el suero usual. La enzima atípica da reacción cruzada con los anticuerpos de la pseudocolinesterasa normal, lo que indica que sus estructuras moleculares globales deben ser muy similares, compartiendo determinantes antigénicos. Una prueba muy fuerte de que los sueros  $E_1^U E_1^U$  y  $E_1^A E_1^A$  contienen concentraciones iguales de pseudocolinesterasa es que volúmenes iguales de ambos sueros neutralizan, por término medio, volúmenes iguales de una solución de anticuerpos contra la pseudocolinesterasa normal (Hodgkin et al, 1965).

Los datos sobre concentración de pseudocolinesterasa en las tres clases de sueros discutidos indican que, si bien desde el punto de vista de la actividad enzimática, sea medida ésta directamente o por resistencia a la inhibición por determinados compuestos, el alelo  $E_1^A$  es ligeramente rece-

sivo frente al  $E_1^U$ , desde el punto de vista de la cantidad de enzima sintetizada ambos alelos son codominantes.

Puesto que, además, la enzima atípica no ha perdido la actividad enzimática y conserva sus propiedades inmunológicas, debemos concluir que la mutación  $E_1^a$  introduce sólo una sutil alteración molecular que, simplemente, altera el número de recambio y la afinidad por los sustratos de la enzima.

### SEMEJANZAS MOLECULARES ENTRE LA ENZIMA NORMAL Y LA ATÍPICA

Lo que acabamos de decir se ve confirmado por los experimentos de electroforesis. La pseudocolinesterasa atípica también aparece en el suero bajo múltiples formas moleculares que, presumiblemente, representan distintos grados de agregación de un único polipéptido.

Por electroforesis en gel de almidón a pH ácido sólo una banda de actividad pseudocolinesterásica es visible en el suero de los individuos  $E_1^a E_1^a E_2^- E_2^-$ . Si la electroforesis se lleva a cabo a un pH básico cuatro isoenzimas son detectables en esos sueros. Se denominan también  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  y  $C_4$ . La distribución de actividades entre ellas es exactamente la misma que en el caso de los sueros normales, estando el 90% de la actividad enzimática en el componente  $C_4$ . Asimismo, la afinidad por el sustrato de las isoenzimas atípicas no varía de unas a otras (La Du y Dewald, 1971) (tabla II). En resumen, todo induce a pensar que la mutación  $E_1^a$  no altera la capacidad de polimerización del polipéptido codificado por el gen  $E_1$ .

Aún más sorprendente es el resultado de que en los sueros de los heterocigotos  $E_1^U E_1^a$  no aparecen, por electroforesis a alto pH, ocho bandas sino cuatro bandas de actividad pseudocolinesterásica. Debemos concluir, a la vista de este resultado, que la mutación  $E_1^a$  no sólo no altera la capacidad de polimerización del polipéptido sino que no altera tampoco sustancialmente su tamaño ni su carga.

Todos los datos hasta ahora expuestos son compatibles con la idea de que la mutación  $E_1^a$  es del tipo de cambio de nucleótido y que su efecto sobre el polipéptido sería introducir en determinado sitio de la secuencia un aminoácido distinto del que lleva la pseudocolinesterasa normal. Ambos aminoácidos deberían tener la misma carga y no jugarían ningún papel en la estructura cuaternaria de la pseudocolinesterasa. Si tendrían importancia para la determinación de la cinética de reacción, presumiblemente por formar parte del centro aniónico.

EL ALELO  $E_1^f$ 

Los estudios de poblaciones en las que se averiguaba el número de fluoruro de sus individuos mostraron que, al igual que en el caso del número de dibucaína, la distribución de números de fluoruro es claramente trimodal. Este resultado era perfectamente previsible puesto que se sabía que los individuos con enzima atípica son más resistentes al efecto inhibidor del fluoruro sódico que los que tienen enzima usual. Era fácil pensar que las tres clases que el número de fluoruro establece entre los individuos corresponden respectivamente a los genotipos  $E_1^a E_1^a$ ,  $E_1^u E_1^a$  y  $E_1^u E_1^u$ . Estas clases de individuos tendrían su número de fluoruro respectivamente entre 57-68, 42-55 y 18-28 (Harri y Whittaker, 1961).

La explicación de que la distribución trimodal de números de fluoruro se debe a la presencia del alelo  $E_1^a$  en la población, predice que todos los individuos con bajo número de fluoruro, es decir, todos los individuos mediana o intensamente resistentes a fluoruro sódico, deben tener números de dibucaína igualmente bajos. Si bien esta predicción se cumple en la mayoría de los casos, no se cumple en todos ellos. Hay individuos cuya actividad pseudocolinesterásica sérica es claramente más resistente al FNa que la de los individuos normales y, sin embargo, su número de dibucaína es casi normal (Harris y Whittaker, 1961). Este resultado sugiere que en la población se encuentra una tercera clase de enzima con propiedades, en cierto sentido, intermedias entre las de la enzima usual y las de la atípica por cuanto es casi tan sensible a la dibucaína como aquélla pero simultáneamente, es casi tan resistente al fluoruro sódico como ésta.

Los estudios de árboles genealógicos familiares demostraron que la enzima resistente a fluoruro se hallaba codificada por un nuevo alelo del gen  $E_1$ , alelo que recibió el nombre de  $E_1^f$  (Lehman et al, 1963; Whittaker, 1964; Griffiths et al, 1966).

Se desconoce totalmente la base molecular de la resistencia de este enzima al efecto inhibidor del FNa.

El alelo  $E_1^f$  provoca, en homocigosis, una reducción moderada de la actividad sérica pseudocolinesterásica, presumiblemente porque la nueva enzima tiene una afinidad por los sustratos habituales menor que la de la enzima usual. No obstante, la actividad es mayor que la producida por el alelo atípico en homocigosis (Motulsky, 1964).

En cuanto a actividad enzimática se refiere, el alelo  $E_1^f$  es codominante con el  $E_1^u$  y totalmente dominante sobre el  $E_1^a$ . Así, los heterocigotos  $E_1^u E_1^f$  tienen una actividad sérica pseudocolinesterásica exactamente intermedia entre las de los homocigotos  $E_1^u E_1^u$  y  $E_1^f E_1^f$  y la acti-

vidad pseudocolinesterásica sérica de los heterocigotos  $E_1^A E_1'$  es exactamente igual a la de los homocigotos  $E_1' E_1'$ . En consecuencia, los individuos homocigotos para el alelo  $E_1'$  son moderadamente hipersensibles al suxametonio, durando en ellos la apnea menos de dos horas (fig. 15).

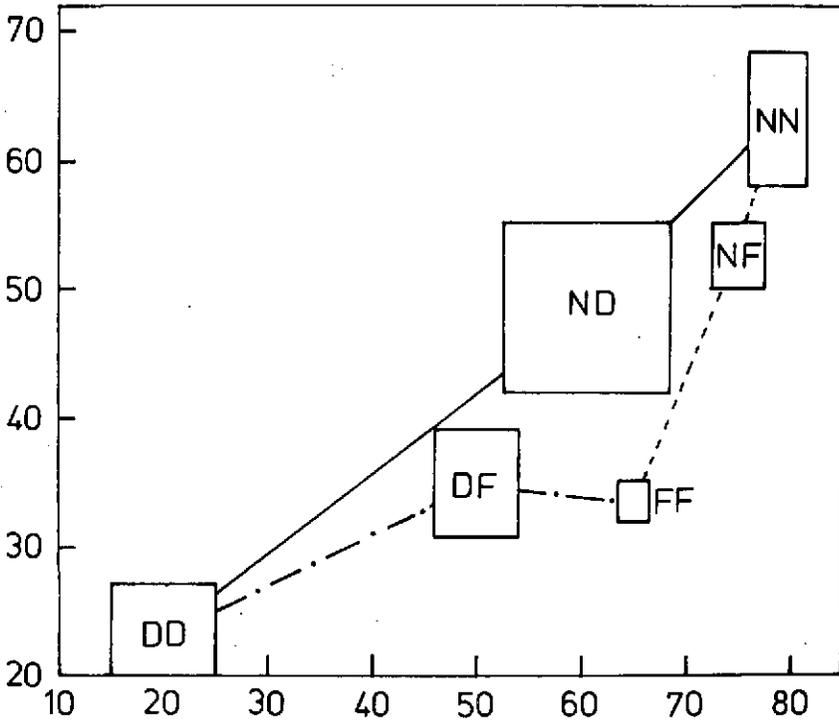


Figura 15.—Relación entre los números de dibucaína (abscisas) y de fluoruro (ordenadas) en los sueros con actividad pseudocolinesterásica. N indica alelo usual; D, resistente a dibucaína, y F, resistente a fluoruro.

Conviene señalar que el alelo  $E_1'$  es indistinguible de los otros dos por electroforesis. De nuevo nos hallamos en presencia de una mutación que altera las características cinéticas de la enzima sin alterar sus propiedades de carga eléctrica y capacidad de polimerización. Sin embargo, cada combinación genotípica de los alelos  $E_1^U$ ,  $E_1^A$  y  $E_1'$  conduce a una curva característica de actividad colinesterásica en función de la temperatura a la que se desarrolla la reacción (King y Morgan, 1970) (fig. 16).

