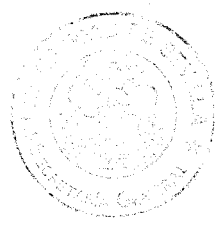


R.19503

T. D.
R/105

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
el día 195 número 84 del libro
de inscripciones.



En el Palacio Nacional de las

Alma Laflite

ESTUDIO DE LA ACETILCOLINESTERASA (ACHE) Y LA COLI-
NESTERASA (CHE) EN ANIMALES Y HUMANOS DE LA POBLA-
CION ANDALUZA. SU SIGNIFICACION CLINICA



JESUS REPETTO JIMENEZ
SEVILLA, 1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

ESTUDIO DE LA ACETIL COLINESTERASA (AChE) Y LA COLI-
NESTERASA (ChE) EN ANIMALES Y HUMANOS DE LA POBLACION
ANDALUZA. SU SIGNIFICACION CLINICA

Memoria presentada por el
Ldo. Jesús Repetto Jiménez
para optar al grado de
Doctor en Medicina.

Sevilla, Septiembre de 1.990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS



TESIS DOCTORAL:

ESTUDIO DE LA ACETILCOLINESTERASA (AChE) Y LA COLINESTERASA (ChE) EN ANIMALES Y HUMANOS DE LA POBLACION ANDALUZA. SU SIGNIFICACION CLINICA

VºBº

LOS CO-DIRECTORES

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M. Repetto".

Fdo.: Dr. M. Repetto

A handwritten signature in black ink, appearing to read "P. Sanz".

Fdo.: P. Sanz

VºBº

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Mª Genis".

Fdo.: Prof. J. Mª Genis

VºBº

EL TUTOR

A handwritten signature in black ink, appearing to read "F. Malagón".

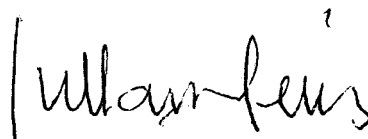
Fdo.: Prof. F. Malagón

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS MORFOLÓGICAS

AVDA. SÁNCHEZ PIZJUÁN, 4
TELÉFONOS (954) 37 11 81
37 69 68
38 16 62
41009 - SEVILLA

D. José M^a Genis Gálvez, Director del Departamento de Ciencias Morfológicas de esta Facultad de Medicina, manifiesta su conformidad a la presentación de la Tesis Doctoral "**Estudio de la Acetilcolinesterasa en animales y humanos de la población andaluza. Su significación clínica**", del licenciado D. Jesús Repetto Jiménez.



Sevilla 30 de Julio de 1.990



DPTO. CIENCIAS MORFOLÓGICAS

Sr. Presidente de la Comisión de Doctorado.

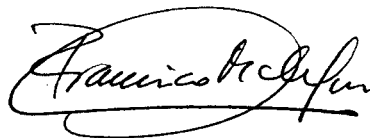
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE
CIENCIAS MORFOLÓGICAS

AVDA. SÁNCHEZ PIZJUÁN, 4
TELÉFONOS (954) 37 11 81
37 69 68
38 16 62
41009 - SEVILLA

D. Francisco Malagón Cobos, Catedrático del Departamento de Ciencias Morfológicas de esta Facultad de Medicina, en calidad de Tutor de la Tesis Doctoral de D. Jesús Repetto Jiménez, manifiesta que ratifica su autorización para que el Dr.D. Manuel Repetto Jiménez y la Dra. Dña. Pilar Sanz Nicolás sean los directores de la mencionada Tesis, en razón de su capacitación y de las disponibilidades metodológicas, materiales y de muestreo a su alcance.

Al propio tiempo hace constar su conformidad con el desarrollo y forma de la presente Memoria, considerándola merecedora de ser presentada y defendida ante Tribunal.



Sevilla 30 de Julio de 1.990



Sr. Presidente de la Comisión de Doctorado



INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA


DEPARTAMENTO REGIONAL

A. POSTAL 863
41080 - SEVILLA

D. MANUEL REPETTO JIMENEZ, PROFESOR ASOCIADO DE TOXICOLOGIA (PROFESOR TITULAR EN EXCEDENCIA) DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, Y DIRECTOR DEL INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOGIA, SEVILLA, Y DÑA. PILAR SANZ NICOLAS, JEFE DE LA SECCION DE BIOLOGIA, DEL CITADO INSTITUTO.

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral titulada "ESTUDIO DE LA ACETILCOLINESTERASA (AChE) Y LA COLINESTERASA (ChE) EN ANIMALES Y HUMANOS DE LA POBLACION ANDALUZA. SU SIGNIFICACION CLINICA", que presenta el Ldo. D. Jesús Repetto Jiménez, ha sido realizada en este Instituto, bajo nuestra dirección. A nuestro juicio reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de memorias de tesis doctorales, y ser defendida ante Tribunal.

Y para que conste, firmamos en Sevilla a cuatro de septiembre de mil novecientos noventa.

M. Repetto  *P. Sanz*

AGRADECIMIENTOS

Deseo dejar constancia de mi reconocimiento al Prof. Dr. D. José M^º Genis, Director del Departamento de Ciencias Morfológicas, por haberme permitido la presentación de la tesis, y al Prof. Dr. D. Francisco Malagón, tutor de la misma, por toda su ayuda y orientación en el desarrollo de ésta.

Así mismo, agradezco al Dr. D. Manuel Repetto y a la Dra. Dña. Pilar Sanz, co-directores de la tesis, su continua dirección y ayuda sin la cual hubiese sido imposible su realización y así como el cariño y dedicación del primero, como hermano mayor de edad, saber y gobierno; a la Dra. Dña. M^º del Carmen Rodríguez Vicente, a las licenciadas Dolores Díaz e Inmaculada Flores y a la Sra Ana M^º Eguino, por su inestimable colaboración en la elaboración, procesado y manuscrito de la tesis.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE MEMORIA

AChE:	acetil colinesterasa
AChEe:	acetil colinesterasa eritrocitaria
AChEe/GR:	acetil colinesterasa eritrocitaria por glóbulo rojo.
AChEe/HB:	acetil colinesterasa eritrocitaria expresada en hemoglobina
AChET:	acetil colinesterasa total
AChET/GR:	acetil colinesterasa total expresada por glóbulo rojo
AChET/HB:	acetil colinesterasa total expresada en hemoglobina
ChE:	colinesterasa plasmática o pseudocolinesterasa

UNIDADES *

ChE

U/L: unidades internacionales por litro

AChE Total y Eritrocitaria

/GR: está expresada en nanounidades por glóbulo rojo.

/HB: está expresada en unidades internacionales por gramo de hemoglobina.

* Unidad Internacional= Cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 micromol de sustrato por minuto.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.....	7
DEFINICION Y CONCEPTOS.....	8
DISTRIBUCION TISULAR Y ESTRUCTURA QUIMICA.....	13
MECANISMOS DE ACCION Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS.....	20
INHIBICION DE LAS COLINESTERASAS.....	26
OTROS INHIBIDORES.....	31
REACTIVACION DE LA ENZIMA INHIBIDA.....	33
ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA.....	38
ACCIONES DE LOS MEDICAMENTOS.....	40
REFERENCIAS FISIOPATOLOGICAS Y CLINICAS.....	44
DETERMINACION ANALITICA.....	51
VALORES DE REFERENCIA EN LA BIBLIOGRAFIA.....	59
PARTE EXPERIMENTAL.....	62
PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.....	63
PLAN DE TRABAJO.....	67
MATERIAL Y METODOS.....	70
1. Muestras Humanas.....	71
2. Muestras Animales.....	72
2.1. Animales.....	75
2.1.1. Rata.....	75
2.1.2. Conejo.....	75

2.2. Extracción de Sangre.....	76
2.3. Tejidos.....	76
2.4. Tratamientos.....	77
3. Métodos Analíticos.....	79
3.1. Colinesterasa Sérica.....	79
3.2. Acetilcolinesterasa Total y Eritrocitaria.....	81
3.3. Acetilcolinesterasa en Tejidos.....	83
3.4. Determinación de Proteínas.....	85
3.5. Recuento de Glóbulos Rojos.....	85
3.6. Determinación de Hemoglobina.....	87
4. Instrumentos y productos utilizados.....	88
4.1. Aparatos.....	88
4.2. Productos.....	88
4.3. Reactivos.....	89
5. Método Estadístico.....	90
RESULTADOS.....	92
DISCUSION.....	132
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFIA.....	142

