

R. 8257

UNIVERSIDAD DE SEVILLA 7-434
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 144 número 159 del libro
correspondiente.

Sevilla,

14 MAR. 1991
El Jefe del Negociado de Tesis,

Alena Saffette

FACULTAD DE FARMACIA

INHIBICION DE LAS COLINESTERASAS HUMANAS POR METOCLOPRAMIDA
Y BROMOPRIDE: CONSECUENCIAS Y PROPUESTA DE UN NUEVO
MECANISMO DE ACCION.

Tesis doctoral presentada por:

Manuel Martín Ruiz


U N I V E R S I D A D D E S E V I L L A

1991

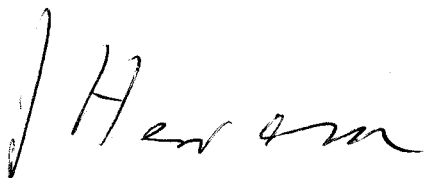
A mi esposa y a mis hijos:
Manuel y M^a Inmaculada

M E M O R I A presentada en la Facultad de Farmacia de
la Universidad de Sevilla, para aspirar
al grado de Doctor en Farmacia, por
Manuel Martín Ruiz.

Fdo.: Manuel Martín Ruiz

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Manuel Martín Ruiz', written over a horizontal line.

El presente trabajo ha sido realizado bajo la dirección
de:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Joaquín Herrera Carranza', written over a horizontal line.

Dr. Joaquín Herrera Carranza
Profesor Titular de Universidad
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, durante los cursos académicos 1987/1988, 1988/1989, 1989/1990 y 1990/1991.

Deseo expresar mi agradecimiento:

A la Profa. D^a Elisa Marhuenda Requena, por acogerme en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, del cual es directora.

Al Prof. D. Joaquín Herrera Carranza, por su docta dirección y entrega en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. D. Teófilo Palomo Gallardo, Analista Clínico y Jefe de Servicio del Banco de Sangre del Hospital Regional de Oncología "Duques del Infantado", por su valioso apoyo, colaboración y amistad.

A D^a Josefina Toro Gómez, Auxiliar de laboratorio y a D^a Margarita Muñoz Ulecia, A.T.S., por la inestimable ayuda que me han prestado.

A todos los compañeros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla.

A todos los compañeros de Moron de la Fra. relacionados con la sanidad, que en mayor o menor grado han contribuido a la realización de este trabajo.

A D. David Garcia-Villalon Hernandez, Quimico, y a D. David Lebron Parejo, Economista, por su asesoramiento en el aspecto informático.

A la casa comercial Boehringer Manhein GmbH, y en especial a D. Marcelo Fosalba Estruch, Dtor. del Departamento Científico de Diagnóstica, por su interés y cooperación.

A los laboratorios Delagrange, S.A., Hoechst Ibérica, S.A. y Schering-Plough, S.A., que desinteresadamente han proporcionado bibliografía y materiales.

ABREVIATURAS

ACHE	Acetilcolinesterasa
CHE	Colinesterasa sérica
DE-50	Dosis eficaz 50
DTNB	Acido 5.5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico
FDA	Food and Drug Administration
I-50	Concentración de inhibidor que produce el 50 % de inhibición
LH	Hormona luteinizante
Nº D	Número de dibucaina
Nº M	Número de metoclopramida
Nº B	Número de bromopride
P	Coefficiente de partición octanol/agua
r.p.m.	revoluciones por minuto
SNC	Sistema nervioso central

S U M A R I O

- I. INTRODUCCION

- II. MATERIAL Y METODOS

- III. RESULTADOS

- IV. GRAFICAS Y TABLAS

- V. DISCUSION

- VI. CONCLUSIONES

- VII. BIBLIOGRAFIA

INDICE

I.- INTRODUCCION	1
PRIMERA PARTE: COLINESTERASAS	2
I.1.- ASPECTOS GENERALES	2
I.1.1.- HISTORIA	3
I.1.2.- LOCALIZACION	5
I.1.3.- ESTRUCTURA	8
I.1.4.- ACCION ENZIMATICA:	
SUSTRATOS Y CENTRO ACTIVO	10
I.1.5.- FUNCION EN EL ORGANISMO	17
I.2.- ASPECTOS ANALITICOS	23
I.2.1.- SIGNIFICADO CLINICO DE LA	
DETERMINACION	24
I.2.1.1.- Colinesterasas y función hepática..	24
I.2.1.2.- Colinesterasas e intoxicación	
por organofosforados	25
I.2.1.3.- Colinesterasas en otros estados	
patológicos	27
I.2.1.4.- Colinesterasas y anestesia:	
variantes genéticas	28

I.2.2.- METODOS ANALITICOS	35
I.2.2.1.- Determinación de la acetil- colinesterasa	35
I.2.2.2.- Determinación de la colinesterasa sérica	42
I.2.2.3.- Determinación de las variantes genéticas	46
I.3.- INHIBIDORES DE LAS COLINESTERASAS	52
I.3.1.- INHIBICION ENZIMATICA:	
MECANISMO DE ACCION	53
I.3.1.1.- Inhibición competitiva	54
I.3.1.2.- Inhibición acompetitiva	55
I.3.1.3.- Inhibición no competitiva	56
I.3.2.- AGENTES ANTICOLINESTERASA	57
I.3.3.- REACTIVADORES DE LAS COLINESTERASAS ...	62
SEGUNDA PARTE: ESTIMULANTES DE LA MOTILIDAD	
GASTROINTESTINAL Y ANTIEMETICOS	64
I.4.- ASPECTOS GENERALES	64
I.4.1.- FARMACOLOGIA DE LA MOTILIDAD GASTRO-	
INTESTINAL: ESTIMULANTES.....	64
I.4.1.1.- Regulación de la motilidad gastrointestinal	65
I.4.1.2.- Sistemas de neurotransmisión	68

I.4.1.3.- Fármacos reguladores de la motilidad gastrointestinal	70
I.4.2.- FARMACOLOGIA DEL VOMITO: ANTIEMETICOS..	72
I.5.- METOCLOPRAMIDA	75
I.5.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	75
I.5.2.- FARMACODINAMIA	77
I.5.2.1.- Acciones gastrointestinales	77
I.5.2.2.- Mecanismo de las acciones gastrointestinales	82
I.5.2.3.- Acción antieméticas	87
I.5.2.4.- Mecanismo de la acción antiemética.	88
I.5.2.5.- Otras acciones farmacológicas	89
I.5.3.- FARMACOCINETICA	90
I.5.4.- INDICACIONES TERAPEUTICAS	92
I.5.5.- EFECTOS SECUNDARIOS	93
I.5.6.- INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS	94
I.6.- BROMOPRIDE	96
I.6.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES	96
I.6.2.- FARMACODINAMIA	98
I.6.2.1.- Acciones gastrointestinales	98
I.6.2.2.- Mecanismo de las acciones gastrointestinales	101
I.6.2.3.- Acción antiemética	102
I.6.2.4.- Mecanismo de la acción antiemética.	103

I.6.2.5.- Otras acciones	104
I.6.3.- FARMACOCINETICA	106
I.6.4.- INDICACIONES TERAPEUTICAS	108
I.6.5.- EFECTOS SECUNDARIOS	108
I.6.6.- INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS	109
OBJETIVOS	110
II.- MATERIAL Y METODO	112
II.1.- MUESTRAS UTILIZADAS	113
II.1.1.- SUERO HUMANO	114
II.1.2.- HEMOLIZADO DE ERITROCITOS HUMANOS ...	115
II.2.- REACTIVOS UTILIZADOS	116
II.3.- APARATOS Y MATERIAL UTILIZADOS	118
II.4.- PROCEDIMIENTOS ANALITICOS	119
II.4.1.- DETERMINACION DE LA COLINESTERASA	
SERICA	121
II.4.2.- DETERMINACION DE LA ACETILCOLINESTE-	
RASA INTRAERITROCITARIA	123
II.4.3.- DETERMINACION DE CHE Y ACHE EN	
PRESENCIA DE INHIBIDOR	125
II.4.4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CHE	
Y ACHE VARIANDO LA CONCENTRACION DE	
SUSTRATO	127
II.4.5.- DETERMINACION DE VARIANTES	
GENETICAS DE LA CHE	128

III.- RESULTADOS	130
PRIMERA PARTE : EFECTO Y ESTUDIO DE SU MECANISMO...	132
III.1.- EFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA SOBRE LA CHE Y ACHE.....	132
III.1.1.- COLINESTERASA SERICA	133
III.1.2.- ACETILCOLINESTERASA	135
III.2.- INHIBICION TOTAL DE LA CHE Y ACHE POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA	136
III.2.1.- COLINESTERASA SERICA	137
III.2.2.- ACETILCOLINESTERASA	139
III.3.- RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA CHE Y ACHE DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA	140
III.3.1.- COLINESTERASA SERICA	140
III.3.2.- ACETILCOLINESTERASA	143
III.4.- TIPO DE INHIBICION EJERCIDA POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA SOBRE LA CHE Y LA ACHE	145
III.4.1.- COLINESTERASA SERICA	145
III.4.2.- ACETILCOLINESTERASA	147

SEGUNDA PARTE: VARIANTES GENETICAS DE LA

COLINESTERASA SERICA	149
III.5.- ENSAYOS REALIZADOS CON CHE NORMALES	
Y ATIPICAS	149
IV.- TABLAS Y GRAFICAS	151
V.- DISCUSION	227
VI.- CONCLUSIONES	267
VII.- BIBLIOGRAFIA	271

I. - INTRODUCCION

Introducción

Se tratará en primer lugar las colinesterasas en un sentido genérico, las distintas metodologías analíticas y los inhibidores de dichas enzimas, estudiándose, en una segunda parte, aquellos fármacos que estimulan la motilidad gastrointestinal y más concretamente la metoclopramida y el bromopride. La interferencia de estos dos fármacos en la cinética enzimática de las colinesterasas humanas y las consecuencias que de ella se derivan, será el motivo de nuestro trabajo.

PRIMERA PARTE : COLINESTERASAS.

I.1.- ASPECTOS GENERALES.

Las colinesterasas son enzimas pertenecientes al grupo de las esterasas que catalizan la hidrólisis de los ésteres de colina, produciendo dicha base y el correspondiente ácido orgánico.

Se acepta actualmente la existencia de dos tipos de colinesterasas: la acetilcolinesterasa o acetilcolina hidrolasa (ACHE) (EC 3.1.1.7) y la colinesterasa, butirilcolinesterasa o acilcolina acilhidrolasa (CHE) (EC 3.1.1.8). La primera hidroliza de manera selectiva acilésteres de cadena corta, especialmente acetilésteres, como el neurotransmisor acetilcolina. De ahí su papel básico en el sistema nervioso y en la coyunturas neuromusculares. La segunda es menos específica, pudiendo hidrolizar diferentes ésteres alifáticos, aromáticos, y ésteres alquílicos de ácidos grasos de cadena corta. Asimismo, ambas difieren en su función y localización en el organismo como describiremos más adelante.

I.1.1.- HISTORIA.-

El primero en sugerir la presencia de una enzima en la sangre, que catalizaba la hidrólisis de los ésteres de colina, fue Dale (1) en el año 1914, al observar la acción de la acetilcolina en el corazón de rana.

Se describían por aquella época la presencia de esterases en muchos tejidos animales, no existiendo razón para pensar que la acetilcolina escapase excepcionalmente a la acción de dichas enzimas. Y así en 1932, Stedman y col.(2) iniciaron la búsqueda de la enzima responsable de la hidrólisis del éster colina, al encontrar que las esterases hepáticas eran incapaces de actuar sobre la acetilcolina. Describieron y purificaron por primera vez una enzima, presente en el suero de caballo, que catalizaba dicha hidrólisis. Llamaron a esta enzima "colina-esterasa", denominación que ha permanecido hasta hoy.

Durante el transcurso de años posteriores existió una cierta confusión. Ello era debido a que las enzimas obtenidas de distintos órganos, capaces de hidrolizar la acetilcolina, presentaban actividades óptimas a diferentes concentraciones de sustrato. Alles y Hawes (3) en 1940 adelantaron una explicación a este fenómeno demostrando la existencia de dos colinesterasas: la primera, cuya actividad fue máxima a bajas concentraciones de sustrato y era inhibida por un exceso de éste, se encontraba en los eritrocitos humanos; y la segunda, cuya actividad incrementaba con todos los

rangos de sustrato estudiados, estaba presente en el suero.

En trabajos posteriores, Mendel and Rudney (4) en 1943, usando enzimas purificadas sugirieron que la colinesterasa eritrocitaria era específica de los ésteres de colina, designándola "colinesterasa verdadera", mientras que la enzima sérica fue denominada "pseudocolinesterasa".

Pero, de hecho, ambas enzimas son en algún grado inespecíficas, y estos nombres no son recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada y la Unión Internacional de Bioquímica (5). Sí son aceptados, en cambio, los nombres de acetilcolinesterasa y colinesterasa para la enzima presente en los eritrocitos y en el suero, respectivamente.

I.1.2.- LOCALIZACION.-

Ambas enzimas aparecen en animales vertebrados, pero además, la ACHE se encuentra en los invertebrados y

la CHE ha sido hallada en microorganismos y determinados tejidos de plantas.

La ACHE se localiza generalmente en las membranas de los tejidos. En el organismo humano se detecta en los hematíes, materia gris del cerebro, fluido amniótico, placenta, pulmón, bazo y en las terminaciones de las células nerviosas. El tejido excitable de los animales es una fuente rica de esta enzima, por ello han sido estudiados y utilizados con este fin los órganos eléctricos de Electrophorus electricus y Torpedo marmorata (6).

La CHE se sintetiza en el hígado y está emplazada en casi todos los sistemas mayores del organismo incluyendo la materia blanca cerebral, el sistema vascular, respiratorio, digestivo, urogenital y también ciertas glándulas endocrinas y exocrinas, además de en el suero (7).

Centrándonos en el sistema digestivo, Sine y col.(8) en 1989 demostraron la presencia de la CHE en las células de la mucosa intestinal de pollo por métodos histoquímicos. Dichos autores hicieron el estudio de

distribución a lo largo del intestino, desde el duodeno al recto, obteniendo como resultado que la mayor actividad enzimática estaba localizada en el tramo yeyuno-íleon. Asimismo y mediante gradientes de centrifugación observaron dos formas globulares con coeficientes de sedimentación de 4.3 S (forma G1) y 10.8 S (forma G4). El cociente G1/G4 decrecía progresivamente en el intestino, desde el duodeno al recto, indicando un predominio de la forma G4 en aquellas áreas donde la actividad de la enzima era menor.

En cuanto al sistema nervioso central, Brimijoin y Hammond (9) en 1988 investigaron la ubicación de la ACHE y la CHE en el cerebro y plasma humano por métodos inmunológicos, marcadamente más específicos que los ensayos convencionales. Los resultados presentaron que el plasma humano contiene cantidades muy pequeñas de ACHE (8 ng/ml), frente a niveles considerablemente mayores de CHE (3300 ng/ml). No se detectó inmunorreactividad para ésta última en los hematíes, pero si se encontró en todas las regiones del cerebro. El cerebelo fue la región más rica en CHE (540 ng/g de tejido), mientras que la corteza cerebral fue la más pobre (240 ng/g de tejido). No obstante, existía un

predominio de esta enzima a nivel cortical sobre la ACHE cuyo contenido era menor en esta región del cerebro (99 ng/g de tejido). En cambio en el putamen ocurría lo contrario, la concentración de ACHE (6100 ng/g de tejido) sobrepasaba ampliamente la de CHE (340 ng/g de tejido).

I.1.3.- ESTRUCTURA.-

Según Masoulié y Bon (10) la ACHE se presenta en dos clases de formas moleculares: oligómeros simples (monómeros, dímeros y tetrameros) de una subunidad catalítica de 70.000 daltons, y formas elongadas de estructuras moleculares complejas. Los oligómeros simples contienen a menudo una superficie hidrófoba y se encuentran asociados a la membrana plasmática. Las formas elongadas consisten en tetrameros de la subunidad catalítica pero, a su vez, los tetrameros están ligados en grupos de tres por uniones disulfuro a una estructura filamentosa. El peso molecular de estas formas se acerca a 1.000.000 daltons y su estructura es análoga a globos unidos a un tallo ramificado (11).

La molécula de CHE es un tetramero de cuatro subunidades catalíticas idénticas con un peso molecular total de 342.136 daltons. Cada unidad menor lleva unida una cadena de carbohidrato y se compone de 574 aminoácidos que suponen un peso molecular de 65.092 daltons (12).

Ambas enzimas son de naturaleza glucoprotéica y mediante estudios de aislamiento y purificación se ha podido conocer la sucesión de aminoácidos que componen las subunidades protéicas. En éstas se encuentran los centros activos que habrán de recibir a los sustratos o inhibidores en la catálisis enzimática.

Existen ocho aminoácidos de cisteína en cada subunidad, de los cuales, seis forman tres puentes disulfuro internos (13). El número de aminoácidos entre cada uno de los puentes disulfuro es exactamente el mismo en la CHE humana que el existente en la ACHE del genero Torpedo (14).

Tanto la ACHE como la CHE no son enzimas homogéneas, sino más bien un conjunto de diferentes isoenzimas, cuyo estudio se ha llevado a cabo por

métodos electroforéticos, cromatográficos y de sedimentación en gradientes de densidad.

Se ha de mencionar aquí la existencia de variantes genéticas de la CHE, las cuales presentan diferente estructura y actividad. Estas han adquirido especial relieve por su detección en anestesia y serán consideradas más adelante dentro del significado clínico de la determinación analítica de la CHE.

I.1.4.- ACCION ENZIMATICA : SUSTRATOS Y CENTRO ACTIVO.-

Como hacíamos alusión al principio del trabajo, la ACHE tiene como sustrato selectivo acilésteres de cadena corta, especialmente acetilésteres. A diferencia de la CHE, no hidroliza la butilirilcolina ni la benzoilcolina pero sí la beta-metil-acetilcolina (6). La enzima eritrocitaria queda inhibida por su sustrato, la acetilcolina, a concentraciones superiores a 10 mM, mientras que la enzima sérica no es inhibida por los suyos.

La CHE es mucho menos específica y su afinidad por

el sustrato butirilcolina es dos veces mayor a la que presenta por la acetilcolina. La actividad hidrolítica sobre la butiril, valeril, propionil, acetil, alfa-etilbutiril y alfa-metilbutiril es decreciente en ese orden (15).

La interacción de estos sustratos con la enzima va a tener lugar en el centro activo, situado, como señalábamos precedentemente, en las subunidades catalíticas de estas enzimas.

En general, el centro activo de la ACHE y de la CHE consiste en un **subsitio negativo** o **aniónico**, que atrae a grupos cuaternarios, como el de la colina, mediante fuerzas culómbicas e hidrófobas, y en un **subsitio esterático**, donde el ataque nucleofílico se produce sobre el acil carbono del sustrato (Fig. A).

El mecanismo catalítico se parece al de otras esterases de serina donde un grupo hidroxilo se hace muy nucleofílico por un sistema de carga-descarga que incluye la estrecha aposición de un grupo imidazol y presumiblemente un grupo carboxilo en la enzima. Durante el ataque enzimático sobre el éster se forma un

intermediario tetraédrico entre la enzima y el éster que por colapso da, en el caso del sustrato acetilcolina, un conjugado de acetil enzima con liberación simultánea de colina. La acetil enzima es lábil a la hidrólisis, produciéndose la formación de acetato y de enzima activa (16).

Además del sitio aniónico y el esterático ha sido bien establecida la presencia de un **sitio hidrofóbico** (17,18,19). Al primero se unen derivados de amonio y cationes metálicos, existiendo además los **sitios aniónicos periféricos** o moduladores, relacionados con él y que parecen intervenir en la regulación del mecanismo catalítico. Por el sitio hidrofóbico se unen al enzima sustratos aromáticos, como el acetato de fenilo, ésteres alifáticos de cadena ramificada, como el acetato de isoamilo, y finalmente hidrocarburos aromáticos.

Kabachnik y col. (20), mediante una serie de estudios con inhibidores organofosforados, define para la CHE dos áreas hifrofóbicas separadas en el sitio aniónico. Una de ellas situada alrededor de éste, en su parte interna (A1), y la otra fuera y cercana a él (A2). La función del área A1 es interaccionar con los grupos

metilos unidos al nitrógeno de la butirilcolina. La denominada A2 puede acomodar una cadena de seis carbonos y es una configuración espacial complementaria de un grupo terbutilo. Además existen dos áreas hidrofóbicas pequeñas en la vecindad del sitio esterático. La longitud total de ellas corresponde a una cadena de siete átomos de carbono de estructura ramificada y no fija grupos butilos terciarios. El esquema que representa las áreas hidrofóbicas puede observarse en la Figura B.

Determinados trabajos describen la importancia de estas zonas hidrofóbicas, relacionando la potencia de inhibición de algunos compuestos con el coeficiente de partición entre un disolvente orgánico y agua.

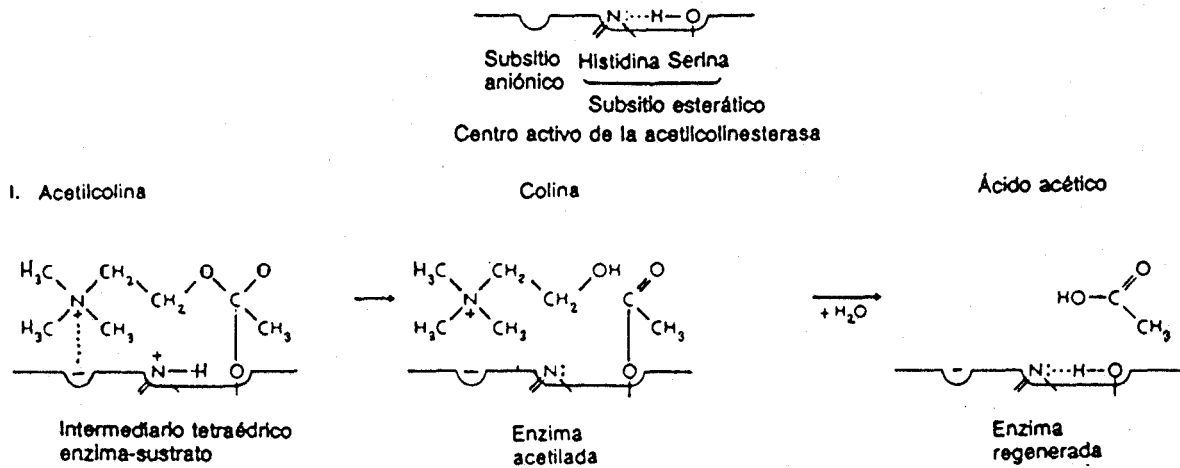
En esta línea, Jarv y Speck (21) en 1982 investigaron la inhibición reversible de la CHE por una serie de compuestos aromáticos hidrocarbonados. Dichos autores encontraron una buena relación lineal entre el carácter hidrofóbico y las constantes de inhibición de los compuestos aromáticos ensayados. Destaquemos aquí como ejemplo el benceno, cloro-benceno y el 1,4 dicloro-benceno. En este orden, su constante de inhibición

disminuye mientras que su hidrofobicidad se ve aumentada.

Del mismo modo, Pérez-Guillermo y col.(22) en 1987 ensayaron y caracterizaron la inhibición producida por determinados anestésicos locales sobre la colinesterasa plasmática y la acetilcolinesterasa del músculo de conejo. Encontraron que la potencia de inhibición de los compuestos ensayados era directamente proporcional al coeficiente de partición octanol-agua.

Estudios de reactividad de una serie de compuestos dieron como resultado un modelo para la ACHE, en el cual el grupo activo catalítico estaba localizado en el fondo de una grieta de la proteína y limitado por paredes hidrofóbicas. La longitud de este hueco daba lugar al área hidrofóbica de unión del sustrato, no acogiendo grupos más largos que el acetato de n-butilo. Por el contrario, la cavidad de la CHE resulta ser bastante más ancha, pudiendo acomodar ésteres de colina aromáticos (benzoilcolina) e hidrocarburos aromáticos (antraceno, bifenilo) (23).

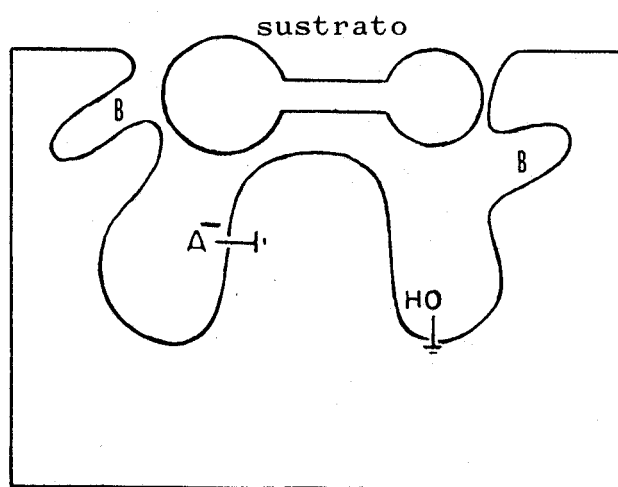
FIGURA A



- Centro activo de la ACHE e hidrólisis de la acetilcolina.

Tomado de: Taylor, P.: Agentes anticolinesterasa. En: Goodman, A.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; et al.: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Panamericana. Madrid, 1986.

FIGURA B



Areas hidrofóbicas en la superficie activa de la colinesterasa. (A_1, A_2, E_1, E_2). Arriba: B (bolsillos hidrofóbicos)

(OH)= sitio esterático (-)= sitio aniónico

Diferencias en la longitud y estructuras de las áreas hidrofóbicas de las superficies activas de la ACHE y la CHE pueden ser las responsables de las diferentes propiedades de ambas enzimas (5).

I.1.5.- FUNCION EN EL ORGANISMO.-

Se ha establecido bien que la función de la ACHE es la hidrólisis de la acetilcolina en todos los emplazamientos de la transmisión nerviosa colinérgica (Fig. C), mientras que el papel fisiológico fundamental de la CHE es casi desconocido, así como sus sustratos naturales o inductores.

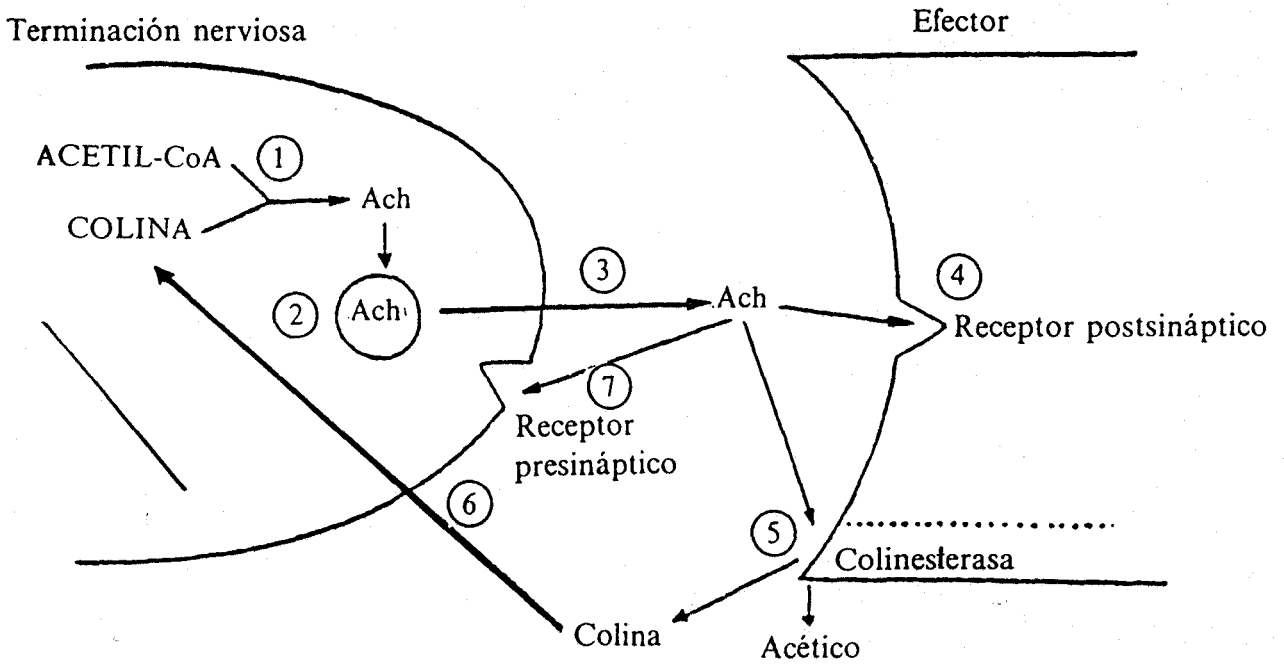
Mediante estudios de corriente iónica en la membrana postsináptica realizados con inhibidores se pudo observar el bloqueo del acceso de acetilcolina a los sitios activos de sus receptores. Tales hechos confirman la idea de que la ACHE puede controlar la corriente iónica producida en la membrana postsináptica de la sinapsis colinérgica por hidrólisis de la acetilcolina, potenciando o disminuyendo los efectos de ésta en el receptor (6).

Otros estudios sugieren que la ACHE puede también ayudar a regular los niveles de almacenamiento de la acetilcolina en la sinapsis, aportando colina procedente de la hidrólisis para resintetizar de nuevo el transmisor (6).

Abramson y col.(24) en 1989 , por diferencia de reactividad con anticuerpos, encuentran dos formas moleculares estructuralmente distintas en el órgano eléctrico de Torpedo californica. Una es dimensionalmente asimétrica y compuesta de subunidades heterólogas, mientras que la otra es hidrofóbica y compuesta de subunidades homólogas. La diferente distribución en la placa nerviosa terminal sugiere que las dos formas de ACHE pueden desempeñar papeles diferentes en la regulación de la concentración local de acetilcolina en la sinapsis.

No está bien definido el papel de la ACHE en la membrana de los eritrocitos. No obstante, hay algunos autores que sugieren una posible actuación en el transporte iónico y en la rigidez de la membrana (6).

FIGURA C



Esquema de la transmisión sináptica colinérgica.

Tomado de: Velasco, A.; Alvarez, F.: Compendio de Psiconeurofarmacología. Díaz Santos, S.A. Madrid, 1988.

En cuanto a la CHE, se pensó en un principio que, por ser una enzima diferente a la ACHE, no estaba implicada en la regulación de la transmisión nerviosa. Sin embargo, diversos hechos parecen implicarla en este fenómeno biológico: 1) la CHE es capaz de hidrolizar ésteres de colina que se comportan como inhibidores de la ACHE en la placa neuromuscular (25); 2) La CHE se localiza en el sistema nervioso central en íntima conexión con la ACHE, así como en el sistema nervioso periférico (26). Este argumento es apoyado por el trabajo de Brimijoin y Hammond (9), al que hacíamos referencia en el apartado I.1.2.

De acuerdo con el primer punto, es bastante lógico el razonamiento de Lehman y Silk (27), los cuales sugieren que el principal papel fisiológico de la CHE sería el de proteger o regular la acetilcolinesterasa, hidrolizando aquellos ésteres de colina que pudieran inhibirla.

En consonancia con el segundo apartado, y debido a la presencia de dicha enzima en las células de Schwann de muchos nervios y entre los pliegues de mielina de algunos axones centrales, se apuntó la idea de que podía

desempeñar una función de mantenimiento de la capa de mielina. La propuesta fue hecha por Earl y Tothompson (28) al observar que un determinado número de compuestos organofosforados inhibidores de la CHE producían desmielinización cuando se daban en cantidad suficiente como para inhibir la enzima.

Hardelo (29) en 1984 mantiene la idea de que la CHE podría estar implicada en el mantenimiento de la función de la barrera hematoencefálica, habiéndosela localizado por métodos histoquímicos en los espacios perivasculares del SNC.

Algunos autores apoyan que la enzima desempeña un papel esencial en los procesos de conducción nerviosa lentos (30).

Otros estudios han sido encaminados a probar la hipótesis de que la CHE fuese un precursor de la ACHE. En ellos se comparó la tasa de regeneración de la ACHE ganglionar seguida a 1) inactivación irreversible de ambas enzimas; 2) inactivación selectiva de ACHE preservando una alta proporción de CHE; 3) Inactivación de ambas enzimas seguida de una supresión continuada de

la CHE. Los resultados no fueron del todo concluyentes y quedaron algunas cuestiones por contestar (31).

Funnell y Oliver (32) propusieron que la CHE podía estar relacionada con el mecanismo de control de los niveles de colina en plasma y, como consecuencia, las tasas de acetilcolina. Se consideró, que bajo ciertas condiciones experimentales, la síntesis de acetilcolina era dependiente de la disponibilidad de colina libre. Ya que la CHE estaba involucrada en la hidrólisis de los ésteres de colina, podía por tanto controlar la colina plasmática y la acetilcolina.

Otra función formulada para la CHE es la de intervenir en el metabolismo lipídico. Refuerzan esta teoría los estudios de Chu y col (33), los cuales implican a esta enzima en el metabolismo de las lipoproteínas, y más concretamente en las de baja densidad. No obstante, son necesarias más pruebas para determinar cual es el papel exacto de la CHE en este campo.

También se advierte un significativo descenso en la actividad de la CHE sérica y hepática del hombre tras el

ayuno, así como un paralelo incremento con la ingesta de alimentos en niños con un estado de nutrición bajo. Por tales motivos se sustentó una conexión existente entre la CHE y la asimilación de alimentos (34).

Jamieson (35), en una serie de estudios efectuados, relaciona a la CHE con la motilidad intestinal.

Finalmente, existe una serie de autores que asignan a la CHE una función relacionada con la eliminación de sustancias tóxicas producidas en el metabolismo de los ácidos grasos. Así la butirilcolina formada a partir de la butiril CoA en dicho metabolismo sería destruida por la CHE, evitando así su efecto nocivo por acumulación (31). En este orden de acción frente a elementos dañinos, parece desempeñar un cierto papel ante la intoxicación por determinados fármacos, como el ácido acetilsalicílico y la procainamida (36).

I.2.- ASPECTOS ANALITICOS.-

Al igual que otras enzimas, la determinación de CHE y ACHE en el laboratorio también puede ir encaminada al

apoyo diagnóstico o preventivo de diversos estados patológicos, amén de los estudios encaminados a esclarecer su estructura, función y localización en el organismo.

Las alteraciones de dichas enzimas, tanto en el aumento de sus actividades como en la disminución de éstas, ha proporcionado interesantes hallazgos. Algunos de ellos han aportado bases científicas enfocadas a deducir el papel fisiológico de las mismas.

En primer lugar se relacionará a las colinesterasas con distintas patologías y con el campo de la anestesia, para pasar a describir a continuación los principales métodos analíticos utilizados

I.2.1.- SIGNIFICADO CLINICO DE LA DETERMINACION.-

I.2.1.1.- Colinesterasas y función hepática.-

De las dos enzimas, la CHE es la que se utiliza como índice de la función hepática, habiéndose observado descensos de su actividad en este tipo de trastornos

orgánicos (37). Dado que su síntesis se realiza en el hígado, paralelamente a la elaboración de la albúmina, puede ser considerada como una excelente expresión de la capacidad funcional del hepatocito para la creación protéica. Guarda buena correlación con la protombina, el complemento C-3 y con otros parámetros de conocida aplicación en la exploración de las disfunciones hepáticas (38).

En este sentido, la colinesterasa sérica, no se comporta como una enzima de valor diagnóstico sino que va a indicar fundamentalmente la evolución de la insuficiencia hepatocelular, sobre todo en la cirrosis. De este modo, es el parámetro que más fielmente ha establecido el pronóstico en enfermos que han sufrido intervenciones del tipo de la cirugía portocava (39), o incluso en enfermos sometidos a trasplantes hepáticos (40).

I.2.1.2.- Colinesterasas e intoxicación por organofosforados.-

Los compuestos organofosforados y carbamatos son ampliamente utilizados como insecticidas y en algunos

procesos industriales. Pueden reducir, en el personal manipulador o expuesto a ellos, los niveles de CHE y ACHE por formación de un complejo enzima-inhibidor, que impide la actividad catalítica de ambas enzimas. Dicha inhibición es irreversible y puede alcanzar diferentes grados dependiendo del tiempo de exposición y del tipo de compuesto (41).

La intoxicación viene dada desde el punto de vista clínico por afectación del sistema nervioso central, de los músculos y del tracto gastrointestinal, pudiendo causar la muerte por parálisis respiratoria (42).

Se puede realizar en estos casos la determinación de ambas enzimas. No obstante hay que tener presente que la CHE recupera antes su actividad normal, ya que es regenerada por síntesis hepática, y que puede estar disminuida por otros factores diferentes a la intoxicación. Mientras Chauchan y col.(43) opinan que la ACHE es un mejor indicador de la exposición a estos productos, Silk y col.(42) indican que la CHE es preferible para el screenig y monitorización de los trabajadores agrícolas e industriales.

Graells y col.(44), en un estudio hecho en 1990 a cuarenta aplicadores de plaguicidas, obtienen un descenso de los niveles de CHE con respecto a los valores basales superior al 15 % en casi la mitad de la muestra estudiada, no detectándose una disminución significativa en los de ACHE.

1.2.1.3.- Colinesterasas en otros estados patológicos.-

Los falsos positivos y negativos recogidos en la determinación de alfa-fetoproteína, como ayuda al diagnóstico prenatal de los defectos de desarrollo del tubo neural, hizo que se estudiaran otros parámetros con este fin. Surgió así la medida de la actividad de ACHE en el líquido amniótico, cuyo valor aparecía aumentado, sobre todo en la anencefalia y en la espina bífida (45). No obstante, es el estudio de los isoenzimas de la ACHE lo que constituye un auténtico marcador de dichas alteraciones del tubo neural (46).

Por otra parte, determinadas observaciones sugieren una íntima relación entre la CHE y el trastorno metabólico de las lipoproteínas. En esta línea, se

detecta un incremento de la enzima sérica en pacientes con hiperlipémias (obesos, diabéticos), y sobre todo en aquellos que presentan cuadros de hipertrigliceridemias (33).

Asimismo, existen algunas publicaciones en las que se ha descrito un descenso notable de la CHE en grandes quemados y alteraciones de dicha enzima en la demencia senil y en desordenes neuropsiquiátricos (38).

I.2.1.4.-Colinesterasa y anestesia: variantes genéticas.

El uso de succinilcolina o suxametonio como relajante muscular fue instaurado en 1951 por su capacidad de producir una parálisis rápida y completa seguida de una pronta recuperación, con ausencia aparente de efectos tóxicos secundarios. No obstante pronto surgieron algunos casos injustificados de apnea prolongada en pacientes sometidos a los efectos de este fármaco.

La succinilcolina es hidrolizada por la CHE para dar succinilmonocolina y colina. Sobre ella no actúa la

ACHE. Nada más ingresar el fármaco en el organismo es inactivada hasta un 90% de la dosis administrada. Pequeñas cantidades no catalizadas pasan a la placa motriz terminal donde producirán una despolarización continuada. Acto seguido, el relajante succinilcolina parece difundir fuera de la sinapsis para acabar de ser escindido por la CHE. Si la enzima posee una actividad disminuida, el periodo de recuperación del paciente se prolonga por encima de lo habitual, causando problemas en la intervención. Esto ocurre en uno de cada cien pacientes europeos o americanos (47).

Fue Kalow (48) en 1956 el primero en dar una respuesta al fenómeno, describiendo las variantes atípicas de la CHE y aportando una base bioquímica para explicar las observaciones clínicas. Sus conceptos básicos aún permanecen sin cambio en la actualidad. Apuntó el carácter hereditario de dichas variantes y todavía el método fenotípico introducido por Kalow y Genest (49) en 1957, basado en la determinación del número de dibucaína, sigue siendo el más utilizado.

Los pacientes que, teniendo una función hepática normal, habían manifestado apnea prolongada, así como sus parientes, presentaban genéticamente una enzima

atípica que era poco inhibida in vitro por el anestésico local dibucaína (50). Al porcentaje de inhibición del enzima en presencia de una concentración 10 microm de anestésico es a lo que se dio en llamar **numero de dibucaína**.

Describimos a continuación las diferentes variantes genéticas de la CHE que se conocen en la actualidad.

Colinesterasa normal o usual:

Su fenotipo se define como U, estando regida su síntesis por el alelo denominado "usual" del locus E_1 . El genotipo en los casos homocigóticos es $E_1^u - E_1^u$. Es la variante más frecuente (97%) y posee gran sensibilidad a ser inhibida por dibucaína con unas cifras situadas alrededor del 80 % de inhibición (51).

Colinesterasa atípica:

Su fenotipo es designado como A y su gen alélico atípico igualmente situado en el locus E_1 , es el E_1^a .

Existen individuos homocigóticos cuyo genotipo es el $E_1^a - E_1^a$, que se caracterizan por una resistencia de la

enzima a ser inhibida por dibucaína. El porcentaje de inhibición para ellos oscila en torno a un 20 % y su frecuencia aproximada es de 1 a 3500 en la población caucásica (47).

Otros son heterocigóticos, presentando el genotipo $E_1^u-E_1^a$ con resistencia intermedia al anestésico local. Responden a un valor cercano a 60 para su número de dibucaína (51).

Colinesterasa fluoruro-resistente:

Harris y Whittaker (52) demostraron en 1961 que no era necesario un compuesto positivamente cargado para ser utilizado como inhibidor diferencial, encontrando una buena correlación entre la inhibición con dibucaína y con fluoruro sódico. Incluso posteriormente identificaron otras variantes genéticas distintas utilizando el número de fluoruro, considerado como el porcentaje de inhibición de la enzima ante una cantidad fija de dicho compuesto.

El fenotipo se denomina F y el gen que coordina la síntesis es el E_1^f , también situado en el locus E_1 . Se

encuentran individuos homocigóticos ($E_1^f - E_1^f$) y heterocigóticos con el gen de la colinesterasa usual ($E_1^u - E_1^f$) y con el gen de la colinesterasa atípica ($E_1^a - E_1^f$). En todos existe una cierta resistencia a la inhibición por fluoruro sódico.

Colinesterasa silente:

El alelo silente fue propuesto por primera vez en los trabajos de Liddell y col. (53) en 1962 y confirmado posteriormente por otros laboratorios (54,55). Se trata de personas donde, no existiendo un trastorno funcional que lo justifique,, presentan una actividad de CHE sérica comprendida entre el 0 y el 2 % de la actividad normal.

A su fenotipo se le llamó S y E_1^S al gen silente, del mismo modo localizado en el locus E_1 . De igual manera que en las otras variantes genéticas, existen unos individuos homocigóticos ($E_1^S - E_1^S$) y herocigóticos ($E_1^u - E_1^S$, $E_1^a - E_1^S$).

La mayor parte de los casos descritos lo han sido en la población esquimal de Alaska (38).

Otras variantes de la colinesterasa:

Se describen en algunos trabajos (47) otras variantes menos frecuentes, encontradas por diversos investigadores, y cuyos fenotipos responden a K, J, H y C₅. Las tres primeras presentan una mayor o menor disminución de la actividad de la CHE, mientras que la última posee un aumento de dicha actividad y está codificada por un gen situado en el locus E₂, según Harris y col.(56).

En la detección de dichas variantes genéticas fueron utilizados otros inhibidores capaces de diferenciarlas por su distinta susceptibilidad frente a ellos.

En este sentido, Mary Whittaker (57) en 1968, examinando el efecto del cloruro sódico sobre las variantes de la CHE, aporta la probable existencia de dos nuevos fenotipos que se distinguen por su sensibilidad a ser inhibidos por el ion cloruro. En ellos el número de cloruro se encuentra significativamente disminuido frente a números de dibucaína normales

y números de fluoruro ligeramente bajos.

También se hicieron estudios observando el efecto del n-butanol como inhibidor, apareciendo dos nuevos fenotipos en base a sus números de butanol y dibucaína (58).

Cabe destacar, entre otros inhibidores utilizados con este fin, el dimetilcarbamato de (2-hidroxi-5-fenilbencil)-trimetilamonio (RO 2-0683), la succinilcolina y la urea (47).

Finalmente, se cree que la diferencia estructural entre las distintas variantes genéticas radica en el sitio aniónico. Ello lo demuestra el hecho de que determinados inhibidores que se unen solo al sitio esterático no son capaces de distinguir a dichas variantes de la CHE (42). Además, Lockridge (47) en su trabajo realizado en 1990, dice que si bien la mutación en la colinesterasa atípica afecta en primer lugar al sitio aniónico, disminuyendo su carga negativa por cambios en la secuencia estructural de aminoácidos, es evidente que también repercute sobre el sitio de unión hidrofóbico.

I.2.2.- METODOS ANALITICOS.-

La actividad enzimática de las colinesterasas puede ser medida por una gran variedad de técnicas. Estas incluyen métodos electrométricos, titrimétricos, manométricos, colorimétricos, radiométricos, potenciométricos, fluorimétricos, conductimétricos e inmunológicos. Una excelente revisión de muchos de estos ensayos ha sido recopilada por Agustínsson (59).

No obstante, los métodos más adecuados para el análisis diario de estas enzimas son el electrométrico y el colorimétrico. Son precisos, económicos, rápidos y permiten una equipación standar en la mayoría de los laboratorios. Además el método colorimétrico admite la posibilidad de ser adaptado para una técnica automatizada (60).

I.2.2.1.- Determinación de la acetilcolinesterasa.-

Dicha determinación puede llevarse a cabo en

muestras de sangre, encaminada a medir la enzima contenida en las membranas de los eritrocitos, o en preparaciones de tejidos homogeneizados.

Las muestras de sangre total han de ser obtenidas por punción sin éxtasis venoso y usando heparina como anticoagulante. Los hematíes se separan lo antes posible mediante centrifugación a 2000 r.p.m. durante quince minutos. La capa de plasma es retirada y el paquete de eritrocitos se lava con igual volumen de solución salina fisiológica, mediante centrifugación en las mismas condiciones. Se retira el sobrenadante para volver a añadir la misma cantidad de solución de cloruro sódico. Se mezcla suavemente y se mide el hematocrito y la hemoglobina (60). A continuación los hematíes son lisados con agua destilada, saponina o mediante ultrasonido, dependiendo del método que se vaya a emplear.

Después de la primera separación las muestras pueden ser conservadas de dos o tres días a 4º C sin pérdida apreciable de la actividad enzimática. Los hemolizados se deben analizar dentro de las cuatro horas después de su preparación. Tanto éstos, como las células

completas, permanecen adecuados para el análisis cuando se almacenan congelados durante un largo periodo de tiempo (61).

García-López y Monteoliva (62) en 1988 hacen un estudio de conservación de hemolizados mediante congelación a -20°C , -70°C y liofilización, no observando cambios significativos de la actividad enzimática en los tres métodos durante un periodo de catorce meses y quince días.

Método electrométrico:

Entre los primeros métodos de dosificación de las colinesterasas se encuentra el método de Michel (63), basado en la caída del pH que se produce como consecuencia del ácido acético producido por hidrólisis de la acetilcolina.

Existen diferentes variantes que utilizan distintos tampones, fuerza iónica, volumen del hemolizado y diversas concentraciones de sustrato (59). Estas últimas habrán de ser adaptadas a la procedencia de las muestras, principalmente en el caso de muestras

tisulares.