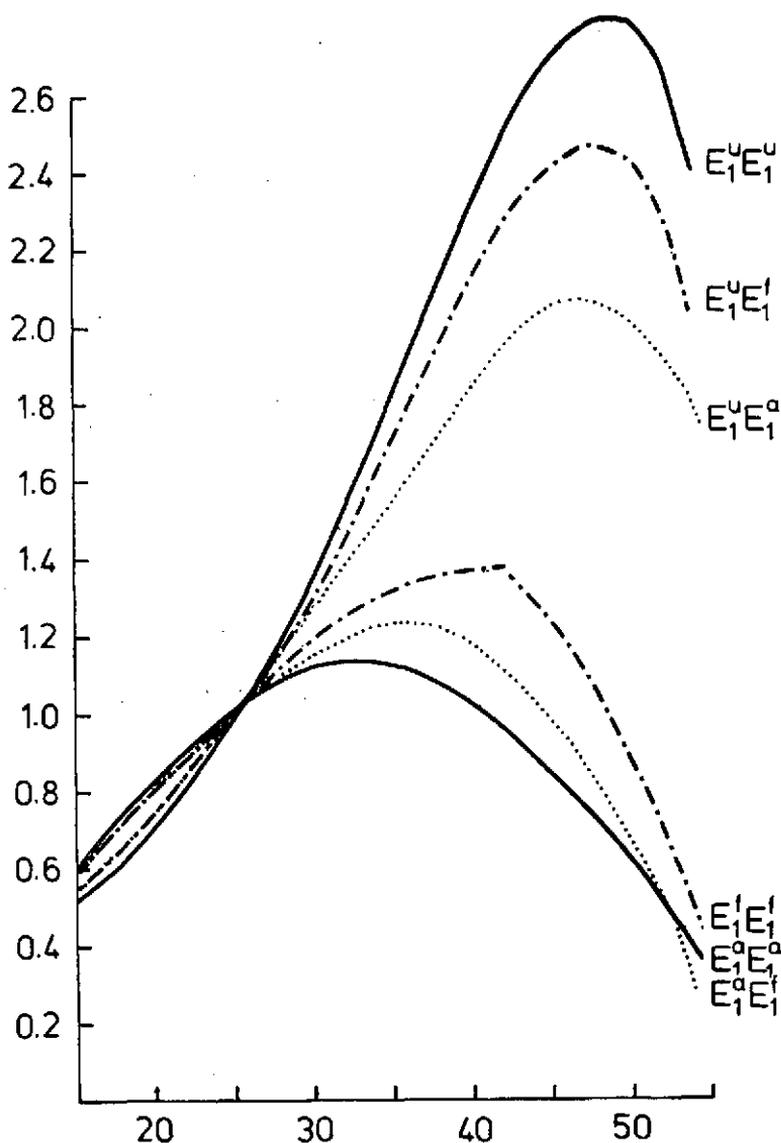


Figura 16.—Relación entre temperatura (abscisas) en °C y la actividad relativa pseudocolinesterásica en los distintos sueros activos.

### EL ALELO SILENCIOSO

Si no existieran otros alelos del gen  $E_1$  que los tres descritos, usual, atípico y resistente a fluoruro, en la descendencia de los individuos con

bajo número de dibucaína no deberían aparecer nunca individuos con número alto de dibucaína. En efecto, si el individuo tiene un número de dibucaína cercano a 20 y sólo existieran los alelos  $E_1^U$ ,  $E_1^a$  y  $E_1^f$ , dicho individuo debería ser obligadamente de genotipo  $E_1^a E_1^a$ , puesto que sólo ese genotipo conduciría a un número de dibucaína cercano a 20. En consecuencia, debería transmitir el alelo  $E_1^a$  a sus descendientes, los cuales, dependiendo de cuál fuera el genotipo del otro progenitor sólo podrían ser homocigotos o heterocigotos del alelo  $E_1^a$  y, por tanto, no podrían tener un número alto de dibucaína, debiéndolo tener, obligadamente, bajo o intermedio.

Sin embargo, estudios de árboles genealógicos familiares indican que en algunas, si bien poco frecuentes, ocasiones aparecen individuos con sensibilidad normal a la dibucaína en la descendencia de individuos presuntamente del genotipo  $E_1^a E_1^a$  (Kalow y Staron, 1957; Harris et al, 1960; Liddell et al, 1962; Simpson y Kalow, 1964). Estas anomalías aparentes del modo de herencia del carácter atípico fueron explicadas por Kalow y colaboradores postulando la existencia de un nuevo alelo del gen  $E_1$  (Kalow y Staron, 1957). Este nuevo alelo,  $E_1^s$ , sería silencioso, es decir, su producto genético no contribuiría a la actividad pseudocolinesterásica del suero en ninguna medida, y su presencia en heterocigosis no modificaría las propiedades de resistencia a inhibidores determinadas por el otro alelo del individuo. Esta hipótesis explica perfectamente las anomalías citadas del modo de herencia del carácter atípico, puesto que es suficiente admitir que los individuos presuntamente del genotipo  $E_1^a E_1^a$ , en cuya descendencia aparecen individuos con un número de dibucaína normal son en realidad  $E_1^a E_1^s$ . Un individuo de genotipo  $E_1^a E_1^s$  tendría, dadas las propiedades exigidas del alelo  $E_1^s$ , un número de dibucaína similar al de un individuo de genotipo  $E_1^a E_1^a$ , pero, a diferencia de éste, no transmitiría obligatoriamente un alelo  $E_1^a$ ; transmitiría a parte de su progenie el alelo  $E_1^s$  y el número de dibucaína de esos descendientes dependería tan sólo del alelo transmitido por el otro progenitor. Si este otro alelo fuera el  $E_1^U$  o el  $E_1^f$  el número de dibucaína sería normal o casi normal respectivamente.

La confirmación de la hipótesis del alelo silencioso exigía la identificación del correspondiente homocigoto silencioso,  $E_1^s E_1^s$ . Esta clase de individuos debería carecer de actividad pseudocolinesterásica en suero, lo que los haría extraordinariamente sensibles al suxametonio.

Evidentemente, los conceptos de número de dibucaína, de fluoruro y de  $RO_2$ -0683 no pueden ser aplicados a estos individuos, puesto que carece de sentido hablar de la inhibición de una actividad inexistente.

La hipótesis del alelo silencioso se vió confirmada a los cinco años de haber sido propuesta. En 1962, Liddell y colaboradores descubrieron una mujer griega que carecía totalmente de actividad pseudocolinesterásica en suero (Liddell et al, 1962). Dicha mujer no sufría ninguna enfermedad de las que habitualmente reducen la actividad esterásica. Su madre y dos hijos suyos tenían números de dibucaina y de fluoruro normales y actividad pseudocolinesterásica baja pero detectable y que caía dentro del rango normal de actividades. La mujer era muy sensible, de hecho por eso fue descubierta, al suxametonio. Como se ve, dicha mujer cumplía todos los requisitos predichos para los individuos homocigotos para el alelo silencioso.

Al año siguiente otra mujer con todas las características de ser homocigota para el alelo  $E_1^s$  fue descubierta (Simpson y Kalow, 1964). El estudio de biopsias hepáticas demostró que tampoco en ese órgano era detectable actividad pseudocolinesterásica (Doenicke et al, 1964). Posteriormente se han descubierto otros casos de anenzimia para la pseudocolinesterasa (Kattamis et al, 1967).

Los estudios de árboles genealógicos demostraron que, efectivamente, la anenzimia era heredable y explicable en términos de un nuevo alelo del gen  $E_1$ , alelo que cumplía todas las predicciones de Kalow y colaboradores (Simpson y Kalow, 1964).

La investigación en profundidad del alelo silencioso ha revelado que dicho alelo o bien no produce proteína alguna o bien produce una proteína tan diferente de la normal que no puede ser identificada ni por técnicas enzimáticas ni por técnicas inmunológicas. Se trata, por tanto, de un alelo amorfo.

El suero de los individuos homocigotos para el alelo silencioso no forma, tras electroforesis en gel de almidón a diferentes pH, ninguna banda de actividad pseudocolinesterásica (Goedde et al, 1965).

Experimentos de inmunodifusión e inmunolectroforesis revelan que el suero de los individuos homocigotos para el alelo  $E_1^s$  no da reacción cruzada en absoluto con anticuerpos contra la enzima usual (Hodgkin et al, 1965). Además, el suero de los individuos silenciosos no neutraliza en ninguna medida soluciones de anticuerpos contra la enzima usual.

El suero de los individuos silenciosos no contiene ningún inhibidor de la pseudocolinesterasa usual o anticuerpos contra ella (Hodgkin et al, 1965). Así, la disminución de la actividad pseudocolinesterásica detectable en las mezclas de sueros normales y silenciosos se debe, única y exclusivamente, a la dilución de la enzima usual.

Todos los resultados descritos apoyan la idea de que el alelo silencioso es amorfo.