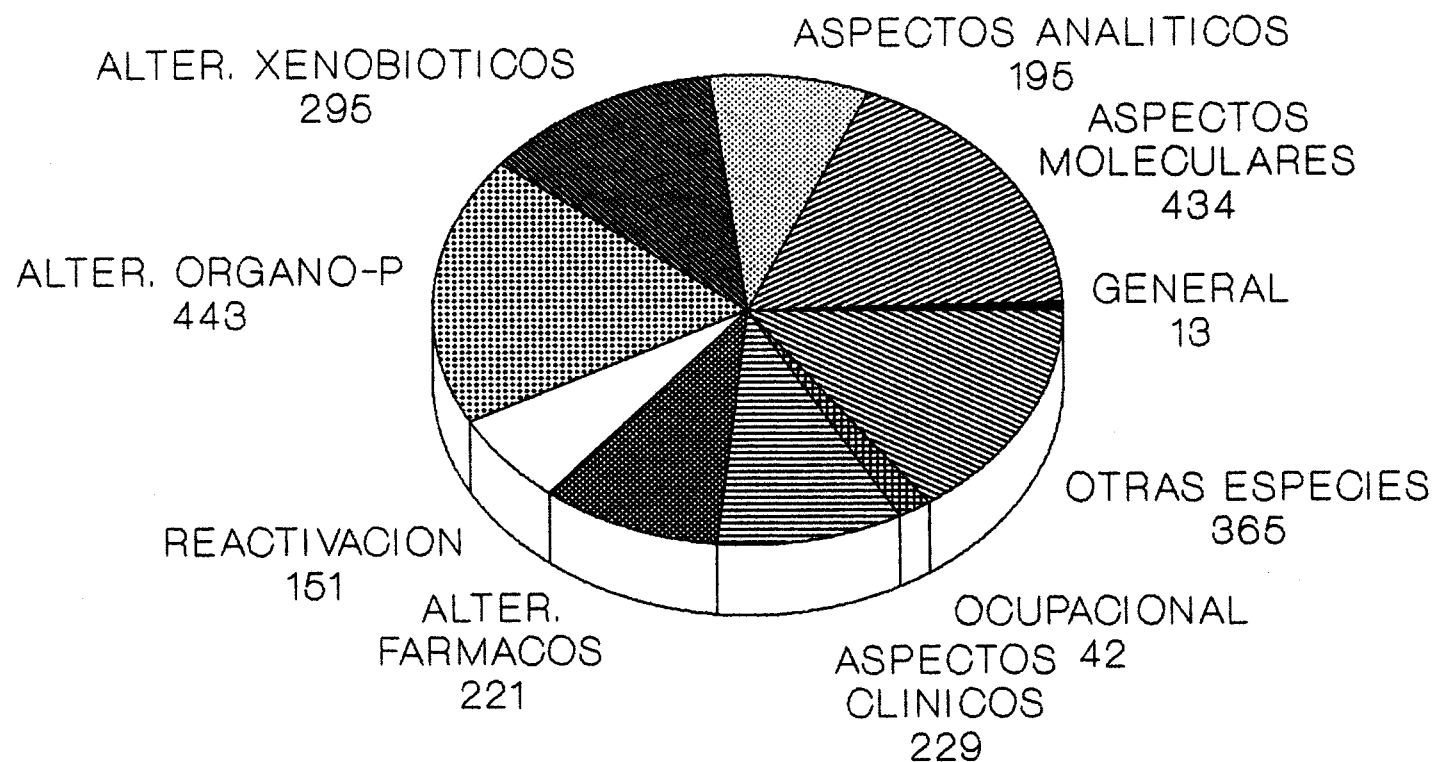
INTRODUCCION

La primera sugerencia sobre la existencia en el suero sanguíneo de un factor capaz de hidrolizar la acetilcolina fue realizada por Dale en 1914; su implicación en la función nerviosa se debe a Loewi y Navratil (1921). Este factor que hidrolizaba los ésteres de la colina recibió el nombre de colinesterasa por Stedman y col (1932); posteriormente se distinguieron una pseudocolinesterasa y colinesterasa verdadera (acetil colinesterasa).

Se ha investigado mucho desde entonces sobre las funciones de esta enzima en situaciones fisiológicas y patológicas, aunque la cantidad de publicaciones y la frecuencia de interpretaciones contradictorias revela que aún queda mucho por clarificar en el tema.

En una revisión que hemos realizado a cerca de 2.500 publicaciones relacionadas, aparecidas en los 10 últimos años, (gráfica 1) 430 trabajos están dedicados a características bioquímicas, moleculares y genéticas, y 1.147 a estudios de interés clínico: intoxicaciones por inhibidores, modificaciones de la actividad por fármacos o productos industriales, factores biológicos de variación, participación en diferentes patologías (malnutrición, anormalidades del metabolismo lipídico, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, algunos trastornos psiquiátricos,

FIG. 1. DISTRIBUCION DE PUBLICACIONES SOBRE COLINESTERASAS, REFERIDAS A DISTINTOS ASPECTOS DEL TEMA, APARECIDAS ENTRE 1979 Y 1989.



Número total de referencias consultadas: 2388
Fuentes: Chemical Abstracts y Excerpta Médica

malformaciones neurológicas congénitas, etc ...). De las restantes publicaciones, 220 se ocupan de los mecanismos de inhibición y reactivación, en tanto que casi 200 son de métodos analíticos y su aplicación al diagnóstico clínico y al control de la exposición a inhibidores. Tan sólo 13 (0.52% del total) son revisiones de carácter general, por lo que entendemos que es conveniente efectuar una valoración crítica que resuma el estado actual de los conocimientos para ayudar a una correcta aplicación clínica.

Teniendo en cuenta la complejidad bioquímica de estas enzimas y a pesar de las lagunas aún existentes en el conocimiento de ambas y de su posible interrelación o independencia, consideramos necesario buscar explicación a las discrepancias que aparecen en la bibliografía y en la práctica clínica.

En primer lugar, como parece claro que la función de éstas enzimas en el organismo es muy diferente, hay que asumir que los valores de cada una de ellas no son similares ni intercambiables para la interpretación de un estado clínico por lo que no es justificable el que sólo la colinesterasa plasmática (ChE) esté incluida en los paneles analíticos.

La ChE presenta grandes fluctuaciones interindividuales e intraindividuales explicables no sólo por causas genéticas sino también por tratarse, al parecer, de una enzima de vertido de origen hepático y cuya función fisiológica aún no

ha sido totalmente dilucidada. Estas fluctuaciones se reflejan en los amplios márgenes de normalidad habitualmente aceptados; ello dificulta su interpretación y no favorece su correcta aplicación al diagnóstico, sobre todo si se desconocen los valores basales del paciente. A pesar de ello su conocimiento es valioso en diferentes situaciones clínicas, así como en el estudio preoperatorio, para detectar los individuos que por causas genéticas poseen una colinesterasa atípica incapaz de hidrolizar suxametonio (succinilcolina) por lo que pueden presentar problemas en la fase de reanimación.

También es útil junto con la valoración de lipoproteínas de baja densidad en el estudio de trastornos del metabolismo lipídico de distinta etiología (obesidad, diabetes, hiperlipoproteinemia) en los que la actividad enzimática se encuentra elevada; igualmente adquiere valores altos en niños con síndrome nefrótico asociado a hiperlipoproteinemia, etc ...

Un extremo conflictivo, a pesar del gran interés clínico, es su aplicación al diagnóstico de las intoxicaciones por insecticidas organofosforados y carbámicos; frecuentemente no se extrae de este parámetro bioquímico la información que puede proporcionar, tanto en la fase aguda como en la evolución de la intoxicación.

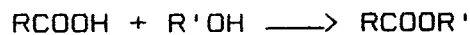
Por todas estas razones, y con la intención de contribuir al mejor conocimiento de ambas enzimas y a su

aprovechamiento para facilitar diagnósticos de carácter diferencial, hemos realizado el presente trabajo.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

DEFINICION Y CONCEPTOS

Las colinesterasas, son enzimas ubicuas que se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino animal y vegetal. Forman parte del grupo de las esterasas o hidrolasas de los enlaces tipo ester, es decir los constituidos, por la unión de ácidos orgánicos o inorgánicos con alcoholes o tioles de muy diferente naturaleza.



Este grupo de enzimas esterasas comprende más de 60, que se distribuyen a su vez en 7 subgrupos. Dos corresponden a hidrolasas de ésteres de ácidos orgánicos, uno de ellos con alcoholes y el otro con tioles; otros cinco subgrupos son de hidrolasas de ésteres de ácidos inorgánicos, tres de fosfatasas para ésteres del ácido fosfórico según se encuentre esterificado en una, dos, o las tres valencias ácidas; otro de estos subgrupos corresponde a sulfatasas, para los ésteres del ácido sulfúrico y el último subgrupo está formado por las prenolpirofosfatasas (Villar Palasí y col., 1977)

Dentro del primer subgrupo citado existen unas esterasas que hidrolizan a los esterres de colina de forma más activa que a los otros ésteres que no son de colina y que difieren de otras enzimas de su grupo por su marcada

afinidad por sales de amonio cuaternario; estas enzimas son las denominadas colinesterasas y sus sustratos más importantes son acetilcolina, butirilcolina, succinilcolina y benzoilcolina, entre otros.

Consecuentemente, distinguiremos a la acetilcolinesterasa (AChE) presente en el sistema nervioso y los eritrocitos, y a la colinesterasa (ChE) presente en el plasma y algunos órganos.

Las colinesterasas constituyen una familia de esterazas caracterizadas por contener un resto de serina en el sitio activo y que se distinguen de otras colinesterasas inespecíficas por su capacidad de ser inhibidas por eserina 10^{-5} M ($n=-5$). (Chatonnet y Lockridge, 1989).

El único sustrato natural de la acetilcolinesterasa (eritrocitaria), AChE, (E.C.3.1.1.7) es la acetilcolina, aunque también hidroliza a la propionilcolina, a la acetil β -metilcolina y a los análogos tiocolina de los tres compuestos.

La colinesterasa del plasma, ChE, (E.C.3.1.1.8) se conoce como pseudocolinesterasa, butiril o succinilcolinesterasa, y se separa en la fracción IV₆ en el fraccionamiento proteico del plasma sanguíneo. Esta enzima no actúa sobre la acetil metilcolina, lo cual nos ayuda a una diferenciación rápida de ambas. La ChE no solamente hidroliza a la acetilcolina sino a la butirilcolina y sus

tioderivados además de otros ésteres de colina y otros alcoholes. También la benzoilcolina es un sustrato específico que no es hidrolizado por la enzima eritrocitaria (Murai, 1981, Brestkin, 1984).

Otra forma de distinguir ambas enzimas es por sus inhibidores. La ChE es inhibida por la quinina y el atoxilo que no influyen sobre la AChE. Inhibidores específicos de ambas y que no afectan a otras esterasas son, en cambio, la fisostigmina y alcaloides de su grupo así como los carbamatos y compuestos organofosforados de aplicación como plaguicidas y como gases de guerra de acción nerviosa (Villar Palasí, 1977).

Hemos visto que la primera sugerencia sobre la existencia en los sueros sanguíneos de una enzima hidrolítica capaz de hidrolizar los ésteres de colina y de tiocolina data de 1914, realizada por Sir Henry Dale. Loewi, en 1921, demostró que la estimulación del vago en corazón aislado de rana, produce la liberación de una sustancia que origina el mismo efecto que la acción debida al nervio, y reconoció que esta "sustancia vagal" era un derivado de la colina. Poco después, en el mismo año 1921, Loewi y Navratil vieron que no había diferencia entre esta "sustancia vagal" y la acetilcolina. Es más, ambas se inactivaban con extractos acuosos del corazón de la rana. Esta actividad destructora se eliminaba de los extractos por calentamiento, lo que sugería su naturaleza enzimática, demostrada de forma concluyente por Engelhardt y Loewi en 1930. Stedman y col.

(1932) propusieron el nombre de colinesterasa para la enzima que hidrolizaba los ésteres de colina; a partir de entonces adquirió una gran importancia en la explicación de la transmisión del impulso nervioso ya que se reconoció que esta enzima, al hidrolizar la acetilcolina liberada en la placa motora, permitía a la fibra nerviosa acomodarse para recibir el próximo impulso. En aquella época fue lógico atribuir a esta misma enzima la capacidad del suero de hidrolizar la acetilcolina (Stedman y Stedman, 1931).