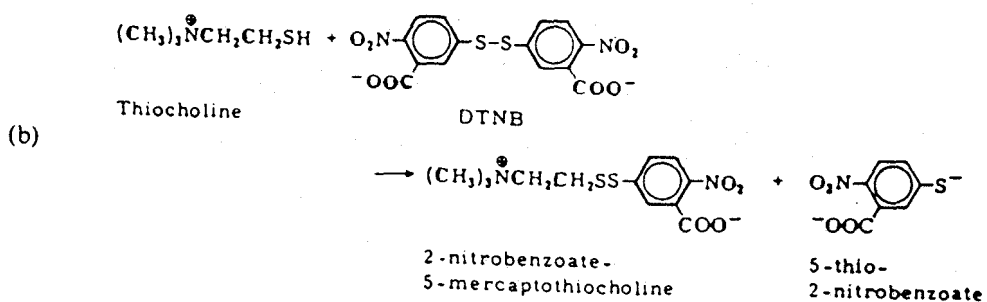
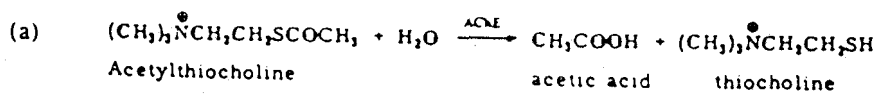
Se suele utilizar saponina como agente hemolizante y, a nivel instrumental, un electrodo simple de pH, preferiblemente de tipo microelectrodo. El deterioro de éste es una causa frecuente de error (60).

Método colorimétrico:

Ellman y col (64) en 1961 idearon una técnica para determinar la ACHE basada en la hidrólisis de acetiltiocolina, la cual daba lugar a ácido acético y tiocolina (Fig. D). La actividad catalítica era medida por el incremento del color amarillo causado por el anión 5-tio-2-nitrobenzoato, siendo éste el resultado de la reacción entre tiocolina y el reactivo de Ellman, el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB).

La velocidad de aparición del color se mide a 410 nm y la actividad máxima de la enzima tiene lugar entre los pH 7.5 y 9. A valores de pH elevados la hidrólisis no enzimática es bastante considerable, de ahí la necesidad de usar un tampón de fosfatos a pH 8.

FIGURA D



Reacción de Ellman. Tomado de: Whittaker, M.: Cholinesterases. In: Bergmeyer, H.V. ed.: Method o enzymatic analysis. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, 1986.

La temperatura también influye en la reacción, siendo la actividad a 25°C. 0.65 y a 30°C. 0.75 veces la que tiene lugar a 37°C.(61).

Por otra parte, la colinesterasa sérica también cataliza la acetiltiocolina, lo cual hace que, en aquellas muestras donde pudiera estar presente, sea imprescindible añadir al medio de reacción un inhibidor selectivo de ésta. Sirven con este fin el sulfato de quinidina o la etopropacina (60).

El hemolizado puede obtenerse por mezcla de la suspensión lavada de hematíes con un volumen apropiado agua destilada, dependiendo de las distintas proporciones de tampón, sustrato y DTNB utilizadas. Mary Whittaker (60) dice en su metodología que la suspensión de eritrocitos ha de diluirse con agua destilada en la proporción 1:50 y que la concentración de acetiltiocolina en el medio de reacción es de 0.47 mM. La dilución lleva también como finalidad que la banda de Soret de la hemoglobina interfiera lo menos posible con la absorción del cromógeno, por elevación de la absorbancia inicial del blanco de reacción.

La actividad de la ACHE se expresa como micromoles de sustrato hidrolizados a una temperatura determinada por gramos de hemoglobina por litro de sangre total. También puede ser definida como micromoles de sustrato hidrolizados por litro de hematíes. La absortividad molar del anión amarillo a 410 nm es $E = 13.4 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Según esto la actividad vendrá dada (61) por la fórmula:

$$\text{Actividad} = [\Delta A / [\text{min} \cdot E]] \cdot [Vt/Vh] \cdot [100 D / H]$$

donde, la actividad (U/L) va expresada en unidades por litro de hematíes, ΔA = incremento de absorbancia, Vt = volumen total de la mezcla de reacción, Vh = volumen del hemolizado en la reacción, D = dilución del hemolizado y H = hematocrito de la suspensión de hematíes.

George y Abernethy (65) proponen una variante del método de Ellman para evitar la interferencia de la hemoglobina usando como inhibidor selectivo el detergente cloruro de benzetonio en lugar del sulfato de quinidina. Con ello el pico de absorción del 5-tio-2-nitrobenzoato es desplazado a 435 nm y la banda de

hemoglobina a 405 nm.

Asimismo, Abernethy y col.(66) en 1988 presentan un método enzimático para la determinación de ACHE donde utilizan como sustrato acetilcolina. Esta es hidrolizada y la colina resultante medida mediante el uso de colina oxidasa unida a peroxidasa, con fenol y aminopirina dando un producto que tiene un pico de absorción máxima a 500 nm.

I.2.2.2.-Determinación de la colinesterasa sérica.-

Como se dijo anteriormente, la técnica colorimétrica constituye también el método de elección para determinar la colinesterasa sérica por su precisión, economía y rapidez. El procedimiento electrométrico de Michel fue muy utilizado pero hoy día no reviste gran importancia.

Tanto en la recogida de la muestra como en la reacción se ha de evitar la presencia excesiva de iones de sodio, potasio, magnesio y calcio, por su interferencia (67), así como los anticoagulantes citrato y oxalato (42).

Asimismo, se debe evitar la hemólisis, puesto que sería una causa de error al ser liberada la ACHE contenida en los eritrocitos.

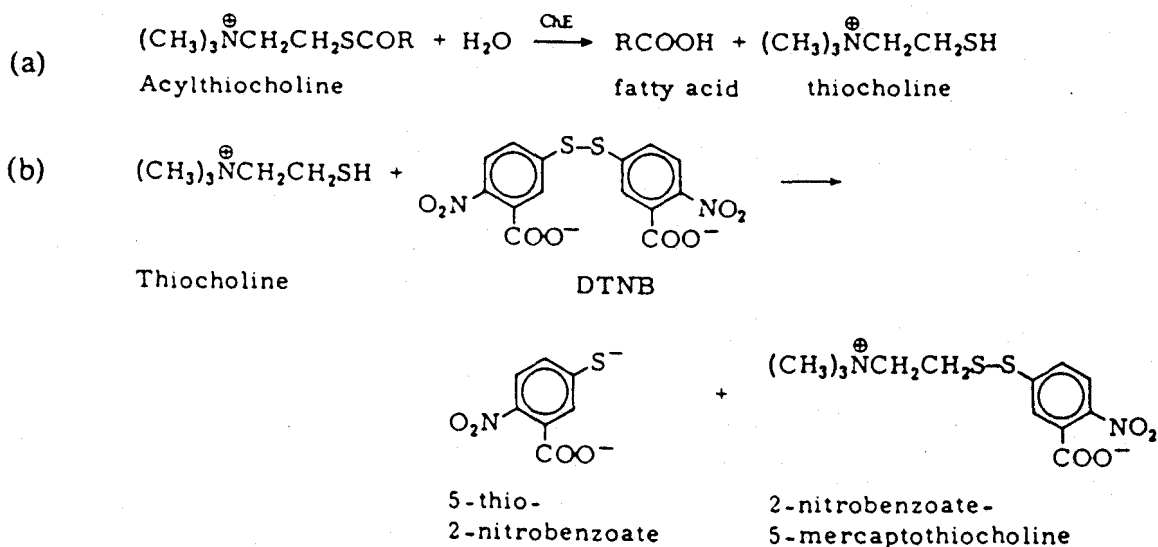
La actividad de la CHE sérica tras su conservación fue estudiada por Braid y Nix (68), los cuales demostraron que dicha enzima era muy estable. A -20°C las muestras retenían más del 95 % de su actividad inicial al cabo de un periodo de tres años, y más del 85 % después de siete años.

Método colorimétrico.-

Tiene como principio la hidrólisis de aciltiocolinas por la CHE, dando lugar al correspondiente ácido graso y a tiocolina. El porcentaje de formación de ésta puede ser monitorizado por la reacción consecutiva del grupo tiol con DTNB que forma el anión amarillo, 5-tio-2-nitrobenzoato, y otros productos (Fig. E). La tasa de producción del cromógeno se mide espectrofotométricamente a 410 nm. (64).

Acetil-, propionil- y butiril-tiocolina han sido útiles como sustratos en diversas modificaciones del

FIGURA E



Fundamento del método colorimétrico para la determinación de la colinesterasa sérica. Tomado de: Whittaker, M. : Cholinesterases. In: Bergmeyer, H.V. ed.: Method of enzymatic analysis. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, 1986.

método, el cual puede adaptarse a un equipo automatizado (60). La afinidad de la butiriltiocolina por la CHE es dos veces la que presenta la acetiltiocolina y es más estable que ésta respecto al pH y a la temperatura (69). Es por tanto la butiriltiocolina el sustrato de elección para determinar tanto la CHE humana como la equina, usando el método de Ellman. Otras especies presentan distinta correlación por diferentes aciltiocolinas como sustrato (5).

Determinados autores han estudiado el análisis de la CHE usando propioniltiocolina. Así, Evan y Wroe (70), mediante el empleo de concentraciones optimizadas de sustrato, observan que la propioniltiocolina proporciona valores más bajos respecto a la butiriltiocolina. De todos modos, ésta última sigue siendo el acilderivado de elección (60).

La máxima actividad del enzima se obtiene a pH comprendido entre 8.5 y 9, usando concentraciones de butiriltiocolina de 10 mM a 37°C. No obstante, la hidrólisis no enzimática en estas condiciones es notable, por ello es preferible utilizar un tampón de fosfatos a pH 7.4 con lo que se consigue reducirla y

hacer la reacción más lineal (42). El ensayo es válido para temperaturas de 20°C, 25°C y 30°C. (47).

La actividad de colinesterasa sérica es expresada como micromoles de sustrato hidrolizados por litro de plasma. Esta vendría dada (61) por la fórmula:

$$\text{Actividad} = [\Delta A / (\text{min} \cdot E)] \cdot [Vt / Vp]$$

cuyos valores fueron definidos en el método de Ellman para la ACHE, excepto Vp = volumen de plasma o suero.

I.2.2.3.- Determinación de las variantes genéticas.-

Algunos investigadores han descrito varios procedimientos de screenig para revelar las variantes genéticas de la colinesterasa sérica. Ninguno de ellos es capaz de señalar la totalidad de los casos anormales, por tanto no son del todo aceptables (5). Es el caso del método de screenig ideado por Morrow y Motulsky (71) usando alfa-naftilacetato como sustrato y el RO 2-0683 como inhibidor selectivo; o la técnica de Harris y Robson (72) por difusión en distintos geles de agar, con

y sin inhibidor.

Al determinar el tipo de variante de la CHE en un determinado individuo, la situación ideal sería encontrar un test único y sencillo que reconociese todas las variantes genéticas de la enzima. Ello no ocurre, generalmente, en el caso de la colinesterasa sérica. Además, potencialmente, el número de variantes de la CHE puede ser muy amplio, y verdaderamente, es indudable que existe un número de ellas previsiblemente no identificadas (5).

Métodos basados en el porcentaje de hidrólisis de un solo sustrato han sido propuestos por Evans y Woe (70) y por Dietz y col. (73). Sin embargo, existe común acuerdo en que las determinaciones de la tasa de actividad enzimática utilizando un sustrato único no son muy eficientes para detección de individuos sensibles y tienen un valor limitado para la determinación de fenotipos.

Los métodos más empleados son aquellos cuyo fundamento se apoya en el uso de inhibidores. Múltiples compuestos de diferentes clases resultan ser inhibidores

o activadores de la CHE y solamente unos pocos son utilizados de forma extensiva para distinguir variantes de dicha enzima. Algunos de estos compuestos, a pesar de ser capaces de distinguir distintas variantes, no han sido probados en un buen número de laboratorios o en una diversidad suficiente de variantes genéticas. Entre éstos se incluyen el cloruro sódico, n-butanol, formaldehído, solanina y solanidina, urea, RO 2-0683 y otros (5).

Número de dibucaína.-

El agente inhibidor más usado para la detección de variantes genéticas de la CHE es la dibucaína. Esta fue introducida por Kalow y Genest (49) en 1957 y ha seguido siendo utilizada extensamente con este propósito. El ensayo se realiza en dos cubetas. Una de ellas con el sustrato solo y la otra con el sustrato más dibucaína en una concentración 10 microM. Ambas llevan una solución tampón de fosfatos a pH 7.4 y cloruro de benzoilcolina 0.05 mM. En las dos cubetas se mide la actividad inicial de la reacción a 25 °C por cambios de absorbancia a 240 nm. El número de dibucaína se calcula, atendiendo a su definición, mediante la

fórmula:

$$\text{Nº D} = 100 \cdot [1 - A/A']$$

donde, A= actividad enzimática no inhibida y
A'= actividad enzimática en presencia de inhibidor.

Una serie de modificaciones fueron propuestas tratando de mejorar el método aunque no siempre se consiguió. Una de las variaciones más frecuente consiste en utilizar diferentes sustratos en lugar de benzoilcolina. En general, con las condiciones del ensayo de Kalow y Genest (49), descrito anteriormente, los resultados obtenidos usando otros sustratos guardan un paralelismo con los que se consiguen utilizando benzoilcolina. No obstante, se ha descrito a veces que la eficiencia en la diferenciación varía con el sustrato y, en ciertos casos, con el genotipo (74).

Algunos sustratos usados para la determinación del número de dibucaína incluyen la acetilcolina (74,75), la butirilcolina (74,76), la propionilcolina (77,78) y la succinilcolina (79).

Los laboratorios de hospitales prefieren frecuentemente la butiriltiocolina o la propioniltiocolina como sustratos, los cuales permiten la adaptación a equipos automatizados. Los números de dibucaína pueden ser medidos con cualquiera de ellos, pero hay que tener presente que los valores de referencia para la interpretación de los resultados pueden variar dependiendo del sustrato, la temperatura o la solución tampón (47).

La determinación del número de dibucaína es aún el mejor método, el más exacto, sencillo y ampliamente utilizado en la fenotipificación de la colinesterasa sérica (47).

Número de fluoruro.-

Ya que ninguno de los métodos descritos anteriormente, empleando la dibucaína como inhibidor, es capaz de diferenciar a todas las variantes genéticas conocidas de la CHE, se recurre con asiduidad al ion fluoruro como ayuda para este fin.

La técnica fue descrita en primer lugar por Harris

y Whittaker (52), siendo exactamente igual a la reseñada precedentemente para el número de dibucaína. La única diferencia estriba en que la concentración de fluoruro sódico en la reacción es de 50 microm. El control de la temperatura durante la medida de la reacción es muy importante porque influye en el porcentaje de inhibición.

Del mismo modo, la definición del número de fluoruro y su cálculo se corresponden con el número de dibucaína. El uso conjunto de ambos aportó dos nuevos fenotipos de la colinesterasa sérica.

Número de succinilcolina:

Debido a que la succinilcolina es la responsable directa de la producción de apnea prolongada en algunos pacientes, se pensó en la posibilidad de detectar fenotipos hipersensibles cuando ésta actuaba competitivamente como sustrato inhibidor de un segundo sustrato.

McComb y col.(80) lanzaron un procedimiento espectrofotométrico para diferenciar los fenotipos de la colinesterasa usual, atípica (homocigóticos)

e intermedia (heterocigóticos con el gen atípico), valorando la inhibición de la hidrólisis de o-fenilbutirato por succinilcolina. Al porcentaje de inhibición en la formación del anión amarillo o-nitrofenilato se le denominó número de succinilcolina.

I.3.-INHIBIDORES DE LAS COLINESTERASAS.-

A lo largo de nuestro trabajo se ha hecho alusión al concepto inhibición enzimática, entendido como la capacidad que tienen algunos agentes de disminuir la actuación catalítica de la enzima y, por tanto, la velocidad con que transcurre la reacción. El mecanismo mediante el cual se produce puede ser de varios tipos, como veremos más adelante.

Existe un gran número de compuestos que inhiben las colinesterasas, muchos de los cuales son utilizados por la acción farmacológica que de dicha conducta se deriva. Estos últimos son los denominados agentes anticolinesterasa.

En determinadas revisiones (30,81) se describen una

serie de causas por las cuales la actividad de la CHE puede encontrarse disminuida. Algunas de ellas hacen referencia a diferentes compuestos inhibidores. Cabe citar entre ellos algunos fármacos antineoplásicos, como la ciclofosfamida, el Endoxan o el Tio-tepa, que producen una inhibición irreversible de la enzima. También deprimen la actividad de la CHE los inhibidores de la monoamino-oxidasa, propanidida, anticonceptivos, clorpromazina, pancuronio y los anestésicos locales.

I.3.1.-INHIBICION ENZIMATICA: MECANISMO DE ACCION.- (82)

Según la teoría de Michaelis-Menten, cuando el enzima reacciona con el sustrato, mediante su centro activo, se forma un complejo enzima-sustrato de alta reactividad. Este, a su vez, se desdobra dando lugar al producto de la reacción y a la enzima libre. Las reacciones, que se suponen reversibles, se pueden expresar de la siguiente manera:



Un inhibidor, adicionado al medio de reacción, se

va a combinar con la enzima disminuyendo la actividad de ésta. Dicha unión puede ser reversible o irreversible. En la primera, el inhibidor interviene en un equilibrio fácilmente reversible, que se establece con rapidez, con la enzima o con el complejo enzima-sustrato. En la segunda, la enzima experimenta una inactivación irreversible porque el inhibidor es capaz de unirse covalentemente y modificar de modo permanente un grupo funcional necesario para la catálisis.

Los tres tipos principales de inhibición reversible son competitiva, acompetitiva y no competitiva, las cuales pueden distinguirse experimentalmente por los efectos que produce el inhibidor sobre la cinética de reacción del enzima.

I.3.1.1.- Inhibición competitiva.-

Aquí, el inhibidor puede combinarse con la enzima libre de forma que compite con el sustrato para unirse al centro activo. Reacciona reversiblemente con la enzima para formar un complejo enzima-inhibidor, análogo

al complejo enzima-sustrato.



La inhibición competitiva se reconoce experimentalmente con facilidad, debido a que el porcentaje de inhibición, para una concentración de inhibidor constante, disminuye al incrementar la concentración de sustrato. Es decir, que la actividad enzimática normal puede ser restablecida por desplazamiento del inhibidor, al aumentar la concentración de sustrato.

La representación gráfica de los inversos de la velocidad o actividad enzimática frente a los inversos de la concentración de sustrato, manteniendo una concentración de inhibidor constante, da una serie de rectas cuyo punto de intersección tiene lugar en el eje de ordenada.

I.3.1.2.-Inhibición acompetitiva.-

En este modelo, el inhibidor no se combina con la enzima libre ni afecta a su reacción con el sustrato

normal. Sin embargo, se une con el complejo enzima-sustrato para formar un complejo inactivo enzima-sustrato-inhibidor, que no experimenta su transformación posterior en el producto habitual de la reacción.

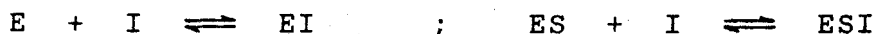


El grado de inhibición, para una concentración de inhibidor fija, puede aumentar cuando la concentración de sustrato se ve incrementada.

Se reconoce fácilmente porque la representación gráfica de los inversos, antes citada, proporciona una serie de rectas, cuyas pendientes permanecen constantes; o lo que es igual, son rectas paralelas entre sí.

I.3.1.3.-Inhibición no competitiva.-

Un inhibidor no competitivo puede combinarse con la enzima libre o bien con el complejo enzima-sustrato, de forma que interfiere con la acción de ambos. Se producen dos formas inactivas, EI y ESI.



Los efectos inhibitorios no se anulan al aumentar la concentración de sustrato. Es decir, la velocidad máxima decrece en presencia del inhibidor y no puede recuperarse su valor, a pesar de que la concentración de sustrato se pueda elevar.

La representación gráfica de los inversos de la actividad enzimática frente a los inversos de la concentración de sustrato da una serie de rectas, que tienen un punto de intersección común en el eje de abscisa.

Los inhibidores no competitivos se unen a un centro de la enzima distinto del centro activo, a menudo con algún grupo funcional básico para mantener la conformación tridimensional catalíticamente activa de la molécula.

1.3.2.- AGENTES ANTICOLINESTERASA. - (83,84)

Tanto la CHE, como la ACHE, son inhibidas por una serie de principios activos de uso farmacológico e

industrial. Se denominan agentes anticolinesterasa a aquellos compuestos que, por su capacidad de inhibir la ACHE en las uniones de diversas terminaciones nerviosas colinérgicas, producen un efecto equivalente a un aumento de la concentración de acetilcolina en las sinapsis y, por tanto, una excesiva estimulación de los receptores colinérgicos en toda la extensión de los sistemas nerviosos central y periférico. Son, pues, principios activos colinérgicos indirectos.

Se pueden agrupar en tres tipos atendiendo a su estructura química:

1) Compuestos de amonio cuaternario.-

El prototipo de este grupo es el edrofonio. Su sal en forma de cloruro puede emplearse para terminar con ataques de taquicardia supraventricular paroxística.

Produce una inhibición reversible de las colinesterasas, uniéndose selectivamente al centro activo y su acción es breve debido a dicha reversibilidad y a la rápida eliminación renal.

2) Compuestos organofosforados.-

Hicimos alusión a ellos cuando se estudió la determinación de la CHE y la ACHE como parámetros detectores de una exposición a estas sustancias. Producen una inhibición irreversible de ambas enzimas, dando como resultado la enzima fosforilada o fosfonilada muy estable, de ahí su toxicidad.

Se encuentran en este apartado el diisopropil fluorofosfato (DFP), de uso en oftalmología y el ecotiofato, empleado en el tratamiento del glaucoma. Asimismo, desde el punto de vista industrial, se destacan como insecticidas el parathion, paraoxon, malathion y fenthion. También se hallan incluidos aquí los agentes potenciales de la guerra química, los denominados "gases neurotóxicos", de acción mucho más potente que el parathion. Su desarrollo tuvo lugar a nivel de la segunda guerra mundial y están representados de manera más significativa por el sarin, soman y tabun.

3) Derivados carbámicos (ésteres del ácido carbámico y alcoholes con nitrogeno terciario y cuaternario).-

Inhiben reversiblemente tanto a la CHE como a la ACHE, por formación de metilcarbamil-enzima o dimetilcarbamil-enzima, de estabilidad mucho mayor que la acetil-enzima. Se trata de una típica inhibición competitiva con la acetilcolina por los enlaces situados en el centro activo de las colinesterasas. A pesar de que inhiben a ambas enzimas, la afinidad de estos compuestos por la CHE es mayor que por la ACHE. Son hidrolizados por éstas y algunos poseen una cierta acción colinérgica directa.

Pertenecen a este grupo la neostigmina, fisostigmina o eserina y la piridostigmina. Son alcaloides con un amplio campo de aplicaciones terapéuticas que se pueden concretar en cuatro frentes: atonía del músculo liso del tracto gastrointestinal y vejiga, glaucoma, miastenia grave y terminación de los efectos de los fármacos bloqueantes competitivos neuromusculares. Así, por ejemplo, para el tratamiento del íleo paralítico y atonía de la vejiga, la neostigmina constituye el agente anticolinesterásico de elección.

El bambuterol es un nuevo dicarbamato que inhibe y es hidrolizado, a su vez, por la colinesterasa (85).

Es de resaltar que el efecto total de estos fármacos sobre la motilidad intestinal representa, probablemente, una combinación de acciones en las células ganglionares del plexo de Auerbach y en las fibras musculares, a consecuencia de la preservación de acetilcolina liberada por las fibras colinérgicas preganglionares y postganglionares, respectivamente.

En la miastenia grave, en la actualidad, se tiene evidencia suficiente para pensar que esta enfermedad se debe a una respuesta autoinmune al receptor de la acetilcolina en la placa terminal postsináptica (86). Tanto la neostigmina, como la piridostigmina y ambimetonio son fármacos recomendables.

Sobre la musculatura bronquial, dichos compuestos, producen contracción, por lo que habrán de utilizarse con cuidado en pacientes asmáticos.

En general, poco se sabe del grado relativo en que

dichos compuestos inactivan las colinesterasas en diferentes tejidos "in vivo". Aquellos que contienen un grupo amonio cuaternario no penetran fácilmente a través de las membranas celulares; es por ello, que dichos agentes se absorben poco en el tracto gastrointestinal y quedan excluidos por la barrera hematoencefálica de ejercer una acción significativa sobre el sistema nervioso central, en dosis moderadas.

Las acciones de los agentes anticolinesterasa sobre las células efectoras autónomas y sobre sitios corticales y subcorticales del SNC, donde los receptores son en gran parte del tipo muscarínico (estimulación de músculo liso y glándulas), están bloqueadas por la atropina. La acción nicotínica sobre los ganglios autonómicos y músculos esqueléticos es antagonizada por los bloqueantes ganglionares y los agentes curarizantes.

I.3.3.- REACTIVADORES DE LAS COLINESTERASAS.-

Hemos de mencionar, aunque sea brevemente, la existencia de una serie de agentes nucleofílicos como la hidroxilamina (H_2NOH), los ácidos hidroxámicos ($RCONHOH$)

y las oximas (RCH=NOH), los cuales tienen la propiedad de reactivar las colinesterasas fosforiladas.

Concretamente, se utiliza con este fin el metilcloruro piridina-2-aldoxima (2-PAM o pralidoxima) y el cloruro de 1-[[[4-aminocarbonil] piridinio] metoxi]-2-[[hidroxiimino] metil] piridina (HI-6). Ambas oximas actúan de forma preponderante sobre la ACHE fosforilada.

Ultimamente, Harris y col.(87) en 1989, demostraron en sus estudios que la protección de la ACHE también fue incrementada sustancialmente por el uso de 2-PAM y HI-6 en la intoxicación inducida por el carbamato fisostigmina.

**SEGUNDA PARTE: ESTIMULANTES DE LA MOTILIDAD
GASTROINTESTINAL Y ANTIEMETICOS.**

I.4.- ASPECTOS GENERALES.-

**I.4.1.-FARMACOLOGIA DE LA MOTILIDAD GASTROINTESTINAL:
ESTIMULANTES.- (84,88,89,90)**

Desde el punto de vista motor, el tracto gastrointestinal posee una actividad distinta en ayunas a la que presenta después de las comidas. Cuando el tubo digestivo no contiene alimento, la actividad motora está organizada en los denominados ciclos motores interdigestivos. La regulación de estos no está completamente dilucidada. Al parecer, la actividad cíclica se origina en los plexos intrínsecos del tubo digestivo y es modulada por la acción del sistema nervioso vegetativo y ciertas hormonas.

I.4.1.1.-Regulación de la motilidad gastrointestinal.-

La ingestión de una comida modifica profundamente la actividad motora gastrointestinal, apareciendo los denominados patrones de digestión que bloquean los complejos motores interdigestivos, instaurados con el ayuno.

-Estómago:

Los mecanismos reguladores de la actividad gástrica postprandial son muy complejos. En primer lugar existen centros de control en el sistema nervioso central conectados con el córtex, a través de los cuales pueden actuar factores psicológicos. El centro del vómito, situado en el área postrema del cerebro, es probablemente un centro regulador de la motilidad gástrica cuya estimulación, en su grado más elevado, produce el vómito. Medicamentos que retardan la evacuación gástrica y pueden llevar al vómito, como la digital, bromocriptina, etc., actúan a través del sistema nervioso central.

A nivel local existen una serie de mecanismos,

principalmente en el duodeno, que regulan el vaciamiento gástrico por ejercer una acción inhibitoria sobre la presión fúndica o aumentando la resistencia duodenal al flujo del quimo. La acción de aquellos sobre el vaciamiento gástrico se ejerce a través de la vías neurohormonales, cuyo conocimiento es todavía muy incompleto.

En cuanto a la inervación, el parasimpático alcanza el estómago mediante el plexo celiaco y el simpático por medio del plexo solar. Van a parar a los plexos autónomos mientérico de Auerbach y submucoso de Meissner.

-Intestino delgado:

La regulación de los movimientos en el intestino delgado dependen de la actividad motora intrínseca de la musculatura lisa, modulada por la acción del sistema nervioso autónomo y las hormonas gastrointestinales.

El intestino delgado recibe también una doble inervación simpática y parasimpática. La estimulación del sistema nervioso simpático produce una inhibición de

la motilidad, mientras que el estímulo parasimpático la aumenta. Los nervios extrínsecos actúan a nivel de la fibra muscular lisa y de los plexos nerviosos intramurales.

-Intestino grueso:

El control principal de la motilidad colónica depende de la propia fibra muscular lisa. Sin embargo tanto el sistema nervioso autónomo como los péptidos gastrointestinales desempeñan un papel en la modulación de dicha motilidad; la presencia de fibra vegetal en la dieta, el estrés y los cambios en la concentración intraluminal de los ácidos biliares pueden asimismo influir sobre la motilidad del colon. Por otra parte, existe una indudable influencia psicológica (enfado, aprensión, ira, depresión).

Finalmente, hay que decir que la regulación nerviosa de la función gastrointestinal se caracteriza por tener un grado elevado de autonomía. Aunque recibe la influencia del sistema nervioso autónomo, presenta características muy especiales que la separan marcadamente de la regulación en otros órganos,

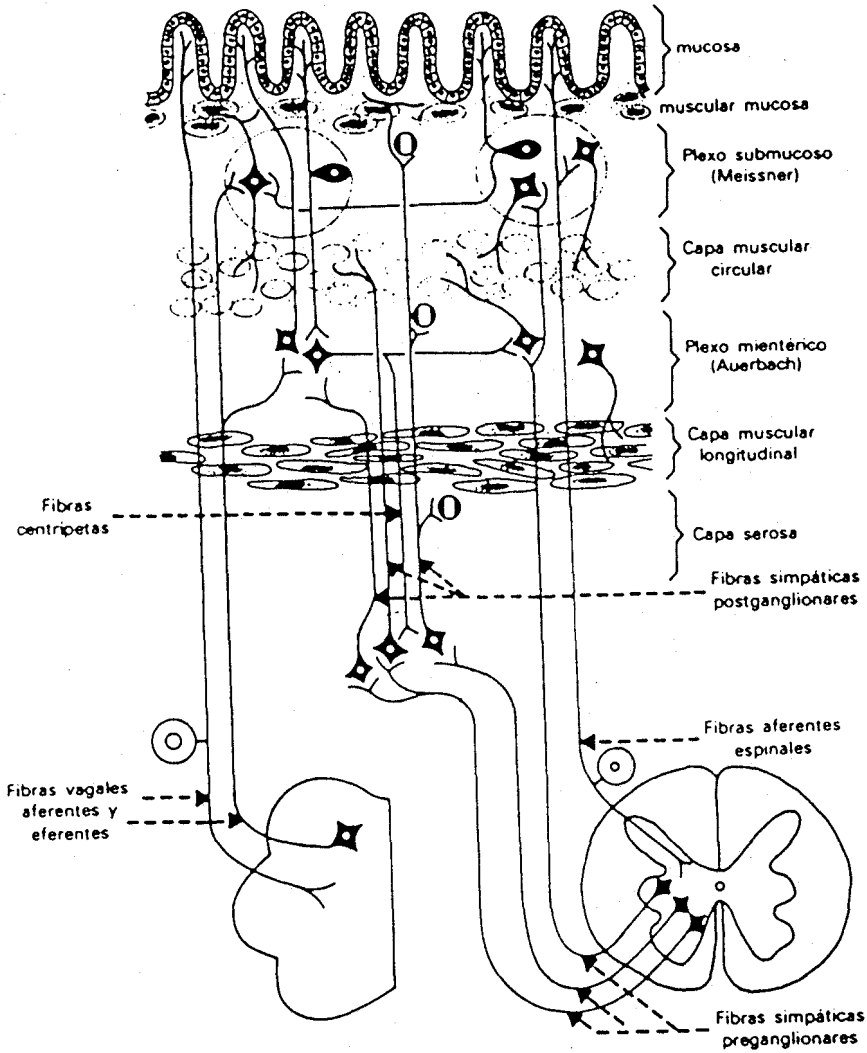
pudiendo ser considerado conceptualmente como un sistema integrador independiente.

I.4.1.2.- Sistemas de neurotransmisión.-

Las neuronas intrínsecas se encuentran distribuidas en el plexo submucoso y en el plexo mientérico. Las neuronas mientéricas inervan el músculo circular y el longitudinal y proyectan también hacia neuronas del plexo mucoso; las neuronas submucosas inervan la muscular mucosa y las células glandulares de la mucosa (Fig. F).

Las redes ganglionares de los plexos difieren en cada localización segmentaria por su riqueza neuronal y sináptica y por la distribución proporcional de los diversos neuromoduladores. La inervación colinérgica es abundante en el sistema nervioso entérico. Además de las aferencias extrínsecas vagales, el 50 % de las neuronas del plexo submucoso y el 20 % de las del mientérico contienen acetilcolina, frecuentemente en asociación con otros cotransmisores.

FIGURA F



Inervación intrínseca y extrínseca de la pared del tubo digestivo. Tomado de: Florez, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, A.: Farmacología humana. Eunsa. Pamplona 1987.

La transmisión neuroquímica en los cuerpos celulares de las neuronas entéricas se realiza por mecanismos sinápticos rápidos y lentos. Dicha transmisión a nivel intraganglionar es en su mayor parte de carácter nicotínico, mientras que a nivel efector es muscarínico.

La acción de la dopamina a nivel gastrointestinal ha suscitado gran interés debido a la importante acción eucinéctica que producen algunos bloqueantes de receptores dopaminérgicos D2, como la metoclopramida y el bromopride que se verán más adelante. La dopamina exógena produce con frecuencia inhibición de la motilidad en diversos segmentos del tracto gastrointestinal pero, a pesar de los esfuerzos realizados, no se han detectado neuronas ni terminaciones dopaminérgicas en los plexos entéricos.

1.4.1.3.- Fármacos reguladores de la motilidad gastrointestinal.-

Son aquellos que se caracterizan por mejorar la coordinación cinética de los diversos segmentos del tubo digestivo. Se distinguen tres grupos:

1) Fármacos estimulantes motores gastrointestinales propiamente dichos.- Son aquellos que favorecen principalmente la coordinación del bloqueo esófago-gastro-duodenal. Pertenecen a este grupo la familia de las benzamidas u ortopramidas, cuyo principal representante y prototipo es la metoclopramida y donde se encuentran otros posteriores, también de origen sintético, como el bromopride, tiapride y clebopride. Igualmente, están incluidos en este grupo los benzimidazoles, representados principalmente por la domperidona, y algunas fenotiacinas entre las que cabe destacar la metopimazina.

b) Fármacos inhibidores de la discinesia esofágica.- Se caracterizan por aliviar ciertos cuadros clínicos relacionados con alteraciones primarias de la motilidad esofágica (determinados nitratos, antagonistas del calcio, anticolinérgicos).

c) Fármacos espasmolíticos generales.- Son relajadores inespecíficos de la fibra muscular lisa de la pared gastrointestinal (papaverina, atropina).

I.4.2.-FARMACOLOGIA DEL VOMITO: ANTIEMETICOS.-(91,92,93)

El vómito es un acto reflejo altamente estereotipado, que incluye una serie de acciones complejas en las que intervienen músculo liso, músculo estriado y glándulas, culminando con la expulsión forzada del contenido gástrico a través de la boca. Va precedido de una serie de acontecimientos preliminares (anorexia, respiración rápida, saliveo copioso, sudor, palidez) y de náuseas.

El control del mecanismo del vómito se realiza a través de dos áreas localizadas en el sistema nervioso central:

- **El centro del vómito**, que se encuentra en la formación reticular y es una zona rica en receptores muscarínicos e histamínicos H-1.

- **La zona quimiorreceptora desencadenante o gatillo**, que también se encuentra a nivel bulbar, en el suelo del cuarto ventrículo, pero al exterior de la barrera hematoencefálica, lo cual le permite entrar en contacto

con la sangre y las sustancias que ésta pudiera contener. Es una zona rica en receptores dopaminérgicos. La estimulación química de esta zona produce estímulos aferentes hacia el centro del vómito, último responsable de la émesis.

Aquellos fármacos que reducen o hacen desaparecer las náuseas y el vómito son los denominados antieméticos. Estos se pueden clasificar de acuerdo con su lugar preferente de acción en:

a) Antieméticos de acción periférica, donde se encuentran sustancias con acción anestésica local (benzocaína, procaína, lidocaína, hielo en trocitos o soluciones liberadoras de anhídrido carbónico en la mucosa gástrica).

b) Antieméticos de acción central, dentro de los cuales se pueden distinguir:

- Fármacos dotados de actividad anticolinérgica.
- Fármacos antihistamínicos.
- Fármacos con actividad antidopaminérgica.

Tres grandes grupos de fármacos antidopaminérgicos se pueden destacar: 1) **Fenotiazinas** (clorpromazina, flufenazina); 2) **Butirofenonas** (haloperidol, domperidona); y 3) **Benzamidas sustituidas y ortopramidas**, ya citadas. Todos estos fármacos se comportan como antieméticos, por antagonizar los efectos de la dopamina sobre sus receptores D2 en la zona quimiorreceptora gatillo. Sin embargo, aunque ésta es la acción primordial, se cree que a altas dosis pueden actuar directamente sobre el centro del vómito. Para alguno de estos fármacos, principalmente benzamidas sustituidas como la metoclopramida o el bromopride, sus acciones periféricas también pudieran contribuir en el efecto antiemético.

Son de interés en este trabajo dos fármacos cuyas acciones principales son las descritas anteriormente: estimulante de la motilidad gastrointestinal y antiemética. Nos estamos refiriendo a la metoclopramida y el bromopride, los cuales se estudian a continuación.

I.5.- METOCLOPRAMIDA

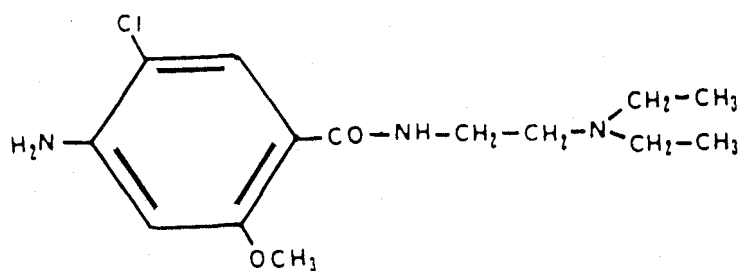
I.5.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES.- (84,94,95)

Descubierta al final de los años sesenta, la metoclopramida es un derivado sintético de la benzamida relacionado con la procainamida (Fig. G), pero carece de efectos antiarrítmicos y anestésicos locales.

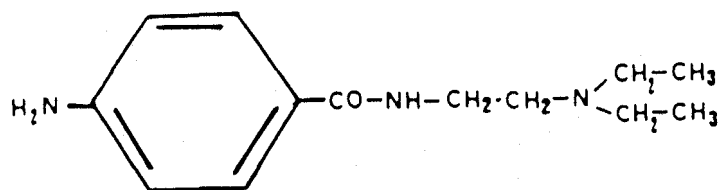
Asimismo, podría decirse que deriva de la orto-anisamida (o-metoxibenzamida), al igual que el sulpiride, fármaco neuroléptico y antiemético que tiene en cierto modo un parentesco farmacológico con aquella. Es, pues, una benzamida sustituida del grupo de las ortopramidas, respondiendo a la formulación 4-amino-5-cloro-2-metoxi-N(2-dietilaminoetil) benzamida.

Se utiliza normalmente su sal en forma de clorhidrato monohidrato, siendo su solubilidad de aproximadamente 1.43 g/ml en agua y 333 mg/ml en alcohol etílico.

FIGURA G



Metoclopramida



Procainamida

Fórmula estructural de la metoclopramida y la procainamida.

I.5.2.- FARMACODINAMIA.-

I.5.2.1.- Acciones gastrointestinales.-

La metoclopramida tiene marcado efecto en la motilidad gastrointestinal tras su administración oral o intravenosa, tanto en animales como en el hombre (96,97).

Posee varios efectos en la actividad mecánica de la musculatura lisa gastrointestinal. A bajas concentraciones, in vitro, la metoclopramida incrementa el tono basal y la actividad contráctil de dicha musculatura, mientras que a altas concentraciones la actividad mecánica es inhibida (95).

-Esófago:

En este órgano la metoclopramida produce un aumento en la amplitud de las contracciones esofágicas y en la presión del esfínter esofágico inferior (98,99).

La administración intravenosa de metoclopramida en individuos sanos, embarazadas y pacientes con hernia de hiato (con y sin reflujo gastro-esofágico) dio como resultado un incremento significativo en la presión del esfínter esofágico inferior. Después de la administración, el comienzo en la elevación de dicha presión fue a los 2 a 5 minutos, con una duración de 90 minutos y alcanzando el pico máximo a los 10 a 20 minutos. Tras la administración oral el tiempo de actuación incrementó a 120 minutos y se alargó el periodo de comienzo de los efectos (10 a 20 min.) y el de aparición del pico máximo a 40 minutos (100,101).

- Estómago:

Sobre éste, la metoclopramida induce una aceleración importante del vaciamiento y un incremento en la amplitud de las contracciones gástricas. Estos efectos se demostraron mediante la administración de 10 a 40 mg de metoclopramida vía oral, intramuscular o intravenosa. Los efectos se observaron mejor en pacientes cuyo vaciamiento gástrico era anormalmente lento o sus contracciones gástricas o duodenales

irregularmente débiles, que en aquellos otros cuya actividad era normal (99).

El aumento del peristaltismo gástrico es sustancial, con rápida evacuación gástrica y relajación del antro pilórico (84).

La onda de contracción antral va seguida por una serie de ondas de presión duodenal. La metoclopramida coordina las contracciones del antro y del duodeno de forma que el gradiente de presión gastroduodenal facilita el vaciamiento gástrico (90).

En cuanto a la secreción gástrica, estudios realizados en voluntarios adultos muestran que dicho fármaco no tiene efectos significativos sobre la secreción de ácido en el estómago, o sobre los niveles séricos de gastrina (96,101).

- Intestino delgado:

La metoclopramida estimula la contracción de la musculatura lisa del intestino delgado en animales, personas voluntarias sanas, mujeres embarazadas y

pacientes con motilidad gastrointestinal debilitada, disminuyendo el tiempo de tránsito a través de él. Estos efectos son antagonizados por agentes anticolinérgicos (96).

El incremento en la frecuencia y amplitud de la contracciones duodenales en individuos sanos ocurre a los 15 minutos de la administración intravenosa de 10 a 20 mg. de metoclopramida y dura alrededor de 10 a 30 minutos (102). Al parecer no tiene efecto en pacientes sin actividad basal del duodeno (103).

Según los trabajos de Oigaard y Fleckenstein (104), este fármaco estimula la motilidad intestinal más fuertemente que el anticolinesterasa bromuro de piridostigmina.

- Intestino grueso:

La acción de la metoclopramida sobre la motilidad del colon permanece controvertida. In vitro, incrementa la magnitud y la frecuencia de la franja circular de la musculatura lisa del colon en el hombre y animales (105). No obstante, en otros estudios in vivo no se

demonstraron, de forma consistente, acciones sobre la motilidad del intestino grueso (99).

En estudios posteriores con pacientes diabéticos que presentaban neuropatía autonómica severa, Battle y col.(106) demostraron un incremento de la actividad motora del colon tras la administración de 20 mg de metoclopramida vía intravenosa, o de neostigmina intramuscular.

Además, según Battle y col. (107) en 1981, la administración intravenosa de 10 mg de metoclopramida en 10 pacientes con esclerosis sistémica progresiva estimuló la actividad contráctil del colon en 4 de ellos.

Aunque en los ensayos iniciales se consideró que había una respuesta fisiológica escasa al fármaco en el colon, investigadores posteriores han constatado un aumento de la amplitud de las contracciones y una disminución del tiempo de tránsito en dicho órgano. Esto se ha observado tanto en voluntarios sanos como en pacientes con enteropatía diabética grave (108).

I.5.2.2.- Mecanismo de la acciones gastrointestinales.-

El mecanismo de acción exacto de la metoclopramida sobre el tracto gastrointestinal permanece aún sin clarificar. No obstante, se ha establecido que las contracciones gástricas y esofágicas producidas por este fármaco fueron inhibidas por agentes anticolinérgicos como la atropina y potenciadas por medicamentos colinérgicos como el carbacol y la metacolina (99).

Ya que la vagotomía no modifica los efectos gastrointestinales de la metoclopramida, ello sugiere que el lugar de acción es localizado, siendo éste las terminaciones nerviosas periféricas en el músculo intestinal (109).

A diferencia de los fármacos colinérgicos, la metoclopramida requiere lugares intrínsecos neuronales de almacenamiento de acetilcolina para ejercer sus acciones farmacológicas. La actividad postsináptica resultante para la metoclopramida se debe a la facilidad para aumentar la liberación de acetilcolina en las neuronas colinérgicas postganglionares del tracto

gastrointestinal y la sensibilización de los receptores muscarínicos de la musculatura lisa gastrointestinal a las acciones de la acetilcolina (95,108).

Destaca la acción facilitadora de la metoclopramida sobre la actividad colinérgica gastrointestinal a nivel periférico. Esta acción se realiza fundamentalmente a nivel presináptico, estimulando la liberación de la acetilcolina pero se desconoce si dicha facilitación es el resultado de una acción inespecífica, o si se debe a la interacción con receptores presinápticos de otros sistemas: a) bloqueo de adrenoceptores alfa 2 o de receptores muscarínicos, que tienen una función inhibidora de la liberación de acetilcolina; b) agonismo parcial sobre receptores de la 5-hidroxitriptamina, otro neurotransmisor relacionado con la conducción nerviosa intestinal (90).

Hay y col.(110) en 1977 y Hay y Man (111) en 1979 refieren que los efectos de la metoclopramida pueden ser debidos a un aumento en la liberación de acetilcolina. También podría sensibilizar los receptores muscarínicos de la acetilcolina en la musculatura lisa gastrointestinal (112) o facilitar los mecanismos

colinérgicos por alguna otra acción, según Zar y col.(113).

Pinder y col.(96) en 1976 sostienen que la metoclopramida no tiene actividad anticolinesterasa y sus acciones no son afectadas por los agentes bloqueantes ganglionares. No obstante, la sensibilización por acetilcolina puede prevenirse por dichos bloqueantes (95).

Posteriormente y en contraposición, Fontaine y Reuse (114) observaron en su trabajo que las benzamidas sustituidas (metoclopramida, bromopride, tiapride y sulpiride), a concentraciones de 10 a 100 microm, aumentan de manera significativa la sensibilidad del recto abdominal de rana a la acetilcolina exógena, pero no al carbacol. Sugieren que dicho efecto podría estar relacionado con la actividad anticolinesterasa de estos fármacos, la cual fue medida en homogeneizados obtenidos del citado músculo.

Por otra parte, se propone que la metoclopramida potencia el peristaltismo de los primeros tramos del tubo digestivo, aumenta el tono de la parte inferior

del esófago y relaja el píloro quizá por antagonización de los efectos inhibidores de la estimulación dopaminérgica (115).

Algunos experimentos tratan de evidenciar que la dopamina es un neurotransmisor inhibitor en el esófago y en el estómago de hombre y animales y que la metoclopramida actúa antagonizandola (115,116). No obstante, efectos opuestos de la dopamina y los antagonistas en el músculo liso gastrointestinal no aportan pruebas de que la dopamina sea un neurotransmisor inhibitor en el intestino (116).

Se ha prestado, pues, particular atención al bloqueo de los receptores D2, habiéndose aceptado de modo general que la estimulación dopaminérgica a nivel gastrointestinal es de carácter inhibitor. Dicho efecto es regido por el vago y es abolido por la vagotomía. Con la metoclopramida, se produce una inhibición farmacológica de este efecto, que puede ser a su vez antagonizada por la administración de levodopa (108).