## INTERACCION DEL ALELO SILENCIOSO CON LOS OTROS ALELOS

En cuanto a la actividad se refiere, el alelo silencioso es totalmente recesivo frente a los alelos atípicos y resistentes a fluoruro. Los heterocigotos entre el alelo silencioso y el alelo  $E_1^a$  o el  $E_1^f$  tienen la misma actividad pseudocolinesterásica que los correspondientes homocigotos activos.

En cambio, el alelo  $E_1^s$  provoca una disminución apreciable de la actividad pseudocolinesterásica en los heterocigotos de genotipo  $E_1^u E_1^s$ . Esta reducción posiblemente se deba a que el número de moléculas activas en el suero de los heterocigotos es menor que en el de los homocigotos activos.

El alelo silencioso es recesivo frente a los otros tres alelos del gen  $E_1$  en cuanto a características de resistencia a inhibidores se refiere. Esto es lógico puesto que dichas características son propiedades cualitativas de las enzimas presentes en el suero, de modo que no dependen, en absoluto, de la concentración de enzima sino sólo de la clase de enzima de la que se trate (tabla IV).

### IDENTIFICACION DEL ALELO SILENCIOSO

El alelo silencioso es fácilmente identificable en homocigotos, porque anula la actividad enzimática del suero. Por el contrario, es prácticamente imposible de identificar por medios bioquímicos cuando se halla en heterocigosis. Como ya hemos dicho, su presencia no altera las características cualitativas del suero y la variabilidad no genética de la actividad pseudocolinesterásica es tan grande que, en un individuo aislado, una reducción de dicha actividad no es necesariamente indicación de heterocigosis para el alelo silencioso.

TABLA IV

Comportamiento del suero de distintos portadores del alelo silencioso frente a diversos inhibidores

Genotipo	Porcentaje de actividad	Núm. de dibucaina	Núm. de fluoruro	Núm. de RO <sub>1</sub> -0683
$E_1^u E_1^u$	100	71-85	57-68	95
$E_1^u E_1^s$	0	Carecen	Carecen	Carecen
$E_1^a E_1^s$	65	71-85	57-68	95
$E_1^a E_1^s$	20	14-25	20-25	10
$E_1^f E_1^s$	60	67	43	?



En consecuencia, el alelo silencioso sólo puede ser identificado por técnicas genéticas de análisis familiar, lo que dificulta notablemente su estudio en poblaciones.

El desarrollo de técnicas inmunológicas que permitieran hallar con exactitud la concentración de moléculas de pseudocolinesterasa abriría la puerta de la detección, en heterocigotos, del alelo silencioso.

### HETEROGENEIDAD DEL FENOTIPO SILENCIOSO

Recientemente se han descrito casos de individuos en los que el suero no mostraba actividad pseudocolinesterásica pero daba reacción cruzada con anticuerpos contra la pseudocolinesterasa usual (Goedde y Atland, 1968). El empleo de tioésteres de colina como sustrato, lo que aumenta la potencia del método de análisis de actividad esterásica, ha permitido demostrar que estos individuos conservan entre el 1 y 2% de la actividad pseudocolinesterásica normal (Scott, 1970).

El suero de estos individuos "casi silenciosos" neutraliza los anticuerpos contra la pseudocolinesterasa usual en la misma medida que el suero de los individuos normales.

La electroforesis del suero de estos individuos permite detectar una única y muy débil banda de actividad pseudocolinesterásica. Esto no quiere decir necesariamente que la proteína del suero de estos individuos no sea capaz de polimerizar. Posiblemente lo único que quiere decir ese resultado es que las otras bandas se hallan por debajo de la capacidad de detección del método de análisis de la actividad enzimática. Esta propuesta nuestra es tanto más lógica cuanto que la movilidad de la única banda que presenta el suero de estos individuos es menor que la del componente  $C_1$  de los sueros activos, debiendo, la banda única, ser equivalente al componente  $C_1$  de los sueros activos.

El fenómeno de estos individuos presumiblemente se debe a un nuevo alelo del gen  $E_1$  (Gutsche et al, 1967; Goedde y Atland, 1968). Este alelo, que sería diferente del  $E_1^*$ , codificaría una proteína anormal que ha perdido casi por completo su actividad enzimática pero conserva, total o parcialmente sus propiedades inmunológicas (Rubinstein et al, 1970).

El nuevo alelo no alteraría la capacidad de polimerizar ni la concentración en suero de su producto. Esta última afirmación no tiene ningún apoyo experimental pero no contradice ningún dato empírico y nos atrevemos a lanzarla a modo de hipótesis de trabajo.

Se han descrito otros casos de individuos cuyo suero conserva una débil actividad colinesterásica y, sin embargo, no da reacción cruzada

con anticuerpos contra la enzima normal. Este resultado sólo podría sorprendernos si olvidáramos que en los glóbulos rojos hay acetilcolinesterasa. No es imposible que un pequeño número de moléculas de acetilcolinesterasa alcance el suero durante el proceso de extracción de la sangre. Dichas moléculas serían las responsables del resultado mencionado.

### OTROS ALELOS DEL GEN E<sub>1</sub>

Aunque los cuatro alelos discutidos son los más frecuentes, algunos fenotipos no atribuibles a ellos se han descrito ocasionalmente (Lehman et al, 1960). Por ejemplo, los estudios de inhibición y activación de las pseudocolinesterasas con alquil-alcoholes han permitido definir un número de alcohol, concretamente de n-butanol, con el que Whittaker dice haber identificado una nueva y rarísima variante de pseudocolinesterasa.

Otros autores (Lehman et al, 1960; Whittaker, 1968), han descrito sueros en los que nuevas bandas de actividad pseudocolinesterásica aparecían tras la electroforesis. Desgraciadamente en ningún caso se realizó un análisis del modo de herencia de esos fenotipos nuevos.

De particular interés fue el descubrimiento de nuevos alelos del gen E<sub>1</sub> que afectan a la concentración de pseudocolinesterasa en suero más que a la clase de enzima sintetizada (Yoshida y Motulsky, 1969).

### EL FENOTIPO CYNTHIANA

Entre los casos de variación cuantitativa genéticamente controlada de la pseudocolinesterasa, el mejor conocido es el llamado fenotipo Cynthia. Se ha identificado en una única familia, proveniente de dicha localidad. El probando tiene una actividad más de tres veces mayor de lo normal. Sin embargo, las características de resistencia a distintos inhibidores y de afinidad por diferentes sustratos son normales. En consecuencia, lo más probable es que se trate de un individuo que sintetiza una enzima normal pero que alcanza una concentración en suero mayor de la normal. Como era de esperar este individuo es más resistente a la anestesia por suxametonio que los individuos normales.

Se ignora si el nuevo fenotipo se debe a una nueva variante alélica del gen E<sub>1</sub> o a un nuevo gen. Desgraciadamente, se sabe muy poco sobre los mecanismos de control de la síntesis de proteínas en organismos eucariontes y, en particular, en mamíferos. Cabría especular con la posibi-

lidad de que la mutación responsable del fenotipo *Cynthiana* afecte a un gen regulador, parecido a los que forman el operón bacteriano.

## HETEROGENEIDAD GENÉTICA DE LOS INDIVIDUOS NORMALES

Si, además de la clase de pseudocolinesterasa que un individuo sintetiza, la cantidad de enzima sintetizada por cada individuo se halla controlada genéticamente, cabría admitir que la amplia variabilidad de la actividad pseudocolinesterásica presente en los individuos normales, es decir, en los individuos de genotipo  $E_1^U E_1^U E_2^- E_2^-$ , se deben, al menos en parte, a diferencias genéticas que han pasado, hasta el momento, desapercibidas.

Las pruebas experimentales pertinentes son contradictorias. Mientras que algunos autores no han encontrado una determinación genética de las diferencias de actividad pseudocolinesterásica en individuos normales, otros autores encontraron pruebas a favor de dicha determinación genética (Simpson y Kalow, 1963). En ambos casos los autores estudiaron la correlación de actividades pseudocolinesterasas en hermanos y la compararon con la de la población en general.

Otros estudios demuestran que la actividad pseudocolinesterásica no fluctúa mucho en función de la edad sino que se mantiene notablemente constante en cada individuo, lo que apoyaría la idea de que las diferencias entre individuos tienen un componente genético.

En nuestra opinión, los resultados anteriores no indican, en absoluto, que existan alelos desconocidos del gen  $E_1$ , (alelos que actualmente clasificaríamos como  $E_1^U$ ) que regulen la cantidad de pseudocolinesterasa sintetizada por cada individuo. Aún suponiendo que hubiera una componente genética en las diferencias de actividad pseudocolinesterásica en los individuos normales no habría que olvidar que debe haber numerosos genes distintos del  $E_1$  que afecten a la capacidad hepática y, en consecuencia, a la cantidad global de pseudocolinesterasa sintetizada. Dicho en términos genéticos más tradicionales: que probablemente la pseudocolinesterasa no sea una excepción a la regla de que junto a los genes principales que determinan un carácter, existen numerosos genes modificadores, no directamente relacionados con dicho carácter, pero que, en pequeña medida cada uno, le afectan de algún modo. Esa constelación de genes menores sería responsable del componente genético de las diferencias de actividad pseudocolinesterásica entre individuos normales.