Los primeros trabajos experimentales se realizaron con colinesterasa plasmática humana y de caballo. Se vió que los eritrocitos presentaban también un efecto hidrolizante de la acetilcolina, por lo que surgió la cuestión de si las actividades eritrocitaria y plasmática eran idénticas. El conocimiento de que se trataba de enzimas diferentes data de 1940 con Alles y Hawes. Estos autores demostraron que la actividad eritrocitaria era mayor a bajas concentraciones de acetilcolina y se inhibía por un exceso de sustrato natural, mientras que la plasmática aumentaba con concentraciones crecientes de sustrato y no se llegaba a inhibir.

Mendel y su grupo (1943 a,b,c) comprobaron que la enzima eritrocitaria es específica para acetilcolina y no hidroliza ésteres alifáticos de tributirina y metilbutirato. La enzima sérica es, por otra parte, capaz de hidrolizar a otros ésteres de la colina además de a la acetilcolina. En 1943 Mendel y Rudney denominaron colinesterasa "verdadera" y

"pseudo"colinesterasa a las enzimas eritrocitaria y sérica, respectivamente; aunque se propusieron otras nomenclaturas, la de Mendel y Rudney fue la generalmente aceptada. La pseudocolinesterasa parecía carecer de función fisiológica, y al mismo tiempo se había demostrado que la colinesterasa no era una entidad única con idénticas propiedades independientemente de su origen tisular. Por el contrario, se consideró a la colinesterasa como una "familia" de enzimas relacionadas, con propiedades divergentes. La actividad difiere, en una especie dada, entre cada tejido, y en el mismo tejido según la especie (Silk y col., 1972).

Mientras que la AChE eritrocitaria de distintas especies de mamíferos presenta una alta especificidad de sustratos, la ChE plasmática muestra pautas diferentes según la especie (Seto y Shinohara, 1989).

Ambas enzimas se conocen actualmente con los nombres de acetilcolinesterasa específica o verdadera, acetilcolina hidrolasa (E.C. 3.1.1.7, AChE) y de colinesterasa no específica o pseudocolinesterasa, butirilcolinesterasa, acilcolina hidrolasa (E.C. 3.1.1.8, ChE).

DISTRIBUCION TISULAR Y ESTRUCTURA QUIMICA

La AChE, cuya estructura, mecanismo de acción y determinación genética es muy constante en todo el reino animal, se encuentra en mamíferos y en el hombre fundamentalmente en sistema nervioso central y placa motora, así como en eritrocitos; también en riñón, páncreas, bazo, linfocitos.

La ChE se localiza principalmente en músculo liso, hígado, adipocitos y plasma.

No obstante, en algunos tejidos se pueden encontrar ambas enzimas, como ocurre en el riñón, con distribución algo diferente entre glomérulo y túbulo, según las especies (Akio, 1986). También se ha determinado la presencia simultánea de actividad acetilcolinesterásica y butirilcolinesterásica en sistema nervioso tanto central como periférico (Kanyshera, 1986; Parveen y Tewani, 1986; Catalán y Hernández, 1987); coexisten igualmente en placa motora (Brzin y col., 1980). La AChE se localiza en sustancia gris y la ChE parece más bien ligada a la sustancia blanca (Ord y Thomson, 1952). En algunas especies al menos, como el pollo, parece que ambas actividades estén asociadas a la misma molécula enzimática (Pellín, 1988; Tsim y col. 1988).

La AChE se distribuye de forma desigual en las distintas regiones cerebrales (Hoover y col., 1978; Mackay y col. 1978; Marquis, 1984; Achaval y Schneider, 1984; Siddique y Alsenosy, 1985; Robertson y Logan, 1986; Geneser, 1986; Hallanger y col. 1986). Tanto en animales como en el hombre se encuentra acumulada en el locus ceruleus, donde por otra parte no hay evidencia de actividad colinérgica (Lewis y Schon, 1975; Gennari y Brodbeck, 1985; De Sarno y col. 1987). La distribución y actividad en animales son diferentes según la edad, aumenta tras el nacimiento y disminuye en la edad adulta (Slavikova y Tucek, 1986; Bhatnagar y Tewari, 1985; Biegón y col., 1986). En humanos la actividad de la colinesterasa también varía con la edad del individuo, así la ChE plasmática disminuye en el hombre y aumenta en la mujer (Hartford y col. 1984). Este hecho puede en parte estar en relación con una diferente actividad nerviosa (Atack y col. 1986; Springer y col. 1987; Washio y col. 1987; Inestrosa y col. 1988) y por otra parte por una posible relación con procesos morfogénéticos (Butcher y Hodge, 1976; Muller y col. 1985; Bear y col. 1985; Mastrolia y col. 1986; Miranda y col. 1987; Prusky y col. 1988). De hecho la actividad de la AChE disminuye en fluido amniótico a medida que avanza la gestación, mientras que aumenta la actividad cerebral en el feto (Adejumo y Egbunike, 1987).

También la distribución subcelular de la AChE es heterogénea aunque en general está ligada a fracciones de

membrana (Henderson y Greenfield 1984; Falugi, 1985; Rosenberry y col. 1986; Inestrosa y col. 1987; Anglade, 1987), presentando un desarrollo ontogénico diferente en las distintas regiones cerebrales, más temprano en las regiones más caudales (Lai y col., 1982).

La diferente distribución tanto tisular como celular, así como en distintos momentos del desarrollo está relacionada con las distintas conformaciones en que puede encontrarse la estructura cuaternaria de la AChE (Fernández y Seiter, 1984; Zakut y col., 1985; Sung y Ruft, 1987).

Efectivamente, la molécula de la AChE puede presentarse como monómero (G1, 4S), dímero (G2), trímero (G3) o tetramero (G4, 10S), o como dodecámero asimétrico característico de la sinapsis (A12, 16S) (Dreyfus y col., 1985; Rosenberry y Scoggin 1985; Skan, 1985; Gennari y Brodbeck, 1985; Manavalan y col., 1985; Sorensen y col., 1986; Israel y Skan, 1986; Schegg y col., 1986; Payner y col., 1987; Gennari y col., 1987; Nyquist-Battie y col., 1987; Koelle y col., 1988; Fuentes y Inestrosa, 1988).

Estas conformaciones se distinguen por diferencias en la movilidad electroforética (Edwards y Shaw, 1983; Ramírez y col. 1984; Rosenberry y Scoggin, 1984) y su estabilidad frente a la temperatura, siendo la más resistente la dodecamérica (Bajgar y Patocka, 1986; Yagüe-Guirao, 1986). Se ha propuesto que la forma monomérica G1, a menudo inactiva, puede ser un precursor de las formas asimétricas

de la AChE (Stieger y col. 1987). La forma G4 de la AChE cerebral se agrega mediante un fragmento 13KDa (Fuentes y col., 1988).

La forma monomérica se ha aislado tanto como especie soluble citoplásmica (Kolle y col. 1987; Sine y Colas, 1987) como ligada al retículo endoplásmico (Vidal y col., 1987); todas las otras formas son enzimas de membrana. En el eritrocito se encuentra ligada a la membrana citoplásmica (Korpela y Táhk, 1988) siendo los eritrocitos humanos los que presentan una mayor actividad acetilcolinesterásica (Bondar, 1983). En linfocitos del timo y en células epiteliales humanas (Tolpiko y Caillon, 1985) se encuentra selectivamente asociada a cisternas perinucleares y al retículo endoplásmico.

Se han utilizado distintas fuentes, como el núcleo caudado de cerebro de mamíferos, los órganos eléctricos de peces de los géneros *Torpedo* y *Electrophorus* y los eritrocitos de buey o caballo, para purificarla en cantidades suficientes para abordar su estudio estructural (Nachmanson y Wilson, 1951 ; Wong y col. 1987; Ulasov y col. 1987). Hoy día se están aislando y caracterizando las AChE de muy distintos orígenes humanos y animales (Adamson, 1977; Bjerrum y col. 1985; Gardner y col. 1986; de la Hoz, 1986; Deschamps y Morris, 1987). Su solubilización requiere el uso de detergentes o de heparina (Bazart y col. 1986).

Se ha establecido parcialmente su estructura primaria

(Schumacher y col., 1986; Schumacher 1987), habiéndose encontrado semejanzas y diferencias entre las distintas formas moleculares (Gibney y col. 1988), por sus aminoácidos terminales y por los componentes del centro activo (Rosenberry y col. 1984; Mac Pee-Quigley y col. 1985; Swillens y col. 1986; Haas y col. 1986; Bon y col. 1986). También se ha estudiado la estructura secundaria de algunas de ellas (Aslanian, 1987) y se ha prestado un particular interés al anclaje de la molécula a la membrana celular.

Parece que la subunidad catalítica de AChE no penetra profundamente en el interior de la bicapa lipídica de la membrana plasmática (Barton y col. 1985), y estudios con antisueros monoespecíficos parecen situarla en la cara externa de la membrana eritrocitaria (Niday y col. 1977). La unión a la membrana se verifica por modificación post-translacional de las subunidades catalíticas. Esto ocurre mediante unión, por puentes disulfuro, de los tetrámeros a una cola fibrosa, tipo colágeno, que interacciona después con un proteoglicano semejante a la heparina, en la matriz extracelular (Koelle y col. 1987). El anclaje a la bicapa lipídica de la membrana puede también tener lugar por unión covalente de una molécula de fosfatidilinositol al C-terminal de cada polipéptido catalítico (Silman y Futerman, 1987; Taguchi e Izekawa; 1987; Low y col. 1987; Roberts y col. 1988; Roberts y Lewis, 1989). La acetilcolinesterasa eritrocitaria humana es una proteína anfifílica cuyo corto dominio de unión a la membrana se elimina por digestión con

papaína (Dutta-Chondhary y col., 1984); la forma anfifílica se transforma en hidrofílica por acción de la fosfolipasa sérica (Toutant y col., 1989).

Se estima que el peso molecular de la ChE se halla entre 300 y 365.000. Es una glicoproteína que contiene ácido siálico está formada por cuatro cadenas polipeptídicas idénticas de 574 aminoácidos cada una (Lockridge, 1987 y Lockridge y col., 1987a y b) y emigra en las electroforesis entre las alfa-2 y las beta-globulinas (Peat y Brock, 1984; Toutant y col. 1985; Atack y col. 1987; Layer y col 1987; Tsim y col. 1988; Lockridge, 1988).

De la conformación de las secuencias de aminoácidos de las hidrolasas que contienen serina en el sitio activo, se deduce que la familia de las colinesterasas es altamente conservativa y diferente de otras serinas proteinasas. Por tanto las colinesterasas forman una familia definida que no puede incluirse en una familia serina-hidrolasa multigénica (Soreg y Prody, 1989).

Desde hace unos años se conoce la secuencia de aminoácidos del sitio activo de las variantes genéticas de la ChE plasmática (La Du y Lockridge, 1986).