Sin embargo, existen autores (90) que alegan importantes dificultades para aceptar esta hipótesis:

a) no se han detectado neuronas ni fibras dopaminérgicas en la pared gastrointestinal, ni se ha demostrado su acción fisiológica a nivel de los plexos; b) no se localizan receptores dopaminérgicos en todas las especies animales; c) la acción de la dopamina puede ser explicada por la activación sobre otros receptores (por ejemplo adrenérgicos), d) hay derivados benzamídicos que carecen de actividad antagonista D2 y mantienen su capacidad de estimular la motilidad gastrointestinal.

Los mismos autores indican la posibilidad de que el efecto facilitador del vaciamiento gástrico producido por la metoclopramida tenga un componente central, no dopaminérgico, consistente en un aumento de la actividad de centros nerviosos de carácter colinérgico.

En consecuencia, el mecanismo de acción de la metoclopramida puede explicarse mediante tres hipótesis:

-1) Por la liberación de acetilcolina como consecuencia de la estimulación de la neuronas postganglionares colinérgicas y de los plexos nerviosos intrínsecos del tubo digestivo, lo que produciría un aumento de la

contracción del músculo liso. Osea potenciación de los efectos colinérgicos.

-2) Por acción directa sobre la musculatura lisa.

-3) Por bloqueo de la acción de la dopamina sobre los receptores D2.

I.5.2.3.- Acción antiemética.- (92,99)

La metoclopramida posee una gran eficacia antiemética siendo, como tal, el fármaco más empleado. Dicha acción es ejercida a nivel central (zona quimiorreceptora gatillo) y a nivel periférico (gastrointestinal).

Es un potente antagonista del vómito inducido en el hombre por apomorfina, hidergina, reserpina y sulfato de cobre. Su acción antiemética es treinta y cinco veces más intensa que la de la clorpromazina (117).

También contrarresta el vómito postoperatorio y el provocado por agonistas dopaminérgicos, opiáceos,

digitálicos, tuberculostáticos, antineoplásicos incluido el cis-platino. Con este último se usan altas dosis de metoclopramida (2 mg/kg) para prevenir las náuseas o el vómito o para reducir el número y duración de los periodos eméticos.

Asimismo, desarrolla su acción en aquellos vómitos que se pueden producir durante el embarazo.

1.5.2.4.- Mecanismo de la acción antiemética.- (95,99)

El mecanismo preciso de esta acción de la metoclopramida no está del todo claro, pero dicho fármaco afecta a la zona quimiorrectora gatillo medular, bloqueando los receptores dopaminérgicos en dicha zona. Además disminuye la sensibilidad de los nervios viscerales que transmiten impulsos aferentes desde el tracto gastrointestinal al centro del vómito en la formación reticular lateral.

A esto se suma que la metoclopramida, con su acción estimulante sobre el vaciamiento gástrico, mejora el vómito evitando la relajación gástrica que lo precede.

I.5.2.5.- Otras acciones farmacológicas.- (84,90,118)

Sobre el sistema nervioso central, la metoclopramida, al igual que otras benzamidas, se comporta como bloqueante de los receptores D2, pero su potencia es inferior a la del supiride y demás compuestos. De ahí que a dosis terapéuticas, dicha acción depresora central de tipo neuroléptica, casi no aparezca. Sin embargo, a veces induce cuadros extrapiramidales y a dosis elevadas llega a producir claros efectos neurolépticos.

A pesar de que la metoclopramida está clasificada como un antagonista selectivo de los receptores D2 dopaminérgicos y aunque existen teorías que avanzan en este sentido, el lugar y mecanismo de acción molecular de ésta y otras benzamidas derivadas, permanece sin aclarar. Además la falta de potencia de las benzamidas en los lugares de los receptores D1 y D2 sugieren que ninguno de ellos ofrece una total explicación de la acción de estos fármacos (119).

En personas anestesiadas, la administración

intravenosa de metoclopramida puede a veces ocasionar una caída de presión arterial; en cambio, en pacientes con feocromocitoma ha originado crisis hipertensivas por estimulación de la médula suprarrenal.

Según Fang y col.(120) dicho fármaco estimula la liberación de prolactina, pero el exacto mecanismo no está claro. El mencionado efecto es producido a bajas concentraciones, mientras que a altas ocasiona una inhibición en la liberación de dicha hormona (121). Asimismo, puede producir aumento en la secreción de aldosterona y parathormona.

I.5.3.-FARMACOCINETICA.- (90,122)

La absorción oral de la metoclopramida es buena, alcanzándose la concentración máxima en una hora. Por vía rectal la absorción es lenta e incompleta. Pasa a todos los órganos, especialmente el tracto gastrointestinal, hígado, corazón, y atraviesa la barrera hematoencefálica, distribuyéndose irregularmente en el cerebro, en el cual la concentración más elevada se alcanza en el área postrema.

El metabolismo hepático es muy variable, lo que hace que la biodisponibilidad fluctúe de un individuo a otro entre el 32 y el 79 %. Las concentraciones máximas plasmáticas también están sujetas a esta variabilidad. Por término medio se pueden alcanzar valores sanguíneos de 100, 80 y 40 ng por ml., tras la administración de 10 mg vía intravenosa, 20 mg y 10 mg vía oral, respectivamente (99). En general aparecen efectos tóxicos con niveles por encima de 120 ng por ml. En la leche, a donde también llega, la concentración alcanzada es doble que en el plasma.

Se elimina con rapidez por conjugación hepática el 80 % y eliminación renal el 20 %, siendo su vida media de 4.2 a 5.1 horas por vía oral, y de 2.6 a 4.6 horas por vía intravenosa. En la insuficiencia renal la vida media aumenta a 14 horas, habiéndose descrito en tales casos una incidencia mayor de reacciones extrapiramidales.

I.5.4.- INDICACIONES TERAPEUTICAS.- (90,108,118)

En la actualidad las indicaciones de la metoclopramida comprenden la gastroparesia diabética y del reflujo esofágico, dispepsia flatulenta, otras alteraciones funcionales de la motilidad intestinal y la reducción del vómito, principalmente y a altas dosis, en el secundario a la quimioterapia anticancerosa. Asimismo, se ha empleado para facilitar la intubación del intestino delgado y el examen radiológico de éste y del estómago (123).

Además, se han identificado un cierto número de posibles indicaciones, hasta ahora no aprobadas por la FDA y que actualmente están justificadas por trabajos publicados. Así, su uso para reducir el riesgo de aspiración del contenido gástrico en enfermos que deben ser intervenidos urgentemente, para tratar a pacientes con esclerodermia y distrofia miotónica con complicaciones gastrointestinales o a pacientes con íleo paralítico inducido por la quimioterapia.

I.5.5.- EFFECTOS SECUNDARIOS.- (90,122)

A dosis terapéuticas usuales (30 a 40 mg diarios) la metoclopramida causa pocas reacciones adversas. Aunque éstas son suaves, transitorias y reversibles al suspender la medicación, hay trabajos (124) que aportan una incidencia del 34 % de pacientes que las presentan a dosis comprendidas entre 30 y 80 mg diarios.

Los efectos secundarios más frecuentes suelen ser somnolencia y desasosiego, existiendo datos (125) que hablan de un 76 % de pacientes que presentaron una sedación leve cuando fueron tratados, a altas dosis (2 mg/Kg), frente a vómitos producidos por administración de antineoplásicos.

Asimismo, puede dar lugar a diarreas y en pacientes con feocromocitoma ha provocado crisis hipertensivas. Fenómenos extrapiramidales e hiperprolactinemia pueden aparecer ocasionalmente a dosis terapéuticas y parkinsonismo en ancianos sometidos a largos tratamientos. En niños son más frecuentes las distonías (trismo, tortícolis, espasmo facial, opistótono, crisis oculógiras), que ceden con agentes anticolinérgicos (126).

A veces se ha observado incontinencia urinaria o broncoespasmo en pacientes asmáticos.

I.5.6.- INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS.- (91,95)

Interacciona con gran cantidad de fármacos, debido a que modifica su absorción por incrementar el vaciado gástrico y tránsito gastrointestinal. Así, la incorporación de digital, que se lleva a cabo en el estómago, puede ser disminuida, mientras que la de otros fármacos (aspirina, diazepam, etanol, acetaminofeno, levodopa, litio, tetraciclina), cuya absorción se realiza en el intestino delgado, puede ser aumentada.

Puede potenciar la acción de depresores del SNC, como analgésicos, sedantes, anestésicos o alcohol y no debe ser utilizada con otros fármacos causantes de reacciones extrapiramidales.

Según Turner y col.(127) en 1989, la premedicación de 10 mg vía intravenosa de metoclopramida condujo a una prolongación significativa de la acción de la succinilcolina.

La administración conjunta de droperidol y metoclopramida puede precipitar la aparición de súbitos temblores de piernas en pacientes no psiquiátricos (128).

I.6.- BROMOPRIDE.-

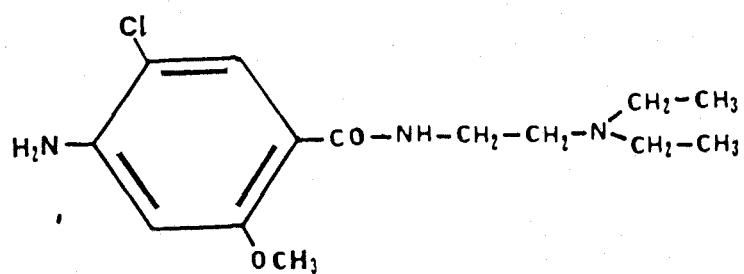
I.6.1.- ESTRUCTURA Y PROPIEDADES.- (122)

El bromopride es una benzamida sustituida similar a la metoclopramida (Fig. H). Su única diferencia estructural es la sustitución en el anillo un átomo de cloro por uno de bromo. Se trata de una orto anisamida que responde a la formulación 4-amino-5-bromo-2-metoxi-N-(2-dietilaminoetil) benzamida.

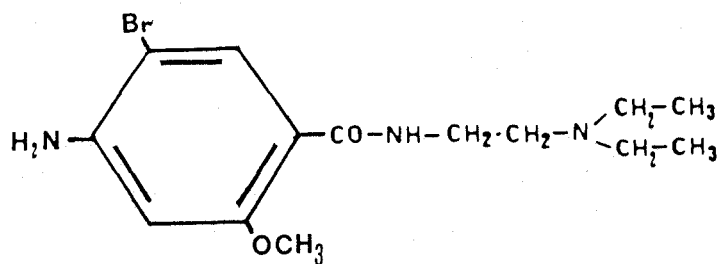
De forma análoga a la metoclopramida, también guarda relación estructural con la procainamida y el sulpiride.

Es utilizado como tal base y también su sal, en forma de clorhidrato. La solubilidad de la primera es aproximadamente de 28 mg/ml en alcohol etílico, 0.1 mg/ml en agua destilada, 137 mg/ml en cloroformo y 1 mg/ml en éter etílico (129).

FIGURA H



Metoclopramida



Bromopride

Fórmula estructural de la metoclopramida y el bromopride.

I.6.2.- FARMACODINAMIA.-

I.6.2.1.- Acciones gastrointestinales.- (129,130,131)

Al principio se descubrió que el bromopride se oponía a la contracción del íleon de cobaya, provocada "in vitro" por la acetilcolina. Sin embargo, posteriormente, con el estudio de diferentes derivados de las benzamidas en el íleon de cobaya, se observó que producía una ligera estimulación a concentraciones comprendidas entre 10 y 100 microm. Más tarde, en otros ensayos, la respuesta de contracción de dicho órgano a la acetilcolina aumentaba cuando se utilizaba el bromopride a una concentración de 10 microm, mientras que a 100 microm decrecía. Esto explicaba los primeros hallazgos.

En preparaciones de diversos músculos lisos, especialmente duodeno e íleon de cobaya, se estudió también el efecto del bromopride "in vitro". Aquí fue confirmado el efecto estimulante o depresor según la concentración débil o fuerte empleada, pero no una

potenciación de la acetilcolina.

Los efectos del bromopride sobre la motilidad intestinal "in vivo" se probaron en perros por electromiografía. El registro de los potenciales eléctricos de punta y de la amplitud de las contracciones mostró aumentos bajo la acción de dicho fármaco. También se observó una aceleración del ritmo eléctrico de la cavidad gástrica y de los arranques de potencial de punta insertados sobre las ondas lentas duodenales.

Sobre la cavidad pilórica, en el perro, la inyección intravenosa de bromopride, en dosis que van de 0.064 a 4 mg/Kg., provocó un aumento dosis-dependiente de la amplitud de los movimientos pilóricos espontáneos.

En ratas no anestesiadas y con una cánula gástrica permanente se demostró que dicho fármaco, a dosis de 5, 10, 15 ó 20 mg/Kg., provocaba una fuerte estimulación de la motilidad gástrica, sobreviniendo después una fase de freno. Al mismo tiempo, el volumen de la secreción gástrica fue disminuido.

Estudios de tránsito digestivo en ratas recibiendo una suspensión de carbón, han revelado con el bromopride un discreto aumento de la velocidad de tránsito, medido a partir del recorrido del trazador. Por otro lado, dicho fármaco antagoniza el efecto de retardo producido por la atropina.

Sobre el esófago, según Lux y col.(132), el bromopride, al igual que la metoclopramida, ejerce un efecto estimulante del esfínter esofágico inferior en el hombre. Esta estimulación también afecta al peristaltismo esofágico, sin embargo no se observaron cambios significativos en el rango de propagación o en la amplitud.

Dicho fármaco posee una acción reguladora de los trastornos funcionales de la motilidad gastrointestinal. Además parece ejercer un cierto efecto protector en la úlcera de Shay por ligadura de píloro. Asimismo, la úlcera provocada en la rata por inmovilización durante 24 h. y la úlcera gástrica causada por la reserpina parecen igualmente estar limitadas por el bromopride.

I.6.2.2.- Mecanismo de las acciones gastrointestinales.-

No existe información clara al respecto. Todo lo dicho anteriormente para la metoclopramida en este apartado podría ser extrapolado, en parte, para el bromopride, no estando del todo dilucidado el exacto mecanismo de acción.

Al igual que aquella, se considera al bromopride un bloqueante de los receptores D2 dopaminérgicos (129) y su mecanismo de acción en el aparato digestivo podría estar relacionado con ellos.

No obstante, existen estudios que apuntan en otro sentido. Así, el aumento de la sensibilidad de un músculo liso a la acetilcolina exógena fue observado por Fontaine y Reuse (114). Ellos hicieron pruebas sobre el recto abdominal de rana y sugirieron que dicho efecto podría estar ligado a una inhibición de la colinesterasa.

En esta línea, Vacca y col.(133) en 1987 encontraron que, a ciertas dosis, el bromopride produce efectos anticolinesterasa. Hecho que aportaron mediante

ensayos realizados en colinesterasa de perro y de conejo, y por la influencia sobre la acción hipotensora de la acetilcolina incubada con suero de conejo, en presencia o ausencia del fármaco. En sus experimentos, el efecto anticolinesterasa de la metoclopramida resultó ser mayor que el del sulpiride, bromopride, procainamida y procaína, pero menor que el de la neostigmina.

I.6.2.3.- Acción antiemética.- (129)

El poder antiemético del bromopride frente a la apomorfina, en el perro, ha dado lugar a diferentes evaluaciones. Unas veces fueron encontradas dosis antieméticas muy débiles, mientras que en otras ocasiones dichas dosis fueron mayores.

Niemegeers (134), utilizando el citado test de la émesis frente a la apomorfina en el perro, obtuvo una DE-50 de 0.091 mg/Kg por vía subcutánea con las siguientes características de acción: comienzo al cabo de 15 minutos, máxima acción a los 60 minutos y una duración de 180 minutos. Por vía oral, la DE-50 fue de 0.33 mg/Kg.

También se ha comprobado la acción ejercida por el bromopride frente a los efectos eméticos de los alcaloides dihidrogenados del cornezuelo del centeno y del lanatósido. De igual manera, antagonizó el efecto emético inducido por el sulfato de cobre.

I.6.2.4.- Mecanismo de la acción antiemética.- (129)

Se atribuye el efecto de la apomorfina a una acción estimulante sobre ciertos receptores dopaminérgicos existentes en la zona quimiorreceptora desencadenante o gatillo. Por tanto, al ser antagonizada por el bromopride, se sugiere una primera demostración de la propiedad antidopaminérgica de éste.

Igualmente, la acción emética de los alcaloides del cornezuelo del centeno y del lanatósido dependen de la misma propiedad a nivel de la zona gatillo, apoyando el mecanismo antidopaminérgico del bromopride.

Por el contrario, el sulfato de cobre no actúa sobre la zona gatillo sino a nivel periférico, por irritación de la mucosa gástrica. También aquí, como se dijo antes, el bromopride antagonizó los efectos eméticos.

I.6.2.5.- Otras acciones.-

De la misma forma que la metoclopramida, el bromopride estimula la secreción de prolactina. Según Ferrau y col.(135), ambos lo hacen cualitativa y cuantitativamente de igual manera en la mujer normal adulta.

Pérez-López y Abos (136) estudiaron la respuesta hormonal de varias ortopramidas, observando el incremento en la secreción de prolactina, y hallaron que la metoclopramida posee mayor efecto a este nivel que el bromopride. Igualmente, ninguno de ellos tuvo efecto sobre otras hormonas pituitarias, como es el caso de la LH.

Felicio y Naselo (137) en 1989 obtuvieron que el bromopride aumentó los niveles de prolactina en ratas. Esta elevación fue máxima recibiendo 2.5 mg/Kg de peso, la menor de las dosis probadas.

En cuanto al comportamiento locomotor, los mismos autores (138) un año antes, probaron que a la dosis

citada, este fármaco producía una inhibición, mientras que administrado a razón de 5 mg/Kg de peso dicha inhibición era bloqueada, con abolición de las respuestas. Además sugirieron que el bromopride posee propiedades neurolépticas.

Respecto a los distintos sexos, esta benzamida también fue estudiada (139) con diferentes tratamientos en ratas machos y hembras, adultas. Ratas hembras de madres tratadas durante la lactancia presentaron cocientes de lordosis más bajos que los controles. Aquellas de madres tratadas solo durante el embarazo no presentaron diferencias en dicho parámetro. Tampoco se apreciaron cambios en los machos.

Mouille y col.(140) ensayaron la acción cardiovascular de algunas benzamidas. Según sus resultados, el bromopride posee un efecto hipotensor y hemodinámico similar al de la metoclopramida en perros anestesiados. Igualmente fue parecida la inhibición de las arritmias inducidas por adrenalina, ouvabaína y ligadura coronaria, en el perro y en el cerdo.

I.6.3.- FARMACOCINETICA.-

La farmacocinética del bromopride es similar a la presentada por la metoclopramida. Sus aclaramientos y volúmenes de distribución fueron parecidos (141).

La biodisponibilidad parece ser ligeramente más baja para el bromopride, pero presenta amplias variaciones entre los distintos individuos. El valor de ésta para la dosis de 20 mg administrada oral e intramuscularmente, fue del 54 y 78 por ciento, respectivamente. Vía oral, la formulación del bromopride en forma de cápsulas retardó la absorción pero, no influyó en la biodisponibilidad del fármaco (141).

Lucker y col.(142) realizaron estudios farmacocinéticos con distintas formas farmacéuticas (supositorios, gotas y cápsulas), no encontrando diferencias de biodisponibilidad entre ellas. Dan valores del 70 % para una sola dosis y del 90 % para dosis múltiples.

Los niveles plasmáticos máximos alcanzados tras

la administración de dosis simples orales de 10, 20 y 30 mg fueron de 20 ng/ml., 32 ng/ml. y 64 ng/ml., respectivamente. Con monodosis intramusculares de 20 mg. se obtuvo un pico máximo de 108 ng/ml.(141).

Grassi y col.(143) proporcionan, sorprendentemente, cifras de 453 ng/ml. y 685 ng/ml. de bromopride en plasma relativas a dosis simples de 10 mg. vía oral e intramuscular.

Brodie y col.(144), mediante cromatografía líquida de alta resolución, determinan concentraciones plasmáticas de 55 ng/ml. una hora después de la administración oral de 20 mg. de bromopride.

Presumiblemente la biotransformación es hepática (141), siendo uno de los principales metabolitos el monoetil-bromopride (145), y solo una pequeña proporción, inferior al 10 %, es excretada por la orina sin modificar (144).

I.6.4.- INDICACIONES TERAPEUTICAS.- (131)

Al igual que la metoclopramida, el bromopride está indicado en la regulación de los trastornos patológicos de la motilidad gastrointestinal, así como en la sintomatología clásica de dichas alteraciones. También tiene utilidad en el tratamiento del reflujo gastroesofágico, estenosis pilórica y en la atonía postoperatoria.

Debido a su propiedad antiemética, es asimismo empleado para combatir los vómitos de cualquier etiología.

I.6.5.- EFFECTOS SECUNDARIOS.- (131)

Son parecidos a los causados por la metoclopramida. Además de los ya mencionados en el apartado de acciones farmacológicas, sobre el sistema cardiovascular y hormonal, el bromopride puede dar lugar, sobre todo con posologías elevadas, a fenómenos de fatiga y neurolépticos. Estos últimos son de tipo disquinético.

I.6.6.- INTERACCIONES CON OTROS FARMACOS.- (131)

La administración simultánea del bromopride con fármacos neurolépticos o antivertiginosos, que actúen a nivel de la sustancia reticulada, puede dar lugar a la potenciación de los efectos.

Al igual que la metoclopramida, puede afectar a la absorción de medicamentos, debido a su efecto sobre la motilidad gastrointestinal.

OBJETIVOS

A la vista de las consideraciones efectuadas en este apartado de Introducción, y ante la observación realizada en nuestro laboratorio de que los fármacos antieméticos y estimulantes de la motilidad gastrointestinal, metoclopramida y bromopride, inhiben la actividad de la colinesterasa plasmática y eritrocitaria humana, los objetivos esenciales del presente trabajo son:

1.- Caracterizar la inhibición producida por dichos fármacos sobre las colinesterasas humanas sérica y hemática.

2.- Analizar en profundidad el mecanismo de acción farmacológico admitido en la actualidad para los fármacos, tipo benzamidas sustituidas, metoclopramida y bromopride.

3.- Proponer, a tenor del tipo de inhibición que ocasionan la metoclopramida y el bromopride sobre las

colinesterasas, la idea de un nuevo mecanismo de acción que, sin invalidar los aceptados con anterioridad, contribuya a un mejor conocimiento del modo de actuación de estos fármacos, ampliamente utilizados en medicina humana.

4.- Realizar una aportación, mediante los resultados obtenidos en nuestros ensayos, del modo en que la metoclopramida y el bromopride interaccionarían con el centro activo de las colinesterasas, ayudando a una mejor comprensión del mecanismo inhibitorio y posibles previsiones para otras benzamidas sustituidas.

5.- Teniendo en cuenta la similitud estructural de estos fármacos con la dibucaina, se pretende analizar y comparar el comportamiento que tendrían frente a determinadas variantes genéticas de la colinesterasa sérica, usual y atípica, observando la posibilidad de ser utilizados como herramientas analíticas para el estudio y detección de otras variantes anormales de dicha enzima.

II. - MATERIAL Y METODOS

Material y métodos

Los ensayos realizados en este trabajo, tanto para la determinación de la CHE como de la ACHE, se basan en técnicas espectrofotométricas que determinan la actividad de una reacción enzimática. La velocidad de la reacción se establece en relación a los incrementos de absorbancia, a una determinada longitud de onda, por unidad de tiempo.

Todas las pruebas se llevaron a cabo "in vitro" coexistiendo en el medio de reacción la enzima procedente de las distintas muestras, el sustrato adecuado para cada enzima, el agente cromógeno y el supuesto inhibidor.

II.1.- MUESTRAS UTILIZADAS.

Las enzimas fueron analizadas en aquellas fuentes donde estaban contenidas de forma predominante en el

hombre. La CHE fue obtenida del suero y la ACHE de un hemolizado de hematíes.

La preparación de dichas muestras se hizo como sigue.

II.1.1.- SUERO HUMANO.-

Se realizaron extracciones de sangre por punción venosa a diez varones adultos sanos. Por coagulación a temperatura ambiente y posterior centrifugación fueron separados los sueros. A éstos se les determinó la CHE, según el método que describiremos a continuación, y el número de dibucaína, resultando para todos ellos valores comprendidos dentro del límite de la normalidad. A partir de los mismos se consiguieron diferentes pool de sueros, que fueron empleados para nuestros propósitos.

La conservación de las muestras se llevó a efecto mediante congelación a temperatura inferior a -20° C.

También fueron utilizados, en otra fase de nuestros ensayos relacionada con las variantes atípicas de la

CHE, cuatro sueros procedentes de pacientes que presentaron variantes genéticas de dicha enzima. Estos fueron proporcionados por el Servicio de Bioquímica Clínica, Departamento de Análisis Clínicos, del Hospital Universitario " Virgen del Rocio ".

II.1.2.- HEMOLIZADO DE ERITROCITOS HUMANOS.-

Para su obtención se extrajo sangre por venopunción a tres personas adultas sanas, recogiénose en tubos que contenían heparina como anticoagulante. Inmediatamente fue centrifugada a 2000 r.p.m. durante quince minutos, se separó el plasma y se añadió un volumen igual de solución isotónica estéril de cloruro sódico. El sobrenadante fue retirado y se repitió tres veces el lavado de los hematíes. En el último, tras desechar el sobrenadante, se tomó con una pipeta un volumen del paquete de eritrocitos y se realizó una dilución 1:50 con agua destilada y desionizada.

Los tres hemolizados, así conseguidos, fueron destinados para la determinación de la actividad

enzimática de la ACHE pocos minutos después de su preparación, y cada uno de ellos por separado.

II.2.- REACTIVOS UTILIZADOS.-

Para el análisis de la enzima sérica se dispuso de los sustratos butiril y acetiltiocolina. El primero a partir de una solución de yoduro de butiriltiocolina 218 mM y el segundo de otra de yoduro de acetiltiocolina 156 mM, preparadas por rehidratación de un liofilizado con 3 ml de agua destilada y desionizada.

El medio de reacción contenía un tampón de fosfatos 52 mM a pH 7.7 para el primer sustrato y a pH 7.2 para el segundo. En el caso del agente cromógeno se partió de una solución 0.26 mM de DTNB.

En el ensayo de la enzima eritrocitaria se empleó yoduro de acetiltiocolina 15.6 mM, un tampón de fosfatos a pH 7.2 y el mismo agente cromógeno citado anteriormente.

Todos los reactivos mencionados hasta ahora fueron

suministrados Boehringer Mannheim GmbH, en sus métodos comercializados para el análisis de una y otra enzima. Del mismo modo, tuvo dicha procedencia el clorhidrato de dibucaína, 100 mg/100 ml, utilizado como inhibidor e incluido en el protocolo para determinación del número de dibucaína del mismo fabricante.

La metoclopramida monoclóridato monohidrato fue solicitada a los laboratorios Delagrange, S.A., siendo recibida en forma de polvo blanco cristalino y respondiendo al lote 43 en la ficha de control de materias primas. En ella se le asigna un punto de fusión de 186 °C, solubilidad normal, pH de 4.84-4.86 y, por color, una absorbancia a 450 nm de 0.004-0.008. Asimismo figuran superadas las pruebas de impurezas de síntesis, arsénico, fenoles, metales pesados y grado de opalescencia. Las distintas soluciones de este principio activo, punto de partida para añadir la cantidad adecuada al medio de reacción, se prepararon por disolución en agua destilada y desionizada.

El bromopride fue también servido como polvo blanco por los laboratorios Delagrange, S.A., pero en forma de base. Perteneciente al lote 871216, respondía a un

punto de fusión de 152 °C, solubilidad normal, pH 9.35 y presentaba un absorbancia a 450 nm de 0.020. De manera similar, superó los controles de impurezas de síntesis, arsénico, hierro y metales pesados. En su ficha científica nos informaron que dicho compuesto tenía una solubilidad en ácido clorhídrico acuoso (6 ml/l) a pH 1.2 de 2.4 g/100 ml., formando así la sal correspondiente. Atendiendo a estos valores se consiguieron las soluciones correspondientes para ser adicionadas al medio de reacción. El ácido clorhídrico dedicado para este fin fue de grado analítico.

II.3.- APARATOS Y MATERIAL UTILIZADOS.-

- Los incrementos de absorbancia fueron medidos con un espectrofotómetro RDJ-55, con lámpara halógena de tungsteno, monocromador con red de difracción de alta resolución y calculador de cinéticas. Se emplearon microcubetas de poliestireno desechables y con 1 cm de longitud.

- Para la obtención de las muestras nos servimos de una centrifuga Heraeus, modelo Varifuge, RS., con

caberales oscilantes.

- Tres micro-pipetas automáticas graduables Brand-Transferpettor que abarcan un rango de 5-25, 10-50 y 20-100 microlitros, respectivamente.

- El peso de los principios activos se hizo en una balanza de precisión Prolabo de cadena, y se manejó material de vidrio (probetas, pipetas, vasos de precipitado y frascos de Erlenmeyer) de calidad contrastada. Los tubos de ensayo fueron de plástico y desechables.

II.4.- PROCEDIMIENTOS ANALITICOS.-

El fundamento básico de la determinación de CHE y ACHE en nuestros ensayos es el método colorimétrico descrito para ambas enzimas en el apartado I.2.2. Se trata de la hidrólisis de los sustratos, butiril o acetiltiocolina, por dichas enzimas y la subsiguiente interacción del grupo tiol formado con el reactivo de Ellman (DTNB). Consecuentemente tiene lugar la aparición del anión amarillo, 5-tio-2-nitrobenzoato, cuya

cuantificación es medida por espectrofotometría a 410 nm en relación a los incrementos de absorbancia por unidad de tiempo.

Debido a la capacidad de la CHE de poder actuar sobre los dos sustratos, se realizaron los estudios enzimáticos de ésta sobre ambos, mientras que aquellos para la ACHE se llevaron a cabo solo con la acetil-tiocolina, dada su especificidad.

A lo largo de todas las pruebas se presto especial atención al control de la temperatura, que fue siempre de 25 °C. Se seleccionó la modalidad de temperatura ambiente en el espectrofotómetro y se mantuvo la habitación del laboratorio a 25 °C mediante un sistema de calefacción por aire acondicionado.

Todos los ensayos analíticos se efectuaron por duplicado, confirmándose la reproducción de los resultados.

II.4.1.- DETERMINACION DE LA COLINESTERASA SERICA.-

- Sustrato butiriltiocolina.-

Las reacciones que transcurren son:

- 1) butiriltiocolina + H₂O --(CHE)-- tiocolina + butirato
- 2) tiocolina + DTNB ----- 5-tio 2-nitrobenzoato.

El medio de reacción se preparó con 1.5 ml de la solución tampón a pH 7.7 citada en el apartado de reactivos, la cual contenía 0.26 mM de DTNB, y se adicionó 0.01 ml de suero. A continuación se añadió 0.05 ml de la solución de sustrato 218 mM, midiendo rápidamente la extinción inicial, y sus valores a los 30, 60 y 90 segundos después, a 410 nm. Se observó que la reacción transcurría de forma lineal. La actividad de la CHE en U/l fue calculada multiplicando la media de los incrementos de las absorbancias por el factor 23460, según el fabricante del método.

Las concentraciones finales en el medio de reacción, al inicio de ésta, fueron:

- Yoduro de butiriltiocolina .. 7 mM.
- Tampón de fosfatos 50 mM.
- DTNB 0.25 mM.

El protocolo analítico fue sometido a control de calidad utilizando los sueros controles Precinorm U y Precipath U, adquiridos a la misma casa comercial.

- Sustrato acetiltiocolina.-

Las reacciones que tienen lugar son:

- 1) acetiltiocolina + H₂O --- (CHE) --- tiocolina + acetato
- 2) tiocolina + DTNB ----- 5-tio 2-nitrobenzoato.

La determinación se efectuó con 1.5 ml de la solución tampón a pH 7.2, cuya concentración en DTNB era de 0.26 mM y la adición de 0.01 ml de suero. Posteriormente se agregó 0.05 ml de yoduro de acetiltiocolina 156 mM. De forma similar se leyó la extinción inicial y los incrementos a los 30, 60 y 90 segundos después. La actividad enzimática fue calculada como resultado del producto de la media dichos incrementos y el factor 23460, facilitado por el método.

Las concentraciones finales en el ensayo, al inicio de la reacción, fueron las siguientes:

- Yoduro de acetiltiocolina .. 5 mM.
- Tampón de fosfatos 50 mM.
- DTNB 0.25 mM.

II.4.2.- DETERMINACION DE LA ACETILCOLINESTERASA INTRA-ERITROCITARIA.-

Se llevó a cabo según la técnica colorimétrica de Ellman, atendiendo a la descripción que hace Whittaker (60) en su trabajo, al artículo de Lewis y col.(61) para el cálculo de la actividad enzimática y a la metodología proporcionada por Boehinger Mannheim GmbH.

El medio de reacción fue elaborado con 1.5 ml de solución tampón a pH 7.2 y DTNB 0.26 mM. Se añadió 0.02 ml de hemolizado (1:50), dejando incubar tres minutos. Acto seguido se puso 0.05 ml de yoduro de acetiltiocolina 15.6 mM y se midió la extinción inicial y los incrementos por minuto a 410 nm, hasta un total de cinco minutos. Se comprobó que la reacción transcurría

de forma lineal y fue hallada la media de dichos incrementos de absorbancia.

Según Lewis y col.(60), y como describíamos en la introducción, la actividad enzimática de la ACHE viene definida por los micromoles de sustrato hidrolizados por minuto y por litros de hematíes. Esto viene dado por la fórmula:

$$\text{Actividad} = [\Delta A / [\text{min} \cdot E]] \cdot [V_t/V_h] \cdot [100 D/H]$$

en la cual, si tenemos en cuenta los volúmenes susodichos y que partíamos directamente del paquete de hematíes, tendremos:

$$A = [\Delta A / [\text{min} \cdot E]] \cdot 3925$$

y sustituyendo el valor de $E = 13.4 \cdot 10^{-3} \text{ L} \cdot \text{micromol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

$$A (U/l) = \Delta A / \text{min} \cdot 292910$$

Las concentraciones finales en el medio de reacción al inicio de la hidrólisis fueron:

- Yoduro de acetiltiocolina ... 0.5 mM.
- Tampón de fosfatos 50 mM.
- DTNB 0.25 mM.

II.4.3.- DETERMINACION DE CHE Y ACHE EN PRESENCIA DE INHIBIDOR.-

Cuando se analizó la actividad de dichas enzimas en presencia de un inhibidor conocido (dibucaína), o posibles candidatos a serlo (metoclopramida y bromopride), se procedió de igual manera. Previamente fue agregado dicho fármaco, mediante pequeños volúmenes micrométricos de soluciones adecuadas, hasta alcanzar la concentración deseada en el medio de reacción. Se llevó a efecto una incubación de dos minutos con una u otra enzima, antes de dar comienzo a la hidrólisis con la adición del sustrato.

Variando las concentraciones de inhibidor en el medio de la reacción y manteniendo constante el resto de los reactivos, con el sustrato y la enzima correspondiente, se consiguieron los resultados de las Tablas I a XVII y las Figuras 1 a 17.

Para evitar interferencias o el acontecimiento de otras reacciones secundarias se realizaron las siguientes comprobaciones:

- Al eliminar el sustrato del medio de reacción la actividad enzimática es nula, se haya añadido o no el inhibidor. Con lo cual confirmamos que no existe interacción entre éste y el cromógeno.

- Al no añadir la muestra (suero o hemolizado de hematíes), la hidrólisis no enzimática del sustrato es prácticamente despreciable y no se observa interacción entre éste y el inhibidor.

- La actividad de las enzimas, practicada con los mismos volúmenes de agua destilada que los añadidos a la reacción con el inhibidor, no sufrió variación. Lo cual indica que el ínfimo volumen sumado no interfiere como tal.

- Cuando se determinó la CHE en el hemolizado con butiriltiocolina como sustrato, su actividad fue cero. Con ello ratificábamos la ausencia de esta enzima al determinar la actividad enzimática de la ACHE.

II.4.4.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CHE Y ACHE
VARIANDO LA CONCENTRACION DE SUSTRATO.-

La concentración de inhibidor se mantuvo constante, así como los volúmenes totales de las distintas reacciones enzimáticas, y las concentraciones de tampón y cromógeno. El sustrato acetiltiocolina o butiriltiocolina, varió su presencia en el medio de reacción, midiéndose la actividad enzimática de la CHE y ACHE de la misma forma descrita en los apartados anteriores.

Las diversas concentraciones de sustrato se consiguieron por diluciones sucesivas de los reactivos iniciales, reportados en los métodos analíticos de la casa comercial.

De esta forma se obtuvieron las Tablas XVIII a XXXV y las Figuras correspondientes.

II.4.5.- DETERMINACION DE VARIANTES GENETICAS DE LA CHE.-

Con las muestras séricas normales y aquellas que contenían variantes atípicas se procedió a determinar el número de dibucaína. Esto se hizo de acuerdo con la metodología propuesta por Boehringer Mannheim GmbH.

Para ello, el ensayo en ausencia de inhibidor se realizó tal y como reseñábamos para la determinación de la CHE, usando como sustrato butiriltiocolina. La presencia de aquel se efectuó añadiendo 0.15 ml de una solución de clorhidrato de dibucaína, 100 mg/100 ml, y retirando el mismo volumen de la solución tampón-cromógeno como indica el fabricante. El número de dibucaína fue valorado por medio de la fórmula mencionada en el apartado I.2.2.3.

$$N^{\circ} D = 100 \cdot [1 - A/A']$$

donde A = actividad enzimática sin inhibidor y
A' = actividad en presencia de dibucaína.

Según el procedimiento empleado, los valores encontrados para el gen normal están comprendidos entre 70-90, para el gen heterocigótico atípico entre 30-70 y para el gen homocigótico atípico entre 0-20.

El mismo ensayo se llevó a cabo sustituyendo la solución de clorhidrato de dibucaína (100 mg/100 ml) por clorhidrato de metoclopramida 25 mg/ml y clorhidrato de bromopride 12.5 mg/100 ml. Estas concentraciones no son aleatorias, sino como consecuencia de la búsqueda de una inhibición similar con la dibucaína en CHE normales, como se verá más adelante. Los números de metoclopramida y bromopride fueron establecidos en razón a la fórmula citada para el número de dibucaína.

Los resultados de las Tablas XXXVI y XXXVII fueron obtenidos según estos procedimientos especificados. Los de la primera partiendo de muestras de sueros normales, mientras que para los de la segunda se utilizaron sueros de pacientes que presentaban variantes genéticas para la CHE.

III. - RESULTADOS

Resultados

En nuestro trabajo se recogen dos grupos de resultados que podemos diferenciar de forma genérica. Por una parte, aquellos que se obtienen al estudiar el efecto, y su mecanismo de acción, de la metoclopramida, bromopride y dibucaína sobre la actividad enzimática de la CHE y la ACHE. Por otra, aquellos que se derivan del comportamiento de la metoclopramida y del bromopride, a concentraciones previamente fijadas, frente a colinesterasas séricas normales y atípicas de determinados pacientes. Asimismo, su comparación con la dibucaína, de utilidad demostrada en la diferenciación de dichas variantes genéticas. Por tanto, distinguiremos en esta sección dos partes, que se abordarán a continuación.

Todas las Tablas que se describen se corresponden con sus Figuras, en cuanto a orden numérico se refiere, exceptuando las dos Tablas finales y las tres últimas Figuras.

PRIMERA PARTE: EFECTO Y ESTUDIO DE SU MECANISMO.-

Teniendo en cuenta que se han empleado dos tipos de sustratos para la CHE y solo acetiltiocolina para la ACHE, procederemos a agrupar los resultados de ambas por separado, diferenciando en cada apartado las consecuencias obtenidas para una y otra enzima.

III.1.- EFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA CHE Y ACHE.-

Los ensayos realizados con la CHE se especifican en las Tablas I a VI y las Figuras 1 a 6, y aquellos para la ACHE en las Tablas VII a IX y sus Figuras respectivas. En ellas se recogen los valores pertenecientes a la actividad de dichas enzimas sin el fármaco, para el primer dato de cada Tabla, y con cantidades crecientes de éste para el resto de los valores que le siguen.

III.1.1.- COLINESTERASA SERICA.-

En las Tablas I y II se refleja la acción de la metoclopramida sobre esta enzima, la primera con el sustrato butiriltiocolina y la segunda con acetiltiocolina.

Se observa en la Tabla I que para una concentración inicial de metoclopramida de 4.2 microM corresponde una actividad de 3050 U/l (74 %) y un porcentaje de inhibición del 26 %, mientras que en la Tabla II con 0.2 microM de metoclopramida se obtiene una actividad de 2698 U/l (79 %) y un porcentaje de inhibición del 21 %.

Las Figuras 1 y 2 se refieren a la representación gráfica de las actividades de la CHE (%) frente a la concentraciones de metoclopramida, para sus respectivas Tablas según el sustrato. En la primera podemos calcular una concentración de inhibidor relativa al 50 % de inhibición (I-50) de 15 microM y en la segunda la I-50 es de 1.5 microM.

En las Tablas III y IV se exponen los datos del

efecto causado por el bromopride sobre la actividad de la CHE. En la primera el sustrato es butiriltiocolina, mientras que en la segunda es acetiltiocolina. Podemos apreciar en la Tabla III que para una concentración inicial de bromopride de 4.2 microm se advierte una actividad de 2729 U/l (66 %) y por tanto, un porcentaje de inhibición del 34 %, mientras que en la Tabla IV, para un valor inicial de 0.2 microm se detectan 2580 U/l (76 %) de actividad y por ende un 24 % de inhibición.

En las Figuras 3 y 4 se realiza la representación, antes descrita, para los datos de sus Tablas correspondientes. Se puede calcular la I-50 para el bromopride en la primera (sustrato butiriltiocolina), que es de 8.3 microm, mientras que en la segunda (sustrato acetiltiocolina) es de 0.8 microm.

En las Tablas V y VI aparecen los valores obtenidos como fruto del efecto de la dibucaína sobre la actividad enzimática de la CHE, según los dos sustratos hidrolizados. Para una concentración inicial de dibucaína de 4.2 microm, en la primera, resulta una actividad de 3933 U/l (96 %) y un porcentaje de inhibición del 4 %. En la segunda, a 0.2 microm de

dibucaína se asocia una actividad de 3100 U/l (91 %) y un porcentaje de inhibición del 9 %.

Las Figuras 5 y 6 manifiestan de forma gráfica los datos de sus Tablas pertinentes. En la primera (sustrato butiriltiocolina) la I-50 para la dibucaína tiene un valor, por extrapolación, de 68 microm, en tanto que en la segunda (sustrato acetiltiocolina) la I-50 es de 4 microm.

III.1.2.- ACETILCOLINESTERASA.-

Se aportan en este subgrupo tres Tablas, VII, VIII y IX, con sus respectivas Figuras, todas concernientes al efecto que sobre la actividad enzimática de la ACHE provocan concentraciones crecientes de metoclopramida, bromopride y dibucaína. Siempre hemos utilizado para ello un único sustrato posible, acetiltiocolina.

En la Tabla VII para la concentración mínima ensayada de metoclopramida, 4.2 microm, se obtiene una actividad de 9074 U/l (83 %) y un porcentaje de inhibición del 17 %. Para el bromopride, en la

Tabla VIII, a dicha concentración la actividad es de 7642 U/l (70 %) y su inhibición del 30 %. En lo que se refiere a la dibucaína, en la Tabla IX, la actividad de la ACHE permanece inamovible hasta que su concentración es 16.8 microm, a la cual la actividad decrece muy ligeramente, 10746 U/l, y el porcentaje de inhibición es solamente del 2 %.

Las Figuras 7, 8 y 9 representan gráficamente los valores de sus Tablas relativas, enfrentando las actividades de la ACHE y las concentraciones de metoclopramida, bromopride y dibucaína, respectivamente. En la Figura 7 hallamos una I-50 para la metoclopramida de 26.2 microm, en la Figura 8 para el bromopride, la I-50 es de 12.5 microm y en el caso de la dibucaína, Figura 9, la I-50 no pudo ser calculada, dada su inhibición casi nula.

III.2.- INHIBICION TOTAL DE LA CHE Y ACHE POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA.-

Estos resultados vienen referidos en las Tablas X a XV, y en las Figuras equivalentes, para la CHE y en las

Tablas XVI y XVII, y las Figuras del mismo orden, para la ACHE.

En todas se aumenta la concentración de fármaco en el medio de reacción para tratar de conseguir que el porcentaje de inhibición sea igual o mayor al 90 %, momento a partir del cual se considera que la inhibición es prácticamente total.

III.2.1.- COLINESTERASA SERICA.-

En las Tablas X y XI la presencia de metoclopramida se aumenta en la reacción hasta alcanzar un máximo de 175.2 microm en la primera (sustrato butiriltiocolina), y de 26.2 microm en la segunda (sustrato acetiltiocolina). En ambas, con esas cifras, se consiguen porcentajes de inhibición del 92 %, vinculados a actividades de 328 U/l en la Tabla X y de 282 U/l en la Tabla XI.

Las correspondientes Figuras 10 y 11 proyectan, como las anteriores, las actividades enzimáticas en el eje de ordenada y las concentraciones de fármacos en el

eje de abscisa. El resultado son curvas descendentes que se aproximan poco a poco al eje de abscisa y cuyo punto mínimo corresponde a una actividad enzimática del 8 %.

Las Tablas XII y XIII se refieren a la inhibición total de la actividad enzimática de la CHE por bromopride. En la primera (sustrato butiriltiocolina) se puede observar que la concentración de bromopride necesaria para alcanzar un porcentaje de inhibición del 91 % es de 105 microm. Además, se proporciona otro ensayo a concentración superior que consigue un porcentaje de inhibición del 94 %. En la Tabla XIII, con el sustrato acetiltiocolina, 26.2 microm de bromopride proporciona un porcentaje de inhibición del 94 %.

Las Figuras 12 y 13 responden a la representación de los datos contenidos en las respectivas Tablas, siendo curvas descendientes similares a las anteriores.

Las Tablas XIV y XV recogen los resultados de la inhibición total de la actividad enzimática de la CHE por dibucaína. En la primera (sustrato butiriltiocolina) se aprecia un porcentaje de inhibición del 91 % a una concentración 525.4 microm de dibucaína. En la segunda

(sustrato acetiltiocolina) podemos observar que el mismo porcentaje está referido a una presencia de 87.6 microm de dibucaína en la reacción.

Las Figuras 14 y 15 también tienen características similares a las cuatro últimas.

III.2.2.- ACETILCOLINESTERASA. -

Se relacionan con esta enzima las consecuencias expuestas en las Tablas XVI, para la metoclopramida, y XVII, para el bromopride, y las Figuras equivalentes. No se pudieron conseguir datos para la dibucaína debido a su poder inhibitorio casi inexistente a estas concentraciones.

La Tabla XVI suministra un porcentaje de inhibición del 91 %, logrado por adición de 350.4 microm de metoclopramida. Según la Tabla XVII, 175.2 microm de bromopride genera un porcentaje de inhibición del 92 %.

Las Figuras 16 y 17 representan gráficamente mediante curvas descendientes los valores de la susodichas Tablas, de igual forma que las precedentes.

III.3.- RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA CHE Y ACHE DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA.-

En todas las Tablas de este subgrupo la primera determinación reseñada en ellas se realizó en ausencia de inhibidor y con la menor concentración de sustrato. Esta actividad sería la equivalente al 100 %, debiendo ser superada, aumentando la presencia de sustrato, para verificar la recuperación total.