Más atractiva nos parece la hipótesis de que existan alelos del

gen  $E_1$  que determinen enzimas cualitativamente distintos de la normal pero que tengan las mismas propiedades de resistencia frente a los inhibidores utilizados hasta ahora. Estos alelos ocultos podrían ser los responsables de ese 50% de individuos hipersensibles al suxametonio y que, hasta ahora, se considera que tienen normal la pseudocolinesterasa.

## LIGAMIENTO AL GEN DE LA TRANSFERRINA

El estudio de los árboles genealógicos de seis familias en las que distintos alelos del gen  $E_1$  y del Tf se hallaban segregando, ha permitido demostrar que ambos genes se hallan ligados, siendo la fracción de recombinación entre ellos posiblemente menor de 0,2 (Robson et al, 1966).

Puesto que en una de las seis familias estudiadas los genes se comportaron como independientes, se necesitan más estudios para confirmar el ligamiento entre el gen de la pseudocolinesterasa y el de la transferrina.

## EL GEN $E_2$

La electroforesis unidimensional del suero humano, en gel de almidón a un pH próximo a 5, no conduce a los mismos resultados que la realizada a pH próxima a 8,7: en vez de las cuatro bandas de actividad pseudocolinesterásica detectables a  $\text{pH} = 8,7$  en la mayoría de los individuos portadores de al menos una copia de un alelo activo cualesquiera del gen  $E_1$ , sólo una banda de actividad pseudocolinesterásica es detectable a  $\text{pH} = 5$  en la mayoría de los individuos. En una minoría de los individuos, entre un 4 y un 9 % de ellos, según la población europea de que se trate, aparece, sin embargo, una segunda banda que viaja hacia el ánodo más lentamente que la banda común a todos los individuos (fig. 5). En consecuencia, cuando la electroforesis se realiza a un pH cercano a 5, todos los individuos, salvo los homocigotos silenciosos, pueden clasificarse en dos grupos: los que exhiben una banda de actividad pseudocolinesterásica y los que exhiben dos bandas, una de ellas equivalente a la de la primera clase de individuos.

La electroforesis bidimensional del suero (Harris et al, 1962), primero en papel de filtro y luego en almidón, cambiando el pH de una a otra, permite visualizar cuatro o cinco bandas de actividad pseudocolinesterásica según que los individuos pertenecieran respectivamente a la primera o a la segunda clase (fig. 7). Esto indica que la segunda banda detectable en una minoría de individuos cuando la electroforesis se realiza a pH alre-

dedor de 5 es diferente de las cuatro bandas normalmente observables a pH alrededor de 9. Esta banda adicional de actividad pseudocolinesterásica ha sido denominada componente  $C_5$ .

La banda  $C_5$  puede observarse conjuntamente con las otras cuatro cuando la electroforesis unidimensional del suero de los individuos apropiados se realiza a pH básico en gel de poliacrilamida (Tortolero y Medina, 1976). Con nuestra técnica, los individuos que no son homocigotos para el alelo silencioso se clasifican en dos grupos: los que exhiben cuatro bandas de actividad pseudocolinesterásica y los que exhiben cinco. Este resultado confirma el carácter independiente del componente  $C_5$  (fig. 8).

Los estudios familiares demostraron que el componente  $C_5$  se halla bajo control genético. En la mayoría de las familias estudiadas el carácter  $C_5^+$  (presencia del componente  $C_5$  en el suero) se comportó como debido a un gen autosómico dominante (Robson y Harris, 1966).

Se pudo demostrar, además, que dicho gen segrega independientemente de los alelos del gen  $E_1$  (Harris et al, 1963). Por ejemplo, en dos familias en las que uno de los progenitores tenía un número de dibucaína normal y carecía del componente  $C_5$  y el otro tenía un número de dibucaína intermedio entre el característico de los individuos normales y el de los hipersensibles al suxametonio y que presentaba el componente  $C_5$  (Harris et al, 1963; Robson y Harris, 1966), aparecieron unos descendientes con las combinaciones parentales de caracteres (número de dibucaína normal- $C_5^-$ , número de dibucaína intermedio- $C_5^+$ ; número de dibucaína intermedio- $C_5^+$ ) y otros con los caracteres parentales mezclados (número de dibucaína normal- $C_5^+$ , número de dibucaína intermedio- $C_5^-$ ). Estos descendientes fenotípicamente recombinantes constituyen una prueba a favor de que el carácter se halla controlado por un gen diferente del  $E_1$ . El nuevo gen fue denominado  $E_2$  (Harris et al, 1963).

Se piensa que existen dos alelos del gen  $E_2$ , llamados respectivamente  $E_2^+$  y  $E_2^-$ . El alelo  $E_2^+$  es dominante sobre el  $E_2^-$ . Los individuos homocigotos recesivos, es decir los  $E_2^- E_2^-$ , carecen de componente  $C_5$ , siendo de fenotipo  $C_5^-$ ; los heterocigotos y homocigotos dominantes, de genotipo  $E_2^- E_2^+$  y  $E_2^+ E_2^+$  respectivamente, muestran componente  $C_5$ , siendo de fenotipo  $C_5^+$ .

Aunque en la mayor parte de las familias estudiadas los resultados apoyan la explicación anterior, se han encontrado, reiteradamente, familias en las que los dos progenitores carecen de componente  $C_5$ , es decir son de fenotipo  $C_5^-$ , y, sin embargo, al menos uno de sus hijos es de fenotipo  $C_5^+$ . Estos árboles genealógicos se hallan en clara contradicción con la idea de

que el carácter  $C_5^+$  sigue una herencia autosómica dominante. En efecto, todo individuo  $C_5^-$  debería ser de genotipo  $E_2^- E_2^-$  y, en consecuencia, a partir de dos individuos  $C_5^-$  nunca debería aparecer uno  $C_5^+$ .

Se desconoce la explicación de esas anomalías. Cabe pensar en varias posibilidades. La más obvia es la no correspondencia entre la paternidad biológica y la legal. La mayor parte de los trabajos en los que se describen familias anómalas no mencionan si se ha investigado o no la autenticidad de la paternidad aparente. Otra explicación, ésta de naturaleza genética, sería suponer que no todos los individuos portadores del alelo  $E_2^+$  desarrollan el fenotipo  $C_5^+$ , es decir, que la penetración del gen  $E_2$  sería incompleta. A su vez esta explicación necesitaría una interpretación en términos moleculares, interpretación de la que hoy carecemos.

Los individuos  $C_5^+$  tienen, por término medio, un incremento de un 25% en la actividad pseudocolinesterásica sérica. En consecuencia, deberían ser menos sensibles de lo normal al suxametonio. No obstante, la distribución de las actividades pseudocolinesterásicas séricas en individuos  $C_5^+$  y  $C_5^-$  solapan ampliamente. Así, en los cuatro casos estudiados por nosotros no hemos encontrado dicho incremento de actividad.

La distribución de números de dibucaína y de fluoruro no es suficiente en los individuos  $C_5^+$  y en los  $C_5^-$ . Este resultado es sorprendente por cuanto cabría esperar que el componente  $C_5$  tuviera un comportamiento propio frente a los inhibidores y, por eso, cabría esperar que alterara dichos números en los individuos apropiados.

El que ambas distribuciones coincidan se debe, al parecer, a que las características de resistencia a la inhibición por fluoruro y por dibucaína del componente  $C_5$  se hallan determinadas por el gen  $E_1$ .

### INTERACCION ENTRE EL GEN $E_1$ Y EL $E_2$

Los estudios de resistencia a la inhibición por dibucaína del componente  $C_5$  demostraron que en los individuos  $E_1^U E_1^U$ , el componente  $C_5$  es tan inhibible como el  $C_4$ , mientras que en los individuos  $E_1^U E_1^A$  el componente  $C_5$  es parcialmente resistente a la inhibición por dibucaína, al igual que lo es el componente  $C_4$  de esos individuos (Harris et al, 1963).

Se sabe que el componente  $C_4$  de los heterocigotos  $E_1^U E_1^A$  es parcialmente resistente a la dibucaína porque, debido a la similitud de movilidads electroforéticas entre las enzimas usual y atípica, consta de una mezcla de moléculas normales y atípicas, éstas resistentes a la dibucaína. Cabría pensar si no ocurre lo mismo con el componente  $C_5$ , es decir, si no será que el componente  $C_5$  contiene el polipéptido codificado por el

gen  $E_1$  y, además, otro codificado por el gen  $E_2$ . Esta hipótesis ha sido llevada al límite por algunos autores, quienes piensan que el componente  $C_s$  es simplemente la pseudocolinesterasa codificada por el gen  $E_1$  al cual se ha unido otra proteína, de función desconocida, determinada genéticamente, y que, en principio, no tendría nada que ver con la pseudocolinesterasa.