Estudios realizados sobre la naturaleza quiral de los conjugados covalentes metilfosfonil-AChE indican que el centro activo de la AChE comprende al menos dos "ambientes" distintos cinéticamente de la región esterática pero

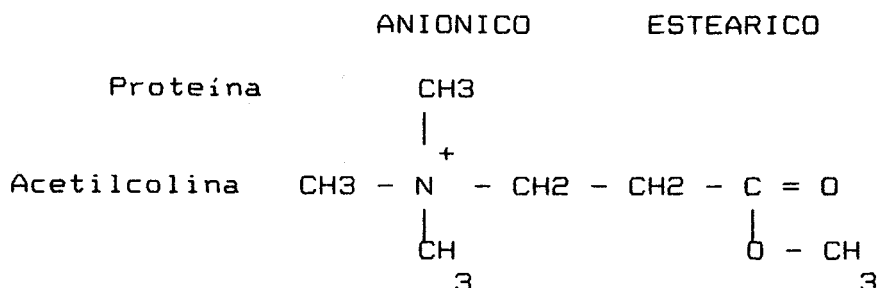
localizados dentro de una distancia de 5Å de la serina nucleofílica. Estos ambientes difieren en sus características dipolares que promueven la separación de cargas y la catálisis ácida (Berman y Decker, 1989). Subsitios cercanos, caracterizados por diferentes propiedades estéricas, electrostáticas e hidrofóbicas, permiten una multiplicidad de orientaciones en la unión y explica la gran variación de ligandos, por ejemplo organofosforados, con diferentes sustituyentes (Berman y col., 1987).

La acetilcolinesterasa de vegetales difiere de la eritrocitaria animal en la estructura de su lugar aniónico de unión a inhibidores (Solyakov y col., 1989).

MECANISMOS DE ACCION Y FUNCIONES FISIOLÓGICAS

La AChE es muy semejante en cuanto a sus propiedades enzimáticas en las distintas especies mientras que la ChE plasmática varía según la especie (Sato y Shinohara, 1988).

Para explicar la afinidad de ambas colinesterasas por sustratos catiónicos y por sus inhibidores, sobre todo los que poseen un átomo de nitrógeno cargado positivamente unido a grupos metilo y etilo, Zeller y Bissegger (1943) postularon la combinación de estos compuestos a la enzima por dos lugares distintos en el centro activo. El primero de ellos, el lugar aniónico, es una región cargada negativamente de la superficie de la molécula, que se combina con la carga positiva del átomo de nitrógeno cuaternario del sustrato o del inhibidor. El segundo o sitio esteárico parece combinarse con el grupo carboxílico del enlace éster y es el responsable de la hidrólisis del sustrato y de la afinidad



(Wee y col. 1976; Jarv y col. 1976; Gentinetta y Brodbecke, 1976; Rosen y col. 1977; Relimpio, 1978; Roufogalis y Beauregard, 1979; Zhang y col. 1984; Radic y col. 1984; Jaaru, 1984; Ulrichova y col. 1985; Das y col. 1986; Langel y col. 1986; Raiteri y col. 1986; Berman y col. 1986, 1987; Acheson y col. 1987; Quinn, 1987).

Estudios cinéticos posteriores a los de Zeller y Bissegger (Davis y Green, 1958) confirmaron esta hipótesis. La hidrólisis de la acetilcolina en el centro esteárico se produce por la intervención de dos restos de aminoácidos presentes en él (histidina y serina); de forma semejante a lo que ocurre en el mecanismo de acción de la tripsina, en reposo, el OH de la serina establece un enlace de hidrógeno con el N imidazólico de la histidina, con desplazamiento del protón de Ser a His. Así es posible un puente de hidrógeno desde el N de la His al O insaturado de la acetilcolina (ACh). Lentamente el O alcohólico de la Ser realiza un ataque nucleofílico sobre el enlace acilo-oxígeno de la ACh, originando la hidrólisis y esterificación de la serina (acetilación). Posterior hidrólisis del nuevo ester regeneraría la enzima. La acetilación de la enzima se desarrollaría según el esquema de la fig. 1:

Este mecanismo no es totalmente aceptado por todos los autores; algunos de ellos afirman que la colinesterasa sérica sólo posee el sitio esteárico, lo que sería compatible con el comportamiento bioquímico de sus distintas variantes genéticas.

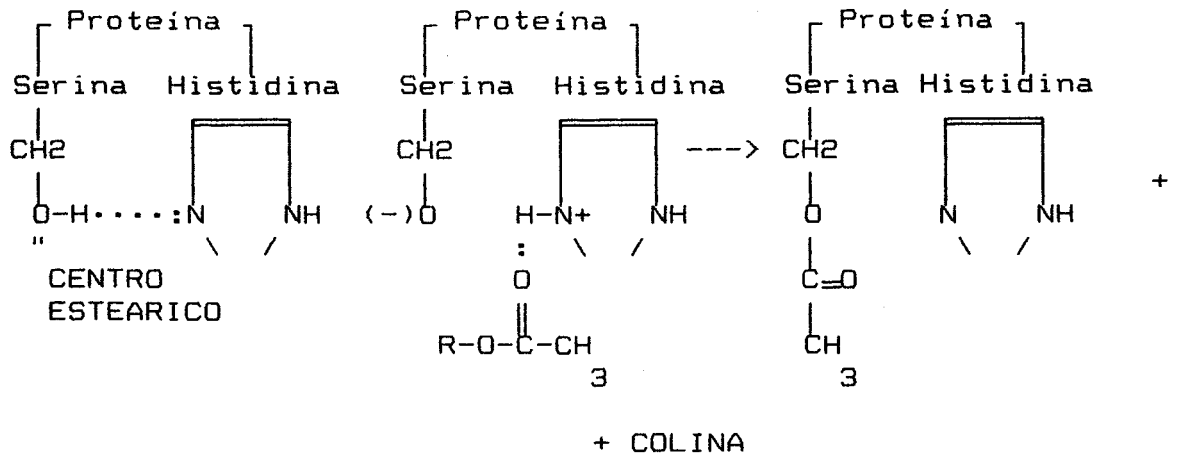


FIG 1. ESTERIFICACION DE LA ENZIMA

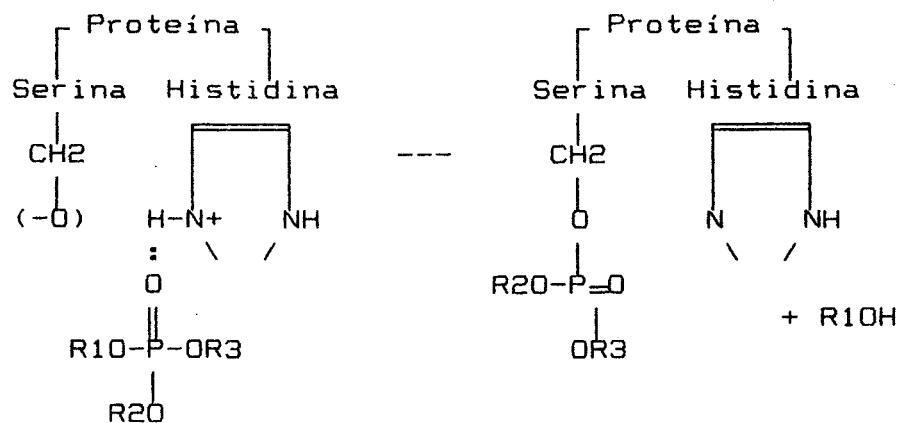


FIG 2. FOSFORILACION DE LA ENZIMA

La función biológica de la AChE en el mecanismo de transmisión nerviosa ha estado perfectamente definida desde su descubrimiento. También se ha postulado su participación en el desarrollo de los procesos cognitivos en los animales y en el hombre (Kostovic, 1988). Sin embargo se desconoce el papel que desempeña en la membrana eritrocitaria, aunque podría estar relacionada con el transporte iónico,

concretamente del potasio, y consecuentemente influir en los cambios que ocurren en el potencial eléctrico celular (Nisita y col., 1984; Torp, 1986).

En cuanto a la ChE, si bien se ha detectado su presencia en los principales tejidos de los animales y del hombre (Silver, 1974), su función biológica aún no se ha establecido con claridad y es posible que posea una acción múltiple (Kutty, 1980; Balasubramanian, 1984).

El descubrimiento de que la acetilcolinesterasa y la colinesterasa eran enzimas diferentes quizás fue perjudicial en el sentido que hizo suponer que la ChE no tenía nada que ver con la transmisión nerviosa. Sin embargo, Ord y Thomson (1952) demostraron su existencia en la sustancia blanca del sistema nervioso central y periférico en íntima asociación con la AChE de la sustancia gris.

Una de las funciones propuestas es que la ChE sea un precursor de la AChE (Koelle y col. 1973, 1976) pero esta hipótesis no se ha podido probar, y quedaría sin explicar el papel de la ChE en tejidos no nerviosos. No obstante, parece existir un mecanismo de regulación recíproca entre BuChE y AChE en músculo esquelético (Berman y col. 1987). Es también probable que desempeñe un papel importante en el mantenimiento de la vaina de mielina. Pero no todos los agentes capaces de inhibir su actividad enzimática son a la vez agentes desmielinizantes por lo que esta hipótesis resulta insostenible (Earl y Thompson, 1952; Davies, 1963).

También se ha propuesto que actúe en el mantenimiento de la estructura o en el proceso de síntesis de las beta-lipoproteínas, porque al parecer, la ChE forma con las lipoproteínas séricas un complejo relativamente inestable, por medio del cual la enzima se transporta en estado inactivo (Lawrence y Melnick, 1961). Algunas observaciones apoyan esta hipótesis, pero esta explicación sólo cubriría algún aspecto de las funciones de la ChE porque sólo un 10% de la actividad está unida a esta fracción lipoprotéica de baja densidad (Chu y col. 1978).

Otros investigadores como Clitherow y col. (1963) postularon que la ChE desempeña en el hígado un importante papel como mecanismo de defensa para la célula frente a la formación de butirilcolina y de otros ésteres de colina en el metabolismo de los ácidos grasos, y así protegerla de efectos tóxicos indeseables de tipo nicotínico y de que estos productos inhiban a la acetilcolinesterasa (Lehmann y Silk, 1953). Una función similar se ha sugerido en adipocitos (Ballantyne, 1968).