III.3.1.- COLINESTERASA SERICA.-

La Tabla XVIII y XIX recogen la recuperación de esta enzima tras ser inhibida por metoclopramida, la primera cuando se usa butiriltiocolina como sustrato y la segunda con acetiltiocolina.

En la Tabla XVIII se mantiene constante la concentración de metoclopramida en 2.6 microm, exceptuando el primer dato obtenido. La CHE presenta una actividad de 3000 U/l (100 %) en ausencia de inhibidor y con una concentración de sustrato de 0.43 mM. En las

mismas condiciones más 2.6 microm de metoclopramida la actividad es de 750 U/l (25 %). Aumentado la comparecencia de sustrato hasta 7 mM y permaneciendo invariable dicha cantidad de inhibidor se alcanza una actividad de 3871 U/l (129 %).

En la Tabla XIX el sustrato es acetiltiocolina y parte de 0.62 mM. Con este valor, la actividad enzimática de la CHE en ausencia de metoclopramida es de 1920 U/l (100 %), y con 0.52 microm de dicha fármaco es de 1056 U/l (55 %). Elevando la concentración de sustrato hasta 5 mM, y manteniendo constante la presencia de metoclopramida, resulta una actividad de 2580 U/l (134 %).

Las Figuras 18 y 19 expresan gráficamente los resultados descritos con ambos sustratos y la metoclopramida. Representan en el eje de ordenada las actividades enzimáticas (%) y en el eje de abscisa las diversas concentraciones de sustrato (mM). En las dos se obtiene una curva ascendente que supera el 100 % de actividad en un punto que se corresponde con 4.2 mM de butiriltiocolina para la Figura 18 y 2.8 mM de acetiltiocolina para la Figura 19.

Las Tablas XX (sustrato butiriltiocolina) y XXI (sustrato acetiltiocolina) muestran como única variante con las dos anteriores el inhibidor, que en este caso es el bromopride. En la primera, con 2.6 microm de bromopride y 0.43 mM de butiriltiocolina resulta una actividad de la CHE de 538 U/l (18 %). Si se aumenta la concentración de sustrato hasta 7 mM, y se deja fija la del fármaco, se consigue una actividad de 3519 U/l, equivalente al 117 %. En la segunda, con 0.52 microm de bromopride y 0.62 mM de acetiltiocolina, hallamos una actividad de 704 U/l (37 %). Elevando la concentración de sustrato hasta 5 mM, y manteniendo la del fármaco, se obtiene una actividad de 2346 U/l (122 %).

Las Figuras 20 y 21 simbolizan estos datos de igual modo que lo hacían las dos anteriores con sus respectivas Tablas. En ambas se aprecia una curva ascendente que supera el 100 % de actividad en un punto, cuya vertical nos da 5.4 mM de butiriltiocolina para la Figura 20 y 3.6 mM de acetiltiocolina para la Figura 21.

Finalmente, las Tablas XXII y XXIII de este apartado también recogen como única variante la presencia de dibucaína como inhibidor. En la primera,

con 2.6 microM de dibucaína y 0.43 mM de butiriltiocolina se apunta una actividad de 1642 U/l (55 %). Subiendo la concentración de sustrato solo a 1.75 mM se consigue una actividad de 3284 U/l (109 %). En la Tabla XXIII, con 0.52 microM de dibucaína y 0.62 mM de acetiltiocolina encontramos una actividad para la CHE de 1408 U/l (73 %). Remontando la concentración de sustrato hasta 2.5 mM logramos una actividad de 2346 U/l (122 %).

Las respectivas Figuras 22 y 23 plasman de forma gráfica los datos reseñados. Igualmente, aparece una curva ascendente para cada una de ellas, que supera el 100 % de actividad en un punto cuya vertical nos proporciona 1.6 mM de butiriltiocolina en la Figura 20 y 1.3 mM de acetiltiocolina en la Figura 23.

III.3.2.- ACETILCOLINESTERASA.-

Se encuentran incluidas aquí las Tablas XXIV, XXV y XXVI con sus correspondientes Figuras. En las tres se presenta una actividad enzimática de la ACHE, en ausencia de inhibidor y con 0.06 mM de sustrato, de 5970 U/l (100 %). En todas, la concentración de

inhibidor, cuando la hay, se mantiene en un valor fijo de 17 micromM.

En la Tabla XXIV, con 0.06 mM de sustrato y 17 micromM de metoclopramida resulta una actividad de 1910 U/l (32 %). Si la presencia de sustrato es incrementada hasta 0.5 mM, la actividad de la enzima es 6447 U/l (108 %).

En la Tabla XXV se observa que, al poner bromopride en las mismas condiciones, la actividad relativa a 0.06 mM de sustrato es 955 U/l (16 %), mientras que para una concentración 1 mM de éste se logra 6485 U/l (109 %) de actividad enzimática.

En la Tabla XXVI, utilizando dibucaína, la actividad con 0.06 mM de acetiltiocolina es 5062 U/l (84 %). Solo con aumentar la concentración de sustrato hasta 0.12 mM., la actividad es de 6853 U/l (114 %).

Las Figuras 14, 15 y 16 también son curvas ascendentes, resultado de la representación de las actividades enzimáticas frente a las concentraciones de sustrato. En el punto que alcanzan el 100 % de actividad

corresponde una concentración de sustrato de 0.45 mM en la Figura 24, 0.85 mM en la Figura 25 y 0.08 mM en la Figura 26.

III.4.- TIPO DE INHIBICION EJERCIDA POR METOCLOPRAMIDA, BROMOPRIDE Y DIBUCAINA SOBRE LA CHE Y LA ACHE.-

Se hallan incluidas en este apartado las Tablas XXVII a XXXV y las Figuras correspondientes al mismo orden numérico, así como las Figuras 36, 37 y 38.

En las Tablas se detallan los valores de los inversos de la distintas concentraciones de sustrato y de los inversos de las actividades enzimáticas, bien en ausencia de inhibidor o bien en presencia de una cantidad constante de éste. Como se especifica, los datos reales referidos a los inversos de las actividades son el producto de los que expresamos por 10^{-5} .

III.4.1.- COLINESTERASA SERICA.-

Las Tablas XXVII y XXVIII describen los resultados obtenidos usando como inhibidor la metoclopramida, la

primera con el sustrato butiriltiocolina y la segunda con acetiltiocolina.

En la Tabla XXVII la concentración de metoclopramida fijada, en su caso, es de 2.6 microm, mientras que en la Tabla XXVIII es de 0.52 microm.

Las Figuras 27 y 28 exponen la imagen de dichos resultados cuando se enfrentan los inversos de la velocidad de reacción o actividad enzimática en el eje de ordenada y los inversos de las concentraciones de sustrato en el eje de abscisa. En ambas, aparecen dos rectas que cortan en un mismo punto al eje de ordenada. Una, con menor pendiente, corresponde a la ausencia de inhibidor y la otra, con pendiente mayor, a la incorporación de 2.6 microm de metoclopramida en la Figura 27 o de 0.52 microm de la misma en la Figura 28.

Las Tablas XXIX y XXX exhiben las cifras anteriores cuando se pone o no, una concentración constante de bromopride. La primera con butiriltiocolina como sustrato y bromopride 2.6 microm, y la segunda con acetiltiocolina y 0.52 microm del fármaco.

En las Figuras que representan estos resultados, 29 y 30, se aprecian también dos rectas que se cortan en el eje de ordenada, con mayor diferencia entre sus pendientes que en las Figuras 27 y 28.

Las Tablas XXXI y XXXII contienen los mismos productos referidos al empleo o no, de la dibucaína como inhibidor. La primera con butiriltiocolina y 2.6 microm de dibucaína y la segunda con acetiltiocolina y 0.52 microm del fármaco.

De su representación en las Figuras 31 y 32 derivan rectas de características similares a las cuatro Figuras anteriores, pero de menor diferencia entre sus pendientes.

III.4.2.- ACETILCOLINESTERASA.-

El tipo de inhibición ejercido sobre esta enzima por los tres fármacos estudiados se reúne en las Tablas XXXIII, XXXIV y XXXV, así como en las Figuras 33 a 35.

En las tres Tablas, las concentraciones de metoclopramida, bromopride y dibucaína, respectivamente,

son de 17 microm y se ponen de manifiesto los inversos de las actividades, con y sin inhibidor, así como los inversos de las concentraciones de sustrato.

Las Figuras 33, 34 y 35 muestran gráficamente estos resultados mediante dos rectas, en cada una de ellas, que se cortan en un punto del eje de ordenada. La pendiente de la recta con inhibidor es mayor en el caso del bromopride (Figura 34) que la presentada por la metoclopramida (Figura 33) y esta a su vez es muy superior a la de la dibucaína (Figura 35).

Para una mejor observación comparativa se han incluido tres Figuras que agrupan el tipo de inhibición de los tres fármacos sobre la CHE con el sustrato butiriltiocolina (Figura 36), sobre la CHE con acetiltiocolina (Figura 37) y sobre la ACHE con este último sustrato (Figura 38). Como puede observarse, en cada una de ellas la concentración de los inhibidores es la misma y todas las rectas se cortan en un mismo punto. En la Figura 36 el valor de la intersección con el eje de ordenada equivale a $21 \cdot 10^{-5} (U/l)^{-1}$, en la Figura 37 es de $28 \cdot 10^{-5} (U/l)^{-1}$ y en la Figura 38 corresponde a $9.5 \cdot 10^{-5} (U/l)^{-1}$.

**SEGUNDA PARTE: VARIANTES GENÉTICAS DE LA COLINESTERASA
SÉRICA**

III.5.- ENSAYOS REALIZADOS CON CHE NORMALES Y ATÍPICAS.-

Ante todo hemos de mencionar que se llevaron a cabo una serie de pruebas teniendo en cuenta las derivaciones de los apartados anteriores y la diferencia en cuanto a potencia de inhibición de los tres fármacos. Estas fueron dirigidas a obtener una solución de metoclopramida y bromopride de concentración tal que, adicionada al medio de reacción en la misma cantidad fijada para la dibucaína en la metodología de determinación de su número, produjese una inhibición análoga a ésta sobre colinesterasas séricas normales. Dichas concentraciones, como se dijo en la sección de metodología, fueron de 25 mg/100ml para la metoclopramida y de 12.5 mg/100 ml para el bromopride.

Se incluyen en este apartado las Tablas XXXVI y XXXVII. La primera contiene las determinaciones de CHE

y del N^o de dibucaína, N^o de metoclopramida y N^o de bromopride realizadas individualmente en ocho sueros de varones adultos sanos. Se observa que existe una similitud entre dichos números en cada una de las muestras analizadas, estando encuadradas todas por encima de 70, rango normal en lo que se refiere a la determinación del N^o D.

En la Tabla XXXVII se recogen los datos para los mismos parámetros con la salvedad de que han sido utilizados, como muestras, cinco sueros de pacientes que presentaron la variante genética atípica de la CHE. Como puede verse los valores de los N^o D, N^o M y N^o B también guardan semejanza y están situados por debajo de 70.

IV. - TABLAS Y GRAFICAS

TABLA I

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/1)	(%)	
0.0	4105	100	0
4.2	3050	74	26
8.4	2580	63	37
26.2	1408	34	66
52.5	852	20	80

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 1

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA
SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

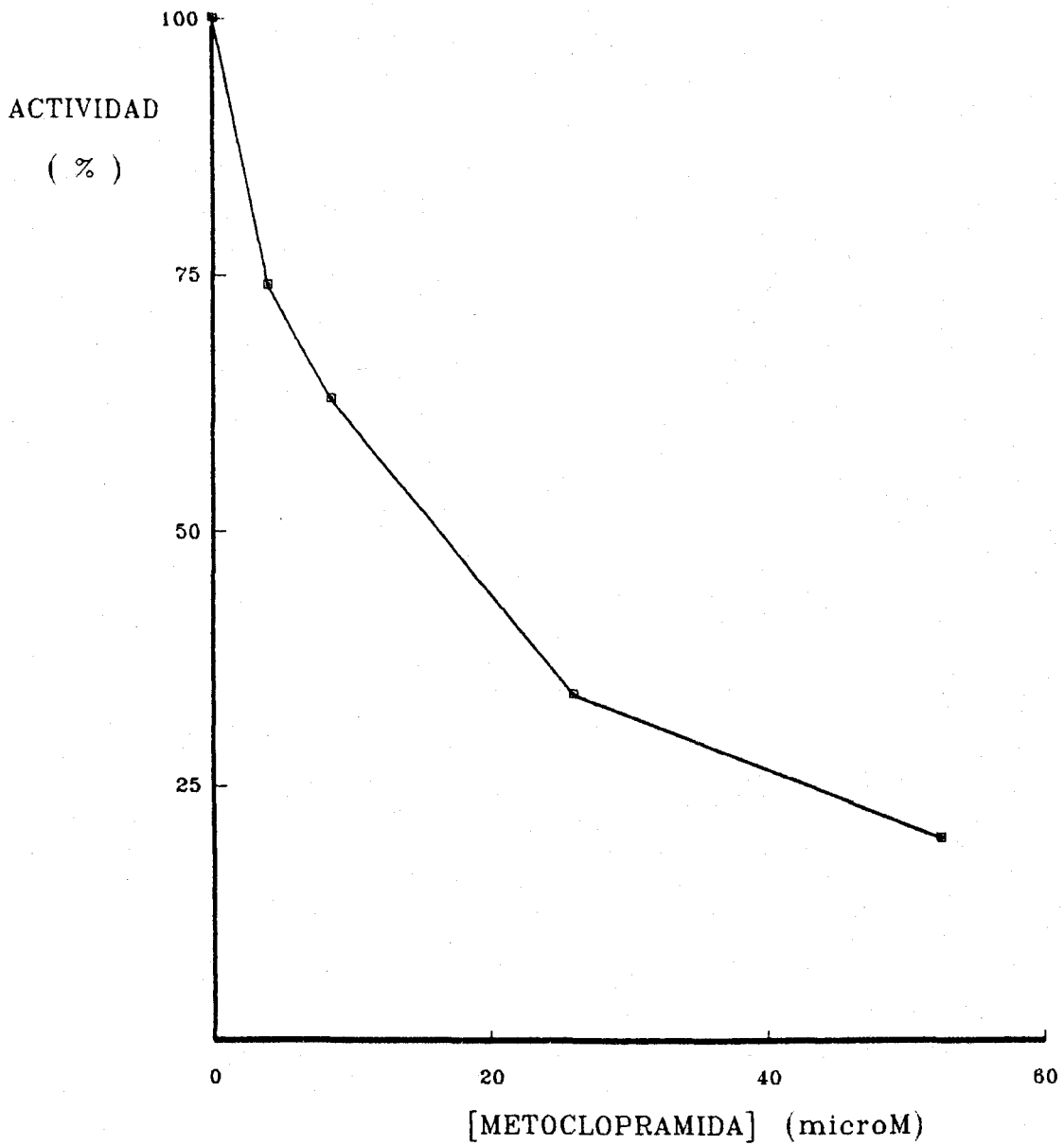


TABLA II

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
0.2	2698	79	21
0.8	2111	62	38
1.6	1525	45	55
4.2	938	28	72

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 2

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

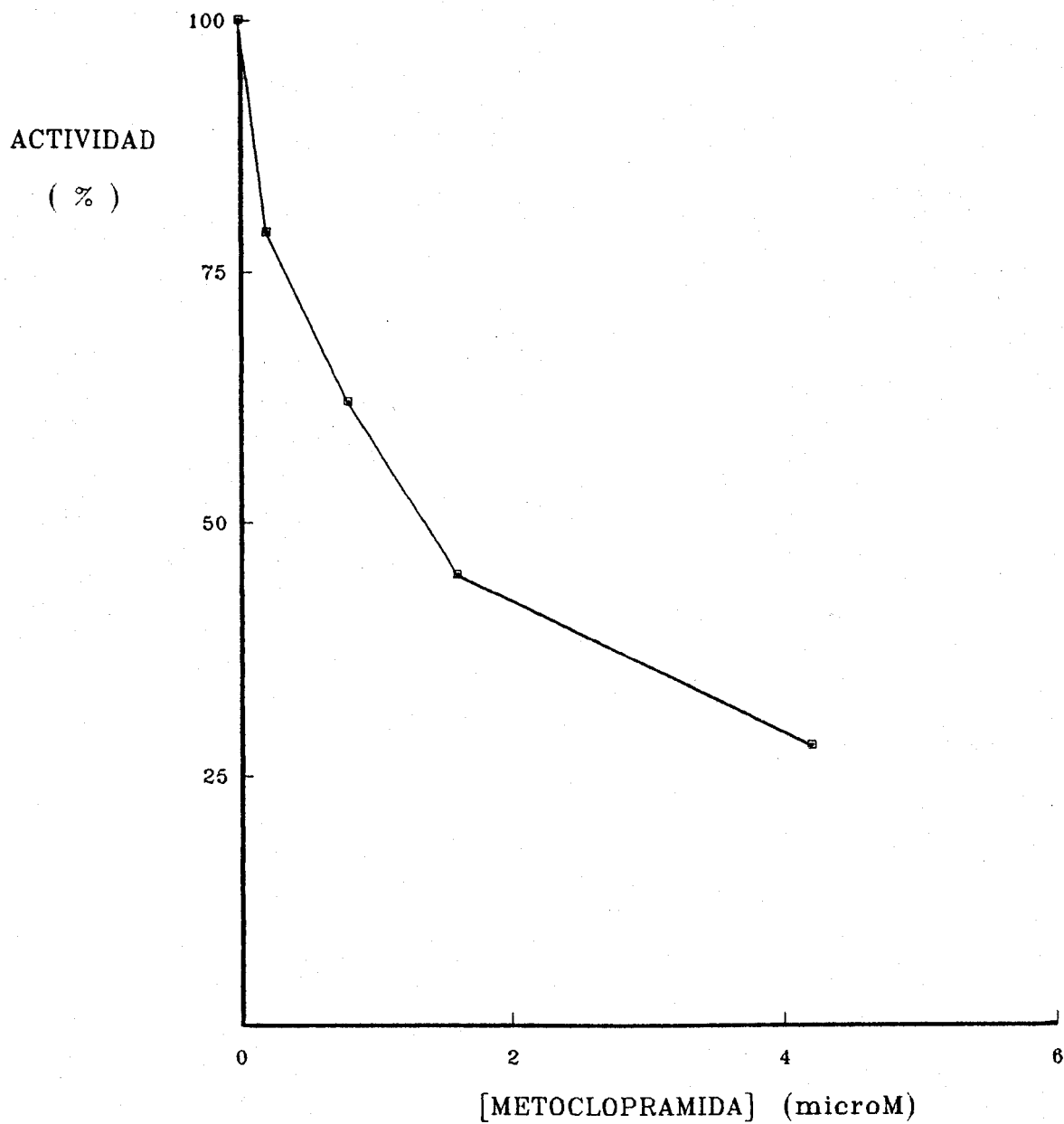


TABLA III

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	4105	100	0
4.2	2729	66	34
8.4	1994	49	51
26.2	1056	26	74
52.5	585	14	86

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 3

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

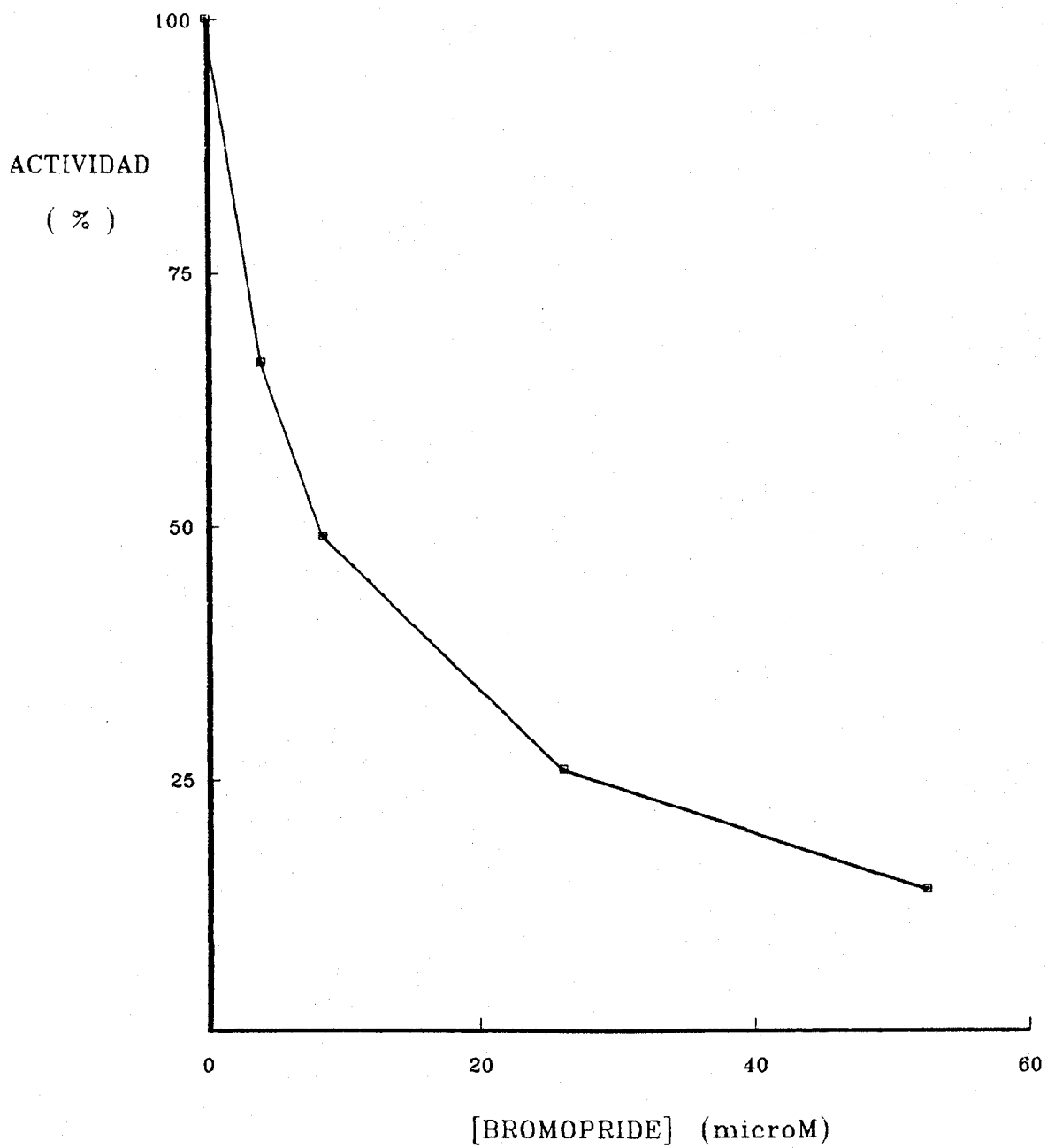


TABLA IV

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microm)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
0.2	2580	76	24
0.8	1759	52	48
1.6	1100	32	68
4.2	586	17	83

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 4

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

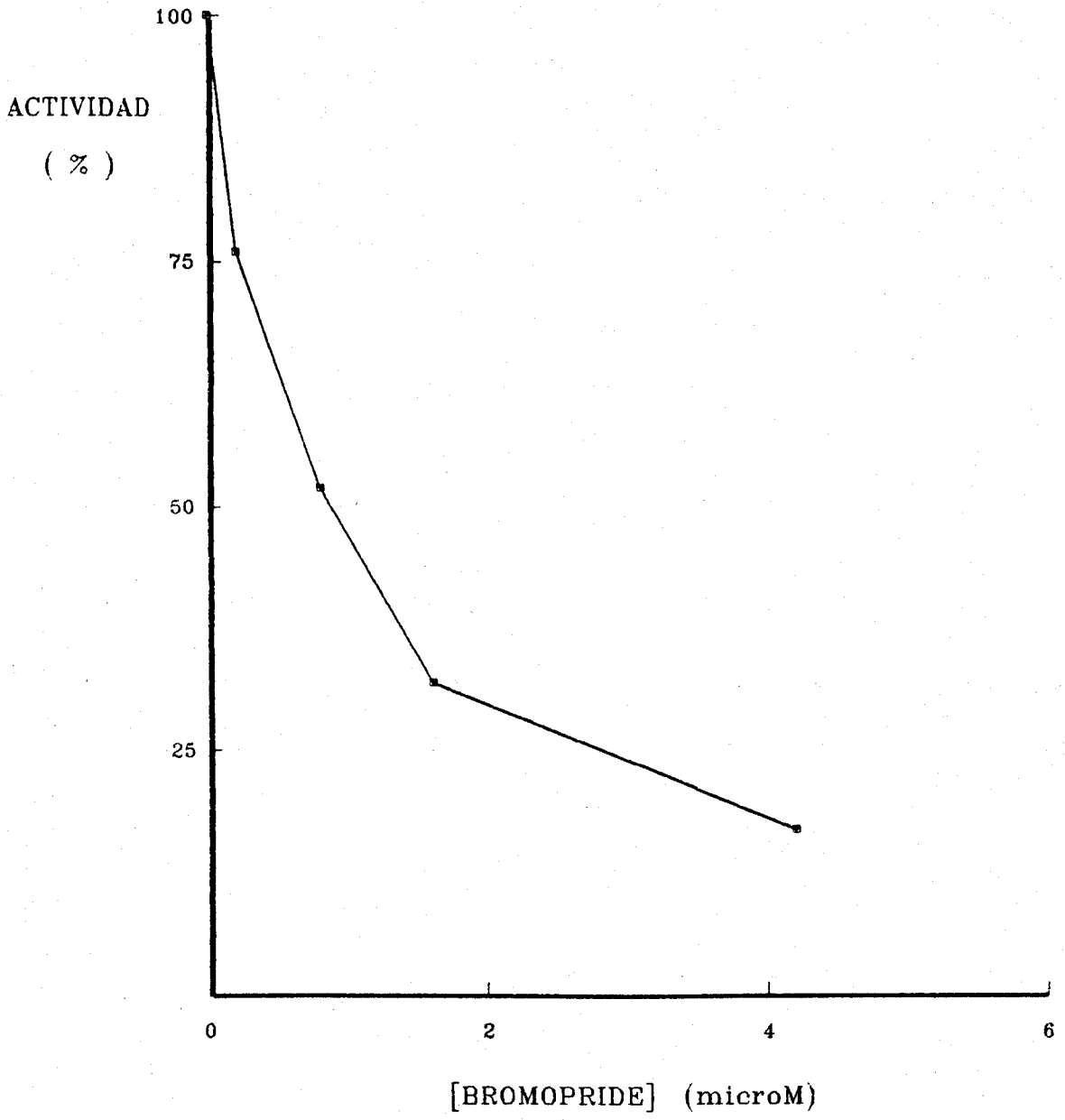


TABLA V

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	4105	100	0
4.2	3933	96	4
8.4	3519	86	14
26.2	3000	73	27
52.5	2346	57	43

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 5

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA
SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

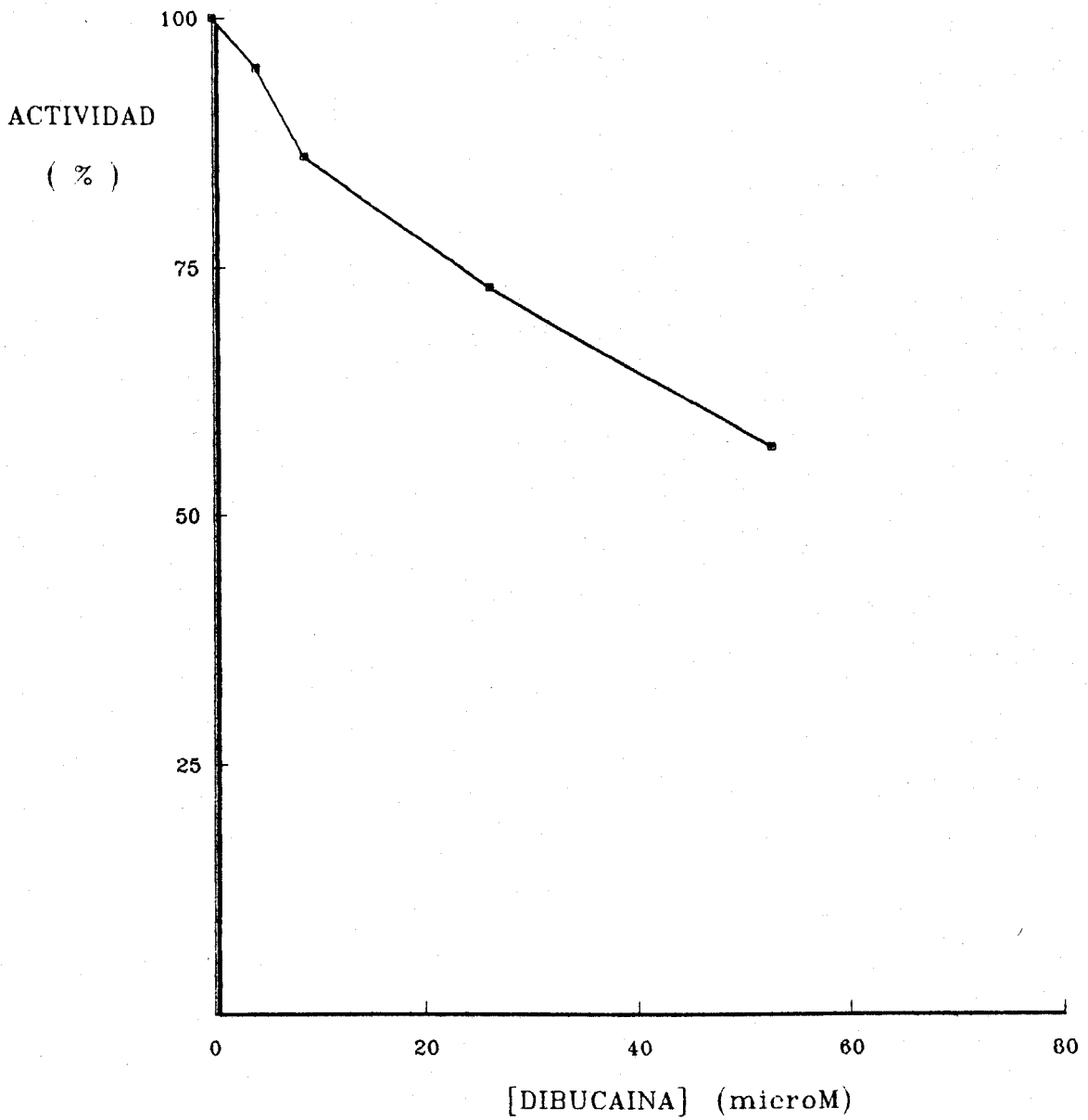


TABLA VI

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
0.2	3100	91	9
0.8	2698	79	21
1.6	2229	66	34
4.2	1642	49	51

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 6

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

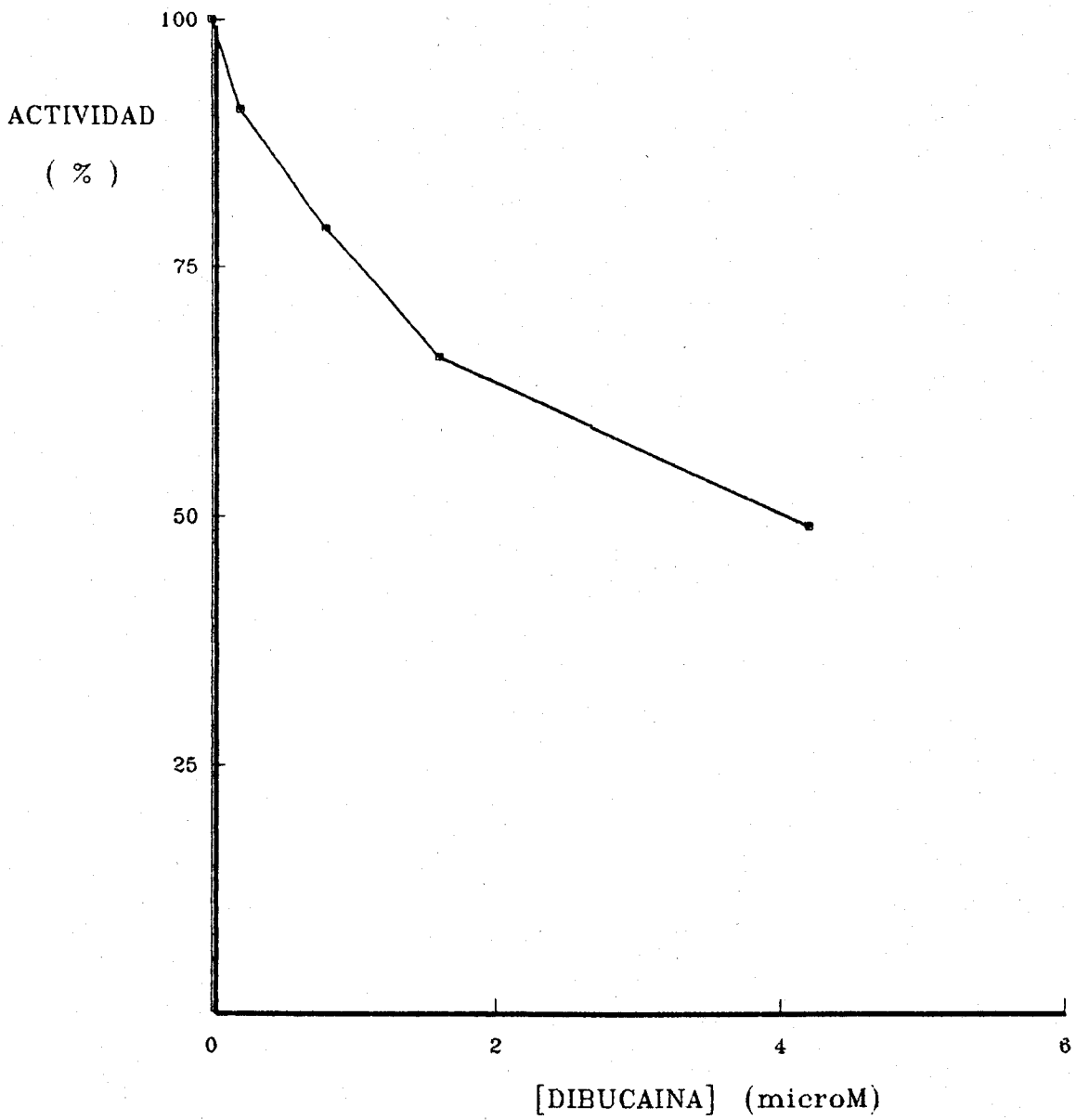


TABLA VII

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	10985	100	0
4.2	9074	83	17
8.4	7402	67	33
16.8	6208	56	44
26.2	5492	50	50
43.8	3820	35	65

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

FIGURA 7

EFFECTO DE LA METOCLOPRAMIDA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

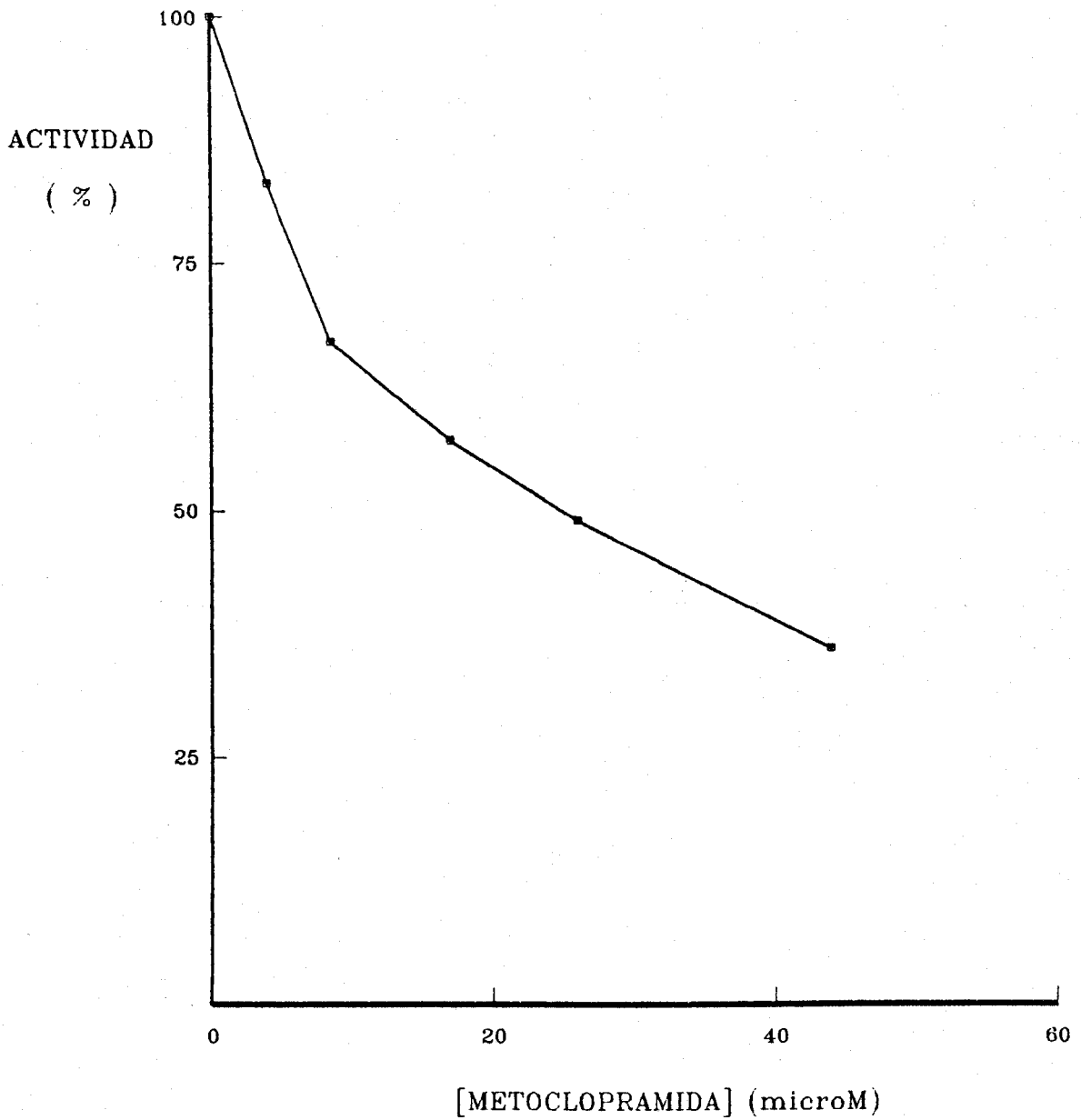


TABLA VIII

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	10985	100	0
4.2	7642	70	30
8.4	5970	54	46
16.8	4537	41	59
26.2	3820	35	65
43.8	2626	24	76

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

FIGURA 8

EFFECTO DEL BROMOPRIDE SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

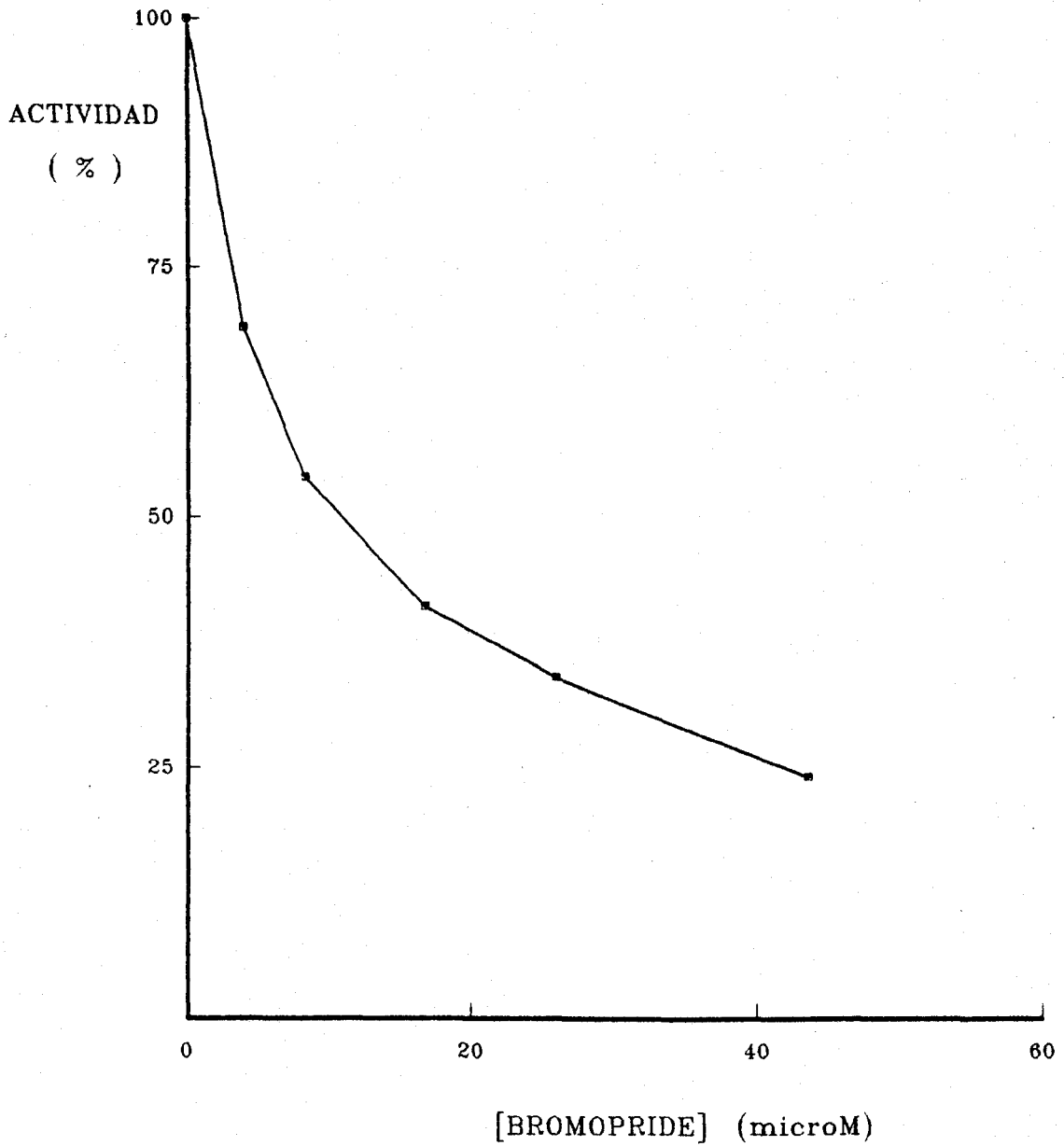


TABLA IX

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	10985	100	0
4.2	10985	100	0
8.4	10985	100	0
16.8	10746	98	2
26.2	10507	96	4
43.8	9790	89	11

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

FIGURA 9

EFFECTO DE LA DIBUCAINA SOBRE LA ACTIVIDAD
ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

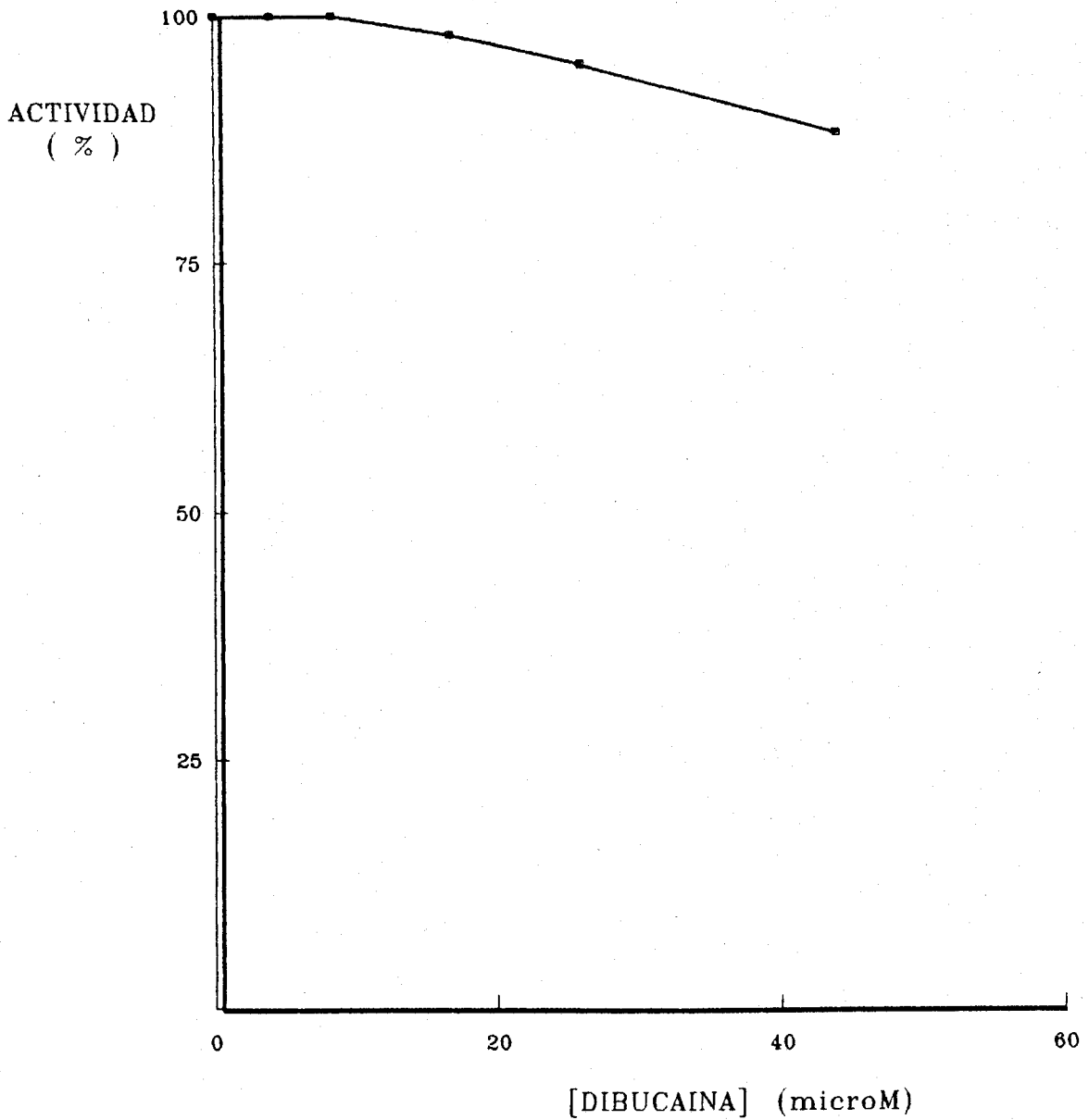


TABLA X

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE
LA COLINESTERASA SERICA POR METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	4105	100	0
26.2	1408	34	66
52.5	852	21	79
105.0	531	13	87
175.2	328	8	92

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 10

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
COLINESTERASA SERICA POR METOCLOPRAMIDA
SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