La hipótesis de que el polipéptido activo del componente  $C_s$  es el codificado por el gen  $E_1$  cuenta con algunas pruebas indirectas a su favor. Aparte de que las características de resistencia a inhibidores del componente  $C_s$  coinciden con las del componente  $C_s$  en cada individuo investigado, nosotros hemos demostrado que ambos componentes,  $C_s$  y  $C_s$ , no son separables por cromatografía en columna de Sephadex G-200, por lo que deben tener pesos moleculares semejantes, y, que la cinética de actividad enzimática de los sueros  $C_s^+$  y  $C_s^-$  no es diferente. Sin embargo, si se confirmara que los sueros  $C_s^+$  tienen, realmente, más actividad, por término medio, que los  $C_s^-$ , la hipótesis anterior, en su forma más sencilla, sería insostenible.

Se ha investigado la frecuencia de aparición del componente  $C_s^+$  en sueros de individuos  $E_1^U E_1^U$ ,  $E_1^U E_1^A$  y  $E_1^A E_1^A$  respectivamente. No se ha encontrado ningún individuo  $C_s^+$  entre los  $E_1^A E_1^A$  (Robson y Harris, 1966), lo que sugiere que la presencia de un alelo  $E_1^U$  es necesaria para el desarrollo del carácter  $C_s^+$ .

Nosotros queremos recalcar que esta última hipótesis permite explicar unitariamente todas las anomalías hasta ahora misteriosas del modo de herencia del componente  $C_s$ . En efecto, si el componente  $C_s$  sólo pudiera presentarse en individuos con al menos un alelo  $E_1^U$ , podría explicarse el que a partir de dos individuos  $C_s^-$  naciese uno  $C_s^+$ ; bastaría para ello que el portador del alelo  $E_2^+$  careciera del alelo  $E_1^U$ , que, sin embargo, en el hijo sería aportado por el otro progenitor. También sería explicable que, por término medio, la actividad de los individuos  $C_s^+$  fuera un 25 % más alta: el incremento de actividad se debería a la mayor actividad que, por término medio, tiene la enzima usual sobre las normales. El fenómeno de la resistencia parcial a dibucaína del componente  $C_s$  de los individuos  $E_1^U E_1^A$  sólo podrían explicarse admitiendo que en los heterocigotos  $E_1^U E_1^A$  se forman moléculas híbridas  $C_s$ , unas de cuyas subunidades son usuales y las otras atípicas y que el componente  $C_s$  deriva de dichas moléculas híbridas.

Se ignora si la epistasia del gen  $E_1$  sobre el  $E_2$  es un fenómeno real o es una apariencia provocada por el pequeño número de individuos  $E_1^A E_1^A$  analizados. La hipótesis de la formación de moléculas híbridas en los

heterocigotos  $E_1^U E_1^a$  no ha sido comprobada empíricamente pero no parece inverosímil.

### OTROS ALELOS DEL GEN $E_2$

Aunque la genética del componente  $C_5$  aún no se entiende bien, algunos autores dicen haber encontrado variantes hereditarias de dicho componente. Generalmente, estas variantes suelen consistir en nuevas bandas de actividad pseudocolinesterásica, llamadas  $C_6$ ,  $C_7$ , etc., por sus descubridores y que emigran más lentamente hacia el ánodo que el componente  $C_4$  (Van Los y Druet, 1966). Así, Neitlich (1966) descubrió una variante con tres veces más de actividad de lo normal y extremadamente sensible a la inhibición por DFP lo que indicaría un número normal de moléculas en el suero. Los números de dibucaína y fluoruro eran normales. Se detectó una banda más lenta que el componente  $C_4$ . La herencia parecía autosómica dominante.

### LA PSEUDOCOLINESTERASA Y LAS ENFERMEDADES

Las enfermedades que dañan a las células hepáticas suelen rebajar la concentración de pseudocolinesterasa en suero ya que la enzima sérica se sintetiza en el hígado. Sin embargo, tal reducción no se presenta en los casos de obstrucción biliar si no hay daño secundario a las células hepáticas, por lo que el nivel de actividad pseudocolinesterásica en suero se ha utilizado como ayuda en el diagnóstico diferencial de la ictericia (Hunt y Lehman, 1960).

El nivel de actividad pseudocolinesterásica en suero también se encuentra reducido en estados tales como la malnutrición, el envenenamiento por compuestos organofosforados y si hay uremia (Waterlow, 1950).

Algunas enfermedades incrementan el nivel de actividad enzimática. Entre ellas cabe señalar la tirotoxicosis, la nefrosis (Kunkel y Ward, 1947), la esquizofrenia, la obesidad (Berry et al, 1954) y los trastornos emocionales agudos (Rose et al, 1965). También la hipertensión suele ir acompañada de un incremento de la actividad pseudocolinesterásica.

Las variaciones hereditarias de la pseudocolinesterasa no han sido relacionadas con estado patológico alguno. Ni siquiera, la anenzimiasis total para ser perjudicial en ausencia de suxametonio. Se ha encontrado una mayor incidencia del componente  $C_5$  en pacientes de mielomatosis que en la población general (Gallango y Arends, 1969). Como hemos

puesto de manifiesto en esta revisión, la importancia farmacogenética de la pseudocolinesterasa es obvia. Por el momento, sin embargo, sólo se ha estudiado su relación con el metabolismo del suxametonio, cuando es obvio que también el acetilsalicilato, y otros ésteres, deben ser hidrolizados en el suero por esta enzima (La Du, 1971). Convendría no olvidar que no en todos los casos de sensibilidad al suxametonio se ha podido demostrar una anomalía en la pseudocolinesterasa. Así, en los tres estudios realizados hasta ahora (Lehman y Liddell, 1969; Kalow, 1965; Thompson y Whittaker, 1966), el 37 % de los individuos sensibles eran de genotipos  $E_1^U E_1^U$  y el 10 % de genotipo  $E_1^U E_1^A$ .

### CAMBIOS DURANTE EL DESARROLLO

En el suero de fetos y de recién nacidos se ha encontrado una banda adicional que emigra hacia el ánodo más lentamente que el componente  $C_1$  (Harris et al, 1962). Dicha banda adicional desaparece después del nacimiento. Posiblemente consista en moléculas de pseudocolinesterasa que no tienen aún todos los restos de ácido siálico. Algo similar se ha encontrado en el caso de la transferrina.

La actividad pseudocolinesterásica decrece con la edad, una vez alcanzado el período adulto (Kalow y Gunn, 1959). No parece que haya diferencias en la actividad pseudocolinesterásica media de hombres y mujeres si se corrigen las medidas para factores como el peso, la edad y hematocrito (Simpson, 1966).

### LA PSEUDOCOLINESTERASA EN LAS POBLACIONES

Las técnicas empleadas en muchos estudios sobre la frecuencia de los diferentes alelos de los genes  $E_1$  y  $E_2$  en poblaciones determinadas no permiten detectar el alelo  $E_1^f$  ni el  $E_1^s$ . Observemos las consecuencias que ello puede tener. Supongamos, a modo de ejemplo, que en una población hipotética, que está en equilibrio para los genes  $E_1$  y  $E_2$ , las frecuencias reales de los alelos  $E_1^U$ ,  $E_1^A$  y  $E_1^s$  son 0,5; 0,3 y 0,2 respectivamente. Si la población tiene 1.000 individuos habrá 250 normales, 90 atípicos y 40 resistentes a fluoruro que consideraríamos normales, el resto serían heterocigotos. Entre los heterocigotos, aproximadamente 300 serían  $E_1^U E_1^A$  y los detectaríamos como tales, pero los 200 heterocigotos  $E_1^U E_1^f$  los consideraríamos homocigotos normales y los 120  $E_1^A E_1^f$  atípicos. Erróneamente pensaríamos que la población se compone de 490 homocigotos normales

210 atípicos y 300 heterocigotos. Concluiríamos que las frecuencias de los alelos  $E_1^U$  y  $E_1^A$  son respectivamente 0,64 y 0,36 y que los números esperados para el equilibrio de homocigotos, normales, atípicos y heterocigotos son, respectivamente, 410, 128 y 462. Posiblemente llegaríamos a la equivocada conclusión de que la población no está en equilibrio porque tiene menos heterocigotos de lo esperado.

Evidentemente, en este ejemplo hemos puesto una exagerada frecuencia de alelos anormales. Conviene, sin embargo, recordar que no hay por qué suponer que en todas las poblaciones nuevas que se estudian las frecuencias de los alelos van a ser parecidas a las de las ya conocidas. De hecho, en algunas poblaciones de esquimales la frecuencia del alelo silencioso puede llegar a ser mayor de 0,2.

El alelo  $E_1^I$  puede ser detectado en homo y en heterocigosis si se adoptan las técnicas apropiadas. Si no se adoptan, su presencia pasará totalmente desapercibida puesto que ni siquiera en homocigosis lo detectaremos. En cambio, el alelo  $E_1^A$  no puede ser detectado en heterocigosis puesto que es totalmente recesivo, pero los homocigotos son siempre fácilmente detectables porque carecen de actividad pseudocolinesterásica.