Esta función no sería generalizable a todo el organismo puesto que el plasma y otros tejidos carecen de colinas hidrosolubles del tipo de la butirilcolina. No obstante, en apoyo de esta acción destoxicante están otras observaciones en las que se ha comprobado el papel de la ChE como enzima metabolizante, por ejemplo de la timoxamina, bloqueante competitivo de los receptores alfa-adrenérgicos (Nielsen-

Kudsk y col. 1980) o de la diacetilmorfina (Lockridge y col. 1980) y se le ha demostrado también actividad peptidásica (Boopathy y Balasubramanian, 1987). En epidermis y glándulas de la piel parece participar en la síntesis de los productos de secreción (Sokolov y col. 1985) y en pulmón parece intervenir en el sistema surfactante ya que la administración de ChE ejerce un efecto protector en casos de hemorragia masiva provocada en conejos (Zelyak y col., 1984).

En la ChE plasmática humana altamente purificada se ha puesto de manifiesto actividad peptidásica, cuyo lugar activo contiene una serina activa y grupos carboxilos en un ambiente no polar; la eliminación de ácido siálico no altera la actividad peptidásica (Chatonnet y Masson, 1985; Majumda y col., 1988). Asi mismo, presenta actividad semejante a tripsina, metaloexopeptidasa (Small y col 1987) y a carboxipeptidasa, requiriendo para ello la presencia de iones metálicos, posiblemente cobalto (Small y col., 1988). Sin embargo otros autores (Checler y Vincent, 1989) estiman que estas actividades se deben a contaminación por otras enzimas.

INHIBICION DE LAS COLINESTERASAS

La inhibición de la colinesterasa por los diferentes plaguicidas organofosforados, carbámicos y otros compuestos orgánicos e inorgánicos, ha sido a lo largo de los años uno de los temas más estudiados por distintos autores, encontrándose en la literatura científica numerosas publicaciones al respecto.

No obstante siguen existiendo puntos oscuros dada la gran variabilidad de respuestas que provocan los diferentes organofosforados incluso los considerados más tóxicos, como difluorodifenilfosfato (DFP), soman, sarín y tabun, lo que ha hecho sospechar que la muerte no se produzca solamente como consecuencia de la inhibición de la AChE.

El aspecto más interesante desde el punto de vista clínico de la inhibición de estas enzimas por sustancias químicas radica en la posibilidad de su utilización como índice de exposición humana en medicina ocupacional.

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa pueden dividirse en dos grupos principales según que la acción sea reversible e irreversible. Se dice que tiene lugar una inhibición reversible cuando la actividad enzimática se recupera al eliminar, por cualquier medio, el inhibidor. En

la inhibición irreversible esto no ocurre. Son inhibidores reversibles de la acetilcolinesterasa, la misma acetilcolina cuando se encuentra en exceso como sustrato, la fisostigmina (eserina) y la neostigmina (prostigmina). Augustisson hizo en 1948 una relación de hasta 100 compuestos entre los que destacan: procaina, cocaína, nicotina, morfina, codeína, colchicina, quinina, cafeína, urea, sulfonamidas, cloroformo, etc.

Se han considerado inhibidores irreversibles todos los compuestos organofosforados utilizados ampliamente como insecticidas y también como gases de guerra, para lo que estas sustancias fueron inicialmente utilizadas. Debido a este hecho algunos autores prefieren utilizar el término de inhibición por organofosforados mejor que el de inhibición irreversible.

Kalow y Genest introdujeron en 1957 otra categoría de inhibidores, aquellos que inhiben de forma diferencial a las distintas variantes de ChE. La mayoría de ellos contienen un átomo de nitrógeno cargado.

La colinesterasa sérica es inhibida por las mismas sustancias que la acetilcolinesterasa eritrocitaria. Sin embargo algunas de ellas son más potentes inhibidores para una enzima que para la otra y esto se ha utilizado para su diferenciación (Dalimov y col., 1984; Gulyamov y col., 1987; Tomokuni y Hasegawa, 1985).

Las dos colinesterasas no responden por igual, así

determinados plaguicidas organofosforados (diazinon, metamidofos) inhiben más rápidamente o con mayor intensidad a la ChE plasmática que a la tisular o eritrocitaria (Tomokuni y Hasegawa, 1985; Rajendra y col., 1986; Gray y col., 1982). También varía el tiempo necesario para la reactivación, que es por ejemplo más lento para ChE tras la administración de metamidofos (Gray y col., 1982).

Los metanos difosforilados son más selectivos para la ChE (butirilcolinesterasa) que para la AChE (Makahaeva y col. 1984).

Algunos de ellos aunque sean inhibidores de colinesterasa como el acefato (Singh, 1986) protegen al enzima. Se ha visto que la preexposición a dicho agente proporciona protección frente a la inhibición de AChE de cerebro y ChE de plasma en ratas posteriormente expuestas a acefato y metamidofos. Parece ser que el acefato tiene una mayor afinidad por el sitio activo de AChE que el metamidofos (Singh, 1986).

Como ya hemos visto (fig 2), el mecanismo de inhibición de las colinesterasas por organofosforados en su primera fase, es semejante al de la hidrólisis de la acetilcolina, pero seguidamente se establece la unión con la serina mediante un enlace covalente, dando lugar a lo que se conoce como fosfatación de la enzima o envejecimiento de la unión. La fosfatación de la serina es tan estable que, cuando se somete a hidrólisis la enzima fosfatada, se obtiene fosfato

de serina.

Los inhibidores, como los compuestos organofosforados, reaccionan con el centro esteárico y no distinguen entre las distintas variantes de ChE. Esto sugiere que la diferencia entre unas variantes y otras se encuentra en el centro aniónico.

En general las colinesterasas son inhibidas por los compuestos cuaternarios de fósforo de forma reversible y mixta, por reacción tanto competitiva como no competitiva. El tipo de inhibición varía con la estructura del agente inhibidor llegando a ser algunos 300 veces más potentes que otros (Brestkin y col. 1986, Francis y Farage-ElAwar, 1987, Barthova y col. 1986, Gray y Dawson, 1987, Andersen y col. 1977).

El diisopropilfluorofosfato (DFP) es uno de los más potentes inhibidores irreversibles de colinesterasa a dosis de 1-4mg/kg; una dosis única de este producto es capaz de mantener baja la actividad 29h.

En conejos, tras administrar dosis subletales de soman durante 7 días (5µg/kg/día), se aprecia bajada en la actividad de ambas enzimas desde la primera dosis y sigue bajando a lo largo del tratamiento (Hu y col. 1988).

La inhibición por organofosforados es en general dependiente de la dosis (Roney y col. 1986, Fu y col. 1986, Shibanov 1984) e independiente de la vía de absorción siendo

igualmente activos por vía oral, inhalatoria, subcutánea o dérmica (Dahl col. 1986, Anand y col. 1977, Hamann 1984, Gupta y col. 1987).

La capacidad inhibidora de los organofosforados es también dependiente de la edad. Así Sterri y col. 1985 observaron que el soman es 6-7 veces más potente en ratas de 5 días de edad que en las de 30. Sin embargo la actividad de la AChE cerebral tras exposición a DFP (Michalek y col. 1985), se recupera antes en el cerebro del feto que en el de la madre.

Las diferentes especies presentan también distinta susceptibilidad frente a la inhibición (Gray, Dawson, 1987; Datsov y col. 1984; Hu y col. 1988) no habiéndose encontrado especies resistentes entre mamíferos aunque sí en insectos.

Como modelo de inhibidores de tipo reversible destacan los carbamatos, muchos de los cuales se han utilizado con carácter profiláctico porque protegen a las colinesterasas de la acción de otros inhibidores fundamentalmente los irreversibles.

Por último, también se ha citado actividad anticolinesterásica de algunos plaguicidas organoclorados, como dieldrin, lindano, endosulfán (Zemaitis y col. 1976; Tiwari y col. 1982; Begum y col 1987; Kiran y Varma, 1988) y al paraquat y en menor grado al diquat (Shinohara y Seto, 1986; 1987; 1988) así como a otros compuestos de amonio cuaternario.

OTROS INHIBIDORES

Además de los plaguicidas citados, existen otros agentes neurotóxicos que son inhibidores más o menos potentes de las colinesterasas: algunos metales como sodio, zinc, cobre y plomo (Hughes y Bennet, 1985; Tomlinson y col. 1980; Louis-Ferdinand y col. 1978; Wysocka-Paruszezwska y Biel-Baranowska, 1979; Anca, 1983; Sakoguchi y col. 1986; Modak y col. 1975); el mercurio tanto metálico, en forma de vapor (Sollet y col. 1988; Yoshida, 1983), o de cloruro (Balykin y Sedov, 1982) o el metilmercurio (Omata y col. 1982). Aunque la acción inhibidora del litio se discute (Hughes y Bennett, 1985; Froede, 1985; Gerri, 1982), parece ser que su unión a la enzima reduce la afinidad por el sustrato (Kouniniotou-Krontiri y col. 1984). Si bien algunos autores citan el ión fluoruro entre los inhibidores (Wilson, 1984), no parece que ejerza esta acción en humanos al menos incluido en la dieta (García, 1988).

También aparecen citados en la literatura numerosos compuestos orgánicos entre los que destacan aminonitrilos neurotóxicos (Froines, 1985), hidrocarburos aromáticos (Korpela y Tahti, 1986) etc.

La inhibición de la acetilcolinesterasa por diisocianatos demostrada in vitro en la actividad

eritrocitaria, participa, junto con el mecanismo inmunitario, en la patogénesis del asma producido por la exposición a estas sustancias (Vasil'kova, 1988).

Muchas zootoxinas frecuentes en venenos de serpiente, escorpiones, arañas y las toxinas botulínicas A y B son potentes anticolinesterásicos (Karlsson y col. 1984; Lin y col. 1987; Kumari y col. 1985; Datta y col. 1988; Evans y col. 1988).

REACTIVACION DE LA ENZIMA INHIBIDA

Las oximas son capaces de reactivar, por descarbamilación (Harris y col. 1985, 1987; Kokshareva, 1982; Dawson y Poretski, 1985; Patocka y Bajgar, 1987) tanto AChE como ChE, inhibida por carbamatos, o por desfosfatación a las inhibidas por organofosforados, desplazando de forma competitiva su unión al enzima (Molinengo y Orsetti, 1988; Sun y col. 1986; French y col. 1983; Javanovic, 1983; Harris y col. 1979; Jakl y col., 1986; Bregovec y col. 1983; Xue y col. 1985; Deljac y col. 1982; Bell y col. 1979, y otros).

En el caso de los organofosforados (OPs), este desplazamiento es especialmente eficaz en los primeros momentos de la intoxicación, pero disminuye su eficacia con el tiempo, por lo que se habla de un envejecimiento de la fosforilación. Ello se debe, no solamente a la esterificación de la serina, sino también a que, sucesivas hidrólisis de los sustituyentes del organofosforado originan un desplazamiento de las cargas y dan mayor fuerza al enlace covalente de la fosforilación.