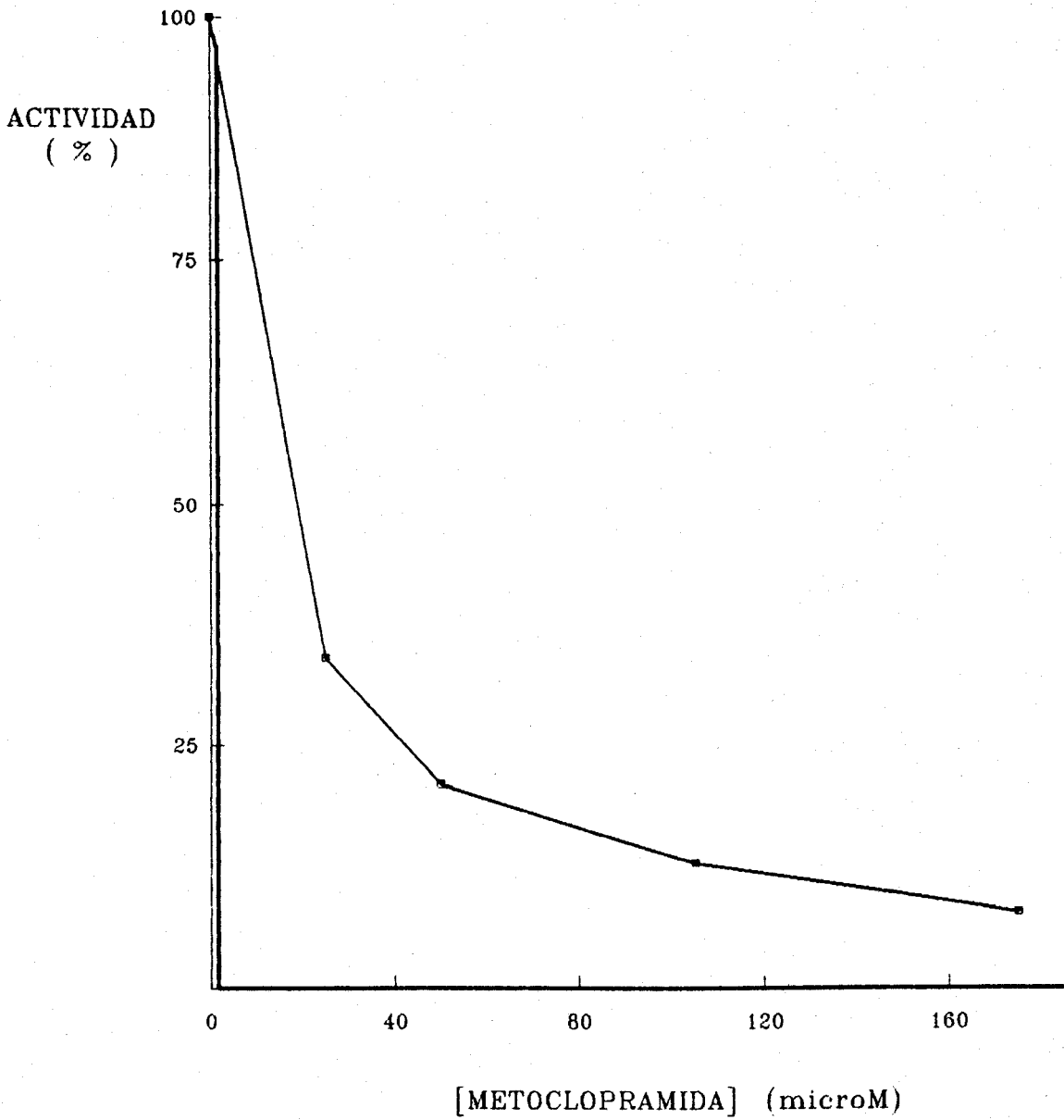


TABLA XI

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE
LA COLINESTERASA SERICA POR METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
1.6	1525	45	55
4.2	938	28	72
8.4	586	17	83
26.2	282	8	92

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 11

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
COLINESTERASA SERICA POR METOCLOPRAMIDA
SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

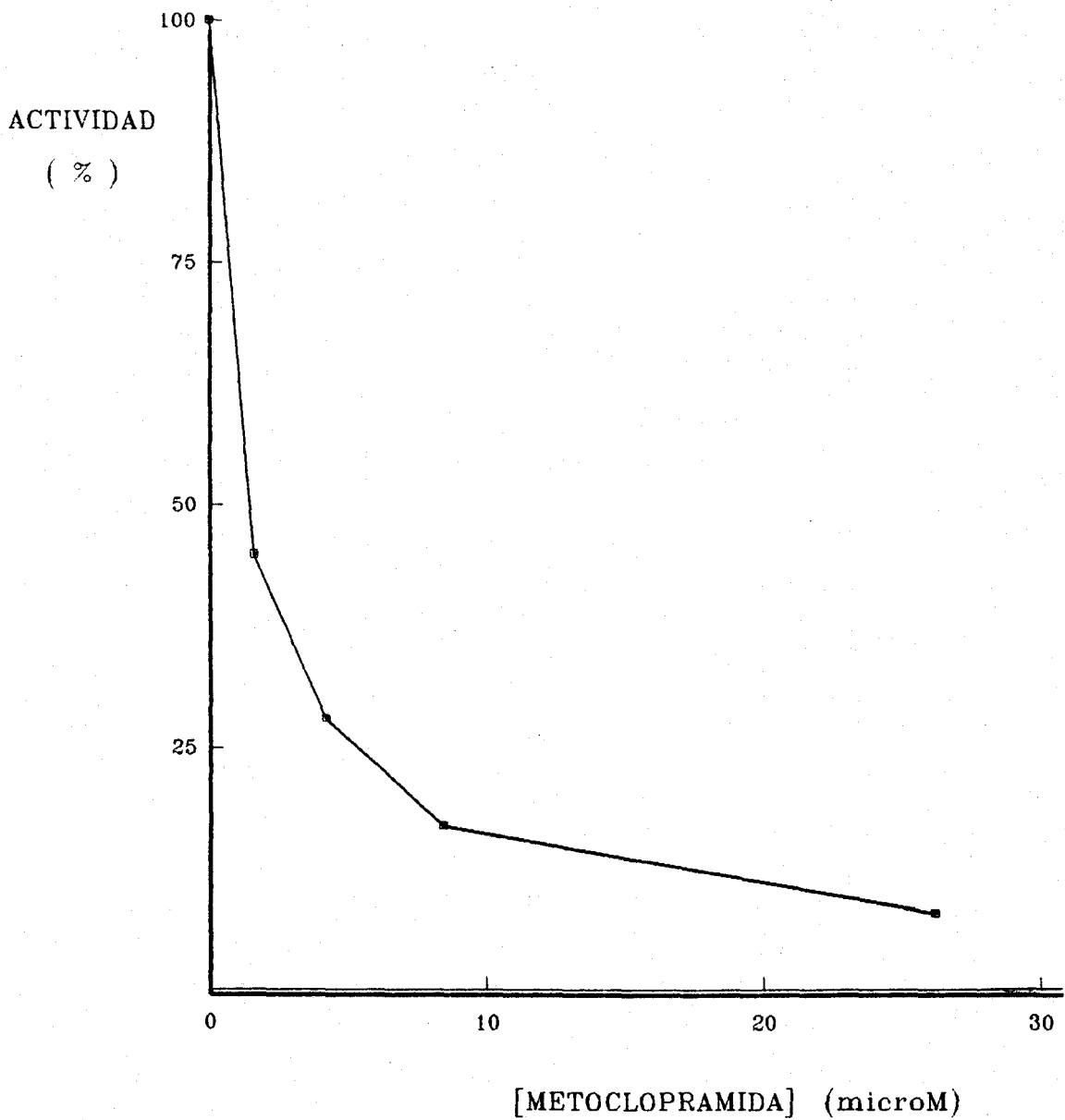


TABLA XII

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR BROMOPRIDE

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	4105	100	0
26.2	1056	26	74
52.5	585	14	86
105.0	352	9	91
175.2	235	6	94

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 12

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR BROMOPRIDE

SUSTRATO: BUTILTIOCOLINA (7 mM)

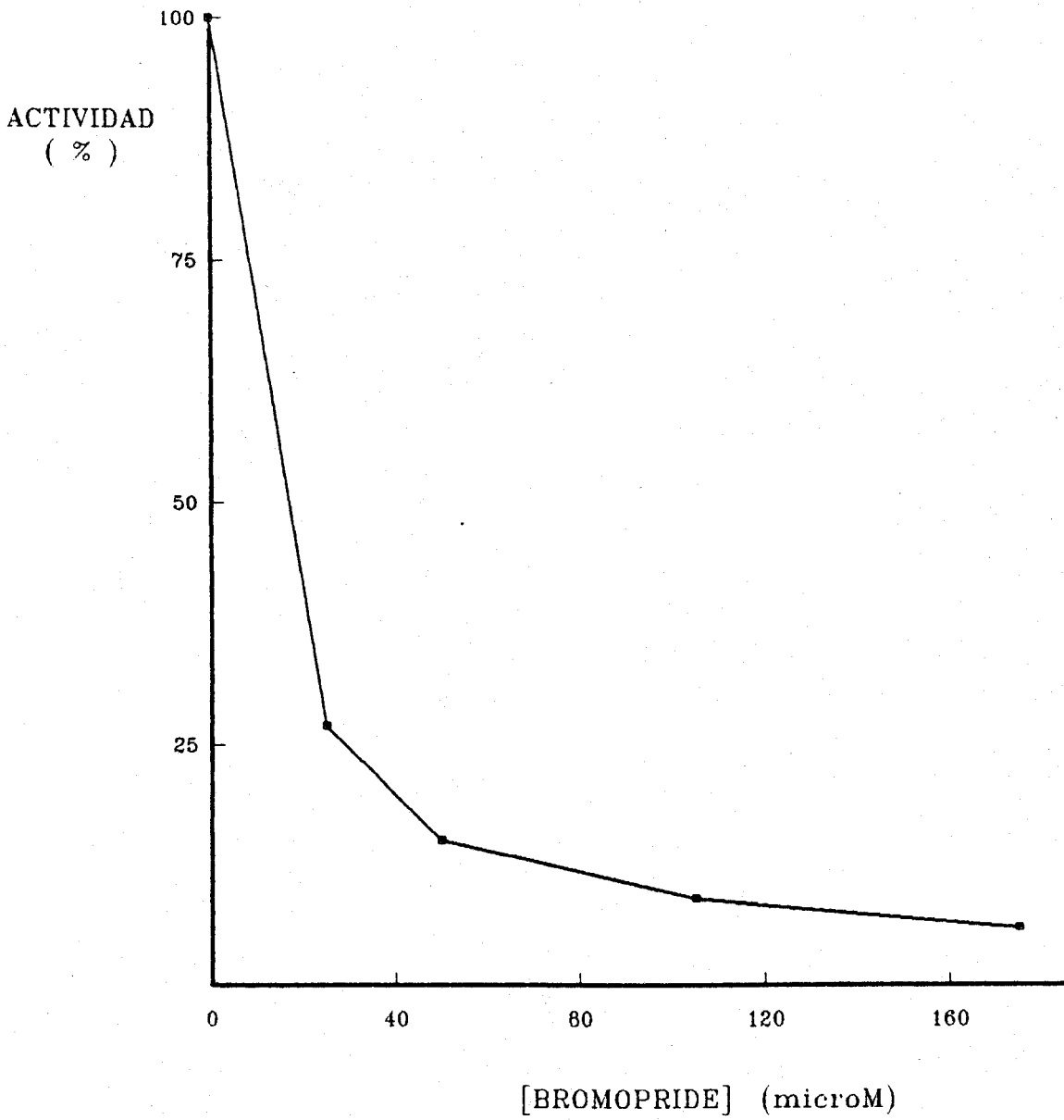


TABLA XIII

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR BROMOPRIDE

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
1.6	1100	32	68
4.2	586	17	83
8.4	398	12	88
26.2	211	6	94

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 13

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASAS SERICA POR BROMOPRIDE

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

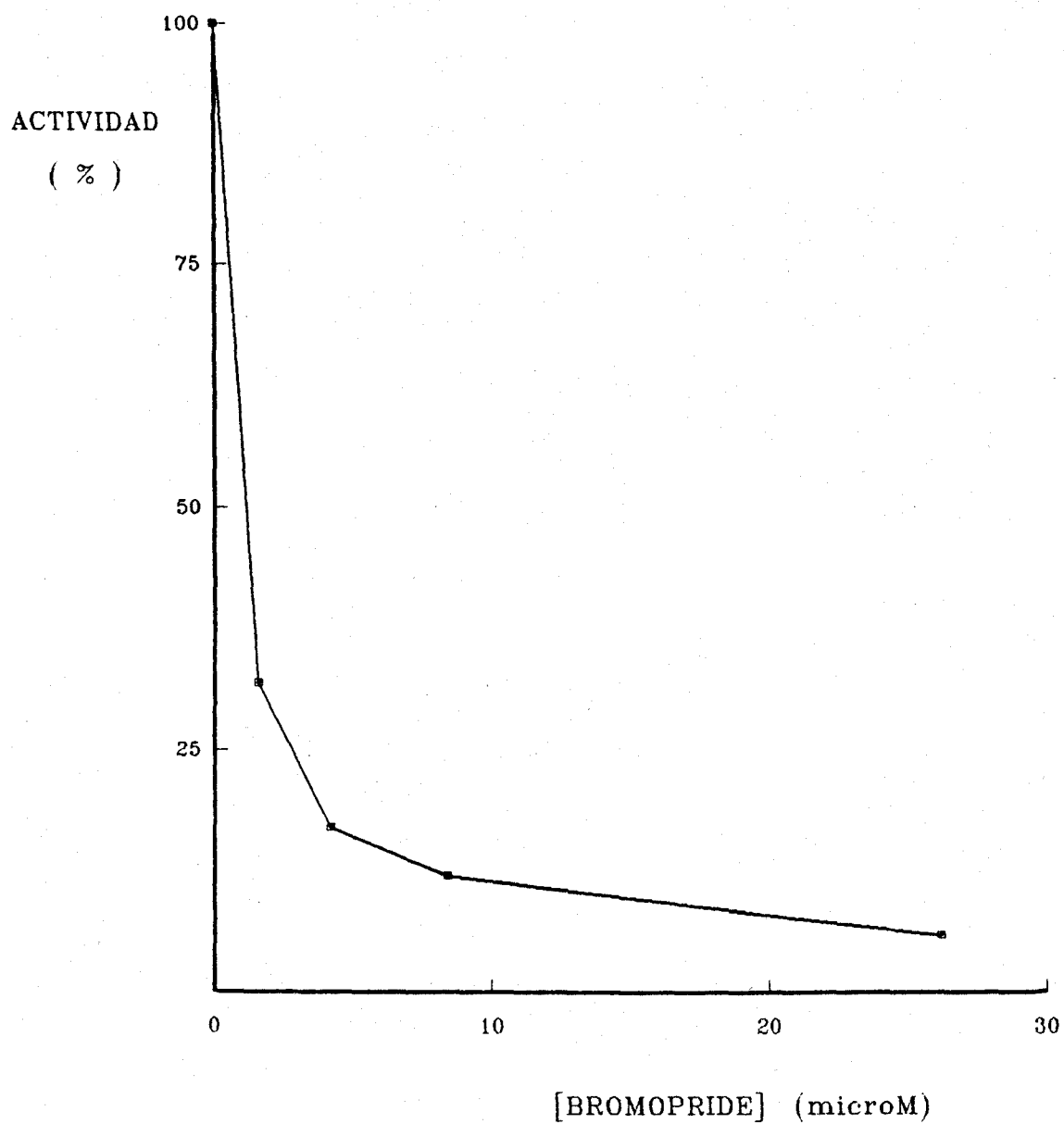


TABLA XIV

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR DIBUCAINA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	4105	100	0
26.2	3000	73	27
52.5	2346	57	43
105.0	1642	40	60
175.2	1173	29	71
350.4	631	15	85
525.4	352	9	91

SUSTRATO : BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

FIGURA 14

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR DIBUCAINA

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA (7 mM)

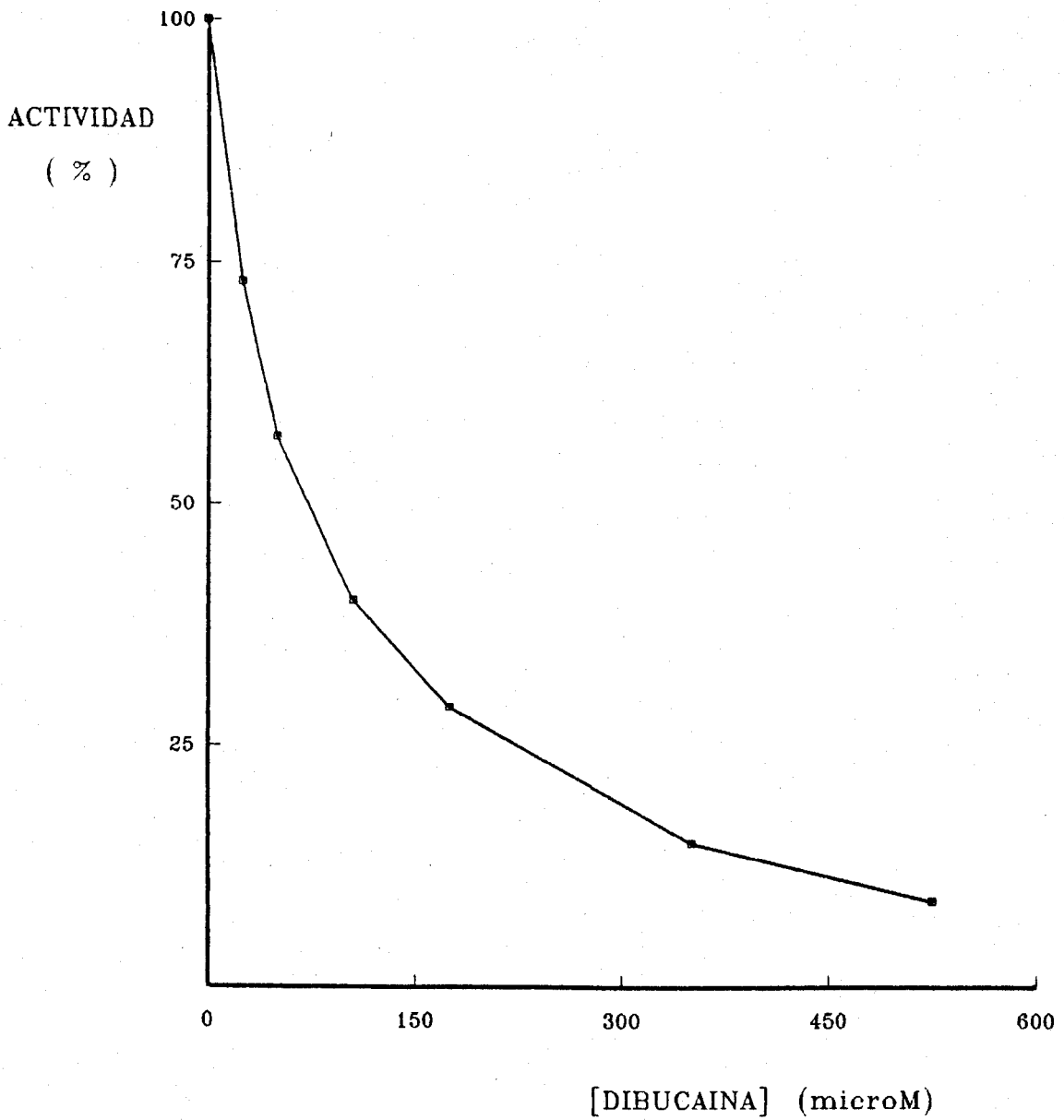


TABLA XV

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR DIBUCAINA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microm)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	3402	100	0
1.6	2229	66	34
4.2	1642	48	52
8.4	1173	35	65
26.2	600	18	82
87.6	300	9	91

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (5 mM)

FIGURA 15

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA COLINESTERASA SERICA POR DIBUCAINA

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (5 mM)

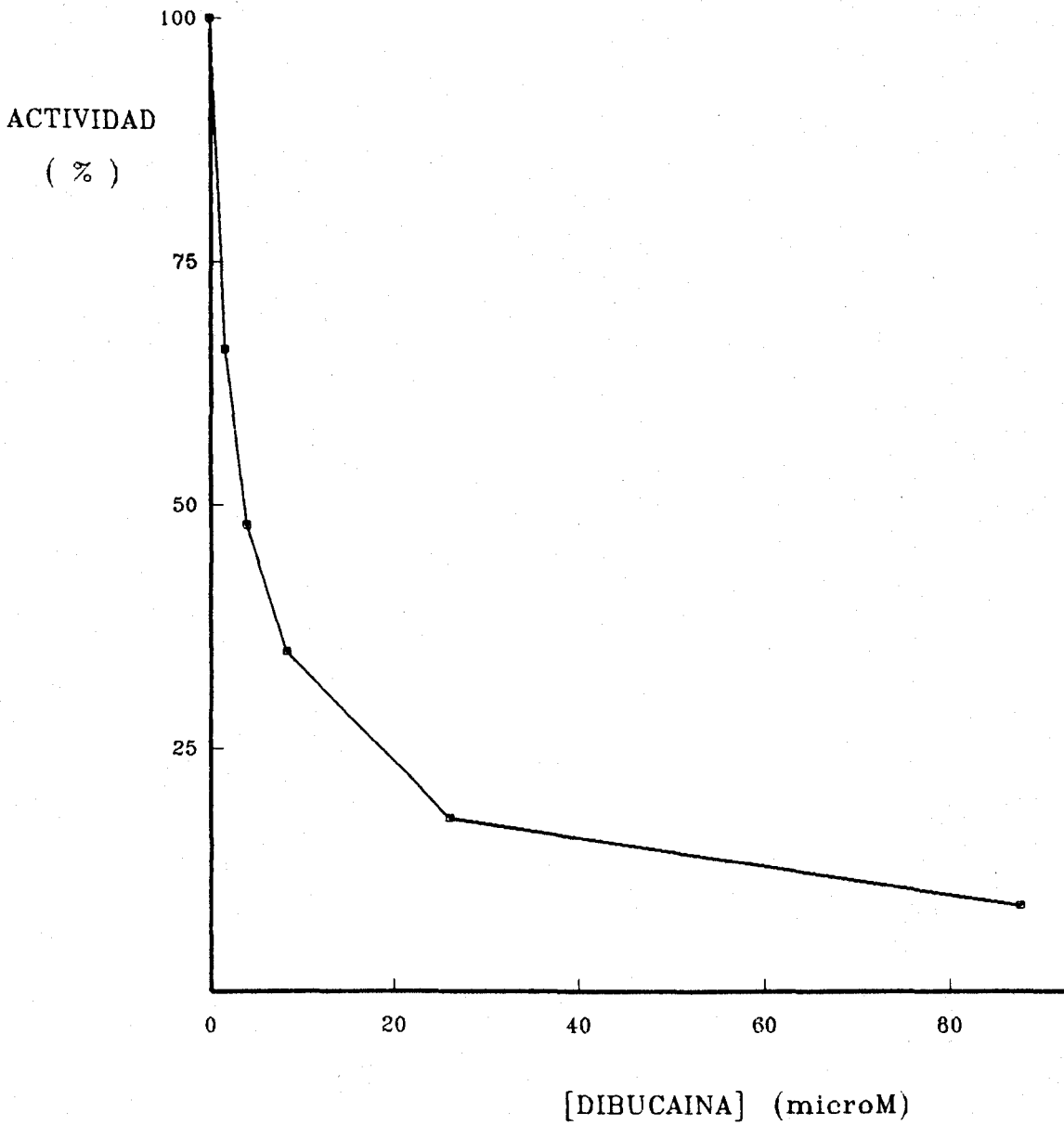


TABLA XVI

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA ACETILCOLINESTERASA POR METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	10985	100	0
26.2	5492	50	50
52.5	3582	33	67
87.6	2626	24	76
175.2	1671	15	86
350.4	955	9	91

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

FIGURA 16

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
ACETILCOLINESTERASA POR METOCLOPRAMIDA

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

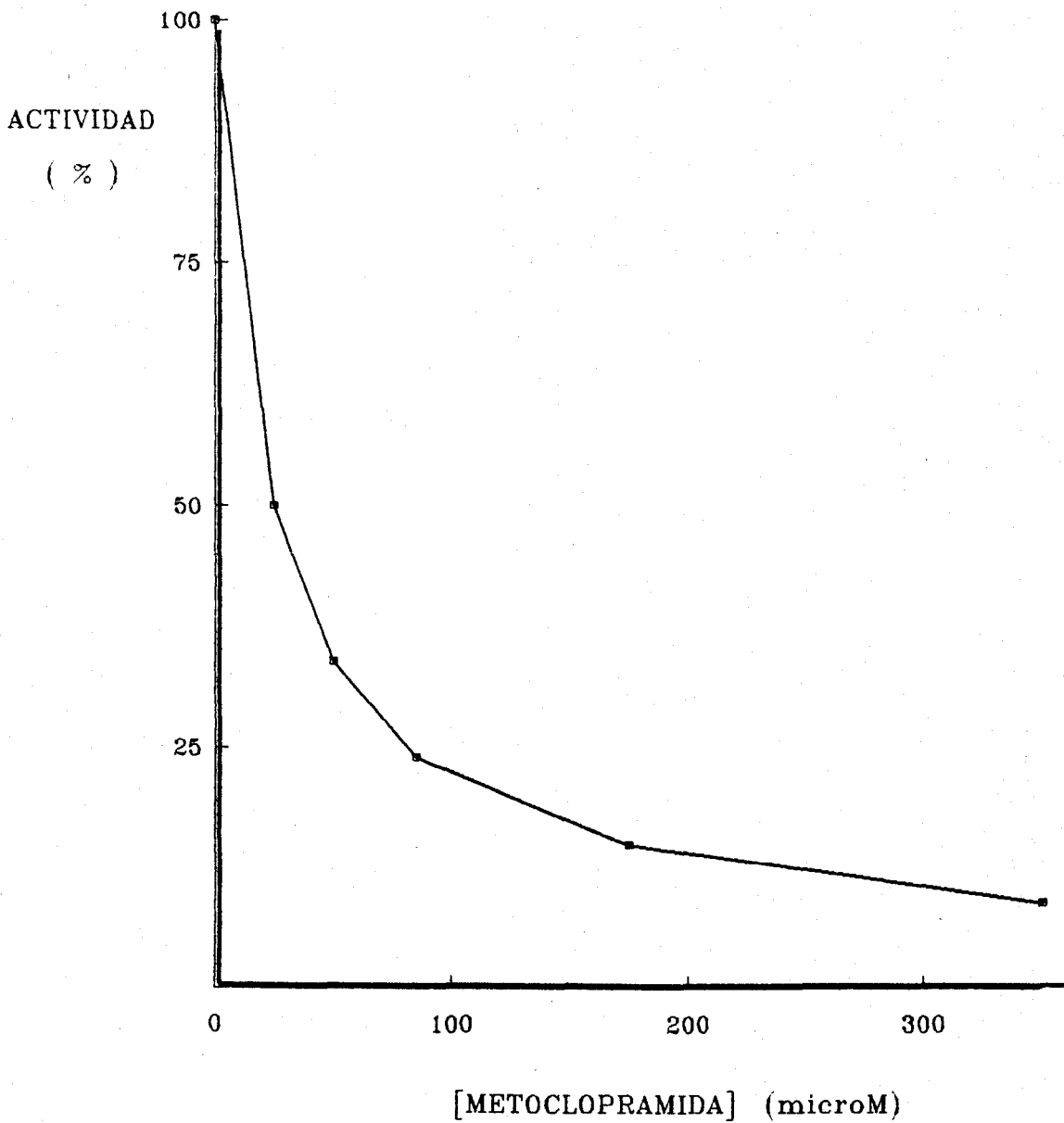


TABLA XVII

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA ACETILCOLINESTERASA POR BROMOPRIDE

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA		INHIBICION ENZIMATICA (%)
	(U/l)	(%)	
0.0	10985	100	0
26.2	3820	35	65
52.5	2149	19	81
87.6	1432	13	87
175.2	940	8	92

SUSTRATO : ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

FIGURA 17

INHIBICION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE LA ACETILCOLINESTERASA POR BROMOPRIDE

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA (0.5 mM)

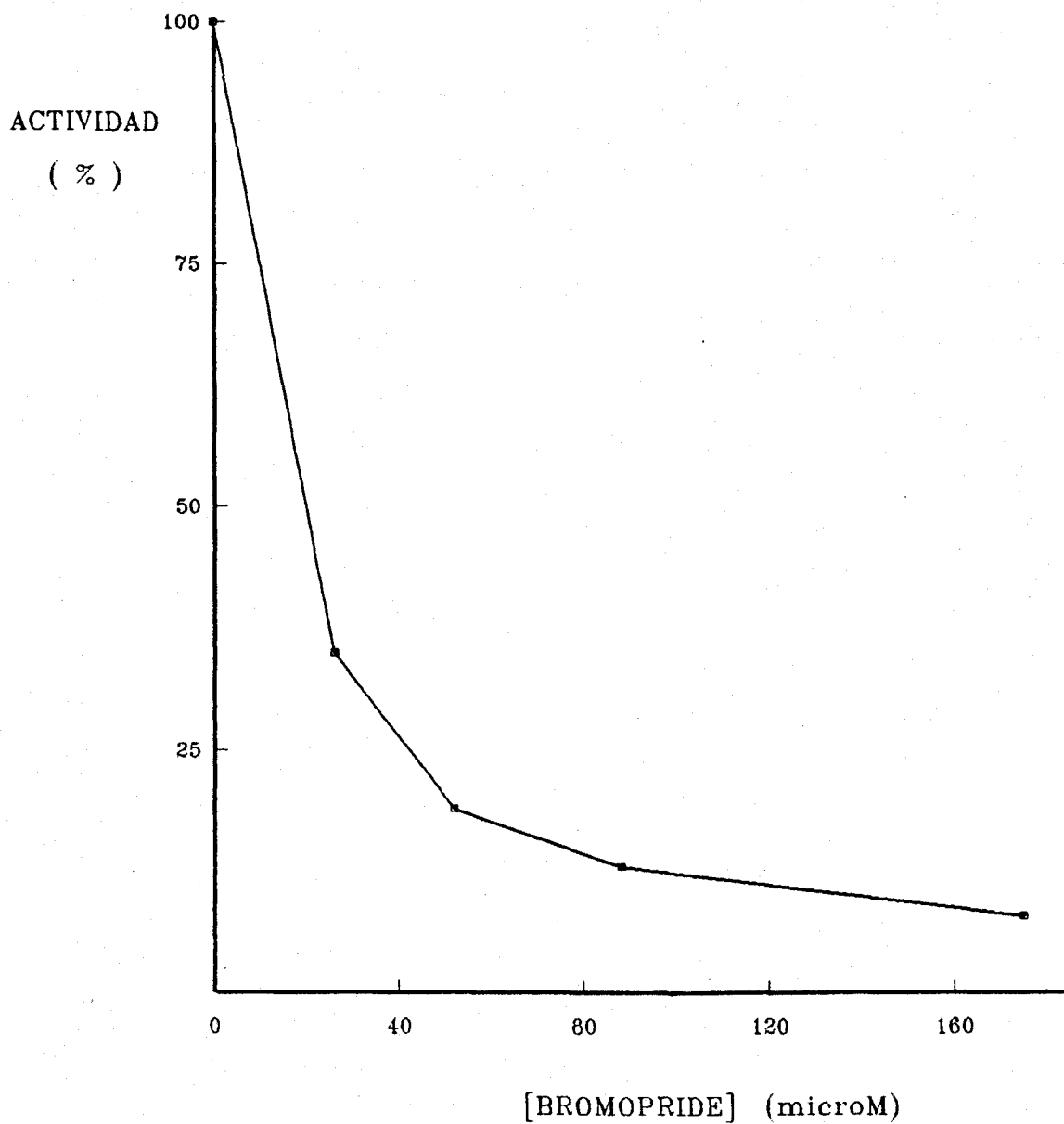


TABLA XVIII

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.0	0.43	3000	100
2.6	0.43	750	25
2.6	0.87	1300	43
2.6	1.75	2111	70
2.6	3.50	2700	92
2.6	7.0	3871	129

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 18

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA (2.6 microM).- SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

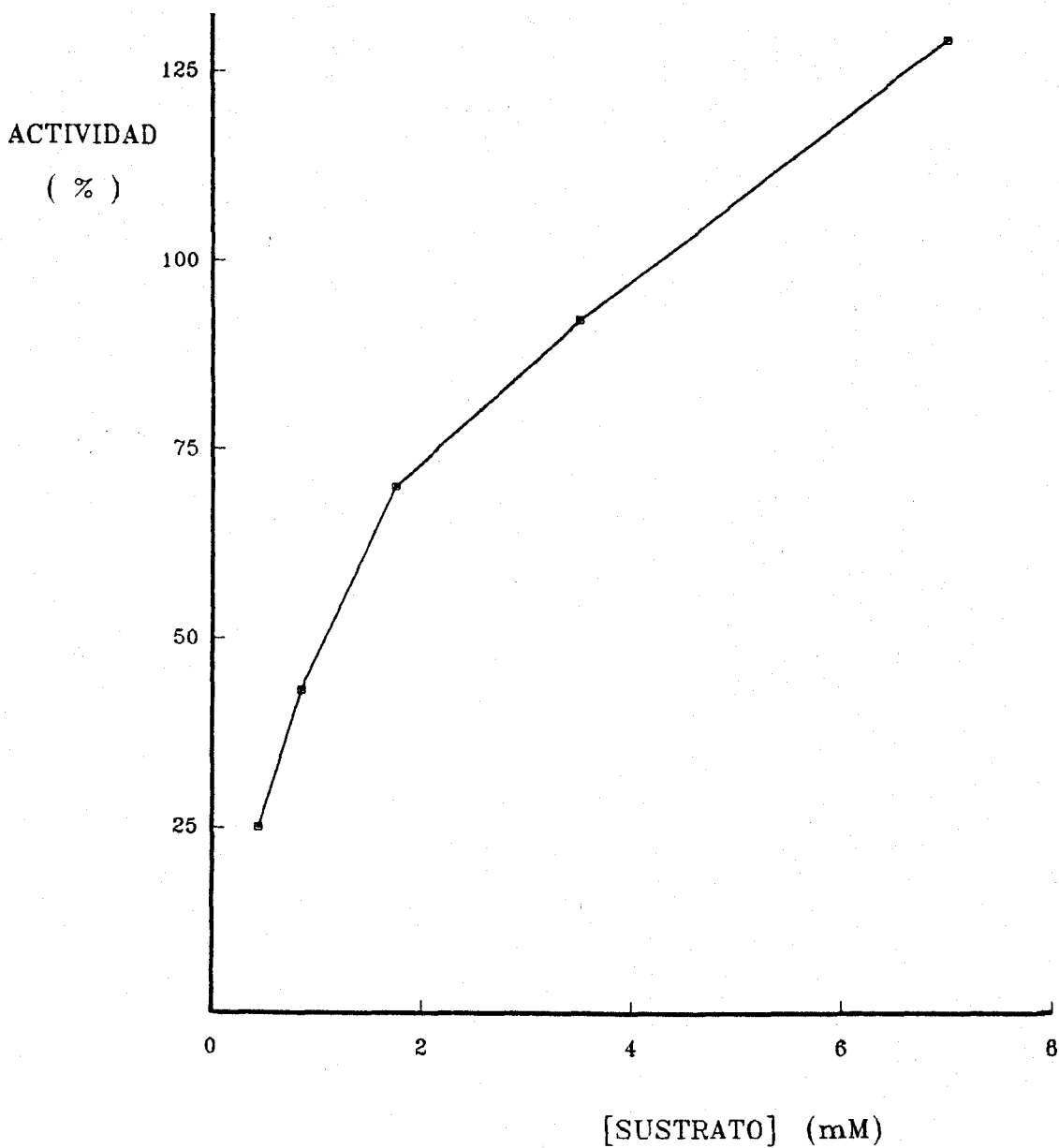


TABLA XIX

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.0	0.62	1920	100
0.52	0.62	1056	55
0.52	1.25	1408	73
0.52	2.5	1877	98
0.52	5.0	2580	134

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 19

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR METOCLOPRAMIDA (0.52 microM).- SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

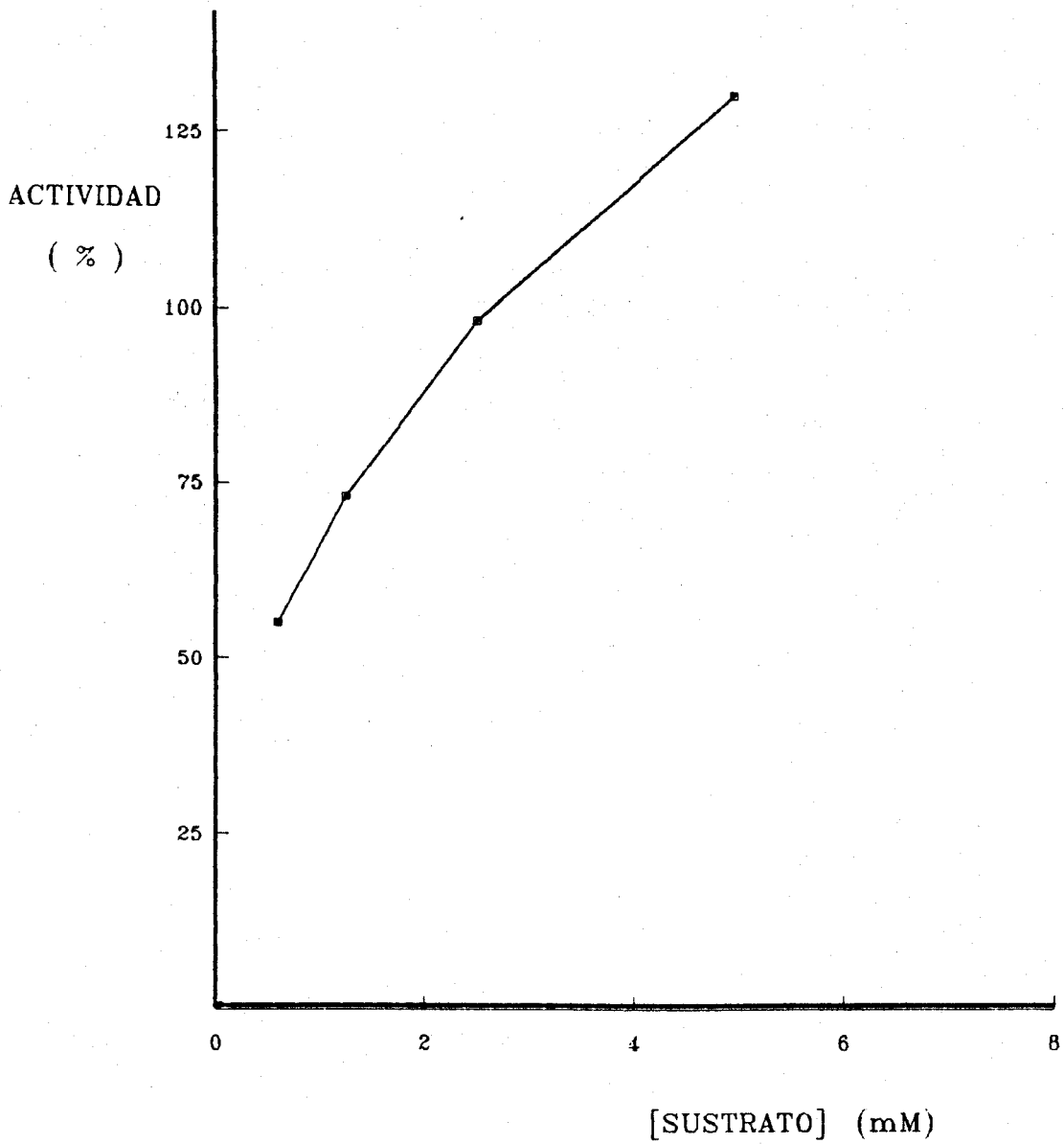


TABLA XX

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE.

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.0	0.43	3000	100
2.6	0.43	538	18
2.6	0.87	938	31
2.6	1.75	1700	57
2.6	3.50	2550	80
2.6	7.00	3519	117

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 20

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE (2.6 μM).- SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

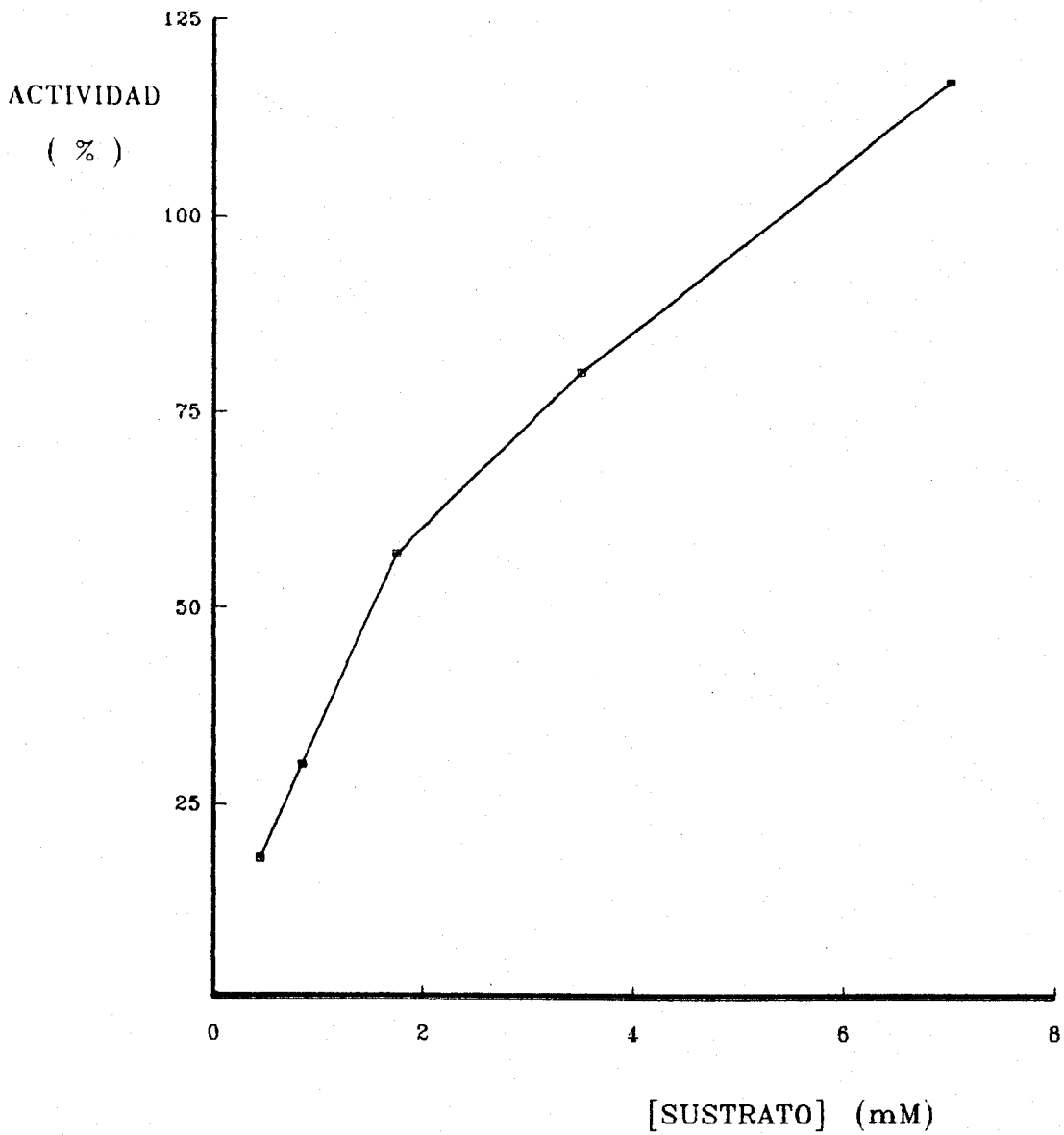


TABLA XXI

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.00	0.62	1920	100
0.52	0.62	704	37
0.52	1.25	1056	55
0.52	2.50	1525	79
0.52	5.00	2346	122

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 21

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE (0.52 μM).- SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

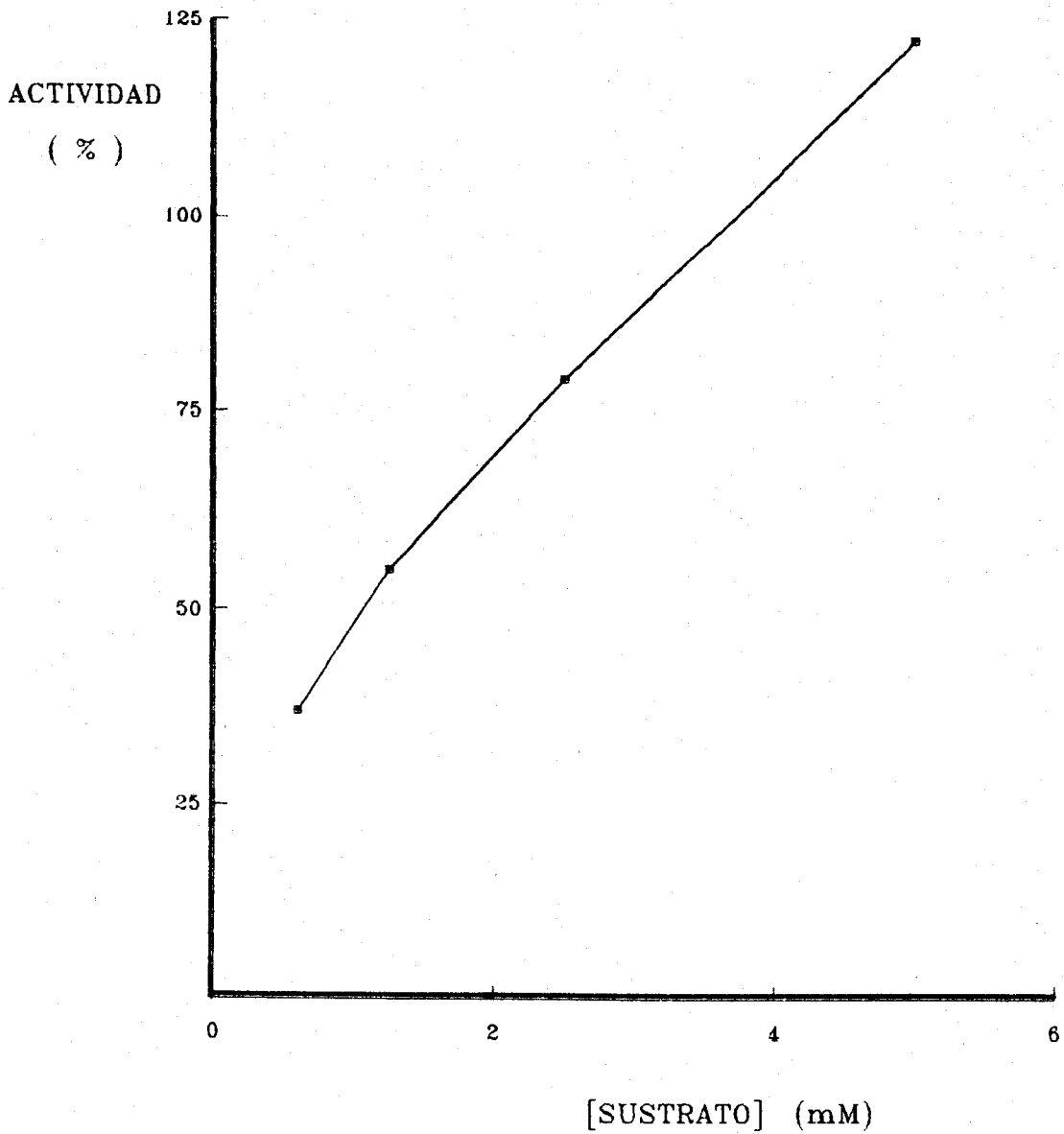


TABLA XXII

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR DIBUCAINA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.0	0.43	3000	100
2.6	0.43	1642	55
2.6	0.87	2346	78
2.6	1.75	3284	109