En el caso de los alelos  $E_1^A$  y  $E_2^-$  no se pueden averiguar directamente las frecuencias alélicas por ignorarse las proporciones de heterocigotos portadores. Se pueden obtener una estimación de dichas frecuencias igualándola a la raíz cuadrada de la proporción de homocigotos correspondiente. Dicha estimación sólo será válida si la población realmente está en equilibrio para los genes  $E_1$  y  $E_2$ . Hasta ahora no se ha encontrado ninguna población en desequilibrio para los genes  $E_1$  y  $E_2$  (Steggmüller, 1975).

En las poblaciones europeas, la frecuencia del alelo  $E_1^A$  es próxima a 0,02 (Kalow y Gunn, 1958; Kattamis et al, 1962). La frecuencia de dicho alelo parece ser más baja entre los negros (Morrow y Motulsky, 1965). No se ha encontrado dicho alelo en tres poblaciones de indios sudamericanos estudiadas (Arends et al, 1967; Tashian et al, 1967), ni entre los pigmeos (Motulsky y Morrow, 1968) tanto entre los Ituri como entre los Babilinga. La frecuencia del alelo  $E_1^A$  también parece muy baja entre los japoneses (Omoto y Goelde, 1965). En los esquimales estudiados no se ha detectado su presencia. En conjunto, son las poblaciones caucasoides las que mayor frecuencia presentan del alelo  $E_1^A$  (tabla V).

La frecuencia del alelo  $E_1^I$  es muy baja, del orden de  $10^{-3}$  en casi todas las poblaciones estudiadas (Lehman y Liddell, 1969). La frecuencia del alelo  $E_1^A$  es aún más pequeña, salvo entre los esquimales, entre los que la frecuencia del alelo silencioso oscila entre 0,07 y 0,22, según las

aldeas (Gutsche et al, 1967). Este resultado es el más interesante de los obtenidos hasta ahora en los estudios sobre la genética de poblaciones de la pseudocolinesterasa (Scott, 1973). Tablas VI y VII).

La incidencia del carácter  $C^{+s}$  (Steegmüller, 1975) oscila alrededor del 5 % en las poblaciones europeas y del 2 % o menos en las de negros estudiados. Como se ve, los negroides parecen menos polimórficos que los caucasoides para todos los alelos de los genes  $E_1$  y  $E_2$  (tabla VIII).

TABLA V

Frecuencia del alelo atípico en algunas de las poblaciones estudiadas

Población	Núm. de individuos	Frecuencia alélica
Alemanes	8.314	0,0162
Franceses	1522	0,0187
Ingleses	703	0,0192
Griegos	561	0,0143
Yugoslavos	248	0,0141
Portugueses	179	0,0168
Canadienses	2.017	0,0188
Judíos	923	0,0168
Arabes	110	0,0091
Pakistaníes	121	0,0124
Hindúes (Bengal)	139	0,0000
Japoneses	371	0,0000
Coreanos	140	0,0000
Filipinos	427	0,0023
Chinos (Formosa)	340	0,0015
Congoleños	585	0,0009
Negros americanos	666	0,0053
Nigerianos	33	0,0000
Esquimales	379	0,0000
Indios (Méjico)	377	0,0093
Indios (Xavante)	285	0,0000
Indios (Sudamérica)	291	0,0000
Pigmeos Ituri	125	0,0000
Pigmeos Babinga	300	0,0000
Laponos	890	0,0146
Australianos	98	0,0050
Espaníoles		
Castellanos	159	0,0094
Andaluces	123	0,0040
Gallegos	143	0,0279
Vascos	224	0,0312

Según Steegmüller, 1975.

T A B L A V I

Frecuencia del alelo resistente a FNa en algunas de las poblaciones estudiadas.

Población	Núm. de individuos	Frecuencia alélica
Alemanes	280	0,0071
Búlgaros	108	0,0046
Griegos	218	0,0161
Judíos	4.196	0,0004
Punjabis	202	0,1287
Hindúes (Bengal)	139	0,0036
Pakistaníes	121	0,0000
Nigerianos	33	0,0000
Japoneses	100	0,0100
Coreanos	115	0,0000

Según Steegmüller, 1975.

T A B L A V I I

Frecuencia del alelo silencioso entre judíos y esquimales.

Población	Núm. de individuos	Frecuencia alélica
Judíos	1.106	0,0009
Esquimales		
Marshall	77	0,1039
St. Mary's	151	0,1689
Emmonak	242	0,2231

Según Steegmüller, 1975.

## TABLA VIII

Frecuencia del fenotipo C<sup>+</sup>, en algunas de las poblaciones estudiadas.

Población	N.º de individuos	Frecuencia fenotípica
Alemanes	586	10,1
Ingleses	1.941	9,7
Polacos	445	6,0
Checoslovacos	312	11,0
Búlgaros	109	8,2
Griegos A	138	9,0
Griegos B	100	29,0
Canadienses	163	4,9
Judíos	64	0,0
Punjabis	284	8,1
Indios (Bengal)	550	3,6
Finlandeses	317	3,5
Nigerianos	68	2,9
Negros (Senegal)	224	2,2
Angoleños	303	1,3
Mozambiqueños	331	1,3
Coreanos	47	2,1
Australianos	98	0,0
Indios Xavante	285	0,0
Indios Motilou	70	1,4
Esquimales		
Marshall	77	0,0
St. Mary's	151	1,3
Emmonak	242	12,8
Espanoles		
Castellanos	159	8,8
Andaluces	124	6,5
Gallegos	143	9,9
Vascos	224	11,1

Datos de Steegmüller, 1975.

## MECANISMOS EVOLUTIVOS DEL POLIMORFISMO

Se desconoce si alguno de los alelos de la pseudocolinesterasa tiene alguna ventaja selectiva sobre algún otro en alguna de las poblaciones estudiadas. Se ha sugerido que los alelos distintos del  $E_1^U$  serían desventajosos en las poblaciones malnutridas debido a que, por bajar la malnutrición el nivel de actividad pseudocolinesterásica, colocaría a los individuos en una situación de práctica anenzimia funcional. No obstante, en las poblaciones actuales los individuos carentes de actividad pseudocolinesterásica parecen perfectamente viables.

Si no hay ninguna diferencia selectiva entre los diferentes alelos, los polimorfismos se habrían establecido por mutación y deriva. La deriva genética es la variación aleatoria, en el curso de las generaciones, de las frecuencias alélicas en genes carentes de significado selectivo en poblaciones pequeñas. Hace sólo unos pocos miles de años casi todas las poblaciones humanas eran suficientemente poco numerosas para que el efecto de la deriva fuera importante. El posterior crecimiento numérico de algunas de dichas poblaciones ha podido "congelar" los polimorfismos ocasionados inicialmente por la deriva. Algunos datos parecen apoyar la idea de que, efectivamente, el polimorfismo de la pseudocolinesterasa es, en términos evolutivos, tan sólo "ruido". Así, la incidencia del componente C<sub>2</sub> en dos pequeñas poblaciones griegas muy próximas entre sí y, por tanto, presumiblemente sometidas a las mismas presiones de selección, se estimó en 0,09 en una de ellas y en 0,29 en la otra (Robson y Harris, 1966). Además, si existieran diferencias selectivas entre unos alelos y otros deberían ser a favor de determinados alelos en unas poblaciones y en su contra en otras.

Los autores que tienen una visión teleológica de la evolución no suelen hacer jugar un papel importante al azar en ella, e insisten en que el organismo humano no sintetizaría una macromolécula como la pseudocolinesterasa si no tuviera una función definida y, en consecuencia, deducen que los cambios hereditarios en ella tienen "a fortiori" significado selectivo.

## VARIACION CONTINUA DE LA ACTIVIDAD PESEUDOCOLINESTERASICA

Si un carácter se halla gobernado por varios genes, el número total de genotipos diferentes relacionados con dicho carácter que pueden existir en una población es el producto del número de genotipos posibles en cada

uno de sus genes. El número de genotipos posibles en cada gen depende del número de alelos que segregan en dicho gen. Si el número de alelos de un gen es  $n$ , el número de genotipos posibles en ese gen es  $n(n + 1)$

2

La pseudocolinesterasa se halla controlada por dos genes. Simplificando, podemos decir que el número de alelos del gen  $E_1$  es  $= 4$  y el de los alelos del gen  $E_2 = 2$ . En consecuencia, el número de genotipos diferentes en el gen  $E_1$  es 10 y en el  $E_2$ , 3. El número total de genotipos diferentes relacionados con el rasgo fenotípico "actividad pseudocolinesterásica en plasma" será, por tanto, 30. Cada uno de los treinta genotipos produce un nivel característico de actividad enzimática y, como los rasgos de variabilidad de la actividad enzimática y, como los rasgos de variabilidad de la actividad enzimática determinados por distintos genotipos solapan, la variabilidad fenotípica resultante es continua (Lehman et al, 1958).

Las diferencias de actividad presentes incluso entre individuos genotípicamente similares para los genes  $E_1$  y  $E_2$  se deben, al menos en parte, a causas ambientales, como los factores de nutrición, funcionamiento hepático, etc. No se descarta que haya factores genéticos adicionales que contribuyan a dichas diferencias.