En cuanto a la capacidad de las oximas aromáticas para liberar al enzima en la primera fase de la fosforilación, puede suponerse que la presencia del anillo aromático



confiere gran reactividad al grupo OH de la oxima, provocando su esterificación con el organofosforado cuando este aun no está unido a la AChE o en su primera unión a la histidina, pero no cuando se haya producido la fosforilación de la serina (Hopff y col. 1984). De aquí que la terapéutica con oximas solo sea válida cuando se utiliza muy precozmente (Wolthuis y Kepner 1978), con un efecto mínimo a las 36h de la absorción. No obstante más recientemente se ha empezado a utilizar en infusión durante varios días para controlar los OPs que se liberan lentamente de los depósitos grasos, dada además la vida media corta (1h) de las oximas, que se eliminan por orina.

Además de regenerar a la enzima, las oximas se han mostrado eficaces como agentes protectores frente a la inactivación y al envejecimiento de su unión con los inhibidores (De Yung y Worlring, 1980; Wolthuis y Kepner, 1978; Gordon y col, 1978).

Se ha visto que esta acción se ejerce tanto in vivo como in vitro (Galvi y col. 1985; Harvey y col. 1986; Bedford y col., 1986) utilizando numerosos derivados con diferente capacidad reactivadora. Los más frecuentes son pralidoxima, obidoxima, trimidoxima, HI-6, P2S, 4S-6, etc, empleadas solas o junto a atropina (Adams y col. 1976; Benschop y col. 1984; Simeon y col. 1979; De La Manche y col. 1979; Bajgar y col. 1981; De Neef y Porsius, 1982; Harvey y col. 1984; Bedford y col. 1986; Clement y col.

1988; Clement y Lockwood, 1982;...).

La oxima HI-6 (dicloruro de 1-[[[4-(aminocarbonil)piridino]metoxilmetil]-2-[(hidroxiimino)metil]-piridinio) parece tener mayor capacidad reactivadora que otras, tanto en humanos como en animales de experimentación (De Jong y Wolring 1985; Harris y col. 1985, 1987), aunque depende del tipo de organofosforado que ha producido la inhibición (Puu y col. 1986; Galosi y col. 1988), de la dosis administrada (Matsubara, Horikoshi, 1984) y de la especie. Igualmente se ha visto una mejor respuesta a la obidoxima en cobaya que en rata o ratón (Hopff y col. 1984). También se ha observado diferente comportamiento en cuanto a la reactivación de ChE in vitro en humanos (Bell y col. 1979).

Se ha estudiado por separado la inhibición por organofosforados y la reactivación de la AChE tisular o la ChE plasmática, y parece haber diferencias de comportamiento entre ambas enzimas y frente a diferentes inhibidores o agentes regeneradores (Doebler y col. 1984; Sket y Brzin, 1986).

La actividad de la colinesterasa baja en el locus ceruleus y el núcleo caudado del cerebro de rata, tras la inyección intraventricular de HC-3 (40 µg). Yin y col. 1985 han conseguido, por electroacupuntura, alcanzar los valores normales anteriores a la inhibición. Mediante dicha técnica logran incrementar o reactivar la actividad en cerebro de ChE.

No obstante las oximas no son capaces de reactivar a las enzimas inhibidas por otras sustancias como proserina (Prozorovskii y col. 1983).

Se han ensayado otros reactivadores de la actividad colinesterásica con mayor o menor eficacia terapéutica, como biperidina (Reiner, 1986; Skrinjaric y col. 1988), derivados de la piridina (Daroszewski y col. 1987), aprofen (Rushy y col. 1986; Dawson y col. 1985), ésteres trihidroxímicos (Kagan y col. 1975) y otros (Bedford y col. 1986). También se ha estudiado el efecto protector que ejercen algunos inhibidores reversibles de estas enzimas como carbamatos, prostigmina, fisostigmina (Green, 1983; Balery y col. 1986; Groff y col. 1977; Gongora, 1988), ketamina (Puu, 1988), galantamina (Gajewski y col. 1988), aprofen (Ruskh y col. 1986; Dawson y col. 1985), hasta tal punto que las fuerzas militares estadounidenses y de países aliados están considerando la administración preventiva de piridostigmina a los soldados como protección frente a los gases de guerra.

Así mismo se han utilizado combinaciones de diversos reactivadores como tacrina, benacticina y trimedoxima (Bajgar y col. 1986), y de oximas con atropina (Yamanaka y Nishimura, 1984; Van Dougen y col. 1987; Kuhnen y col. 1985, de Kort y col. 1988; Hauser y Weger 1979).

En resumen los agentes protectores en las intoxicaciones por organofosforados son según su acción: antagonistas de los efectos de la excesiva cantidad de

acetilcolina (como la atropina); aceleradores de la reversión de la colinesterasa inhibida (oximas como PAM, PAD); estimulantes de la síntesis de enzimas degradantes; incluso otros fosfatos de acción antagonista; sustancias bloqueantes de colinesterasa por combinación reversible con el enzima (eserina); agentes que protegen contra organofosforados por bloqueo de enzimas responsables de la activación de éstos, o que impiden la acción mantenida de la acetilcolina por competir con el receptor de ésta en la placa motora (suxametonio); y activadores de las colinesterasas (acridina, tacrina).

ESTIMULACION DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASICA

Se sabe bien que todas aquellas sustancias capaces de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa tienen, en sistema nervioso, una acción colinérgica por mantenimiento de niveles altos de acetilcolina en la sinapsis, pero se desconocen aún las consecuencias patológicas de la inactivación de la ChE plasmática sola.

Los agentes estimulantes de la AChE provocan, por el contrario, un bloqueo de la transmisión colinérgica.

Así, en la intoxicación aguda con lindano, se han observado en ratas niveles altos tanto de ChE plasmática como de la AChE de sinaptosomas (Muñoz-Blanco y col., 1985; González-Rodríguez y col., 1987). Aunque con resultados controvertidos, particularmente en el caso del $Al(3+)$ (Banks y col., 1985; Hughes y Bennett, 1985) se ha implicado a algunos cationes metálicos, como $Mg(2+)$, $Ca(2+)$, $Sn(2+)$ y $Hg(2+)$; también el acetato amónico y el vanadato (Sadasivudu, 1983; Catalán, 1985; Hughes y Bennett, 1985; Savolainen, 1986) elevan la actividad colinesterásica, no obstante con el cloruro mercuríco en administración repetida tras una estimulación inicial, aparece una disminución de la actividad (Miszta, 1984).

Asimismo se conoce la acción estimulante de ciertos disolventes: tolueno, n-hexano y sus metabolitos como 2,5-hexanodiona, tricloroetileno, cloruro de metileno, cloruro de vinilo (Honma, 1983;Kalemba, 1983; Chimakova, 1984; Kjellstrand y col.1986; Bastone y col., 1987; Korpela y Tahti, 1988); de algunas micotoxinas, ocratoxina A, citrinina, zearalenona (Gupta y col., 1982; Nassav y col., 1987); de bifenilos policlorados a dosis bajas; del etanol (Bauman y col., 1983; Chumakova y col., 1984; Dremov y col.1985); de las radiaciones ionizantes (Navratil y col.,1985; Skopec, 1986); de los campos magnéticos pulsantes de baja frecuencia (Rajeswari y col., 1985) y del stress tanto en animales como en humanos (Oriaku y Soliman, 1986; Romero-Vecchione y col., 1987).

Mientras que el mecanismo de acción de los agentes inhibidores suele estar bien establecido, se sabe poco sobre los mecanismos de activación, aunque se postula activación de tipo alostérico en el caso del aluminio (Patocka y Bajgar, 1987), aumento de síntesis enzimática en agentes de tipo hormonal como sustancia P (Catalán y col., 1984) o ecdisterona (Catalán y col., 1984), o facilitación de la unión enzima-sustrato por fluidificación de la membrana para la AChE (Mazzanti y col., 1986).

ACCIONES DE LOS MEDICAMENTOS

Los inhibidores del receptor H₂ de la histamina, ranitidina, cimetidina, oximetidina, T2 V0460, YM 11170, son inhibidores reversibles, dosis dependientes, tanto de la AChE como de la ChE (Galli y col., 1984; Jensen y Gugler, 1984; Aono 1984, 1986; Kounenis, 1986).

La administración de cortisol, sobre todo si es por vía intraperitoneal, también inhibe la actividad colinesterásica actuando específicamente sobre ChE hepática, posiblemente interfiriendo en su síntesis (Massa y col., 1975; Verjee y col., 1977). Dengler y col. 1979, atribuyen al efecto inhibitor de la prednisona la exacerbación de la miastemia gravis al inicio de la terapia esteroidea.

Diversos agentes cardiotónicos (isoproterenol, propranolol) son inhibidores competitivos de la ChE plasmática en humanos y animales (Ishikawua, 1980; Soylemez y Ozer, 1985, 1986; Ozer, 1987). Godin y col. (1978) atribuyeron también a diversos agentes antiarrítmicos un efecto sobre la actividad de la AChE por interacción con la membrana eritrocitaria.

Los analgésicos del tipo de los salicilatos (aspirina, indometacina) incrementan la actividad de la AChE de

estómago y duodeno y de la enzima purificada in vitro (Catalán y col., 1983). Es más los salicilatos son metabolizados en el organismo por la ChE plasmática de ahí que la administración conjunta de agentes anticolinesterásicos potencie los efectos de aquellos (Ray y col., 1987).

Sin embargo los analgésicos del grupo de los opiáceos como la metadona y apomorfina, disminuyen los niveles de AChE cerebral (Field y col., 1977; Herman y col. 1977; Eikenburg y Stickney 1979; Sood y Mohanakumar, 1985).

En general las benzodiazepinas disminuyen de forma específica entre un 60 y un 90% a la ChE plasmática, si bien el loracepan reduce también a la mitad la actividad de la AChE eritrocitaria (Holmes y col, 1978; Saha y Sengupta, 1987).

A dosis bajas los barbitúricos estimulan a la AChE, pero el aumento de la dosis conduce a una inhibición progresiva de la actividad enzimática (Deliconstantinos y Tsakiris, 1985).

La administración en fase neonatal, a ratas, de fenobarbital disminuye la AChE de hipocampo, pero esto no ocurre si la administración tiene lugar en fase prenatal (Kleniberger y Yanai, 1985).

La insulina, somatostatina, adrenalina, histamina, prostaglandinas, inducen la activación de la AChE (Catalán

1981, 1984 a y b; Massa y col. 1975; Kolataj y col. 1984).