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 22

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR DIBUCAINA (2.6 microM).- SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

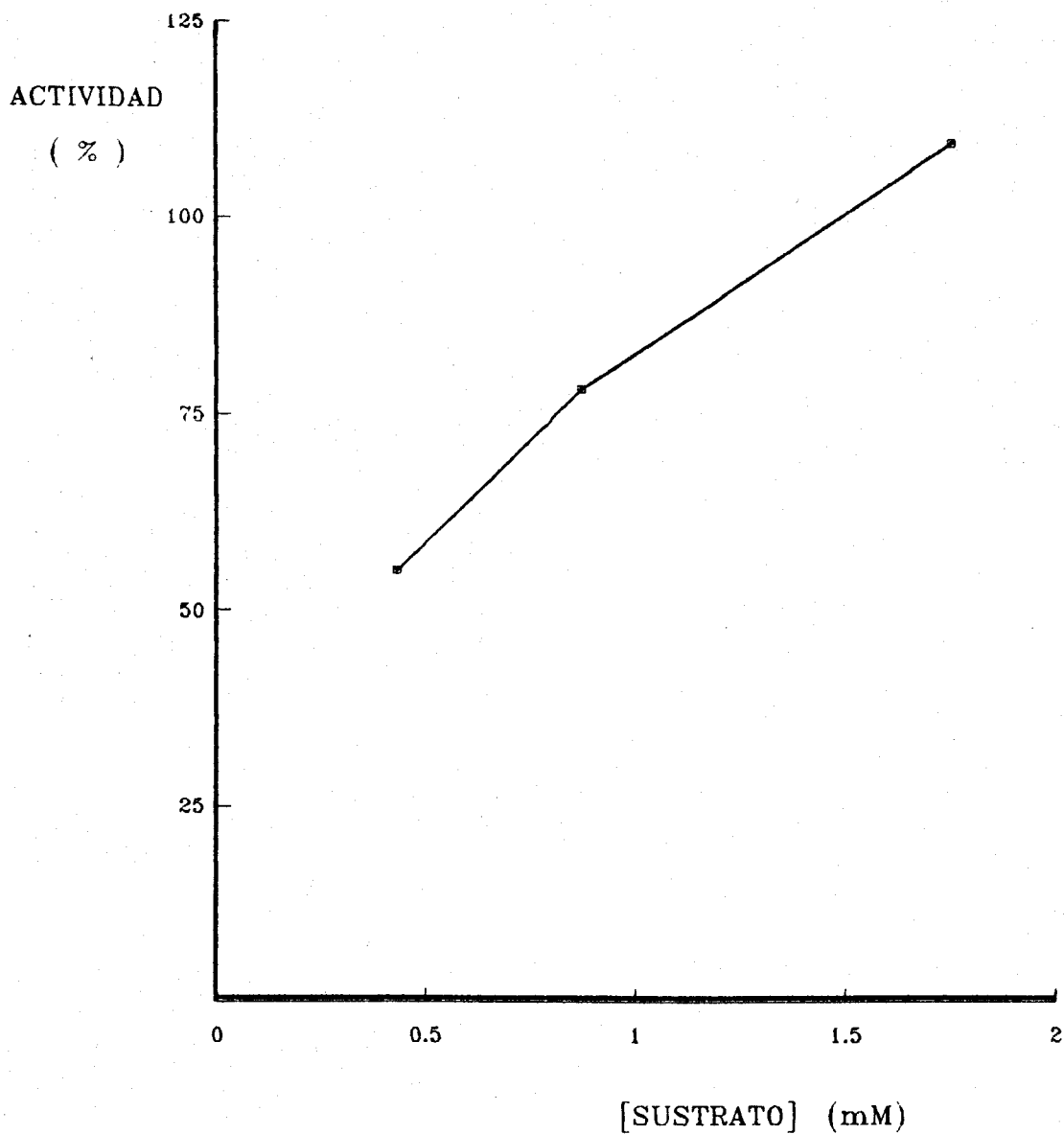


TABLA XXIII

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR DIBUCAINA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microm)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0.00	0.62	1920	100
0.52	0.62	1408	73
0.52	1.25	1877	98
0.52	2.50	2346	122

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 23

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA COLINESTERASA SERICA DESPUES DE SU INHIBICION POR DIBUCAINA (0.52 microM).- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA

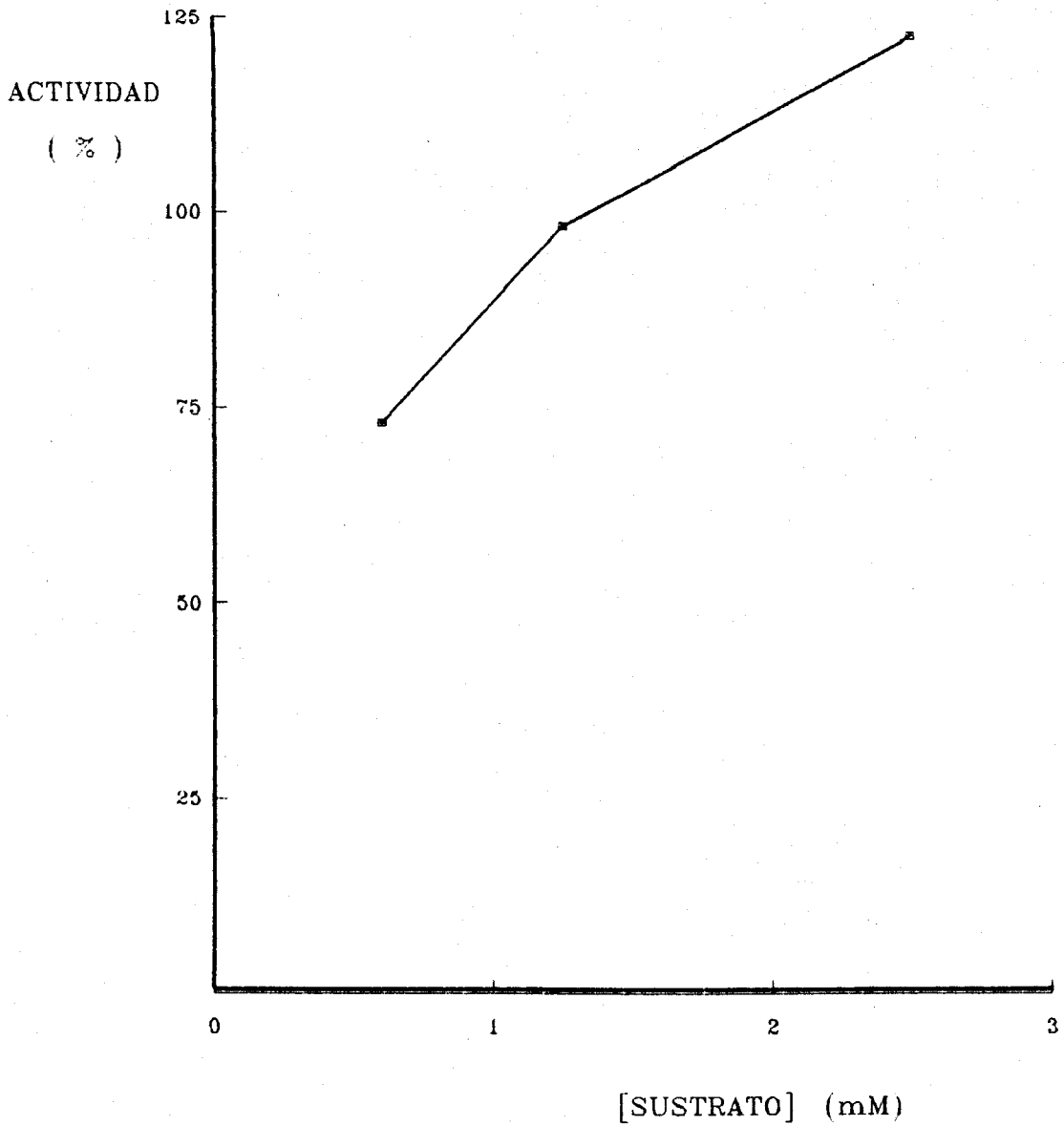


TABLA XXIV

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE SU INHIBICION POR
METOCLOPRAMIDA

CONCENTRACION METOCLOPRAMIDA (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0	0.06	5970	100
17	0.06	1910	32
17	0.12	3104	52
17	0.25	4537	76
17	0.50	6447	108

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 24

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE SU INHIBICION POR
METOCLOPRAMIDA (17 μM).- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA

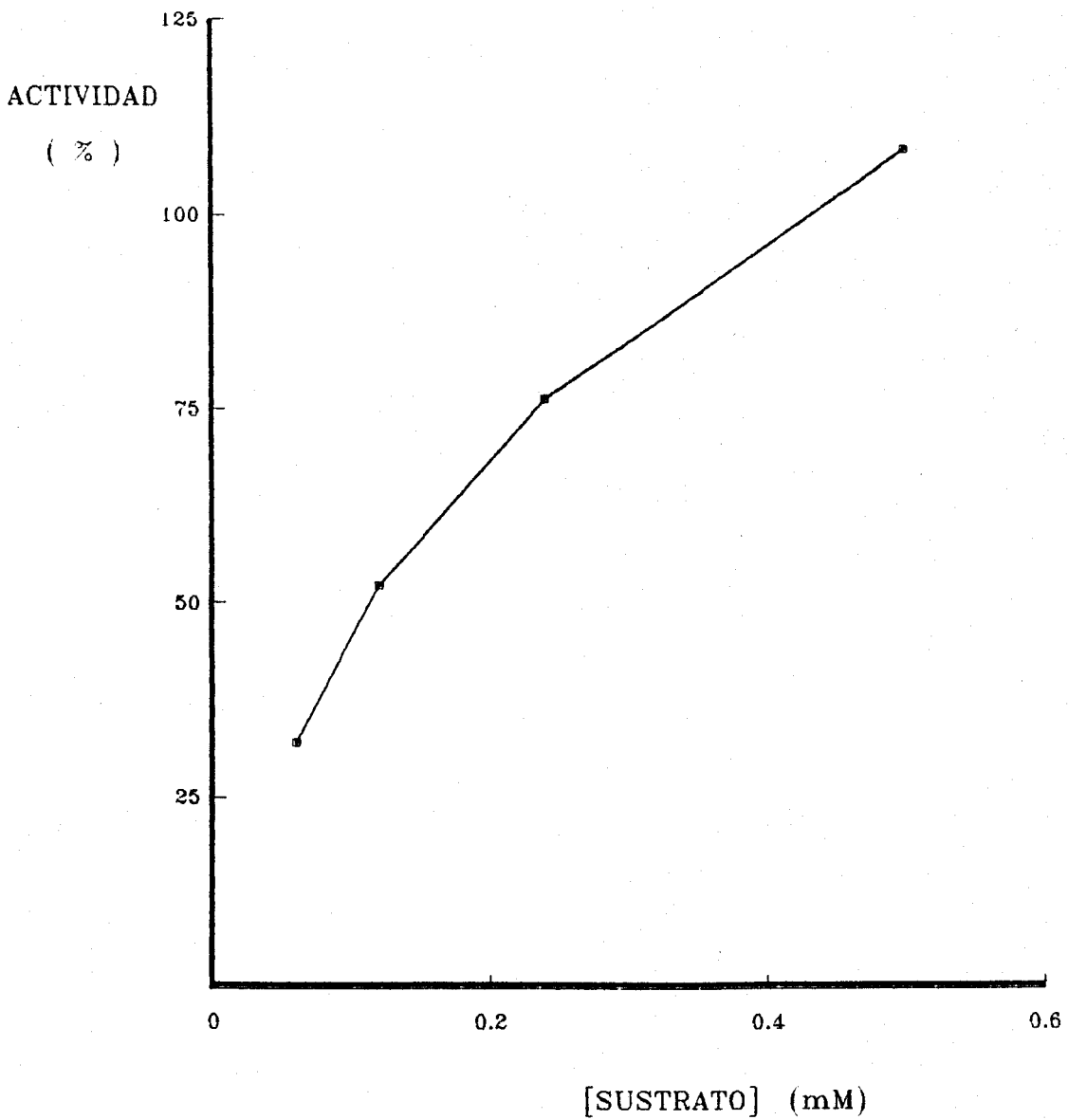


TABLA XXV

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE

CONCENTRACION BROMOPRIDE (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	INHIBICION ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0	0.06	5970	100
17	0.06	955	16
17	0.12	1791	30
17	0.25	2913	49
17	0.50	4179	70
17	1.00	6485	109

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 25

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE SU INHIBICION POR BROMOPRIDE (17 μM).- SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

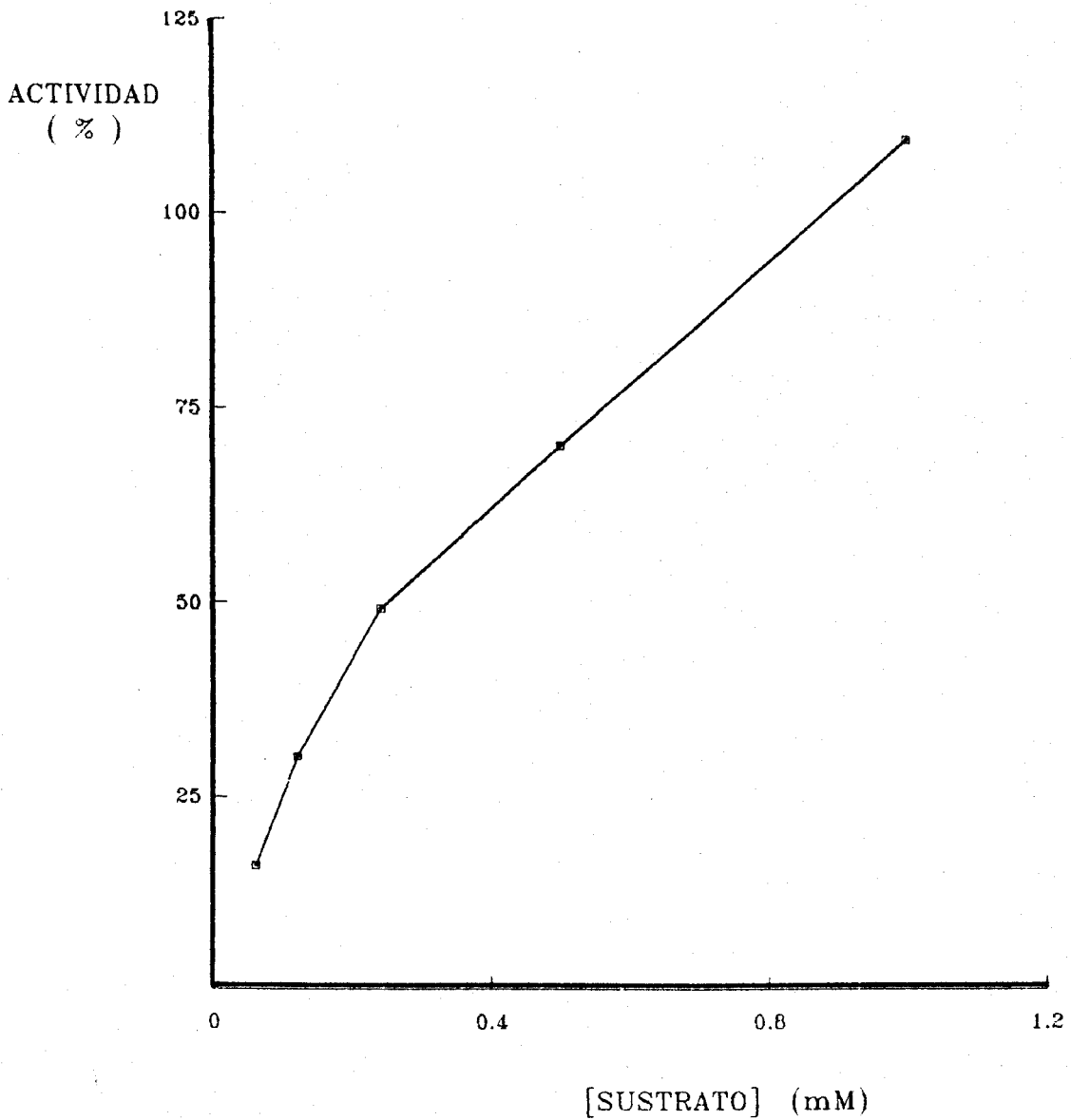


TABLA XXVI

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA
ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE LA INHIBICION POR
DIBUCAINA

CONCENTRACION DIBUCAINA (microM)	CONCENTRACION SUSTRATO (mM)	ACTIVIDAD ENZIMATICA	
		(U/l)	(%)
0	0.06	5970	100
17	0.06	5062	84
17	0.12	6853	114
17	0.25	8286	139

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 26

RECUPERACION TOTAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA ACETILCOLINESTERASA DESPUES DE SU INHIBICION POR DIBUCAINA (17 microM).- SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

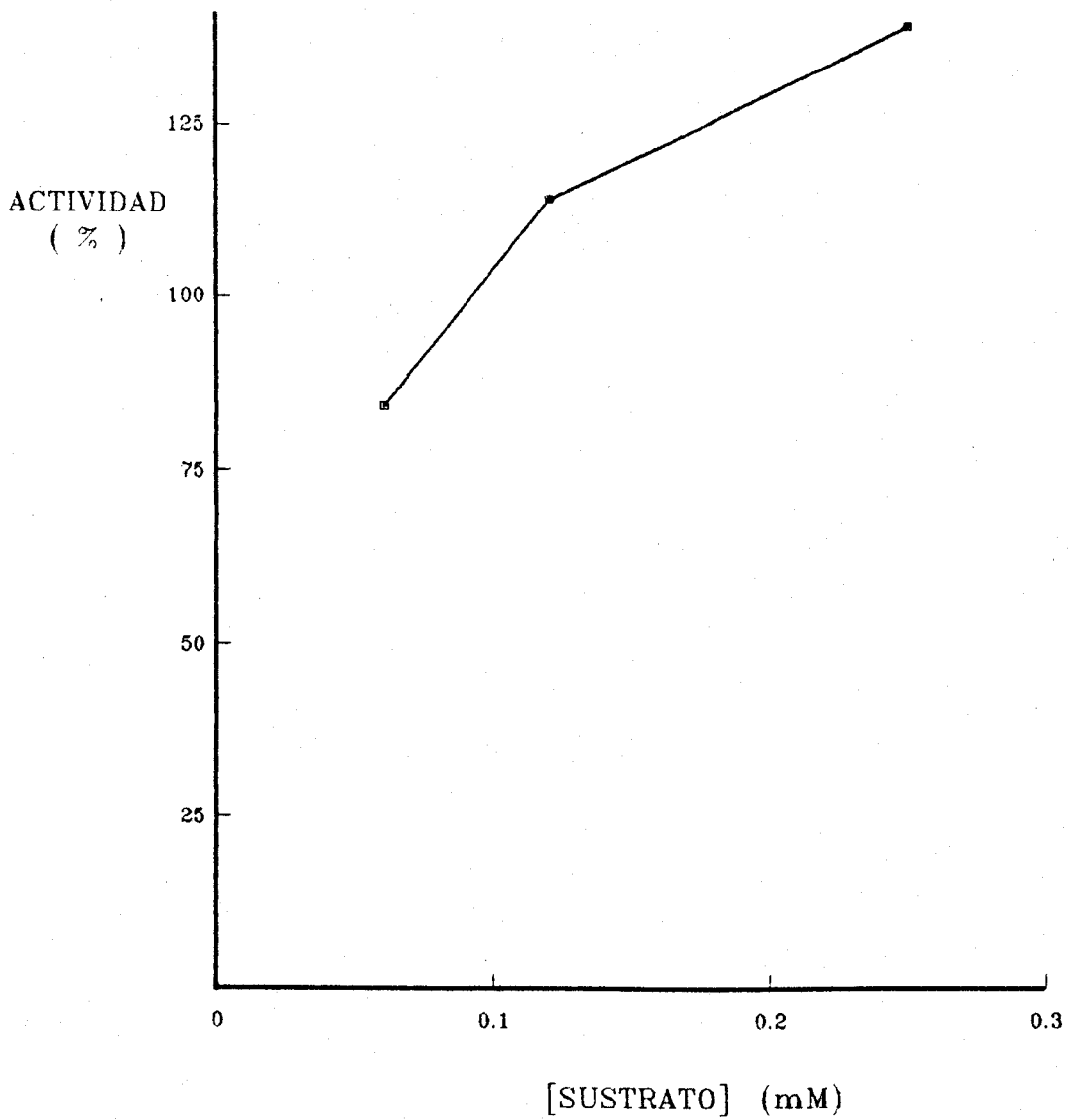


TABLA XXVII

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
 POR METOCLOPRAMIDA

[METOCLOPRAMIDA] = 0		[METOCLOPRAMIDA] = 2.6 microM.
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ . 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ . 10 ⁻⁵
21.3	0.14	25.8
23.6	0.51	47.3
27.5	1.14	76.9
33.3	2.28	133.3

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 27

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR METOCLOPRAMIDA.- SUSTRATO BUTIRILTIOCOLINA.

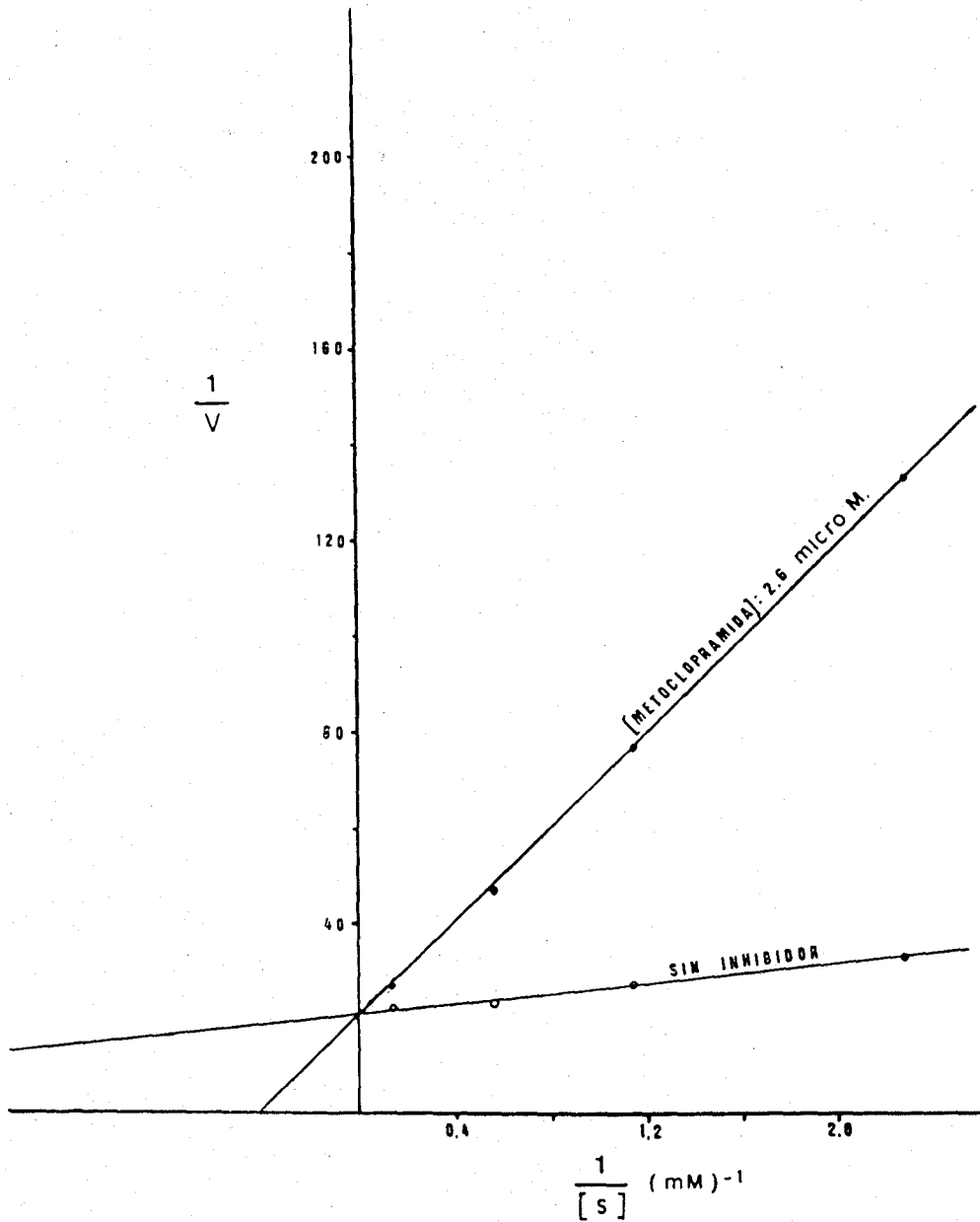


TABLA XXVIII

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
 POR METOCLOPRAMIDA

[METOCLOPRAMIDA] = 0		[METOCLOPRAMIDA] = 0.52 microM.
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ . 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ . 10 ⁻⁵
29.3	0.2	38.7
35.5	0.4	50.5
41.6	0.8	71.0
52.0	1.6	111.1

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 28

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR METOCLOPRAMIDA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

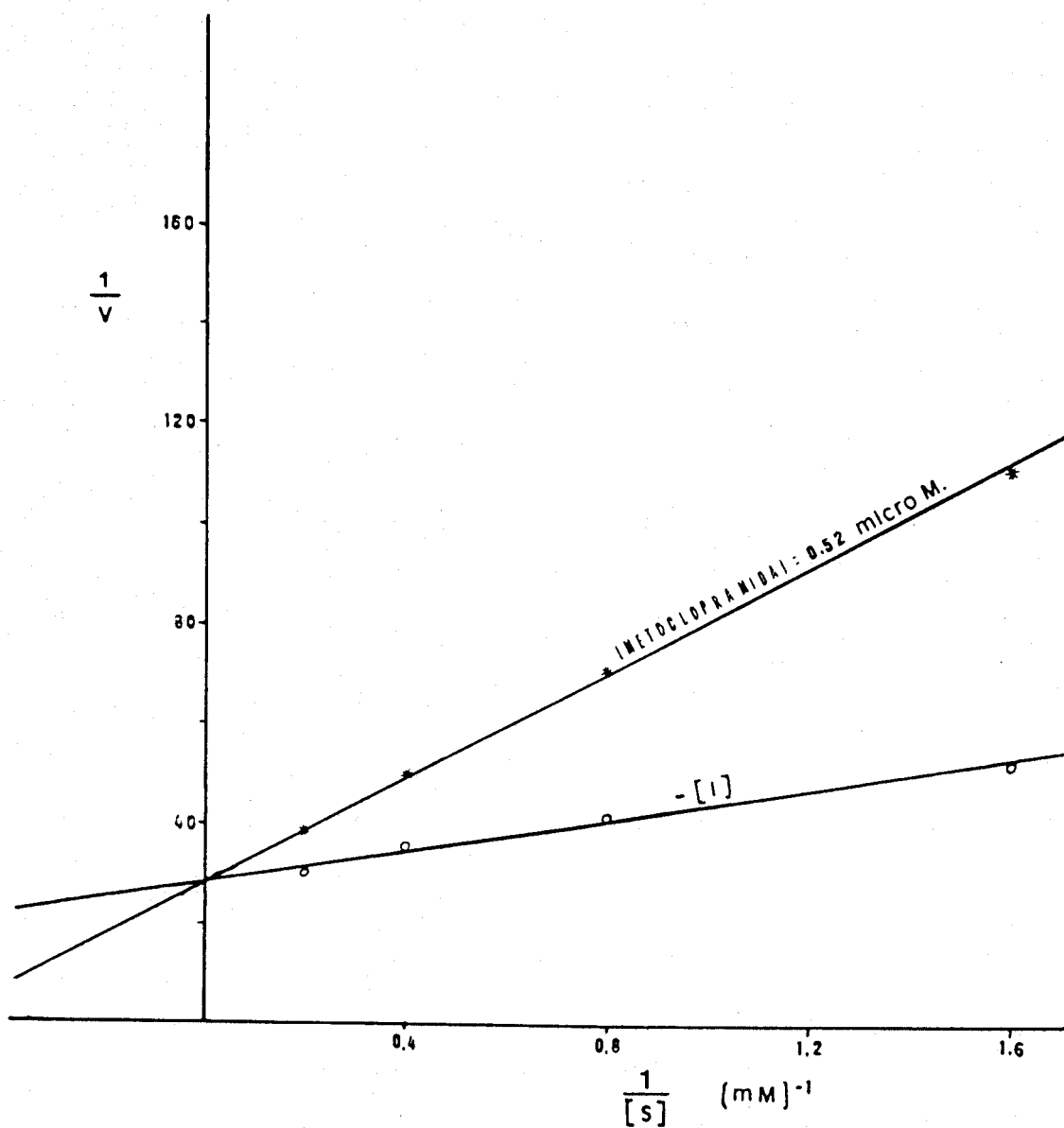


TABLA XXIX

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR BROMOPRIDE

[BROMOPRIDE] = 0		[BROMOPRIDE] = 2.6 microm.	
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹
21.3	0.14	28.4	0.14
23.6	0.57	58.8	0.57
27.5	1.14	106.6	1.14
33.3	2.28	185.8	2.28

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 29

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR BROMOPRIDE.- SUSTRATO BUTIRILTIOCOLINA.

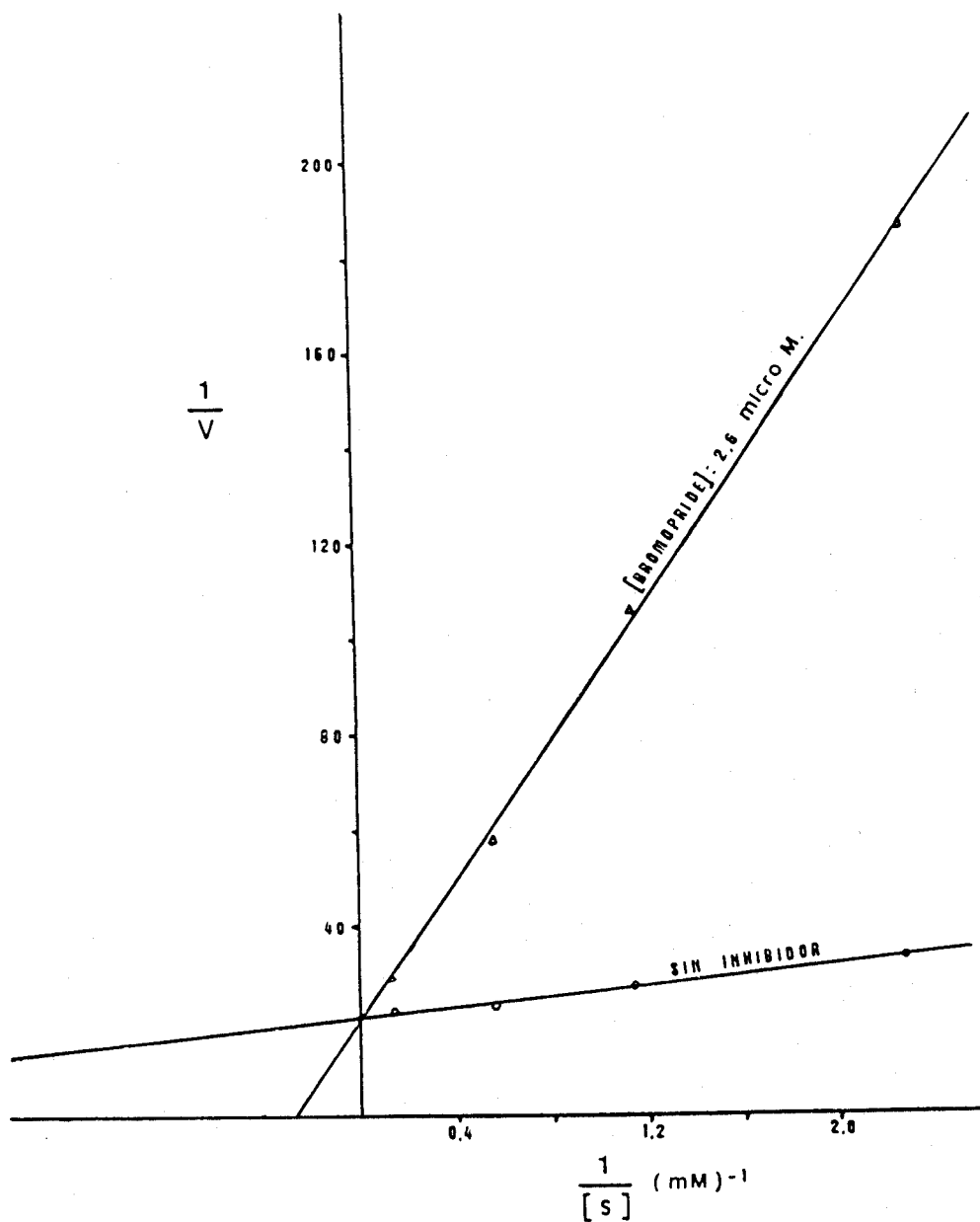


TABLA XXX

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
 POR BROMOPRIDE

[BROMOPRIDE] = 0		[BROMOPRIDE] = 0.52 microm.	
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹
29.3	0.2	42.6	0.2
35.5	0.4	61.5	0.4
41.6	0.8	94.6	0.8
52.0	1.6	152.9	1.6

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 30

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR BROMOPRIDE.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

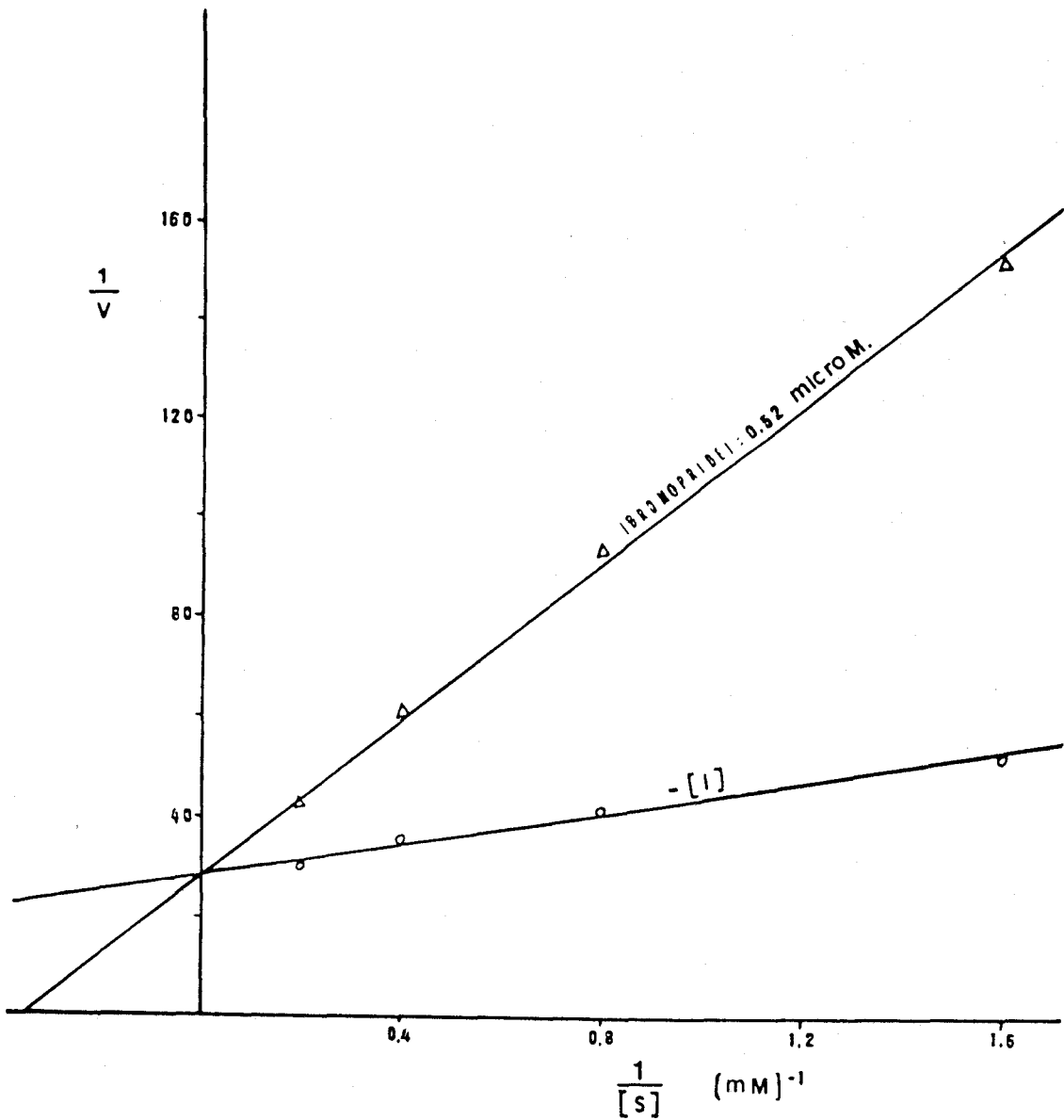


TABLA XXXI

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
 POR DIBUCAINA

[DIBUCAINA] = 0		[DIBUCAINA] = 2.6 microM.
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵
21.3	0.14	22.4
23.6	0.57	30.4
27.5	1.14	42.6
33.3	2.28	60.9

SUSTRATO: BUTIRILTIOCOLINA

FIGURA 31

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR DIBUCAINA.- SUSTRATO BUTIRILTIOCOLINA.

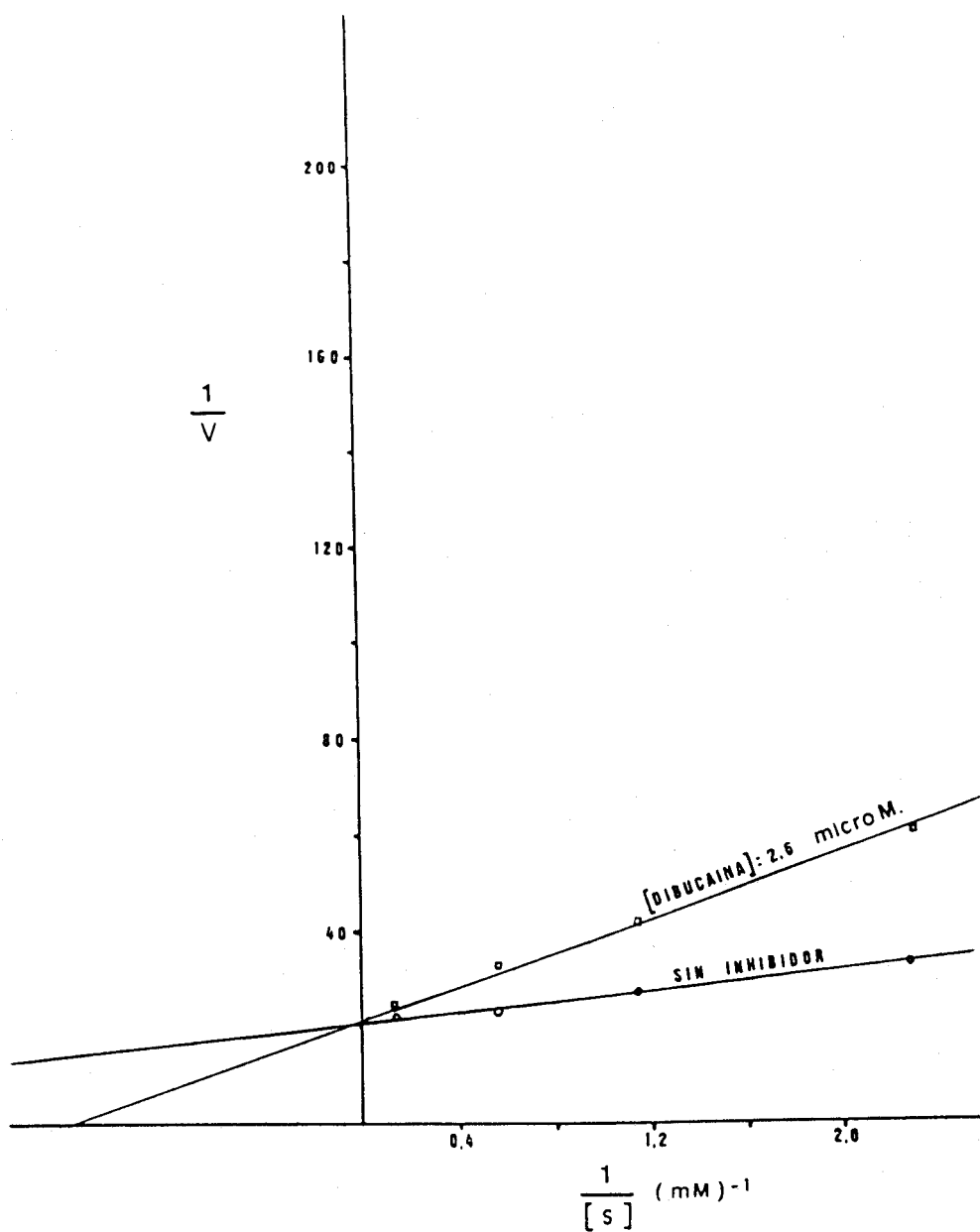


TABLA XXXII

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
 POR DIBUCAINA

[DIBUCAINA] = 0		[DIBUCAINA] = 0.52 microM.	
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹
29.3	0.2	32.7	0.2
35.5	0.4	42.6	0.4
41.6	0.8	53.2	0.8
52.0	1.6	76.4	1.6

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 32

INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA
POR DIBUCAINA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA

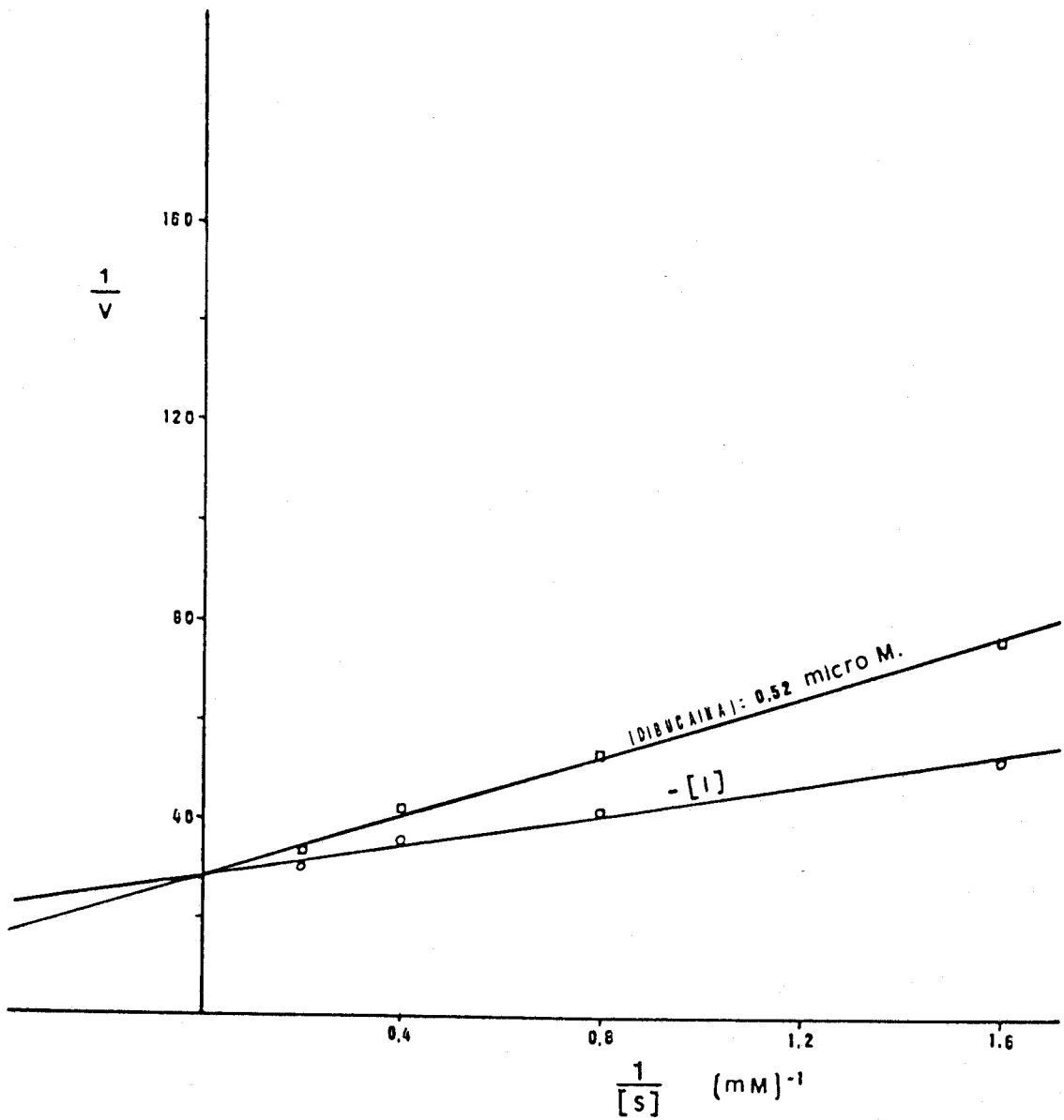


TABLA XXXIII

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
 POR METOCLOPRAMIDA

[METOCLOPRAMIDA] = 0		[METOCLOPRAMIDA]= 17 microM.	
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹
10.5	2	15.5	2
11.1	4	22.0	4
13.0	8	32.2	8
16.7	16	52.3	16

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 33

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
POR METOCLOPRAMIDA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