En cualquier caso, la distribución de actividades pseudocolinesterásicas investigadas es siempre continua y claramente unimodal con una amplia desviación típica en torno a la media, si bien algunos pocos individuos carecen totalmente de actividad y otros la tienen excesivamente alta.

## NOMENCLATURA

La nomenclatura que hemos utilizado en esta revisión fue propuesta por Motulsky (1964). Otros autores emplean la nomenclatura de Giedde y Baitsch (1964) que no emplea el símbolo  $E$ , de esterasa, para denominar los genes, sino el símbolo  $Ch$ , de colinesterasa. En esta segunda nomenclatura los genes  $E_1$  y  $E_2$  son denominados, respectivamente,  $Ch_1$  y  $Ch_2$ . Se reconocen los alelos del gen  $Ch_1$  siguientes:  $Ch_1^D$ , o alelo resistente a dibucaina que equivale al alelo  $E_1^s$  de nuestra nomenclatura;  $Ch_1^F$  o alelo resistente a fluoruro, equivalente al  $E_1^f$  de la nuestra;  $Ch_1^S$  o alelo silencioso, equivalente a nuestro  $E_1^s$  y  $Ch_1^U$  o alelo usual, equivalente a nuestro  $E_1^U$ . En el gen  $Ch_2$  se reconocen dos alelos,  $Ch_2^+$  y  $Ch_2^-$  equivalentes a nuestros  $E_2^+$  y  $E_2^-$ .

## AGRADECIMIENTOS

Los trabajos experimentales nuestros citados en el texto fueron realizados con la ayuda de una beca para investigación concedida por el Patronato Angel García Rogel de la Caja de Ahorros de Orihuela.

Enrique Cerdá Olmedo, Catedrático de Genética, cedió amablemente las instalaciones de su Departamento para que el trabajo se llevara a cabo y nos estimuló con inteligentes hipótesis de trabajo.

Fernando Recio, de la Seguridad Social de Sevilla, nos proporcionó cuantos sueros humanos necesitamos y colaboró con nosotros en todo cuanto le pedimos.

Asunción Fernández y Julio Polaina, compañeros nuestros, soportaron estoicamente cuantas punciones venosas les rogamos.

A todos ellos nuestro agradecimiento.

## BIBLIOGRAFIA

- Ammon, R. Die fermentative spaltung des acetylcholins phlügers. *Arch. Ges. Physiol.* 233, 486 (1933).
- Arends, T., Davies, D. A., Lehmann, H. Absence of variants of usual pseudocholinesterase (acylcholina, acylhidrolasa) in South American Indians. *Acta Genet. (Barel)* 17, 13 (1967).
- Atland, ., Goedde, W. Heterogenety in the silent gene phenotype of pseudocholinesterase of human serum. *Biochem. Genet.* 4, 321 (1970).
- Bamford, K. F. and Harris, H. F. Studies on usual ans atypical serum cholinesterase using  $\alpha$ -naphthil-acetate os substrate. *Ann. Human. Genet.* 27, 417 (1964).
- Berry, W. T. C., Cowin, P. J. and Davies, D. R. A relationship between body fat and plasma pseudocholinesterase. *Brit. J. Nutr.* 8, 79 (1954).
- Bocerne, J. G., Collier, H. O., Somers, J. F. Succinylcholine (succinoylcholine) muscle relaxant of short action. *Lancet*, 1, 1225 (1952).
- Callaway, S., Davies, D. R. and Rutland, J. P. Blood cholinesterase levels and range of personal variation in a healthy adult population. *Brit. Med. J.*, II, 812 (1951).
- Clark, S. W., Glaubiger, G. A., La Du, B. N. Properties of plasma pseudocholinesterase variants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 710 (1968).
- Clitherow, J. W., Mitchard, M., Harper, N. Y. The possible biological function of pseudocholinesterase. *Nature*, 199, 100 (1963).
- Cohen, J. A., Oosterbaan, R. A., Jansz, H. S., Bereds, F. The active site of sterases. *J. Cell. Comp. Physiol.* 54, suppl. 1, 231 (1959).
- Curtain, C. C., Gadjurek, D. C., Kidson, C., Gorman, J., Champnes, L. and Rodrigues, R. Serum pseudocholinesterase levels and variants in the peoples of Papua and New Guinea. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 14, 671 (1965).
- Das, P. K., Kiddell, J. Purification and properties of human serum cholinesterase. *Biochem. J.*, 116, 875 (1970).
- Davies, R. O., Marton, A. V., Kalow, W. The action of normal and atypical cholinesterases of human serum upon a series of sters of choline. *Canad. J. Biochem. Physicol.* 38, 545 (1960).
- Dewald, B. y La Du, B. N. Properties and relationship of multiple moleuclar forms of human serum cholinesterase. *Federation Proc.* 29, 803 (1970).



- Doenicke, A., Grütner, T. y Krentzberg, G., Remos, J., Epein, W., Steinbereithner, K. Serum cholinesterase anenzymia: report of a case confirmed by enzyme histochemical examination of liver biopsy specimen. *Acta Anaesth. scand.* 7, 59 (1963).
- Ellman, G. L., Courtney, M. D., Andrés, V. y Featherstone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharm.* 7, 88, (1961).
- Evans, F. T., Gray, P. W. S., Lehman, H., Silk, E. Sensitivity to succinylcholine in relation to serum cholinesterase. *Lancet*, 2, 1067, (1952).
- Forbat, A., Lehman, H., Silk, E. Prolonged apnoea following injection of succinylcholine. *Lancet*, 2, 1229 (1953).
- Funnell, H. S., Oliver, W. S. Proposed physiological function for plasma cholinesterase. *Nature*, 208, 689 (1965).
- Gallango, M. L., Arends, T. Phenotypical variants of pseudocholinesterase in myeloma patients. *Humangenetik*, 7, 104 (1969).
- Gaftmy, P. J., Lehman, H. Residual enzyme activity in the serum of a homozygote for the silent pseudocholinesterase gene. *Human Herd*, 19, 234 (1969).
- Goedde, H. W., Gehring, D., Hofman, R. A. On the problem of a silent gene in pseudocholinesterase polymorphism. *Biochim. Biophys. Acta*, 107, 391, (1965).
- Goedde, H. W., Atland, K. Evidence for different silent genes in the human serum pseudocholinesterase polymorphism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 540 (1968).
- Goedde, H. W., Atland, K. Pseudocholinesterase variants in Germany and Czechoslovakia. *Nature*, 189, 1203 (1963).
- Goedde, H. W., Held, K. R., Atland, K. Hydrolysis of succinylcholine in human serum cholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 4, 274, (1969).
- Goedde, H. W., Atland, K. Scholoot, W. Therapy of prolonged apnoea after suxamethonium injection. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151, 742 (1968).
- Goedde, H. W., Baitsch, H. Nomenclature of pseudocholinesterase polymorphism. *Brit. Med. J.* 2, 310, (1964).
- Griffithe, P. D., Davies, D., Lehman, H., A second family demonstrating the homozygote for the fluoride-resistant pseudocholinesterase variant. *Brit. Med. J.* 2, 215, (1966).
- Gürtner, T., Krentzberg, G., Doenicke, A. Comparative studies on cholinesterase activities in serum and liver cells. *Acta Anaesth. Scand.* 7, 89, (1963).
- Hammer, G. S., La Du, B. N., Evidence for the liver being the source of human pseudocholinesterase. *Pharmacologist.* 10, 202, (1968).
- Gutsche, B., Scott, M., Whight, R. C. Hereditary deficiency of pseudocholinesterase in Eskimos. *Nature.* 215, 322, (1967).
- Hanel, H. K., Mongensen, J. V., Urea inhibition of human pseudocholinesterase, a new method of detecting atypical pseudocholinesterase in homozygotes. *Brit. J. Anaesth.* 43, 51, (1971).
- Harris, H., Hopkinson, D. A., Robson, E. B. Two dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. *Nature*, 196, 1296 (1962).
- Harris, H., Robson, E. B. Fractionation of human serum cholinesterase components by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta*, 73, 649 (1963).
- Harris, H., Whittaker, M. The serum cholinesterase variants a study of 22 families selected via the intermediate phenotype. *Ann. Hum. Genet.*, 26, 59 (1962).