Sustancias de muy distinta acción farmacológica también incrementan la actividad colinesterásica: los fármacos hipolipemiantes aumentan la ChE sérica (Butler 1988), la vitamina A (Pillans y col. 1988), la veratridina (Mizobe y Iwamoto, 1984), la imipramina y la clorpromacina activan la AChE (Bareggi y col., 1978; Greenfield y col., 1979).

Los anestésicos tanto locales, como generales son inhibidores de las colinesterasas. La lignocaina, al menos en ensayos in vitro realizados con tejidos de rata, ha mostrado ser inhibidor competitivo de la AChE de sinaptosomas y no competitivo de la eritrocitaria, mientras que la tetracaína es inhibidor reversible de ambas (Haque y Poddar, 1983, 1985).

La procaína, mepivacaína, lidocaína, tetracaína, dibucaína y bupivacaína inhiben también la ChE sérica de caballo (Kunec-Vajic y col. 1985) y la humana; la procaína de forma competitiva, probablemente por unión al sitio aniónico principal, mientras que los demás presentan un tipo mixto, por unión al centro catalítico o a un lugar aniónico periférico o modulador, modificando así la cinética de la enzima (Pérez-Guillermo y col. 1987). La ketamina modifica de forma competitiva (Curatola y col. 1979) la actividad de la AChE cerebral en ratas, disminuyendo la velocidad máxima (V_{max}) pero sin alterar la K_m para la acetilcolina, de forma íntimamente relacionada con la fluidificación de las

membranas (Mazzanti y col. 1988).

La galantamina inhibe ambas colinesterasas (Kriovi y col. 1985; Kriovi, 1988) mostrando más afinidad por la AChE eritrocitaria que por la sérica (Schuh 1976), y disminuyendo la velocidad máxima (Mazzanti y col. 1988).

Los anestésicos volátiles también inhiben de forma reversible y mixta, dependiente de la dosis pero siempre por encima de las usadas en clínica (Braswell y col. 1977).

Algunos bloqueantes musculares cuya acción farmacológica se debe principalmente a la unión con el receptor postsináptico de la acetilcolina (Florez y col. 1980) son a la vez inhibidores reversibles de la AChE. Actúan de esta forma el pancuronio (Schuh, 1977), el bromuro de pipecuronio (Simon y col. 1980), la D-tubocurarina (Zorko y Paulic 1986).

REFERENCIAS FISIOPATOLOGICAS Y CLINICAS

Parece ser que existe un cierto paralelismo entre la actividad de la ChE enzima y la asimilación de alimentos (Gerebtzoff, 1959), ya que se ha observado en niños mal nutridos incremento de esta actividad sérica en relación con la ingesta (Waterloo, 1950) y una disminución con el ayuno en ratas (Harrison y col. 1951); aunque se desconoce el tipo de alimento, glucídico, protéico, graso o mixto que conduce a estas alteraciones.

Con gran interés clínico, se ha señalado una actividad elevada de ChE en situaciones relacionadas con anormalidades del metabolismo lipídico como hiperlipoproteinemia (Cucuianu y col. 1976; Kutty y col. 1977; Chu y col. 1978), obesidad (Cucuianu y col. 1968) y diabetes (Antopol, 1973; Deshmukh, 1986). Estos pacientes presentan también concentraciones elevadas en suero de lipoproteínas de baja densidad (VLDL), relacionadas con un aumento en la síntesis de triglicéridos en hígado, derivado del exceso de ácidos grasos procedentes del metabolismo de glúcidos, o de un incremento del transporte desde el adipocito. También se encuentra ChE elevada en niños con síndrome nefrótico asociado a hiperlipoproteinemia (Way y col. 1975). De forma semejante se han detectado niveles aumentados de ChE en ratones

genéticamente obesos (Kutty y col 1979, 1984), en conejos tratados con endotoxina de *Escherichia coli* que produce hiperlipoproteinemia severa (Kutty y Melnick, 1961) y en la íntima de la aorta en ratones ateroscleróticos en los lugares de acumulación de lipidos (Kutty, 1979), mientras que en los animales normales la actividad se localiza en la lámina media.

En la especulación sobre el papel de la colinesterasa se debe tener en cuenta que existen individuos sanos normales que carecen de la actividad colinesterásica sérica, aunque cabe suponer que estos individuos posean mecanismos alternativos que compensen el déficit de ChE.

Se conocen entre ambos extremos, actividad normal y ausencia, variantes de origen genético en cuanto a su sensibilidad frente a la succinilcolina (Goedde y col. 1979).

La existencia de una variante atípica de la colinesterasa sérica humana se reconoció por primera vez cuando se administró bajo anestesia el relajante muscular suxametonio (succinil--colina), produciéndose apnea severa en algunos pacientes (Svensmark, 1965; Yucel y col., 1988). Al contrario de lo que ocurre con la ChE normal, la forma atípica es incapaz de hidrolizar la succinilcolina a velocidad normal (Sugimori, 1986) y es anormalmente resistente a inhibidores como la dibucaina. La ChE atípica puede detectarse en el suero de estos pacientes utilizando

benzoilcolina como sustrato en presencia de dibucaina (Kalow y Genest, 1957).

De forma similar se ha descubierto un tipo de ChE resistente a fluoruro (Harris y Whittacker, 1961). En este caso la ChE no se inhibe con fluoruro sódico pero se inhibe normalmente con dibucaina.

Se ha señalado una tercera variante (Lidell y col. 1962) en la cual los individuos que la presentan carecen aparentemente de ChE sérica. Esta variante se debe a la presencia de un alelo "silente". Goedde y col. (1965), encontraron que el suero de los individuos portadores del gen silente contienen una proteína semejante a la ChE normal, pero desposeída de actividad. Parece ser que existen dos variantes genéticas del gen silente: en el tipo I no hay actividad, ni se detecta la proteína, en el tipo II la proteína estaría presente y es inmunológicamente detectable pero la actividad es solamente residual (Maekawa y col. 1987).

Las variantes genéticas de la ChE pueden detectarse por técnicas electroforéticas (Fritze y col. 1987), por datos cinéticos de inhibición con organofosforados (Chemnitius y col. 1982), con propranolol (Whittaker y col. 1981) o por diferencias en la absorción a 340 nm (Shino, 1984). Están codificadas por un gen que se ha aislado y codificado a partir de tejidos fetales humanos (Prody y col. 1987). La secuencia de aminoácidos del sitio activo es, sin embargo,

idéntica en los distintos genotipos (Lockridge, 1987).

Así pues existen cuatro variantes de la ChE: normal, resistente a dibucaína, resistente a fluoruro y silente (dependientes de un único gen) (Das, 1976; Rotund, 1988). Su conocimiento es particularmente importante por sus repercusiones en neurotoxicología (Gnatt y Soreq, 1987), por la posibilidad de predecir la sensibilidad a fármacos de los individuos portadores (Valentino y col. 1981), especialmente en lo que se refiere a pacientes que hayan de recibir suxametonio durante la anestesia y requieran por tanto la aportación de protección adecuada (Evans, 1986).

Además de la elevación ya citada de la actividad de ChE en relación con hiperlipoproteinemias de muy distinta etiología y los fenómenos de inhibición y de activación, tanto de AChE como de ChE, por sustancias químicas, algunos procesos patológicos están acompañados de modificaciones de las colinesterasas.

Según algunos autores las lesiones neurológicas en corteza cerebral características de la enfermedad de Alzheimer parecen ser debidas a un déficit colinérgico por disminución de acetilcolina y se intenta modular su contenido mediante la administración de anticolinesterásicos (Johns y col. 1984; Moss y col. 1986; Weinstok y col. 1986; Becker y Giacobini, 1987; Giacobini 1987; Mesulam y col. 1987). Sin embargo otros autores han observado disminución de actividad colinesterásica en líquido ceforraquídeo de

pacientes con demencia senil tipo Alzheimer (Hammond y Brimijoin 1988), más acusada cuanto más jóvenes morían los enfermos (Reinikainen y col. 1988), aunque parece ser muy grande la variación de esta actividad en los distintos individuos afectados por la enfermedad (Nakano y col. 1986). Tampoco está siempre clara la correlación entre su gravedad y la actividad de la AChE (Jolkkonen y col. 1984; Atack y col. 1988), así como son poco concluyentes los datos de estas actividades en plasma o eritrocitos (Atack y col. 1985; Adem y col. 1986).

Según Fishman y col. (1986), hay una pérdida selectiva de la forma molecular G4 en las áreas 9, 10, 11, 21, 22 y 40 de Brodman y en la amígdala, sin cambios en la relación G4/G1. Esta pérdida está relacionada con la degeneración de los elementos presinápticos.

En distintos desórdenes psiquiátricos (esquizofrenia, manía, enfermedad de Huntington, demencia,...) no se han detectado cambios en la AChE de líquido cefalorraquídeo (Davis y col. 1979; Youkin y col. 1986; Alexandrova y col. 1987; Ferrante y col. 1987; Fritze y col. 1987). En enfermos de Parkinson con o sin demencia se ha observado disminución de AChE en cortex frontal pero no en líquido cefalorraquídeo, con concentraciones de la forma 10S en dementes, inferiores a las de los no dementes. La BuChE se haya disminuida solo en los no dementes (Ruberg y col. 1986). También aparece disminución de BuChE plasmática (Adem y col. 1986).

La ChE total de fluido amniótico aumenta en caso de fetos con malformaciones que afectan al normal desarrollo del cerebro, anencefalia, exencefalia e hidroencefalia (Szabo, 1982) teniendo su determinación prenatal valor diagnóstico (Troccoli y col. 1985).

Bonham y Attack 1987, observaron que la forma molecular de la AChE de fluido amniótico en casos de fetos con anencefalia o espina bífida es tetramérica (10.15) mientras que en embarazos con exencefalia se encuentra la forma monomérica (4.85). La actividad de la AChE específica de las citadas malformaciones del tubo neural se encuentra muy incrementada por lo que su valoración tiene valor diagnóstico (Bonham y col. 1987).

Se ha citado incremento de AChE en relación con neumonía aguda (Dubilei y Tenyukov, 1985), epilepsia (Kish y col. 1988), hipotiroidismo (Sonawane y Baksi 1980), enfermedad de Hirschsprung en la que se afecta la forma tetramérica de la enzima (Bonham y col. 1985, 1988), glomerulonefritis (Dlin y col. 1985) y durante y después de una fibrilación ventricular (Wortsman y col. 1987).