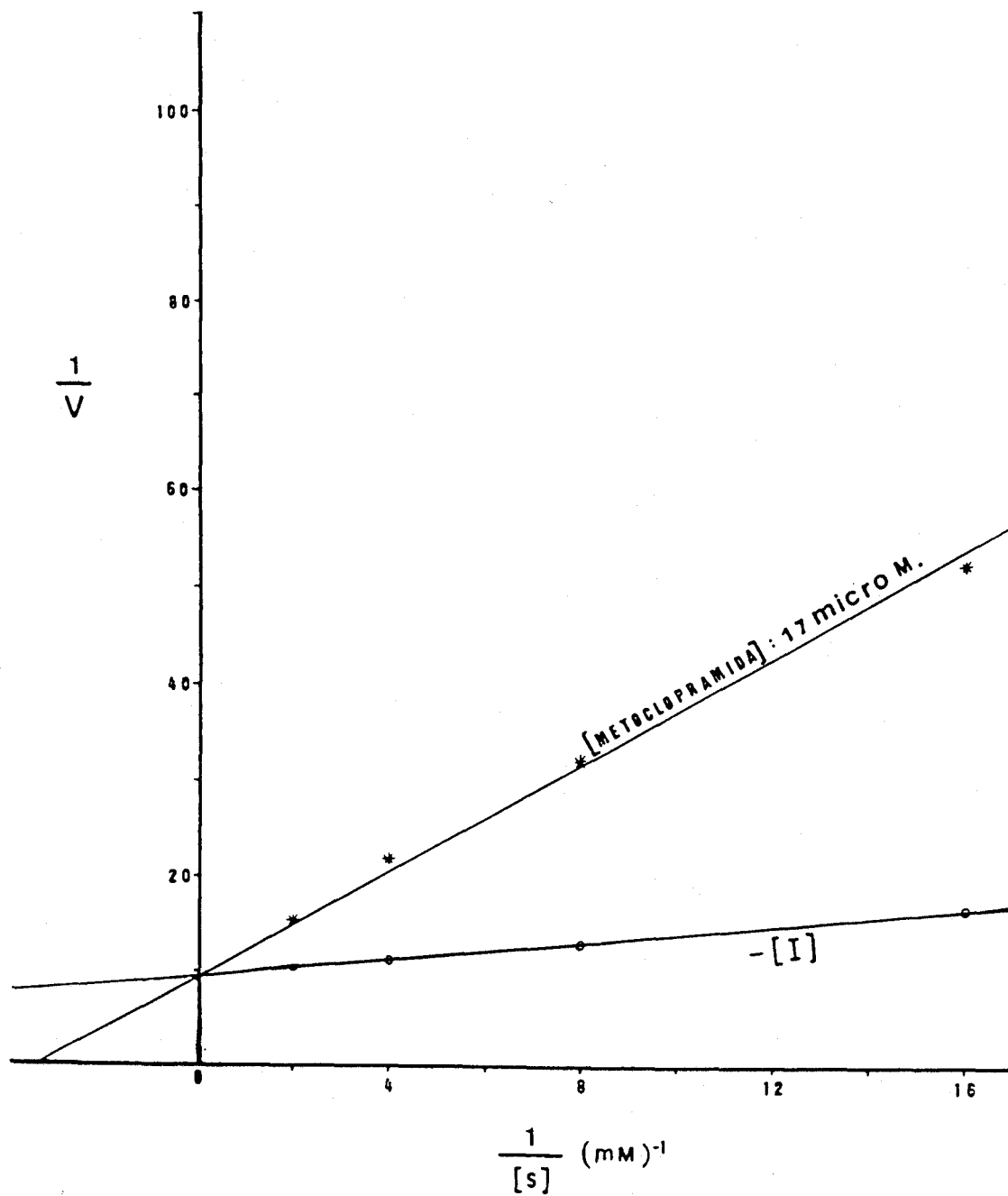


TABLA XXXIV

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
 POR BROMOPRIDE

[BROMOPRIDE] = 0		[BROMOPRIDE] = 17 microM.
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵
10.5	2	23.9
11.1	4	34.3
13.0	8	55.8
16.7	16	104.7

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 34

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
POR BROMOPRIDE.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

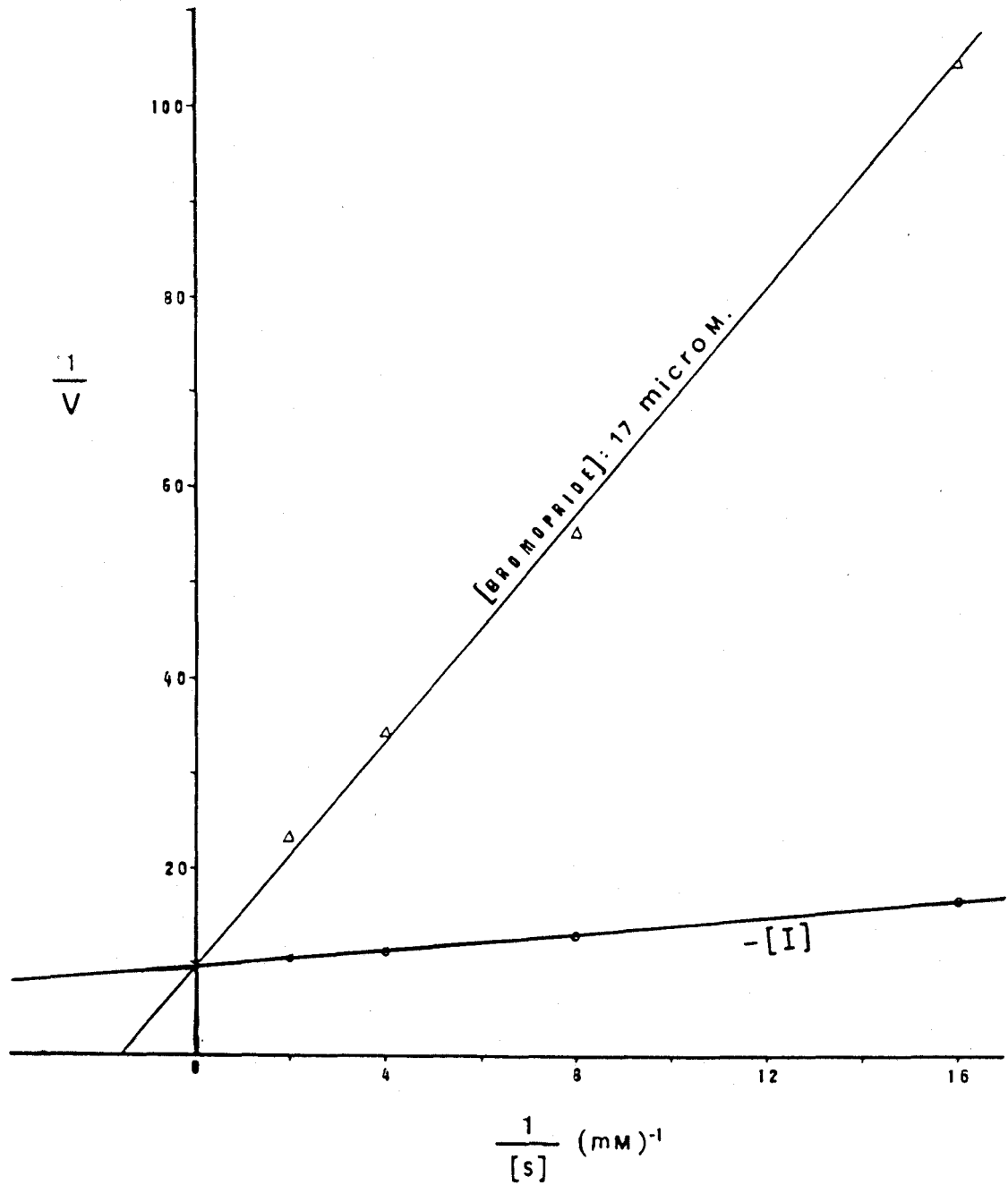


TABLA XXXV

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
 POR DIBUCAINA

[DIBUCAINA] = 0		[DIBUCAINA] = 17 microM.	
1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹	1 / ACTIVIDAD (U/l) ⁻¹ · 10 ⁻⁵	1 / [SUSTRATO] (mM) ⁻¹
10.5	2	11.1	2
11.1	4	12.0	4
13.0	8	14.5	8
16.7	16	19.7	16

SUSTRATO: ACETILTIOCOLINA

FIGURA 35

INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA
POR DIBUCAINA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

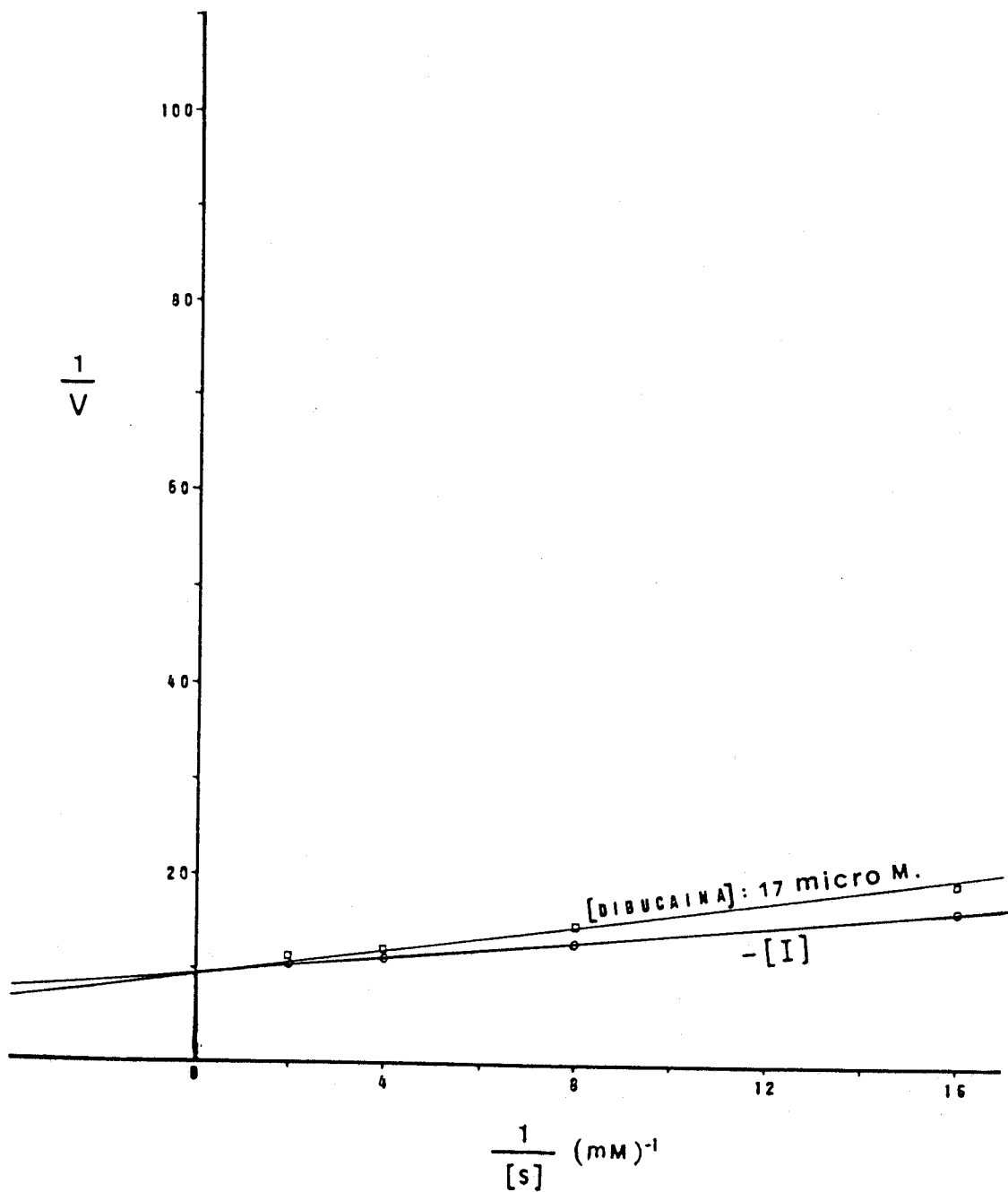


FIGURA 36

REPRESENTACION CONJUNTA.- INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA.- SUSTRATO BUTIRILTIOCOLINA.

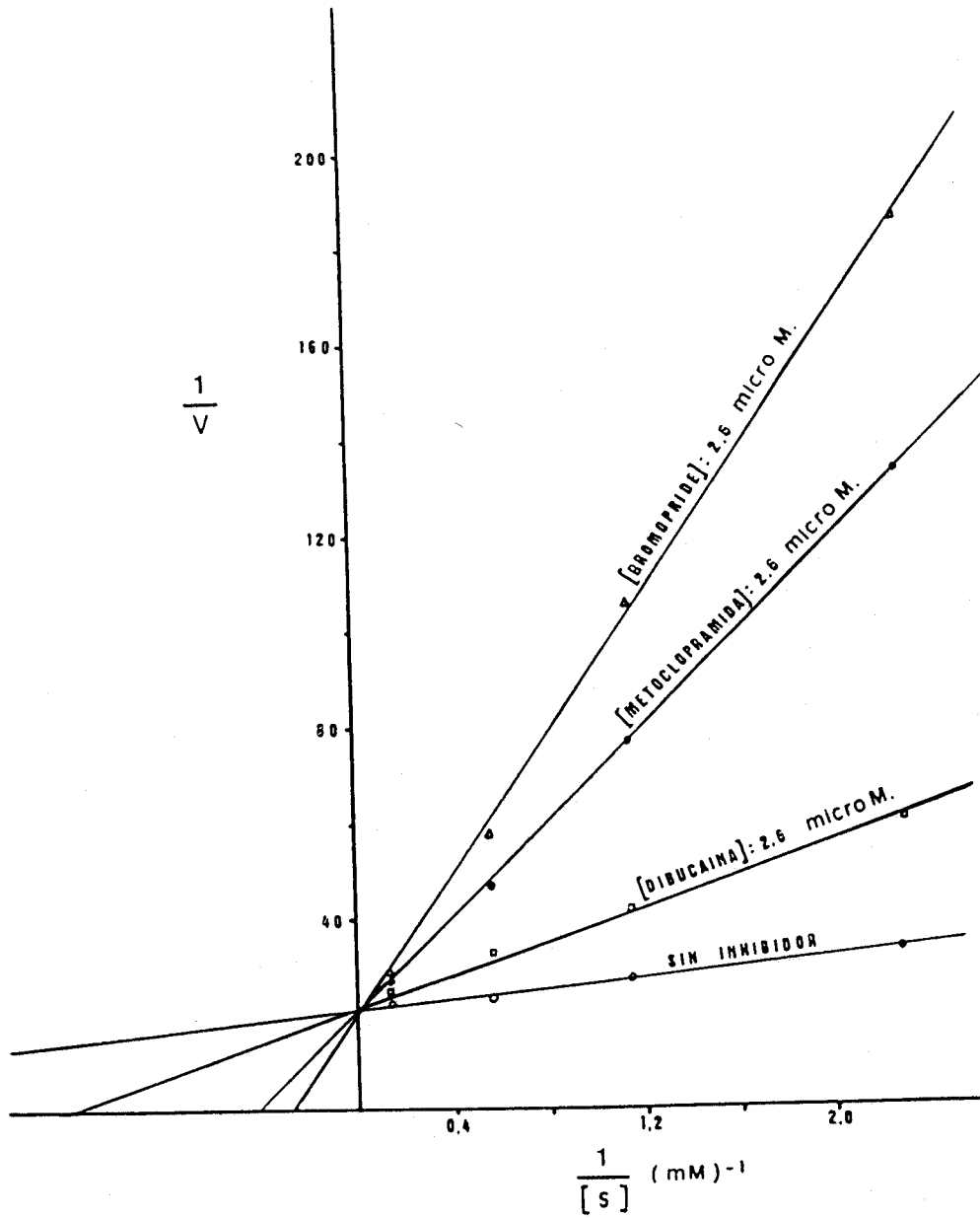


FIGURA 37

REPRESENTACION CONJUNTA.- INHIBICION COMPETITIVA DE LA COLINESTERASA SERICA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

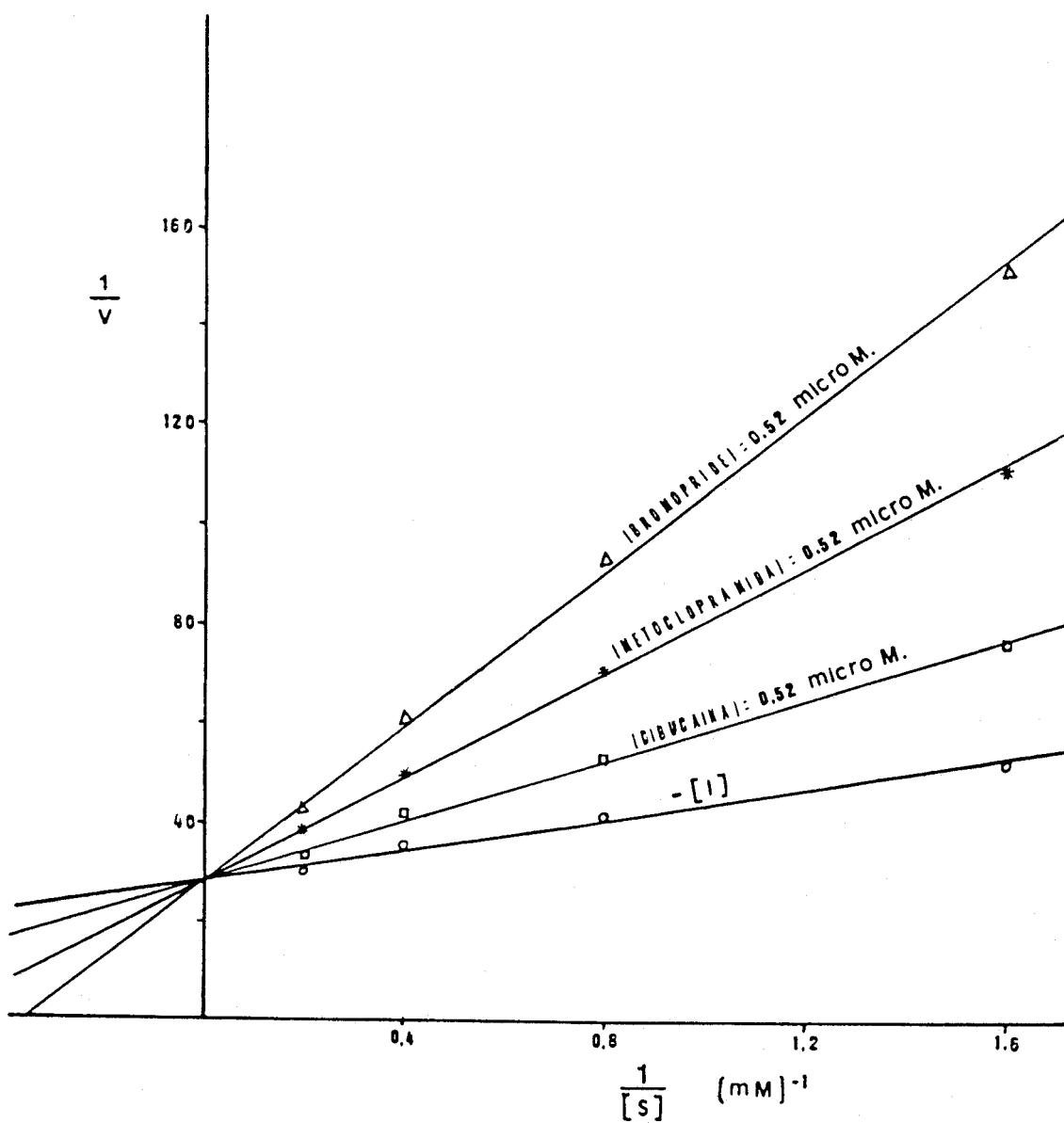


FIGURA 38

REPRESENTACION CONJUNTA.- INHIBICION COMPETITIVA DE LA ACETILCOLINESTERASA.- SUSTRATO ACETILTIOCOLINA.

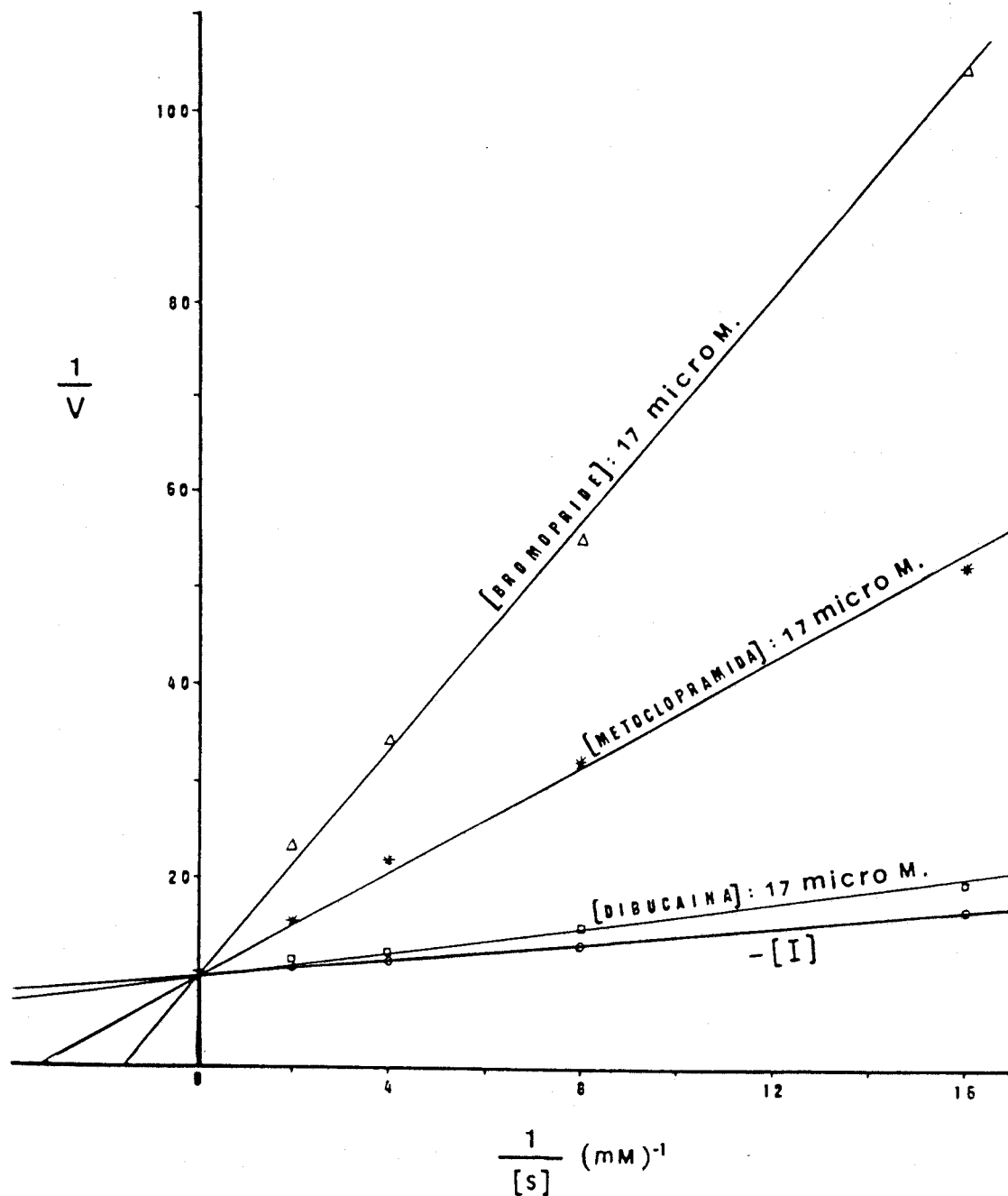


TABLA XXXVI

DETERMINACION DEL NUMERO DE DIBUCAINA, METOCLOPRAMIDA Y BROMOPRIDE.- COLINESTERASA SERICA NORMAL O USUAL.

MUESTRA No	CHE (U/l)	No D	No M	No B
1	6000	78	80	79
2	5372	82	81	83
3	5630	78	79	75
4	5536	78	78	77
5	7888	75	78	74
6	5067	80	78	76
7	6900	73	73	72
8	5835	84	86	81

TABLA XXXVII

DETERMINACION DEL NUMERO DE DIBUCAINA, METOCLOPRAMIDA
Y BROMOPRIDE.- COLINESTERASA SERICA ATIPICA.

MUESTRA No	CHE (U/l)	No D	No M	NoB
1	1595	63	61	62
2	1877	36	41	30
3	3346	64	68	66
4	1501	28	37	26
5	2068	49	52	47

V. - DISCUSSION

Discusión

A tenor de todo lo reseñado anteriormente, se puede apreciar que el desarrollo de nuestro trabajo toma como cimiento fundamental la conexión entre las dos grandes partes con las que comenzábamos la introducción. Por un lado, las colinesterasas sérica y eritrocitraria, y por otro, los fármacos antieméticos y estimulantes de la motilidad gastrointestinal, metoclopramida y bromopride. De esta correlación, puesta sólidamente de manifiesto mediante un detallado estudio enzimático, derivan una serie de consecuencias que forman tres pilares básicos: la propuesta de un nuevo mecanismo de acción para estos fármacos, un aporte a cerca de su interacción con el centro activo de la enzima y el comportamiento que presentan ante determinadas variantes genéticas de la CHE. Sobre estos materiales de soporte, que trataremos de fortalecer en este apartado, se construye nuestra tesis.

Durante el comienzo de nuestra tarea de investigación no se encontró ningún estudio realizado

"in vitro" que abordase íntimamente el efecto, y su caracterización, de la metoclopramida y el bromopride sobre la actividad de la CHE y ACHE humanas.

Determinados autores (114,133,148) habían efectuado pruebas algo relacionadas en homogeneizados de tejidos de rana, perro y conejo, pero nunca en colinesterasas humanas, ni acerca del tipo de inhibición.

Por otro lado, Kambam (149) en 1988, tras la observación de apneas prolongadas en pacientes anestesiados que recibían succinilcolina y metoclopramida, intenta establecer un vinculo entre esta última y la CHE, comprobando un descenso de la actividad enzimática. Relaciona estos hechos desde el punto de vista anestésico, pero no aporta nada referente al tipo de inhibición, a la actuación sobre la ACHE o relativo a otras benzamidas, como el bromopride.

Coincidiendo con nuestras publicaciones (150, 151) en 1990, Kao y col.(152) emiten un trabajo, relacionado con ellas, en el que estudian solo la metoclopramida y utilizan acetiltiocolina como único sustrato. Experiencia con la que discrepamos, en lo que corresponde al

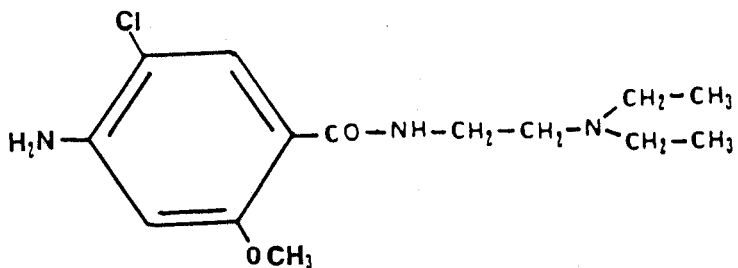
tipo de inhibición ejercido sobre las colinesterasas, y que discutimos mas adelante.

Hasta la fecha de presentación de nuestra tesis no hemos hallado estudio alguno que caracterice la acción producida por el bromopride sobre la CHE y ACHE humanas, ni la ejercida por la metoclopramida utilizando dos sustratos distintos para la primera enzima. Consecuentemente, tampoco se encontró ninguna publicación que hiciese un análisis comparativo de la acción de estos dos fármacos y un inhibidor conocido, como el anestésico local dibucaína.

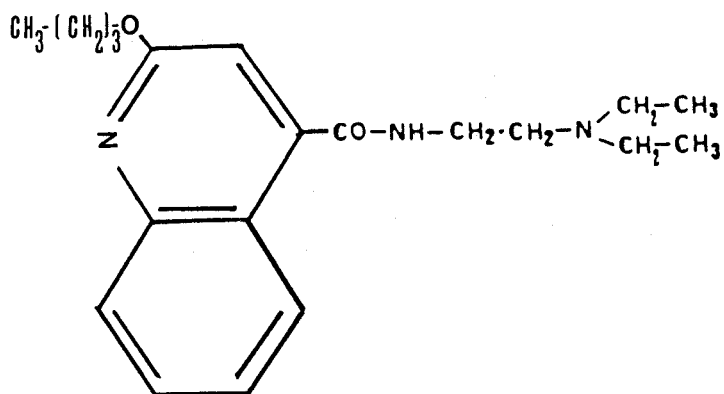
La elección de este último se llevó a cabo por la igualdad de los radicales hidrocarbonados que parten del grupo amida, a su vez unido a un radical aromático (Fig. I). Basándonos en dicha semejanza molecular y otros datos, como se verá luego, tratamos de explicar la actuación de estos fármacos sobre el centro activo de la enzima y el comportamiento similar frente a variantes genéticas de la CHE.

De la observación de los resultados se advierte en primer lugar la inhibición de alta afinidad producida

FIGURA I



Metoclopramida



Dibucaína

Formula estructural de la metoclopramida y la dibucaína.

por la metoclopramida y bromopride sobre la CHE y ACHE. A la vista de ello la cuestión prioritaria sería la de adquirir una noción de la potencia inhibitoria de dichos fármacos. Esta se puede deducir si tenemos en cuenta el parámetro I-50, definido y calculado en nuestros resultados, y se compara con el de agentes anticolinesterasas conocidos, como la neostigmina.

Según determinados autores (146,147), en sus estudios comparativos, el valor I-50 para la dibucaína es de 2.7 microm, mientras que para la neostigmina es de 0.13 microm. En nuestro trabajo, con el sustrato acetiltiocolina y las condiciones definidas, la I-50 para la dibucaína es de 4 microm, cifra próxima a la que aportan dichos autores para este mismo principio activo. Para la metoclopramida encontrábamos un valor de 1.4 microm y para el bromopride de 0.8 microm.

Por tanto, se advierte una proximidad en lo que corresponde al orden de concentraciones inhibitorias de las dos benzamidas, sobre todo el bromopride, y la neostigmina. Hecho este que confirma un alto poder inhibitorio, teniendo en cuenta que la comparación se está llevando a cabo con un principio activo, la

neostigmina, cuya acción farmacológica principal se basa en el efecto anticolinesterasa.

Tanto la actividad de la CHE como de la ACHE queda inhibida de forma proporcional respecto a la presencia de metoclopramida o bromopride, demostrándose que dicha inhibición puede llegar a ser total, como se observa en las tablas y gráficas correspondientes. La dibucaína, en cambio, casi no inhibe a la ACHE y se necesitarían concentraciones muy elevadas para conseguir una inhibición total de esta enzima.

Resulta que, según los datos preliminares obtenidos, la capacidad inhibitoria del bromopride sobre la actividad de la CHE, es casi dos veces mayor a la presentada por la metoclopramida, y la de ésta, a su vez, unas cuatro veces superior a la que se observa para la dibucaína, tanto con el sustrato butiriltiocolina como con acetiltiocolina. Con este último el calibre de la inhibición aparece mucho más incrementado, superando unas diez veces al que se encuentra con el primer sustrato. Esto último está de acuerdo con las conclusiones de Sekul y col.(15), mencionadas en el apartado I.1.4, relativas a la especificidad de

sustratos por la CHE y que afirmaban una mayor afinidad por la butiriltiocolina que por la acetiltiocolina.

Igualmente, la inhibición máxima de las colinesterasas es alcanzada con menor concentración de bromopride; casi la mitad de la correspondiente a metoclopramida. Y la de ésta es bastante menor que la necesitada para conseguir un descenso total de la actividad enzimática de la CHE por dibucaína. Lo cual nos confirma que los dos primeros fármacos disminuyen la actividad enzimática en mayor grado que este último.

En cuanto a la ACHE, los tres principios activos responden al mismo orden de predominio inhibitorio, solo que aquí el efecto de la dibucaína es prácticamente despreciable comparado con el de la metoclopramida y el bromopride. Es decir, se podría considerar que con este rango de concentraciones, la dibucaína no inhibe la actividad de la ACHE. Hecho que está de acuerdo con el trabajo de Pérez-Guillermo y col.(22) donde tratan la inhibición de las colinesterasas por algunos anestésicos locales. También sobre la ACHE, según nuestros resultados, el bromopride ejerce una disminución de su actividad aproximadamente dos veces mayor que la llevada

a cabo por la metoclopramida.

Siguiendo con la discusión de nuestro estudio enzimático, se puede observar en las tablas XVIII a XXVI, y sus correspondientes figuras, que el descenso de la actividad enzimática, tras la adición de una concentración fija de uno de los tres inhibidores, revierte al aumentar la cantidad de sustrato hasta rebasar la velocidad de hidrólisis en ausencia de inhibidor. Esto y la representación de los inversos de las concentraciones de sustrato frente a los inversos de las velocidades de reacción, en ausencia o en presencia de una cifra constante de inhibidor, nos va a definir el tipo de inhibición. Ya que la representación gráfica nos reporta, en todos los casos, rectas que se cortan en un mismo punto del eje de ordenada, estamos en situación de afirmar que, en el rango de concentraciones ensayadas, la metoclopramida, bromopride y dibucaína interaccionan con la CHE y ACHE provocando una inhibición de tipo reversible y competitiva.

Esto hace que estemos en desacuerdo con el trabajo, cronológicamente simultáneo con los nuestros (150, 151), de Kao y col. (152), en el cual encuentran una inhibición

no competitiva de la CHE y ACHE por metoclopramida, usando acetiltiocolina como sustrato y con representación gráfica de tres puntos de la reacción. Inhibición en la que, según las características que la definen, la velocidad máxima en presencia de inhibidor decrece, no pudiéndose restablecer su valor a pesar de que la concentración de sustrato pueda ser elevada. Es decir, los efectos de dicha inhibición no se anulan al aumentar la concentración de sustrato, ya que el inhibidor se une a un centro del enzima distinto del centro activo (82).

Como se aprecia en nuestros resultados la inhibición es perfectamente anulada al aumentar la cantidad de sustrato, con restablecimiento y superación de la actividad máxima en ausencia de inhibidor. Según se comentó en la Introducción, la inhibición competitiva, a parte de su representación gráfica, se reconoce con facilidad, debido a que el porcentaje de inhibición para una cantidad de inhibidor constante disminuye al incrementar la concentración de sustrato (82). Se interpreta fácilmente en los datos de nuestras tablas correspondientes a la recuperación total de la actividad enzimática, que el aumento progresivo de la presencia de sustrato, manteniendo fija la de inhibidor,

aumenta la velocidad de la reacción, llegando a anular el porcentaje de inhibición.

Además, como veremos posteriormente, pensamos y apoyamos la idea de que, tanto la metoclopramida como el bromopride, van a unirse al centro activo de la CHE y ACHE, característica fundamental de la inhibición competitiva, lo cual reafirma nuestros hallazgos.

Se da la circunstancia de que los agentes anticolinesterasa, neostigmina y fisostigmina, presentan el mismo tipo de inhibición encontrado para la metoclopramida y bromopride en nuestros ensayos, lo cual subrayamos por las circunstancias que más adelante se comentan.

En toda la bibliografía revisada, el exacto mecanismo de las acciones gastrointestinales de la metoclopramida y el bromopride permanece aún sin esclarecer. A continuación, mediante nuestros resultados y una exhaustiva recopilación de datos, tratamos de evidenciar un nuevo mecanismo de acción para estos fármacos, sin descartar otras posibles teorías, que aportaría una luz a algunos aspectos sombríos, tanto de

las colinesterasas como de las benzamidas sustituidas.

Puesta de manifiesto la considerable inhibición de la actividad de la CHE y ACHE por metoclopramida y bromopride, proponemos que la estimulación de la motilidad gastrointestinal provocada por ellos es debida a un mecanismo colinérgico, como consecuencia del aumento de la concentración de acetilcolina en la sinapsis nerviosa, preservada de su hidrólisis por las colinesterasas, que serían inhibidas por estos fármacos. Obsérvese que dicha inhibición es mucho mayor cuando se utiliza el sustrato similar al que se encuentra en las terminaciones nerviosas, la acetilcolina. Además, ésta va a estar presente en la sinapsis a concentraciones muy pequeñas, a las cuales la actuación de la ACHE será óptima, pues a concentraciones de 10 mM y superiores, la ACHE posee la particularidad de ser inhibida por su propio sustrato. Por tanto, y según nuestros resultados, cuanto menor sea la concentración de sustrato, mayor será el porcentaje de inhibición producido por metoclopramida y bromopride sobre esta enzima.

Los hechos fundamentales que se aproximan a una explicación del mecanismo de acción, contrastados en la

bibliografía reciente y como se ha indicado en la Introducción, son los siguientes:

1.- La metoclopramida y bromopride son potentes antagonistas de los receptores dopaminérgicos D2, por lo que, al menos en parte, algunas de las acciones de estos fármacos sobre la musculatura lisa del tracto gastrointestinal podrían deberse a un antagonismo de la neurotransmisión dopaminérgica.

2.- Acción directa sobre la musculatura lisa gastrointestinal.

3.- Liberación de acetilcolina y potenciación consecuente de los efectos colinérgicos.

Algunos trabajos (115,116,129) han tratado de sostener el primer punto, aduciendo que la metoclopramida y el bromopride podrían ejercer efectos gastrointestinales quizás por antagonización de los efectos inhibidores de la estimulación dopaminérgica, y que la dopamina es un neurotransmisor inhibidor en el esófago y en el estómago. Sin embargo, la experimentación llevada a cabo dio, en algunos casos,

resultados opuestos con la dopamina y sus antagonistas (116), lo cual resta evidencia a la hipótesis de que ésta sea un neurotransmisor inhibitor en el tracto gastrointestinal.

Se ha prestado un determinado interés por los receptores D2, llegándose a respaldar que el efecto de la estimulación dopaminérgica, regido por el vago y abolido por la vagotomía, es inhibido por la metoclopramida, y a su vez antagonizado por la administración de levodopa (108). No obstante, se ha demostrado que la vagotomía no modifica los efectos de la metoclopramida, lo que sugiere un lugar de acción localizado, probablemente en las terminaciones nerviosas periféricas de la musculatura intestinal (109). Luego el hecho contradice que estos fármacos pudieran ejercer sus acciones gastrointestinales basándose en un mecanismo de coordinación vagal, como es la estimulación dopaminérgica.

También hemos encontrado la aportación de otras razones que restan credibilidad a la hipótesis anterior. Así, no se han detectado neuronas ni fibras dopaminérgicas en la pared gastrointestinal, ni se ha demostrado

su acción fisiológica a nivel de los plexos, y existen derivados benzamídicos que carecen de actividad antagonista D2 y mantienen su capacidad de estimular la motilidad gastrointestinal (90).

Además se da el caso contrario. Es decir, el alizapride, otra benzamida sustituida antiemética, está considerado como un principio activo de gran potencia antidopaminérgica. Sin embargo éste no modifica, en absoluto, la motilidad del estómago, mantiene la abertura del esfínter pilórico y provoca una disminución significativa y prolongada de la motilidad duodenal (129). Osea, produce efectos sobre el aparato digestivo totalmente opuestos a los causados por la metoclopramida y bromopride, aún siendo antagonista de la dopamina.

La acción estimulante directa de los dos fármacos estudiados sobre la musculatura lisa del tracto gastrointestinal se puede explicar, en parte, a través de la liberación de acetilcolina, como consecuencia de la estimulación de las neuronas postganglionares colinérgicas y de los plexos nerviosos del tubo digestivo.

Solo hemos encontrado un trabajo (153) que infiera una acción directa sobre la musculatura lisa por parte de la metoclopramida, el cual habla del efecto causado solo sobre el esfínter esofágico inferior. Se argumenta en él un aumento en la tensión de dicho órgano, no bloqueada por anticolinérgicos, hexametonio, fentolamina, propanolol o difenhidramina; ni aumentado por gastrina I, acetilcolina o norepinefrina.

No obstante, existe común acuerdo entre la mayoría de los autores (95,98,99,117) y ha quedado establecido que el aumento de las contracciones producidas por la metoclopramida sobre el esfínter esofágico inferior, estómago e intestino, es bloqueado por la acción de los fármacos anticolinérgicos, como la atropina y potenciado por agentes colinérgicos, como el carbacol, betanecol o la metacolina. Comportamiento, por otra parte, muy parecido al de los agentes anticolinesterasa, como se puede observar en el apartado I.3.2.

En toda la bibliografía examinada se extrae un argumento comúnmente compartido y es que, aunque el mecanismo exacto de acción de la metoclopramida y el bromopride no es bien conocido, la investigación

reciente y amplia llevada a cabo en los últimos 20 años ha permitido sugerir que, a parte de ser antagonistas dopaminérgicos, poseen notables efectos colinérgicos. A éstos se atribuyen, al menos en parte, la actuación sobre el aparato digestivo.

Aunque determinadas acciones de estos fármacos pudieran estar relacionadas con la inhibición de la dopamina (por ejemplo la antiemética), el efecto estimulante sobre la motilidad del tracto gastrointestinal encontraría una razón de ser fundamental en la liberación o aumento de acetilcolina en la conjunción neuromuscular y consiguiente contracción de la musculatura lisa.

Estamos ante la tercera de las hipótesis antes citada, a nuestro parecer, la de mayor sostén para la explicación del mecanismo de acción gastrointestinal de estos dos fármacos, a la vista de los argumentos contradictorios de las dos primeras y los que a continuación se discuten para esta última.

Hemos encontrado siempre un gran apoyo a la teoría de potenciación de los efectos colinérgicos, aunque no

se define el exacto mecanismo. Mientras unos autores (110,111) opinan que dicha acción podría deberse a la liberación de acetilcolina, otros (113) piensan que los mecanismos colinérgicos serían facilitados por alguna otra acción, o bien podrían sensibilizar los receptores muscarínicos de la acetilcolina en la musculatura lisa gastrointestinal (112). Además, aunque se afirma el efecto facilitador sobre la actividad colinérgica gastrointestinal a nivel periférico, se desconoce si es debida a una acción inespecífica o al resultado de la interacción con otros receptores (90).

Cabría la posibilidad de pensar que la metoclopramida y bromopride fuesen agentes colinérgicos directos, como el carbacol o la metacolina. Pero a diferencia de éstos, se ha comprobado que aquellos requieren lugares intrínsecos neuronales de almacenamiento de acetilcolina para ejercer sus acciones farmacológicas (95), lo cual indica que necesitan de ella para estimular la musculatura lisa.

Ampara también otra razón contraria en este sentido el trabajo de Fontaine y Reuse (114), quienes observaron que, previa incubación del músculo abdominal de rana con

metoclopramida y bromopride, la dosis de acetilcolina, necesaria para producir una respuesta igual a la provocada sin la incubación con aquellos fármacos, era disminuida casi la mitad, mientras que dicha dosis no sufría variación en el caso de otros agonistas de la estimulación muscular, como el cloruro potásico o el carbacol.

Esto podría parecer contradictorio, si tenemos en cuenta la afirmación hecha anteriormente, en la cual decíamos que la acción de la metoclopramida y bromopride es potenciada por agentes colinérgicos, como el carbacol o la metacolina. No obstante, tiene su explicación si consideramos la acción anticolinesterasa de estos fármacos, demostrada en nuestros ensayos y apoyada por el experimento de los autores mencionados en el músculo abdominal de rana.

En dicho músculo, no se está midiendo una potenciación del efecto por adición conjunta de las benzamidas y la acetilcolina o el carbacol, sino que se realiza una preincubación de diez minutos con aquellas. En ese tiempo, la ACHE es inhibida en las sinapsis neuromusculares y, al adicionar la acetilcolina, su

hidrólisis es preservada, necesitándose menos cantidad para ejercer el mismo efecto. En el caso del carbacol, la concentración de enzima no influye en su dosis, ya que no es degradado por ella.

Hemos de decir también que, en el mismo ensayo, la preincubación con un agente anticolinesterasa conocido, la neostigmina, se obtienen los mismos resultados que con la metoclopramida y bromopride, lo cual reafirma nuestra propuesta.

Por otra parte, nuestros datos están en desacuerdo con la afirmación de Pinder y col.(96), que en 1976 sostenían que la metoclopramida no tiene actividad anticolinesterasa.

En contrapartida, son reafirmados por las experiencias de Vacca y col.(133), realizadas en perros y conejos, en lo que se refiere al efecto inhibidor de las colinesterasas por ambos fármacos. Sin embargo, nuestras aportaciones respecto al orden de potencia contrasta con la de estos autores, los cuales confieren una mayor acción anticolinesterasa a la metoclopramida. Pensamos que tal vez podría ser debido a que las pruebas

se llevaron a cabo en animales o con distintas condiciones de trabajo.

No obstante, secundan nuestros resultados en ese sentido los niveles plasmáticos efectivos alcanzados tras la administración de metoclopramida y bromopride, descritos en la introducción, y que son para el bromopride (141) aproximadamente la mitad de los que se obtienen con metoclopramida (99). Obsérvese que la I-50, calculada en nuestras gráficas correspondientes al efecto inhibidor de la actividad de las colinesterasas para ambos fármacos, guarda la misma relación.

Aportamos, por consiguiente, una novedosa y, tal vez, complementaria aproximación que permite explicar los efectos gastrointestinales de estos dos principios activos, en el sentido de que, al inhibir la ACHE, el resultado sería similar a una "liberación de acetilcolina", como sostienen la mayoría de la hipótesis comentadas con anterioridad. Es decir dichos fármacos se comportarían como agentes colinérgicos indirectos.

Como se puede contemplar en la Figura C de la Introducción, en las terminaciones nerviosas coliné-

gicas, la acetilcolina es sintetizada y almacenada en las vesículas presinápticas, de donde será liberada al espacio sináptico mediante impulsos colinérgicos o filtrada espontáneamente a la terminación nerviosa (154). Una vez allí, cuyos niveles van a ser controlados por la ACHE, interaccionará con el receptor postsináptico o presináptico y finalmente será hidrolizada por dicha enzima. Si la actividad enzimática de ésta es inhibida se incrementa la presencia del acetilcolina y por tanto su acción, mediante una mayor interacción con los receptores y un aumento de la transmisión del impulso nervioso.

Se describió en la Introducción el gran componente autonómico y complejidad de la regulación nerviosa gastrointestinal y que la inervación colinérgica a nivel entérico es abundante. También que el intestino delgado puede regular la motilidad y vaciamiento gástrico, y que la transmisión neuroquímica en las neuronas entéricas es de carácter nicotínico a nivel ganglionar, mientras que a nivel efector es muscarínico.

Teniendo en cuenta que la estimulación de los receptores muscarínicos son bloqueados por la atropina,

coincidiendo con la acción de la metoclopramida y bromopride, y que el efecto de estos fármacos no es abolido por la vagotomía, todo ello nos conduce a pensar en una actuación de éstos en las terminaciones nerviosas efectoras del aparato digestivo.

Se sugiere que la metoclopramida y bromopride presentarían una especial predilección para acceder y actuar sobre las conjunciones neuromusculares finales, ricas en receptores muscarínicos, lo que provocaría una estimulación de la musculatura lisa gastrointestinal. Esto tendría lugar mediante un mecanismo colinérgico indirecto, regido, en su mayor parte, por la inhibición de la ACHE y, tal vez, la CHE.

Hasta ahora solo hemos hecho alusión a la enzima eritrocitaria porque su papel ha estado siempre relacionado con la transmisión del impulso nervioso, mientras que el de la enzima sérica permanece aún sin aclarar. No obstante, hay una serie de hechos que la relacionan con el sistema nervioso y con el aparato digestivo, los cuales podrían implicarla, demostrada su mayor inhibición por metoclopramida y bromopride, en el mecanismo de acción gastrointestinal de estos fármacos.

La CHE se localiza en todo el aparato digestivo, desde el duodeno al recto, según demostraron Sine y col.(8), con dos formas distintas de la enzima (G1 y G4). Predomina, curiosamente, la de mayor actividad en algunos tramos donde la acción de la metoclopramida y bromopride es mayor y decreciendo progresivamente hasta llegar al recto, lugar donde, aunque existente, el efecto de dichos fármacos es menor.

En el sistema nervioso central se encuentran en íntima relación ambas enzimas, como confirma el trabajo de Brimijoin y Hammond (9), existiendo en determinadas zonas niveles mayores de CHE. No hay que olvidar que el centro del vómito, situado en el área postrema del cerebro y rico en receptores muscarínicos, es probablemente otro centro regulador de la motilidad gástrica, cuya estimulación, en su grado más elevado, produce el vómito (88). Se sugiere que la ligera actuación de la acetilcolina sobre los receptores del centro del vómito, provocada por un fármaco como la metoclopramida capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, podría favorecer el vaciamiento gástrico por aumento de la motilidad y aliviar la sensación de náuseas.

El mismo mecanismo de acción antiemética se explicaría por el efecto sobre los receptores muscarínicos presentes en las terminaciones nerviosas de la musculatura lisa gastrointestinal.

Si atendemos a las posibles funciones que se asignan a la CHE, también contribuyen a consolidar nuestra teoría. Así, la hipótesis de que la CHE fuese un precursor de la ACHE (31) nos llevaría a la conclusión de que la actividad de ésta se encontraría aún más disminuida, si además de ser inhibida decrece su producción por inhibición de la primera.