- Harris, H., Whittaker, M. Differential inhibition of serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature*, 191, 496 (1961).
- Harris, H., Whittaker, M. Differential inhibition of "usual" and "atypical" serum cholinesterase by sodium chloride and sodium fluoride. *Ann. Human. Genet.* 27, 53 (1963).
- Harris, H., Hopkinson, D. A., Robson, E. B., Whittaker, M. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. Human. Genet.* 26, 859 (1963).
- Harris, H., Robson, A. M., Glen-Bott, A. M., Thompson, J. A. Evidence for non allelism between genes affecting human serum cholinesterase. *Nature*, 200, 1185 (1963).
- Harris, H., Whittaker, M., Lehman, H., Silk, E. The pseudocholinesterase variants. Esterase levels and dibucaine numbers in families selected through suxamethonium sensitive individuals. *Acta. Genet. Stat. Med.* 10, 1 (1960).
- Haupts, V. D., Heide, K., Zwisler, O., Schwick, H. G. Isolierung und physikalisch-chemische charakterisierung der cholinesterase aus human serum. *Blut.* 14, 65 (1963).
- Hodgkin, W. E., Giblett, E. R., Levine, H., Bauer, E. W., Motulsky, A. G. Complete pseudocholinesterase deficiency: genetic and immunologic characterisation. *J. Clin. Invest.* 44, 486 (1965).
- Hunt, A. H., Lehmann, H., Serum Albumin, pseudocholinesterase and transaminases in the assessment of liver function before and after venous shunt operations. *Genet.* 1, 303 (1960).
- Jenkins, T., Balinsky, T., Patient, D. W. Cholinesterase in plasma: first reported absence in the Bantu, half life determination. *Science.* 156, 1748 (1967).
- Kalow, W. and Lindsay, H. A. A comparison of optical and manometric method for the assay of human serum cholinesterase. *Canad. J. Physiol.* 33, 568 (1955).
- Kalow, W. Cholinesterase types; in *Ciba Foundation Symposium on Biochemistry of human Genetics*, ed by E. G. W. Wolstenhulme and C. M. O'Connor, Churchill, London, 1960.
- Kalow, W. and Davies, R. O. The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* 1, 183 (1958).
- Kalow, W. and Genest, K. A method for the detection of atypical forms of human cholinesterase: determination of dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 339 (1957).
- Kalow, W. Contribution of hereditary factors to the response of drugs. *Fed. Proc.* 24, 1259 (1965).
- Kalow, W. and Staron, N. On the distribution and the inheritance of atypical forms of human serum cholinesterases as indicated by dibucaine numbers. *Canad. J. Biochem. Physiol.* 35, 1305 (1957).
- Kalow, W. and Gunn, D. R. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. *Ann. Human. Genet.* 23, 239 (1959).
- Kattamis, C., Zannos-Manolea, L., Franco, A. P., Liddell, J., Lehmann, M., Davies, D. Frequency of atypical pseudocholinesterase in British and Mediterranean populations. *Nature*, 196, 599 (1962).
- Kaufman, L., Lehmann, H., Silk, E. Suxamethonium apnoea in an infant. Expression of familial pseudocholinesterase deficiency in three generations. *Br. Med. J.* 1, 166 (1960).



- King, J. and Morgan, M. G. The temperature activity relationships of serum cholinesterases. *J. Clin. Pathol.* 23, 270 (1970).
- Kunkel, M. G. and Ward, S. M. Plasma esterase activity in patients with liver disease and nephrotic syndrome. *J. Exp. Med.* 86, 325 (1947).
- La Du, B. N. Plasma esterase activity and the metabolism of drugs with ester groups. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 179, 684 (1971).
- La Du, B. N. and Dewald, B. Genetic regulation of plasma cholinesterase in man. En: *Advances in enzyme regulation*. Ed. G. Weber. N. Y. Pergamon Press, 1971, vol. 9, p. 317.
- La Motta, R. V., Woronick, C. L. Reinfrank, R. Multiple forms of serum cholinesterase: molecular weights of isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 448 (1970).
- Lehmann, H. and Ryan, E. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*, 2, 124 (1956).
- Lehmann, H., Pakton, V., Ryan, E. The inheritance of an idiopathic low plasma pseudocholinesterase level. *J. Clin. Pathol.* 11, 554 (1958).
- Lehmann, H., Silk, E., Liddell, J. Pseudocholinesterase. *Brit. Med. Bull.* 17, 230 (1961).
- Lehmann, H., Liddell, J., Blackwell, B., O'Connor, D. C., Daws, A. V. Two further serum pseudocholinesterase phenotypes as causes of suxamethonium apnoea. *Brit. Med. J.* 1, 1116 (1963).
- Lehmann, H. and Liddell, J. The cholinesterase variants. En: *The metabolic basis of inherited disease*. Ed. Stanbury, J. B., Wingaarden, J. B. Fredrickson, D. S. Mc Graw-Hill. p. 1730, 1972.
- Lehmann, H. and Liddell, J. Human cholinesterase (pseudo cholinesterase). Genetics variants and their recognition. *Brit. J. Anaesth.* 41, 235 (1969).
- Lehmann, H., Silk, E., Harris, H., Whittaker, M. A new pseudocholinesterase phenotype? *Acta Genet.* 10, 241 (1960).
- Liddell, J., Lehmann, H., Davies, D. Harris and Whittaker. A pseudocholinesterase variant with increased resistance to fluoride: a study of four families and identification of the homozygote. *Acta Genet.* 13, 95 (1963).
- Liddell, J., Lehmann, H., Davies, D., Sharih, A. Physical separation of pseudocholinesterase variants in human serum. *Lancet*, 1, 643 (1962).
- Liddell, J., Lehmann, H., Silk, E. A "silent" pseudocholinesterase gene. *Nature*, 193, 1361 (1962).
- Morrow, A. and Motulsky, A. G. Population genetics of pseudocholinesterase variants. *Clin. Res.* 13, 266 (1965).
- Motulsky, A. G. and Morrow, A. Atypical cholinesterase gene  $E^s_1$ : rantly in Nodroes and most orientals. *Science*. 202, (1968).
- Motulsky, A. G. Pharmacogenetics. En: *Progress in Medical Genetics*, vol. III, edited by Steinburg, A. G., Grunc and Stratton, N. Y. 1964.
- Neitlich, H. W. Increased plasma cholinesterase activity and succinylcholine resistance: a genetic variant. *J. Clin. Invest.* 45, 380 (1966).
- Robson, E. M. and Harris, H. Further data on the incidence and genetics of the 205, 726 (1965).
- Omoto, K. and Goedde, H. W. Pseudocholinesterase variants in Japan. *Nature*, serum cholinesterase phenotype  $C_3^+$ . *Ann. Human. Genet.* 29, 203 (1966).
- Robson, E. B., Sutherland, O., Harris, H. Evidence for linkage between the transferrin locus (Tf) and the serum cholinesterase locus (E) in man. *Ann. Human. Genet.* 29, 325 (1966).

- Rose, L., Davies, D. A., Lehmann, H. Serum pseudocholinesterase in depression with notable anxiety. *Lancet*, **11**, 563 (1965).
- Rubinstein, H. M., Dietz, A. A., Hodges, L. K., Subrano, T. R., Czebotar, V. Silent cholinesterase gene. Variations in the properties of serum enzyme in apparent homozygotes. *J. Clin. Invest.* **49**, 479 (1970).
- Scott, A. M. Properties of the trace enzyme in human serum cholinesterase deficiency. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 902 (1970).
- Scott, E. M. Inheritance of two types of deficiency of human serum cholinesterase. *Ann. Human. Genet.* **37**, 139 (1973).
- Simpson, N. E. and Kalow, W. The silent gene for serum cholinesterase. *Amer. J. Human. Genet.* **18**, 243 (1964).
- Simpson, N. E. Factors influencing cholinesterase activity in a Brazilian population. *Amer. J. Human. Genet.* **18**, 243 (1966).
- Steegmüller, H. On the geographical distribution of the pseudocholinesterase variants. *Humangenetik*, **26**, 167 (1975).
- Surgenor, M. D. and Ellis, D. Preparation and properties of serum plasma proteins. Plasma cholinesterase. *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 6049 (1954).
- Swift, M. R. and La Du, B. N. A rapid screening test for atypical serum cholinesterase. *Lancet*, **1**, 513 (1966).
- Tashian, R. E., Brewer, G. Y., Lehmann, H., Davies, D. A., Rucknagel, D. L. Further studies on the Xavante Indians. *Amer. J. Human. Genet.* **19**, 524 (1967).
- Thompson, J. C. and Whittaker, M. A study of pseudocholinesterase in 70 cases of apnoea following suxamethonium. *Acta. Genet.* **16**, 209 (1966).
- Tortolero, M.<sup>2</sup> y Medina, J. R. El componente C<sub>5</sub> de la pseudocolinesterasa humana. *Sangre*, **22**, 5 (1977).
- Van Ros, G. and Druet, R. Uncommon electrophoretic patterns of serum cholinesterase. *Nature*, **212**, 543 (1966).
- Waterlow, J. Liver choline-esterases in mal nourished infants. *Lancet* **1**, 908 (1950).
- Whittaker, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with n-butyl-alcohol: recognition of new phenotypes. *Acta. Genet.* **18**, 335 (1968).
- Whittaker, M. The pseudocholinesterase variants: differentiation by means of alkyl alcohols. *Acta.* **18**, 325 (1968).
- Whittaker, M. The pseudocolinesterase variants: esterase levels and increased resistance to fluoride. *Acta. Genet.* **14**, 281 (1964).
- Whittaker, M. An additional pseudocholinesterase phenotype occurring in suxamethonium apnoea. *Brit. J. Anaesth.* **40**, 579 (1968).
- Wilson, I. B. The active surface of serum esterase. *J. Biol. Chem.* **208**, 123 (1954).
- Yoshida, A., and Motulsky, A. G. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. *Amer. J. Human. Genet.* **21**, 486 (1969).