Otro posible papel bastante lógico de la CHE (27) es el de actuar protegiendo o regulando la ACHE, hidrolizando aquellos ésteres de colina que pudieran inhibirla. Según esto si disminuyese la actividad de la CHE, dichos ésteres inhibirían todavía más a la ACHE.

Jamieson (35), en sus estudios, relaciona a la CHE con la motilidad intestinal, mientras que otros autores sustentaron una conexión entre dicha enzima y la asimilación de alimentos (34). Esto último posiblemente se debe a la modificación de la motilidad gastro-

intestinal, ya que, como se trató en la Introducción, existen alteraciones provocadas por la metoclopramida y bromopride en la absorción de determinados medicamentos debidas a dicha acción. De hecho, en el ayuno, cuando la actividad motora está organizada en los ciclos motores interdigestivos, existe un descenso de la actividad de la CHE. Todo lo cual nos confirma un compromiso entre esta enzima y el aparato digestivo.

Pero además, algunos autores (30) reseñan que la CHE desempeña un papel esencial en los procesos de conducción nerviosa lentos, estando en concordancia con la activación muscarínica, responsable de la contracción de la musculatura lisa entérica, cuya respuesta es más lenta en su iniciación y más prolongada en su duración que la nicotínica (90).

Existen una serie de puntos en común entre los agentes anticolinesterasa, neostigmina y fisostigmina (derivados carbámicos) y las benzamidas sustituidas, metoclopramida y bromopride. Esta concordancia nos permite afianzar más nuestra hipótesis. Son los siguientes:

- Son inhibidores reversibles y competitivos de la CHE y ACHE, con mayor potencia frente a la primera.

- Poseen una acción eucinéctica, estimulando la contracción de la musculatura lisa a lo largo de todo el tracto digestivo, por un mecanismo colinérgico.

- En ambos grupos de fármacos, la acción anteriormente citada, es bloqueada por la atropina.

- Están indicados igualmente en varios trastornos patológicos de la motilidad intestinal, como el íleo paralítico y la gastroparesia diabética.

- Tanto unos como otros, han de ser utilizados con precaución en pacientes asmáticos por la producción de broncoespasmos.

Al mismo tiempo, poco se sabe de grado relativo con que los agentes anticolinesterasa inactivan a la enzima en diferentes tejidos. Ello depende en parte de la facilidad para penetrar a los espacios celulares, y así, si bien la neostigmina y fisostigmina presentan una potencia inhibitoria algo mayor que la metoclopramida y

bromopride, también es cierto que al ser sales de amonio cuaternario tendrán más dificultad para la absorción y entrada en los tejidos que estos últimos, de mayor carácter hidrofóbico. De hecho, determinados autores (104) describen que la metoclopramida estimula más la motilidad intestinal que el bromuro de piridostigmina.

En esta misma línea, pasamos a discutir otra prueba confirmatoria relacionada tanto con la acción estimulante motora gastrointestinal de la metoclopramida y bromopride, como con algunos de sus efectos secundarios.

Como se apuntó en un principio, al describir las acciones de estos fármacos, a bajas concentraciones, "in vitro", aumentan el tono basal y la actividad contráctil, mientras que a altas concentraciones la actividad mecánica es inhibida (95,129). Hecho que presenta una explicación lógica si atendemos a nuestra propuesta sobre el mecanismo de acción.

Ya que actuarían inhibiendo las colinesterasas, a bajas dosis el efecto sería colinérgico, pero con grandes cantidades la actividad enzimática quedaría tan

disminuida que se produciría una gran acumulo de acetilcolina en los receptores postsinápticos. La ausencia de hidrólisis del neurotransmisor impediría que éste fuese retirado, para así dejar paso a otras moléculas que, al interaccionar, diesen lugar a la producción de otros impulsos nerviosos. Se ocasionaría una despolarización continuada y, por tanto, una interrupción de la transmisión nerviosa. Circunstancia que se produce asimismo con los agentes anticolinesterasa, citados anteriormente.

Acontece de forma similar con otro efecto suscitado por la metoclopramida y bromopride, concretamente la liberación de prolactina, la cual es incrementada a bajas concentraciones del fármaco (120,136,155,156), mientras que a altas ocasionan una inhibición en la secreción de dicha hormona (121,137).

Ya que se desconoce el mecanismo exacto para el citado fenómeno, su explicación se haría con un razonamiento aceptable si atendemos al modo de actuación, como anticolinesterasas, que se sugiere para estos fármacos. Cuando más, si se tiene en cuenta que algunos autores apuntan hacia la posibilidad de otro

mecanismo de componente central, no dopaminérgico, que consiste en un aumento de la actividad de centros nerviosos de carácter colinérgico (90).

Conjuntamente, y siguiendo con esta hormona, se da un ciclo muy curioso, a considerar. Por un lado, la acción de la metoclopramida sobre la liberación de prolactina, reseñado anteriormente. Por otro, los estudios de Ramaswamy y col.(157) demuestran que la prolactina inhibe la CHE y sugieren que puede ejercer su actividad colimimética por inhibición de dicha enzima. Y por último, nuestros resultados ponen de manifiesto que la CHE es inhibida por metoclopramida.

Con todo esto, supongamos que un mecanismo colinérgico en un compartimento cercano a la glándula pituitaria, es el responsable de la secreción de prolactina y que ésta constituye su propio factor de inhibición hormonal. Cuando la concentración de ésta es baja, la colinesterasa es inhibida y por estimulación colinérgica se libera hormona. Si ésta aumenta demasiado, la inhibición de la enzima sería tal que se acumularía gran cantidad de acetilcolina y el impulso nervioso abolido por despolarización continuada, no

liberándose prolactina. De igual modo, si la metoclopramida tuviese capacidad para alcanzar esas células reguladoras, su acción a bajas concentraciones segregaría hormona, mientras que a grandes dosis provocaría el efecto contrario.

Finalmente, y volviendo al estímulo de la motilidad en el tracto digestivo inducido por metoclopramida y bromopride, reafirman nuestra teoría los ensayos realizados con otra benzamida antiemética, el alizapride.

En nuestra línea de investigación, que se continuará con estos fármacos antieméticos, se han efectuado algunas pruebas preliminares con el susodicho medicamento. Los resultados obtenidos en ellas indican que el alizapride, considerado un fuerte antagonista dopaminérgico, no inhibe, en las concentraciones utilizadas en nuestro trabajo, a la colinesterasa. Hecho que coincide con nuestra hipótesis, pues en la documentación recibida sobre este principio activo (129) se afirma que carece de acción estimulante sobre la musculatura lisa gastrointestinal.

En otro orden de cosas, ha quedado bien establecida la existencia de un sitio aniónico, un sitio esterático y sitios hidrofóbicos en el centro activo de la CHE y ACHE, como se vio en la Introducción. Queremos hacer una aportación referente al modo en que la metoclopramida y el bromopride van a interaccionar con estas enzimas y la diferencia de inhibición que presentan entre ellos.

De la fórmula estructural, presentada al principio para ambos fármacos, se deduce que exhiben sendos radicales tipo amina terciaria unido al grupo amida, cuyo nitrógeno a pH fisiológico podría encontrarse, en parte, cargado positivamente y unirse a la enzima por el sitio aniónico, al igual que lo hace el grupo amonio cuaternario de la acetilcolina. De la misma forma los grupos etílicos serían acomodados por el sitio hidrofóbico A1, según el modelo que representábamos en la figura B, propuesto por Kabachnik y col.(20). Lo mismo ocurriría con la dibucaína, que presenta idéntico radical, adherido al grupo amida.

La longitud de la cadena entre el nitrógeno amínico y el carbono amídico, en los tres fármacos, es la misma que la existente entre el primero y el carbono del grupo

éster en la acetilcolina. Por tanto, el radical aromático encajaría en el bolsillo de las áreas hidrofóbicas, situado en las inmediaciones del sitio esterático (Fig. B). No se produciría unión entre éste y la amida, debido a la necesidad de un grupo éster. Como es lógico, ninguno de los tres principios activos serían hidrolizados por la CHE o la ACHE. No obstante, la interacción hidrofóbica, cuya importancia fue indicada (5,18,19), si tendrá lugar, en mayor o menor grado, dependiendo del radical aromático que parte de la amida.

Según se dijo, determinados estudios (23) demuestran que la grieta situada en el sitio esterático, rodeada de paredes hidrofóbicas y encargada de acomodar radicales aromáticos, es menor en la ACHE que en la CHE. Esto nos explica porqué la dibucaína, con un anillo quinolínico de tamaño mayor que el anillo de las benzamidas sustituidas (Fig. I), al no entrar en el hueco de la ACHE, no inhibe su actividad enzimática. En cambio con la CHE ocurriría lo contrario.

Además, por la misma razón, el grado de interacción hidrofóbica de la metoclopramida y bromopride es de menor intensidad con la ACHE. Al ser menor el tamaño de

su bolsillo hidrofóbico es menos inhibida por dichos fármacos, como lo demuestran nuestros resultados.

Otros autores (21,22) encuentran una relación directamente proporcional entre la inhibición de las colinesterasas por determinados compuestos aromáticos y su coeficiente de partición octanol-agua. Es decir, cuanto más hidrofóbico sea un fármaco, mayor capacidad presentará para disminuir la actividad de ambas enzimas.

En nuestra parte experimental, la potencia inhibitoria obtenida para el bromopride es casi el doble de la que se calcula para la metoclopramida. Si atendemos a sus respectivas fórmulas (Fig. H), la única diferencia entre ambos es el átomo halogenado, cloro o bromo, unido al anillo bencénico. El cloro, más electronegativo, posee un efecto inductivo negativo y desestabilizante del anillo, mayor que el bromo y por el contrario, un menor efecto de resonancia, activador del anillo. Según lo cual cabe esperar que el bromopride sea más hidrofóbico que la metoclopramida. Efectivamente, en el estudio realizado por Van Damme y col.(158), donde se determina el coeficiente de partición octanol-agua (P) para diferentes benzamidas sustituidas, se obtiene para

la metoclopramida un valor de $P=416$, mientras que para el bromopride $P=669$. Por ello, aportamos que la diferente inhibición que presentan se debe, solo y exclusivamente, a la distinta interacción hidrofóbica. Asimismo, proponemos que la capacidad inhibitoria de las colinesterasas, esperada para una benzamida sustituida, podría preverse por el carácter hidrofóbico y el tamaño que confiera un determinado radical unido al anillo bencénico, siempre que el radical amínico sea el mismo.

En esta línea, el alizapride, que como aludíamos antes no disminuye la actividad de la colinesterasa, presenta en el susodicho trabajo un coeficiente de partición muy bajo, de tan solo de $P=8.9$, y su radical aromático se compone de dos núcleos cíclicos unidos, hecho que consolida nuestros argumentos.

Una herramienta fundamental para la detección de variantes genéticas de la CHE la constituye la dibucaína, desde que Kalow y Genest (49) pusieron de manifiesto la resistencia que mostraban a ser inhibidas, por este anestésico local, las variantes atípicas de dicha enzima.

Al observar la igualdad del radical hidrocarbonado unido a la amida, existente en la dibucaína, metoclopramida y bromopride, decidimos ver el comportamiento que demostraban estos dos últimos con las mencionadas variantes.

En la Tabla XXXVI se contempla como los tres fármacos, mediante la determinación de sus NQD, NOM y NOB, encuadran con valores similares a todas las colinesterasas procedentes de distintas muestras, dentro de la variante normal o usual con cifras por encima de 70. O sea, la conducta de los tres es idéntica.

En la Tabla XXXVII, con CHE anormales, la actitud es muy parecida clasificándolas, por los valores de referencia citados con anterioridad, dentro de las variantes atípicas heterocigóticas. Lo cual indica que, en un principio, exhiben la propiedad de poder diferenciar, al menos, las CHE de este tipo, pudiendo ser de gran utilidad en este sentido.

Nuestra idea en lo sucesivo es tratar de conseguir el mayor número posible de variantes genéticas, e investigar la inhibición producida por metoclopramida y

bromopride a estas concentraciones. También se llevarían a cabo ensayos con otras CHE procedentes de pacientes que presentaron apneas prolongadas tras la administración de succinilcolina y cuyas CHE no han podido ser definidas genéticamente por los inhibidores diferenciales existentes. Como aludíamos en la Introducción, tanto el uso del cloruro (57) como del butanol (58), contribuyeron a la detección de nuevas variantes anormales de la CHE, luego podríamos estar antes dos nuevos inhibidores diferenciales. Además, potencialmente el número de variantes genéticas de la CHE puede ser muy amplio, y verdaderamente, es indudable que existe un número de ellas previsiblemente no identificadas (5).

Desde siempre ha sido sostenida la creencia de que la diferencia estructural de las distintas variantes genéticas radica en el sitio aniónico, y no en el esterático (42), ya sea por la diferencia de tamaño y forma en la variante atípica (159), o bien por la variabilidad de las distancias con el sitio activo serina (160). Son razonables, por ello, que los resultados obtenidos en las dos tablas citadas para los tres fármacos sean similares, debido a que todos

comparten el mismo radical encargado de interaccionar con el sitio aniónico.

Pero adicionalmente, Lockidge (47) afirma que, si bien la mutación de la colinesterasa anormal afecta al sitio aniónico disminuyendo su carga negativa, también existe una repercusión sobre el sitio de unión hidrofóbico. En este sentido, es lógico pensar que la metoclopramida y bromopride podrían tener un comportamiento distinto a la dibucaína, a este nivel, frente a otras colinesterasas anormales, aún sin detectar, ya que, como hemos demostrado, el tipo de unión hidrofóbica es diferente dependiendo de los diversos radicales aromáticos.

Como señalan algunos autores (149,152) se han observado casos de prolongación del bloqueo muscular causado por succinilcolina en pacientes que recibían metoclopramida a nivel preoperatorio. Teniendo en cuenta que el bromopride, más reciente y menos empleado todavía, puede ser prescrito con la misma finalidad farmacológica que la metoclopramida en anestesia e inhibe en mayor grado la CHE, sugerimos, por primera vez según la bibliografía revisada, una precaución a la hora

de administrar este fármaco junto con succinilcolina u otros inhibidores de dicha enzima, de utilidad en intervenciones quirúrgicas.

Finalmente y como colofón a este apartado queremos reseñar que dejamos una puerta abierta en el campo de la interferencia analítica, motivo en un futuro de sucesivos estudios en nuestro Departamento.

Son muchos los medicamentos que afectan las pruebas que determinan parámetros en el laboratorio, haciéndolo por distintas vías. Día a día son descubiertas nuevas perturbaciones en diferentes etapas del proceso analítico por principios activos de uso terapéutico (161).

A causa de la evidente inhibición de las colinesterasas por metoclopramida y bromopride, se prevé una incidencia de este efecto en la determinación de las mencionadas enzimas, sobre todo de la CHE. Pues, como indicábamos en los estudios farmacodinámicos de ambos fármacos los niveles plasmáticos están sujetos a importantes variaciones y se describen algunos casos anormalmente altos. Asimismo, cabe esperar que los

valores sanguíneos estén mucho más elevados durante la administración de estos principios activos a dosis muy superiores a las usuales, como es el caso del tratamiento de vómitos inducidos por antineoplásicos. Adicionalmente, la alteración analítica de la CHE tendría mayor incidencia si el sustrato base para la determinación fuese la acetiltiocolina, con el cual la inhibición producida por metoclopramida y bromopride es unas diez veces mayor que la resultante para la butiriltiocolina.

Sugerimos, por todo ello, una posible alteración analítica en la determinación de las colinesterasas y se pretende realizar una investigación según las líneas directrices para estudiar y definir una interferencia analítica (161), propuesta por la Comisión "Effets des médicaments sur les examens de laboratoire".

VI . -CONCLUSIONES

Conclusiones

De la exposición y resultados de este trabajo, junto con los razonamientos que se han llevado a cabo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1ª.- Los fármacos antieméticos y estimulantes de la motilidad gastrointestinal, metoclopramida y bromopride, inhiben de forma considerable la actividad de la colinesterasa sérica y eritrocitaria humanas.

2ª.- El bromopride inhibe la actividad de dichas enzimas en mayor grado que la metoclopramida, casi el doble, y ambos superan en este sentido al anestésico local dibucaína.

3ª.- Se puede considerar que la dibucaína no inhibe prácticamente, a las concentraciones empleadas en este trabajo, la actividad de la enzima eritrocitaria.

4a.- La disminución de la actividad enzimática de la colinesterasa sérica producida por los tres fármacos citados es notablemente mayor con la acetiltiocolina, como sustrato, que con la butiriltiocolina.

5a.- La inhibición de las colinesterasas provocada por metoclopramida, bromopride y dibucaína es de carácter reversible y competitivo.

6a.- Se propone, sin invalidar ninguna de las hipótesis en vigor, un mecanismo de acción colinérgico basado en la inhibición de las colinesterasas por metoclopramida y bromopride a distintos niveles del organismo, que contribuye a comprender mejor los efectos desencadenados en el tracto gastrointestinal y sus propiedades como antieméticos de amplio uso terapéutico.

7a.- La falta de inhibición de la ACHE por parte de la dibucaína se debe posiblemente a un mayor tamaño de su radical aromático, siendo dificultada la interacción en el pequeño bolsillo hidrofóbico del sitio esterático de la enzima.

8a.- El hecho de que el bromopride disminuya la actividad de las colinesterasas con mayor intensidad que la metoclopramida, dada su similitud estructural, puede ser debido al aumento del carácter hidrofóbico de aquel, como consecuencia de la sustitución de un átomo de cloro por uno de bromo en el radical aromático.

9a.- Dado el similar comportamiento de la metoclopramida y el bromopride frente a variantes genéticas usuales y atípicas de la colinesterasa sérica, se sugiere el empleo de estos fármacos como posibles inhibidores diferenciales de otras colinesterasas anormales.

10a.- Se aconseja precaución en el uso conjunto del bromopride, al igual que la metoclopramida, con el relajante muscular succinilcolina, ya que al inhibir la colinesterasa sérica se podría producir apneas prolongadas en pacientes anestesiados.

11a.- Debido al uso terapéutico de dichas benzamidas a nivel sistémico y la permisividad de poder ser utilizadas a dosis muy altas se prevé una interferencia analítica en la determinación de las colinesterasas provocada por la metoclopramida y el bromopride.

VII. - BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- 1.- Dale, H.H.: The action of certain esters y ethers of choline and their relation to muscarine. J Pharmacol Exp Ther 1914; 6:147-190.
- 2.- Stedman, E.; Stedman, E.; Easson, L.H.: Cholinesterase: An enzyme present in the blood serum of the horse. Biochem J 1932; 26:2056-2066.
- 3.- Alles, G.A.; Hawes, R.C.: Cholinesterase in blood of allergic patients. Allergy 1940; 12:1-5.
- 4.- Mendel, B.; Rudney, H.: Studies on cholinesterase I. Cholinesterase and pseudocholinesterase. Biochemical Journal 1943; 37:59-63.
- 5.- Brown, S.S.; Kalow, W.; Pilz, W.; et al.: The plasma cholinesterases: A new perspective. Advances in Clinical Chemistry 1981; 22:1-123.

- 6.- Rosenberry, T.L.: Acetylcholinesterase. In: Meister A. ed.: Advances in enzymology. John Wiley & Sons. New York, 1975:103-210.
- 7.- Silver, A.: The biology of cholinesterases. In: Neuberger, A.; Tatum, E.L. eds.: Frontiers of Biology. North-Holland Publishing. Amsterdam, 1974:443-449.
- 8.- Sine, J.P.; Ferrand, R.; Colas, B.: Characterization of cholinesterase molecular forms in the mucosal cells along the intestine of the chicken. Mol Cell Biochem 1989; 85:49-56.
- 9.- Brimijoin, S.; Hammond, P.: Butyrylcholinesterase in human plasma: trace enzymes measured by two-site immunoassay. J Neurochem 1988; 51:1227-1231.
- 10.- Massoulié, J.; Bon, S.: The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annu Rev Neurosci 1988; 5:106-112.

- 11.- Cartaud, J.; Reiger, F.; Bon, S.; et al.: Fine structure of electric eel acetylcholinesterase. Brain Res 1975; 88:127-130.
- 12.- Lockidge, O.; Bartels, C.F.; Vaughan, T.A.; et al.: Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. J Biol Chem 1987; 262:549-557.
- 13.- Lockidge, O.; adkins, S.; La Du, B.N.: Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. J Biol Chem 1987; 262:12945-12952.
- 14.- Macphee-Quigley, K.; Vedvick, T.S.; Taylor, P.; et al.: Profile of the disulfide bonds in acetylcholinesterase. J Biol Chem 1986; 261:13565-13570.
- 15.- Sekul, A.A.; Holland, W.C.; Breland, A.E.: Enzymic hydrolysis of saturated and unsaturated acid esters of choline. Biochem Pharmacol 1962; 11:487-491.
- 16.- Froede, H.C.; Wilson, I.B.: Acetylcholinesterase. In: Boyer, P.D. ed.: The Enzymes. Academic Press, Inc. New York, 1971:87-114.

- 17.- Mayer, R.T.; Himel, C.M.: Dynamics of fluorescent probe cholinesterase reactions. *Biochemistry* 1972; 11:2082-2090.
- 18.- Bracha, P.; O'Brien, R.D.: Hydrophobic bonding of trialkyl phosphates and phosphorothiolates by acetylcholinesterases. *Biochemistry* 1970; 9:741-745.
- 19.- Chan, L.M.; Himel, C.M.; Main, A.R.: Active-site-directed probes in the kinetics and spectroscopy of purified horse serum cholinesterase. *Biochemistry* 1974; 13:86-90.
- 20.- Kabachnik, M.I.; Brestkin, A.P.; Godovikov, N.N.; et al: Hydrophobic areas on the active surface of cholinesterases. *Pharmac Rev* 1970; 22:355-388.
- 21.- Jarv, J.; Speek, M.: Reversible inhibition of butyryl-cholinesterase with aromatic hydrocarbons. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982; 706:174-178.

- 22.- Pérez-Guillermo, F.; Muñoz-Delgado, E.; Vidal, C.J.: Inhibition of human serum and rabbit muscle cholinesterase by local anesthetics. *Biochemical Pharmacology* 1987; 36:3593-3596.
- 23.- Tornel, P.L.; Muñoz-Delgado, E.; Vidal, C.J.: Inhibition of cholinesterases by the Zwitterionic detergent 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylamonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). *Biorganic Chemistry* 1990; 18:1-9.
- 24.- Abramson, S.N.; Ellisman, M.H.; Deerinck, T.J.; et al: Differences in structure and distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase. *J Cell Biol* 1989; 108:2301-2311.
- 25.- Bovet, D.; Bovet-Nitti, F.; Guarino, S.; et al.: Proprieta farmacodinamiche di al curi derivati della succinilcolina dolati di azione curarica. *Biological Abstracts* 1949; 24:3276-3283.
- 26.- Ord, M.G.; Thompson, R.H.S.: Pseudocholinesterase activity in the central nervous system. *Biochemical Journal* 1952; 51:245-251.

- 27.- Lehman, H.; Silk, E.: Succinylmonocholine. British Medical Journal 1953; 1:767-768.
- 28.- Earl, C.J.; Thompson R.H.S.: The inhibitory action of tri-ortho cresyl phosphate on cholinesterase. Brit J Pharmacol 1952; 2:685-692.
- 29.- Hardelo, J.E.: Perivascular cholinesterase and morphological blood-brain barrier function. Acta Neurol 1984; 70:438-443.
- 30.- Whittaker, M.: Plasma cholinesterase variant and the anaesthetist. Anaesthesia 1980; 35:174-197.
- 31.- Kutty, K.M.: Review: Biological function of cholinesterase. Clin Biochem 1980; 13:239-243.
- 32.- Funnell, H.S.; Oliver, W.T.: Proposed physiological function for plasma cholinesterase. Nature 1965; 208:689-690.

- 33.- Chu, M.I.; Fontaine, P.; Kutty, K.M.; et al.:
Cholinesterase in serum and low density
lipoprotein of hyperlipidemic patients. Clin
Chem Acta 1978; 85:55-59.
- 34.- Gerebtzoff, M.A.: Cholinesterase. In: International
series of monographs on Pure and Applied Biology.
Pergamon Press. New York, 1959:12-16.
- 35.- Jamieson, D.: The function of true and
pseudocholinesterase in the mamalian ilium.
Biochemical Pharmacology 1963; 12:693-703.
- 36.- Sánchez, J.L.; Rodríguez, M.; Villanueva, A.:
Datos analíticos en el diagnóstico diferencial de
la ascitis (III): enzimas pancreáticas y
colinesterasas. Jano 1988; 2:53-56.
- 37.- Shih, P.L.; Chag, W.; Sung, J.L.: Cholinesterase
in hepato-biliary diseases. JAMA 1966; 65:519-528.
- 38.- Serrera, J.L.: Colinesterasa sérica. Fisio-
patología. Lab 2000 1988; 13:5-10.

- 39.- Hunt, A.H.; Lehmann, H.: Serum albumin pseudocholines-terase and transaminase in the assessment of liver function before and after venous shunt operations. Gut 1960; 1:303-311.
- 40.- Evans, D.B.; Lehmann, H.: Pseudocholinesterase activity in liver transplantation. Lancet 1971; 1:1040-1044.
- 41.- Wills, J.H.: The measurement and significance of changes in the cholinesterase activities of erythrocytes and plasma in man and animals. CRC Crit Rev Toxicol 1972; 2:153-202.
- 42.- Silk, E.; King, J.; Whittaker, M.: Assay of cholinesterase in clinical chemistry. Ann Clin Biochem 1979; 16: 57-75.
- 43.- Chauchan, V.; Rastogi, V.; Jaggi, C.; et al.: Effect of acute malathion poisoning on acetylcholinesterase in various tissues of rate. Indian J Experimen Biol 1973; 11:576-578.

- 44.- Graells, M.; Perales, G.; Casas, E.; et al.:
Colinesterasa plasmática y eritrocitaria como
parametro biológico de la exposición a plaguicidas
agrícolas. Rev Diag Biol 1990; 39:60-64.
- 45.- Smith, A.D.; Wald, N.J.; Cuckle, H.S.; et al.:
Amniotic fluid acetylcholinesterase as a possible
diagnostic test for neural-tube defects in early
pregnancy. Lancet 1979; 1:685-688.
- 46.- Barlow, R.D.; Cuckle, H.S.; Wald, N.J.: A simple
method for amniotic fluid gel-acetylcholinesterase
determination, suitable for routine use in the
antenatal diagnosis of open neural-tube defects.
Clin Chim Acta 1982; 110:137-142.
- 47.- Lockridge, O.: Genetic variants of human serum
cholinesterase influence metabolism of the muscle
relaxant succinylcholine. Pharmac Ther 1990;
47:35-60.
- 48.- Kalow, W.: Familial incidence of low pseudo-
cholinesterase level. Lancet 1956; 2:576-577.

- 49.- Kalow, W.; Genest, K.: A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. Can J Biochem Physiol 1957; 35:339-346.
- 50.- Kalow, W.; Staron, N.: On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase as indicated by dibucaine numbers. Canadian Journal of Biochemistry 1957; 35:1305-1320.
- 51.- Whittaker, M.: Cholinesterase. Monographs in Human Genetics. Beckman, L. ed. Karger, Basel. Switzerland, 1986.
- 52.- Harris, H.; Whittaker, M.: Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: Recognition of two new phenotypes. Nature 1961; 191:496-498.
- 53.- Liddell, J.; Lehmann, H.; Silk, E.: A silent pseudocholinesterase gene. Nature 1962; 193:561-562.

- 54.- Altland, K.; Goedde, H.W.: Heterogeneity in the silent gene phenotype of pseudocholinesterase of human serum. *Biochem Genet* 1970; 4:321-338.
- 55.- Rubinstein, H.M.; Dietz, A.A.; Hodges, L.K.; et al.: Silent cholinesterase gene: variations in the properties of serum enzyme in apparent homozygotes. *J Clin Invest* 1970; 49:479-486.
- 56.- Harris, H.; Hopkinson, D.A.; Robson, E.B.; et al.: Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann Hum Genet* 1963; 26:359-382.
- 57.- Whittaker, M.: The pseudocholinesterase variants. Differentiation by means of sodium chloride. *Acta Genet* 1968; 18:556-562.
- 58.- Whittaker, M.: Differential inhibition of human serum cholinesterase with n-butyl alcohol: Recognition of new phenotypes. *Acta Genet* 1968; 18:335-340.

- 59.- Agustínsson, K.B.: Determination of activity of cholinesterases. In: Glick, D.; ed.: Methods of biochemical analysis. John Wiley and Sons Inc. New York, 1971: 217-273.
- 60.- Whittaker, M.: Cholinesterases. In: Bergmeyer, H.U. ed.: Method of enzymatic analysis. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, 1986:52-74.
- 61.- Lewis, P.J.; Lowing, R.K.; Gompertz, D.: Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. Clin Chem 1981; 27:926-929.
- 62.- García-López, J.A.; Monteoliva, M.: Efecto de la conservación en la actividad colinesterasa eritrocitaria. Análisis Clínicos XIII 1988; 52:223-225.
- 63.- Michel, H.O.: An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. J Lab Clin Med 1949; 34:1564-1568.

- 64.- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, Jr.V.; et al.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7:88-95.
- 65.- George, P.M.; Abernethy, M.H.: Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin Chem* 1983; 29:365-368.
- 66.- Abernethy, M.H.; Fitzgerald, H.P.; Ahern, K.M.: An enzymatic method for erythrocyte acetylcholinesterase. *Clin Chem* 1988; 34:1055-1057.
- 67.- Augustinsson, K.B.: Cholinesterases: A study in comparative enzymology. *Acta Physiologica Scandinavica* 1948; 45:1-182.
- 68.- Braid, P.E.; Nix, M.: Stability of esterases in stored blood fractions. *Am Ind Hyg Assoc J* 1973; 43:360-366.
- 69.- Szasz, G.: Cholinesterase-bestimmung im serum mit acetil- and butyrylthiocolin als substrat. *Clin Chim Acta* 1968; 19:191-204.

- 70.- Evans, R.T.; Wroe, J.: Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. Clin Chem 1978; 24:1762-1766.
- 71.- Morrow, A.C.; Motulsky A.G.: Rapid screening method for the common atypical pseudocholinesterase variant. J Lab Med 1968; 71:350-356.
- 72.- Harris, H.; Robson, E.B.: Screening test for the "atypical" and "intermediate" serum-cholinesterase types. Lancet 1963; 2:218-221.
- 73.- Dietz, A.A.; Rubinstein, H.M.; Lubrano, T.: Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholinedithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. Sel Methods Clin Chem 1978; 8:41-46.
- 74.- Bonderman, P.W.; Bonderman, D.P.: Family segregatig for multiple alleles of cholinesterase: a laboratory study. Clin Biochem 1973; 6:256-265.

- 75.- Barker, E.L.; Smrek, A.; Kimbrough, R.D.; et al.: Hereditary cholinesterase deficiency: A report of a family with two rare genotypes. Clin Genet 1977; 12:134-138.
- 76.- Garry, P.J.: A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants. Differentiation by means of Tris and phosphate buffers. Clin Chem 1971; 17:192-198.
- 77.- Diezt, A.A.; Rubinstein, H.M.; Lubrano, T.: Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variant by the propionylthiocholine-dithiobis (nitrobenzoic acid) procedure. Clin Chem 1973; 19:1309-1313.
- 78.- Garry, P.J.: Serum cholinesterase variant: Examination of several differential inhibitors, salts, and buffers used to measure enzyme activity. Clin Chem 1971; 17:183-191.

- 79.- Agarwal, D.P.; Schwenkenbecher, S; Srivastava, L.M.; et al.: Spektrophotometrische bestimmungsmethode für serumcholinesterase (EC 3.1.1.8) varianten mit succinylbischolin als substrat. Z Klin Clin Biochem 1975; 13:133-135.
- 80.- McComb, R.B.; LaMotta, R.V.; Werstone, H.J.: Procedure for detecting atypical serum cholinesterase using o-nitrophenylbutyrate as substrate. Clin Chem 1965; 11:645-652.
- 81.- Viby-Mogensen, J.; Anormal plasma cholinesterase activity: implications for the anaesthetist. In: Zorab, J.S.M. ed.: Lectures in anaesthesiology. Scientific Publications. Oxford, 1985: 63-73.
- 82.- Lehninger, A.L.: Bioquímica. Omega. Barcelona, 1990.
- 83.- Taylor, P.: Agentes anticolinesterasa. En: Goodman, A.; Goodman, L.S.; Rall, T.W.; et al. eds.: Las bases farmacológicas de la terapéutica. Panamericana. Madrid 1986: 121-138.

- 84.- Litter, M.: Farmacología experimental y clínica. Ateneo. Buenos Aires, 1988.
- 85.- Tunek, A.; Svensson, L.A.: Bambuterol, a carbamate ester prodrug of terbutaline, as inhibitor of cholinesterases in human blood. Drug Metab Dispos 1988; 16:759-764.
- 86.- Berkow, R.: com. El manual Merck. Doyma. Barcelona, 1989.
- 87.- Harris, L.W.; Talbot, B.G.; Lennox, W.J.; et al.: The relationship between oxime-induced reactivation of carbamylated acetylcholinesterase and antidotal efficacy against carbamate intoxication. Toxicol Appl Pharmacol 1989; 1:128-133.
- 88.- Malagelada, J.R.; Guarner, L.: Enfermedades del estómago y duodeno. En: Farreras, P.; Rozman, C. eds.: Medicina interna. Doyma. Barcelona, 1988: 51-114.

- 89.- García-Pugés, A.: Enfermedades del intestino delgado y del colon. Generalidades. En: Farreras, P.; Rozman, C. eds.: Medicina Interna. Doyma. Barcelona, 1988:114-130.
- 90.- Flórez, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, A.: Farmacología humana. Eunsa. Pamplona, 1987.
- 91.- Alvarez F.J.; Velasco A.: Farmacoterapia del aparato digestivo. En: Lorenzo Velázquez, B. eds.: Farmacología y su proyección clínica. Oteo. Madrid, 1987.
- 92.- Velasco, A.; Dueñas, A.; Alvarez, F.J.: Farmacoterapia del aparato digestivo. Delagrangue. Madrid, 1987.
- 93.- Craig, Ch.R., Stitzel, R.E.: Farmacología médica. Interamericana. Mexico, 1984.
- 94.- Bochner, F.; Carruthers, G.; Kampmann, J.: Manual de Farmacología Clínica. Salvat. Barcelona, 1986.

- 95.- Mcevoy, G.K.; Mc Quarrie, G.M.: Comps. Drug Information. American Society of Hospital Pharmacists. Maryland, 1989.
- 96.- Pinder, R.M.; Brogden, R.N.; Sawyer, P.R.; et al.: Metoclopramide: A review of its pharmacological properties and clinical use. Drugs 1976; 12:81-131.
- 97.- Schulze-Delrieu, K.: Drug Therapy. New England Journal of Medicine 1981; 395:28-33.
- 98.- García-Pugés, A.M.: Fármacos antieméticos. Jano 1983; 587:72-76.
- 99.- Harrington, R.A.; Hamilton, C.W.; Brogden, R.N.; et al.: Metoclopramide: An updated review of its pharmacological properties and clinical use. Drugs 1983; 25:451-494.
- 100.- Baumann, H.W.; Sturdevant, R.A.T.; McCallum, R.W.: L-dopa inhibits metoclopramide stimulation of the lower esophageal sphincter in man. American Journal of Digestive Diseases 1979; 4:289-295.

- 101.- Cohen, S.; Morris, D.W.; Schoen, H.J.; et al.: The effect of oral and intravenous metoclopramide on human lower esophageal sphincter pressure. *Gastroenterology* 1976; 70:484-487.
- 102.- Banke, L.: Research on the action of metoclopramide in the gastro-intestinal tract. In: *Modern Gastro-enterology (Proceedings of VIII Internatinal Congres on Gastroenterology, Prague, July 1968)*. Schattauer, Stuttgart, 1969:571-572.
- 103.- Johnson, A.G.: Controlled trial of metoclopramide in the treatmen of flatulent dyspepsia. *British Medical Journal* 1971; 2:25-26.
- 104.- Oigaard, A.; Fleckenstein, P.: The effect of metoclo-pramide, piridostigmine bromide and cholecystokinin on duodenal motility. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1975; 10:30-39.
- 105.- Schuze-Delrieu, K.: Metoclopramide. *Gastroenterology* 1979; 77:768-779.

- 106.- Battle, W.M.; Snape, W.J.; Alavi, A.; et al.:
Colonic dysfunction in diabetes mellitus.
Gastroenterology 1980; 79:1217-1221.
- 107.- Battle, W.M.; Snape, W.J.; Wright, S.; et al.:
Abnormal colonic motility in progressive systemic
sclerosis. Annals of Internal Medicine 1981;
94:749-752.
- 108.- Litaker, D.G.: Metoclopramida. In: Van Ness, M.M.;
Gurney, M.S. eds.: Manual de Farmacoterápia
gastrointestinal. Salvat. Barcelona, 1990:85-91.
- 109.- Stadaas, J.O.; Aune, S.: The effect of
metoclopramide on gastric motility before and
after vagotomy in man. Scandinavian Journal of
Gastroenterology 1971; 6:17-24.
- 110.- Hay, A.M.; Man, W.K.; McCloy, R.F.: Mechanism of
action of metoclopramide: importance of intrinsic
sources of acetylcholine. Gut 1977; 18:1950.

- 111.- Hay, A.M.; Man, W.K.: Effect of metoclopramide on guinea pig stomach. Critical dependence on intrinsic stores of acetylcholine. Gastroenterology 1979; 76:492-496.
- 112.- Okwuasaba, F.K.; Hamilton, J.T.: The effect of metoclopramide in intestinal muscle responses and the peristaltic reflex in vitro. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 1976; 54:393-404.
- 113.- Zar, M.A.; Ebong, O.O.; Bateman, D.N.: Effect of metoclopramide in guinea-pig ileum longitudinal muscle: evidence against dopamine-mediation. Gut 1982; 23:66-70.
- 114.- Fontaine, J.; Reuse, J.: The effects of substituted benzamides on frog rectus abdominis. European Journal of Pharmacology 1980; 68:55-60.
- 115.- Berkowitz, D.M.; McCallum, R.W.: Interaction of levodopa and metoclopramide on gastric emptying. Clin Pharmacol Ther 1980; 27:414-420.

- 116.- De Carle D.J.; Cristensen, J.: A dopamine receptor in esophageal smooth muscle of the opossum. *Gastroenterology* 1976; 70:216-219.
- 117.- Bowman, W.C.; Rand, M.J.: *Farmacología: Bases bioquímicas y patológicas*. Panamericana. Mexico 1984.
- 118.- Clark, G.W.; Brater, D.C.; Johnson, A.R.: *Farmacología Clínica*. Panamericana. Madrid, 1990.
- 119.- Wazer, D.E.; Rotrosen, J.; Stanley, M.: The benzamides: Evidence for action at dopamine receptors-shortcomings of current models. In: Rotrosen, J.; Stanley, M. eds.: *The Benzamides: Pharmacology, Neurobiology and Clinical Aspects*. Raven Press. New York, 1982: 83-95.
- 120.- Fang, V.S.; Zimo, D.A.; Byyny, R.: Pituitary response to metoclopramide in the rat. *Journal of Endocrinology* 1977; 74: 155-156.

- 121.- Besser, G.M.; Delitala, G.; Grossman, A.; et al.: Chlorpromazine, haloperidol, metoclopramide, and domperidone release prolactin through dopamine antagonism at low concentrations but paradoxically inhibit prolactin release at high concentrations. British Journal of Pharmacology 1980; 71:569-573.
- 122.- Reynold, J.E.F.: comp. Martindale. The Pharmaceutical Press, 1989.
- 123.- Morewood, D.J.W.; Whitehouse, G.H.: A comparison of three methods of performing barium follow-through studies of the small intestine. Brit J Rad 1986; 59:971-973.
- 124.- Perkel, M.S.; Hersh, T.; Moore, C.; et al.: Metoclopramide therapy in fifty-five patients with delayed gastric emptying. American Journal of Gastroenterology 1980; 74:231-236.
- 125.- Gralla, R.J.; Itri, L.M.; Pisko, S.E.; et al.: Antiemetic efficacy of high-dose metoclopramide: Randomized trials with placebo and prochlorper-

zine in patients with chemotherapy-induced nausea and vomiting. New England Journal of Medicine 1981; 305:905-909.

126.- Goslin, R.H.; Garnick, M.B.: Metoclopramide as an antiemetic in patients receiving cisplatin. In: Poster et al. eds.: Treatment of Cancer Chemotherapy Induced Nausea and Vomiting. Masson Press. New York, 1981: 159-165.

127.- Tuner, D.R.; Kao, Y.J.; bivona, C.: Neuromuscular relaxation by suxamethonium following treatment with histamine type II antagonists or metoclopramide. British Journal of Anaesthesia 1989; 63:348-350.

128.- Manual de interacciones de los medicamentos. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Madrid, 1985.

129.- Documentación científica. Departamento Bibliográfico. Laboratorios Delagrangé. Madrid, 1990.

- 130.- De Angelis, L.: Bromopride: N-(diethylamino ethyl)-2-methoxy-4-amino-5-bromobenzamide. Med Actual 1978; 14:191-194.
- 131.- VI Vademecum internacional de especialidades farmacéuticas y biológicas, productos y artículos de parafarmacia y métodos diagnósticos. Medicom. Madrid, 1988.
- 132.- Lux, G.; Engel, H.; Roesch, W.: The stimulation of esophageal motility with bromopride, domperidone and metoclopramide. Int Congr Symp Ser - R Soc Med 1981; 36:29-36.
- 133.- Vacca, C.; Maione, S.; Tozzi, A.; et al.: Benzamides and cholinesterases. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1987; 55:193-201.
- 134.- Niemegeers, C.J.E.: Antiemetic specificity of dopamine antagonists. Psychopharmacology 1982; 78:210-213.

- 135.- Ferrau, O.; Luzzza, G.; Pitrone, F.; et al.: Comparison of the effects of bromopride and metoclopramide on hypothalamic-hypophysial function. *Rass Med Sper* 1981; 28:336-350.
- 136.- Perez-López, F.R.; Abos, M.D.: Pituitary hormonal response to the orthopramides clebopride, bromopride, metoclopramide, and sulpiride. *Fertil Steril* 1982; 37:445-447.
- 137.- Felicio, L.F.; Nasello, A.G.: Effect of acute bromopride treatment on rat prolactin levels and sexual behavior. *Braz J Med Biol Res* 1989; 22:1011-1014.
- 138.- Nasello, A.G.; Felicio, L.F.: Acute bromopride treatments: effects on general activity and inhibitory avoidance in rats. *Braz J Med Biol Res* 1988; 21:841-843.
- 139.- Felicio, L.F.; Palermo-Neto, J.; Nasello, A.G.: Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. *Behav Neural Biol* 1989; 52:145-151.

- 140.- Mouille, P.; Cheymol, G.; Gadbin, C.:
Cardiovascular and hemodynamic effect of two
metoclopramide derivatives (bromopride and MUS
1880). Ann Pharm Fr 1977; 35:53-63.
- 141.- Brodie, R.R.; Chasseaud, L.F.; Darragh, A.; et
al.: Pharmacokinetics and bioavailability of the
antiemetic agent bromopride. Biopharmaceutic &
drug disposition 1986; 7:215-222.
- 142.- Luecker, P.W.; Tinhof, W.; Wetzelsberger, N.;
et al.: Pharmacokinetics and absolute
bioavailability of bromopride from various
pharmaceutical formulations. Arzneim-Forsch
1983; 33:453-458.
- 143.- Grassi, E.; Passetti, G.L.; Trebbi, A.: Metabolism
and pharmacokinetics of bromopride in rat and man.
In: Frigerio, A. ed.: Recent Developments in Mass
Spectrometry in Biochemistry and Medicine. Plenum.
New York, 1978:99-112.

- 144.- Brodie, R.R.; Chasseaud, L.F.; Rooney, L.:
Determination of bromopride in human plasma and
urine by high-performance liquid chromatography. J
Chromatogr 1984; 310:353-360.
- 145.- Jung, L.; Imbs, J.; Koffel, J.C.: Bromopride:
pharma-cokinetics in dogs. Arzneimittel-Forsch 1982;
32:509-511.
- 146.- Kalow, W.; Davies, R.O. The activity of various
esterase inhibitors towards atypical human serum
cholinesterase. Biochem Pharmac 1958; 1:183-192.
- 147.- Whittaker, M.; Britten, J. Differential inhibition
of plasma cholinesterase variants using the
dibutyrate analogue of pancuronium bromide. Hum
Hered 1981; 31:242-247.
- 148.- Karanth, K.S.; Rao, S.G.; Kumari, P. et al.:
Anticholinesterase activity of metoclopramide.
Indian Journal of Medical Research 1981;
74:125-128.

- 149.- Kambam, J.R.: The inhibitory effect of metoclopramida on on plasma colinesterasa activity. Can J Anaesth 1988; 35:476-478.
- 150.- Herrera, J.; Martín, M.: Inhibición de la colinesterasa sérica por metoclopramida. Farm Clin 1990; 8:648-651.
- 151.- Herrera, J.; Martín, M.: Un nuevo mecanismo de acción de la metoclopramida como inhibidor competitivo de la colinesterasa. Farm Clin 1990; 9:770-776.
- 152.- Kao, Y.J.; Tellez, J.; Turner, D.R.: Dose-dependent effect of metoclopramide on cholinesterases and suxamethonium metabolism. British Journal of Anaesthesia 1990; 65:220-224.
- 153.- Cohen, S.; DiMarino, A.J.: Mechanism of action of metoclopramide on opossum lower esophageal and sphinter muscle. Gastroenterology 1976; 71:996-998
- 154.- Velasco, A.; Alvarez, F.: Compendio de Psiconeurofarmacología. Díaz de Santos, S.A. Madrid, 1988.

- 155.- Graf, K.J.; Schmidt-Gollwitzer, M.; Horowski, R.; et al.: Effect of metoclopramide and lisuride on hypophyseal and gonadal function in men. *Clinical Endocrinology* 1982; 17:243-251.
- 156.- Kauppila, A.; Ylikorkala, O.: Effects of oral and intravenous TRH and metoclopramide on PRL and TSA secretion in women. *Clinical Endocrinology* 1982; 17:617-623.
- 157.- Ramaswamy, S.; Reganathan, S.; Bapna, J.S.: Anticholinesterase activity of prolactin: correlation with analgesia. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40:306-307.
- 158.- Van Damme, M.; Hanocq, M.; Molle, L.: Specific role of solvents on the partition of some substituted benzamides between octan-1-ol and water. *Pharm Acta Helv* 1984; 59:235-240.
- 159.- Hasan, F.B.; Cohen, S.G.; Cohen, J.B.: Hydrolysis by acetylcholinesterase: apparent molal volumes and trimethyl and methyl subsites. *J Biol Chem* 1980; 255:3898-3904.

160.- Berman, H.A.; Decker, M.M.: Kintic, equilibrium and spectroscopic studies on cation association at the active center of acetylcholinesterase: topographic distinction between trimethyl and trimethylammonium sites. Biochem biophys Acta 1986; 872:125-133.

161.- Siest, G.; Galteau, M.M.; Schiele, F. y col.: Análisis Clínicos y medicamentos. Doyma. Barcelona, 1987.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

Marcos Martín Ruiz

Intervención de los colmesteros humanos por
método piramidal y bromopida: consecuencias y propaga-
ta de un nuevo mecanismo de acción.

Apto cum laude

Sevilla, 17 de Mayo 1991

El Vocal,

[Signature]

El Presidente

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocal,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]