Por el contrario se encuentran decrementos de la actividad enzimática en hipertiroidismo (Sonawane y Baksi, 1980; Babloyan, 1986) hemoglobinuria paroxismal esencial (Chow y col. 1985), estrés quirúrgico (Cruz y col. 1987), miopatías (Laskowski y Dettbarn, 1977), cirrosis hepática

(Oete y col. 1985).

En células malignas procedentes de distintos tipos de carcinoma humano se ha observado una distribución anómala de la acetilcolinesterasa que se acumula fundamentalmente alrededor de la envuelta nuclear (Falugi, 1985).

DETERMINACION ANALITICA

Como ya se ha indicado repetidas veces, la función biológica de la AChE en sistema nervioso está perfectamente definida y aunque no está aclarado su papel en el eritrocito, parece existir una buena correlación entre las actividades en ambos lugares, y su determinación presenta valor diagnóstico, fundamentalmente en procesos de tipo neurológico.

No obstante, la utilización rutinaria de la enzima eritrocitaria es muy limitada, mientras que está ampliamente difundido el uso de la ChE sérica en el diagnóstico de diferentes estados patológicos con los que no siempre está relacionada, como son las intoxicaciones por OPs y carbamatos. Su determinación ha sido además automatizada en distintos tipos de analizadores Panteghini y Bonora 1984; Mashige y col. 1985; Ratnaike y col. 1987; Gruss y col. 1988).

Sin embargo en trabajos de investigación se utilizan ambas enzimas, aunque a menudo se hace referencia a ellas indistintamente sin distinguirlas como moléculas enzimáticas diferentes e independientes o bien se hace una valoración conjunta de ambas actividades en sangre total.

Aunque con diferente localización y especificidad de sustrato, el fundamento de la determinación de ambas actividades es el mismo, y pueden encontrarse en la bibliografía revisiones de los distintos métodos existentes (Witter, 1963; Ganelin, 1964; Angustinsson, 1971; Holmstedt, 1971; Long, 1975; Ikemoto y Todani, 1985).

Los diferentes métodos conocidos pueden agruparse según Suzuki y Tauchi (1975) en: técnicas de detección de CO₂ (Ammon 1934); medida de incremento de acidez (Michel 1949; Shibata y Takahashi 1953; Edson 1958; Ecobichon 1970); método de determinación de acil derivados (Hestrin 1949; de la Huerga y col. 1952; Truhaut y Vernin 1964) y determinación colorimétrica de tiocolina (Ellman y col. 1961; Miyamoto y col. 1972; George y Abernethy 1983).

El método de Ammon se basa en la determinación manométrica durante 40 minutos y a 38°C, del CO₂ liberado al reaccionar en una vasija de Warburg el acético procedente de la hidrólisis enzimática del sustrato (bromuro de acetilcolina), con bicarbonato sódico que se agrega a la mezcla de reacción. Esta técnica es muy precisa pero requiere aparataje complicado y hoy día totalmente obsoleto.

El segundo grupo de técnicas citadas consiste en la determinación de la modificación del pH en el medio de reacción, producido por la aparición de ácido acético procedente de la hidrólisis. El decremento de pH es proporcional a la concentración del ácido, y por lo tanto a

la actividad enzimática. Este método, propuesto por Michel en 1949, ha gozado de gran popularidad, por su sencillez y la posibilidad de utilizarlo para medidas in situ, sin transporte de las muestras al laboratorio. Muchos autores han introducido diferentes modificaciones que pueden resumirse en tres tipos: El método original de Michel y la modificaciones posteriores de Aldridge y Davies 1952; Suzuki y Tauchi 1975; y Gibson y Guibault (1976), utilizan un electrodo de vidrio; es aplicable a suero y sangre total humana o animal, así como a tejidos, solo con ajustar las condiciones del tampón requerido en cada caso. Reciben la denominación general de técnicas pH-stat. El equipamiento necesario es simplemente un pHmetro y un baño incubador; la técnica presenta una exactitud de $\pm 1\%$ aunque requiere condiciones de trabajo muy estrictas.

Diferentes autores han introducido electrodos selectivos como el de ión potasio (Kellner 1989) o los de platino (Gruss y col. 1988) al que a menudo se añaden enzimas inmovilizadas en matrices de albúmina glutaraldehído (Yao y Wasa 1984) lo que aumenta el poder de sensibilidad de la técnica hasta 0.001-0.08 unidades (unidad definida como cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 micromol de sustrato por minuto). También se han utilizado otras técnicas conductimétricas (Duffy y Wallach 1988).

Edson (1958) realiza una valoración semicuantitativa del ácido liberado, por el cambio de color sufrido por el azul de bromotimol respecto a patrones coloreados de

referencia. Otros autores (Shibata y Takahashi 1953) proponen otras disoluciones indicadoras. Aunque mucho menos exacta que la anterior ($\pm 12.5\%$), la correlación de esta técnica titrométrica con la de Michel es aceptable y se ha utilizado durante muchos años como ensayo rápido de campo para el control de trabajadores expuestos a inhibidores de la colinesterasa. Solo es válida para la actividad sérica.

Por último, también se ha utilizado la titulación del ácido con una base, normalmente hidróxido sódico, manteniendo el pH constante. Este método fue introducido por Stedman en 1932 y posteriormente desarrollado como método de rutina y automatizado mediante el uso de un titulador automático 'Radiometer' (Nabb y Whitfield 1967; Ecobichon 1970).

Tomita y Kamei (1985) basan la valoración de la actividad enzimática midiendo la liberación del ácido acético no por cambios de pH, sino mediante una serie de reacciones acopladas. En primer lugar transforman el acético en acetilfosfato en presencia de ATP y acetato quinasa y el ADP producido se acopla con piruvato quinasa y lactato deshidrogenasa en presencia de fosfoenolpiruvato y NADH. La cantidad de NADH consumida se determina por absorción UV a 340nm. Han demostrado la linealidad de la reacción hasta 3300 U/L.

En 1949, Hestrin desarrolló un método colorimétrico modificado posteriormente por de la Huerga (1952), Truhaut y

Vernin (1964) y He (1986), basado en la condensación en medio alcalino de los O-acil derivados con hidroxilamina, que da lugar a ácido hidroxámico. A su vez este origina un derivado de color rojo púrpura, con iones férricos en medio ácido, cuya intensidad valorada espectrofotométricamente a 540 nm es proporcional a la cantidad de sustrato no hidrolizado cuando se utiliza acetilcolina o sus derivados como sustrato.

Prince (1966) propuso un método fluorimétrico muy sensible, capaz de detectar cantidades muy bajas de enzima, de hasta 0.0003 unidades. El procedimiento se basa en la hidrólisis por la acetilcolinesterasa del ioduro de 1-metilacetoxiquinolina. Es un método muy rápido, de ejecución muy sencilla, adecuado para estudios cinéticos. La fluorescencia del producto de la reacción se observa a 505 nm tras excitación a 406 nm. Las lecturas se realizan a intervalos de 1 min durante varios minutos y los resultados se registran como incrementos de fluorescencia frente a tiempo. Para hacer la corrección adecuada de los resultados debido a hidrólisis espontánea del sustrato, es necesaria la inclusión de pruebas en blanco que contengan todos los reactivos menos la solución enzimática. Utilizando el mismo sustrato, este autor desarrolló también una técnica espectrofotométrica (Prince 1966).

El método que sin lugar a dudas ha alcanzado mayor difusión es el de Ellman y col. (1961). Consiste en una

determinación colorimétrica sencilla y rápida. Utiliza acetiltiocolina como sustrato y valora la tiocolina liberada por la intensidad del color amarillo aparecido al reaccionar esta sustancia con ditiobisnitrobenzoato. Se forma 5-tionitrobenzoato que presenta un fuerte máximo de absorción a 412 nm. Estos autores hicieron un estudio exhaustivo de la técnica y de las condiciones del ensayo, que se adapta a la valoración de la enzima AChE en sangre total, eritrocitos lavados y tejidos. Posee gran sensibilidad y requiere muy pequeña cantidad de muestra (10 microl de sangre). Existe la posibilidad de inhibir la ChE plasmática con sulfato de quinidina.

Las técnicas actuales de valoración de ChE plasmática se han basado en última instancia en la técnica de Ellman, utilizando preferiblemente butiriltiocolina como sustrato (Knedel y Bottger 1967) y la misma reacción de detección con ditiobisnitrobenzoato, pero como el máximo de absorción coincide con la banda Soret de la hemoglobina (410 nm), que puede estar presente en el medio, algunos autores han introducido variantes a la técnica original de Ellman. Así Dietz y col. (1972) utiliza propioniltiocolina como sustrato alternativo de la colinesterasa sérica. También se ha sugerido sustituir al ditiobisnitrobenzoato, por otros reactivos capaces de detectar grupos tiol, como 4,4'-dipiridindisulfuro (Ampulski y col. 1969), ácido 6,6'-ditiodinicotínico (Grassetti y col. 1975), 4,4'-bis-dimetilamino difenilcarbinol (Rorhbach y col. 1973), 2,2'-

ditiobis-(5-nitropiridina) (Swatditat y Tsen 1972). Para inhibir la ChE, George y Abernethy (1983) utilizan el detergente cloruro de benzetonio en vez de sulfato de quinidina propuesto por Ellman, que permite leer a 440 nm, lo que aleja el máximo de la hemoglobina que además es trasladado a 405 nm (en lugar de 410) y la intensidad reducida casi a la mitad. Otros autores (Voss y Sachsse 1970) han sugerido otras técnicas para soslayar la presencia de hemoglobina.

Otra fuente de variabilidad de las técnicas existentes se basa, como podemos ver, no ya en la técnica de detección utilizada, sino en la sustancia elegida como sustrato de la reacción enzimática: acetilcolina, específica de la AChE eritrocitaria, butirilcolina, específica de la ChE plasmática, los respectivos tioderivados, propionilcolina, con igual afinidad por ambas enzimas, 1-metilacetoxiquinolina, que permite detección por fluorescencia, muy sensible, o p-hidroxibenzoilcolina.

La primera referencia encontrada sobre la utilización de este último sustrato es de 1985 (Yamanichi y col. 1985). Su uso requiere la introducción de una reacción acoplada con p-hidroxibenzoato hidroxilasa dependiente de piridinnucleótidos. La valoración cuantitativa se lleva a cabo midiendo la disminución de NADPH a 340 nm (Panteghini y col. 1986). Los valores que se obtienen son algo superiores a los de los métodos colorimétricos (Huizenga y Gips 1987), pero no suelen presentarse interferencias por

otros componentes del suero, ni por aditivos, excepto el ión F⁻ o el citrato que inhiben la pseudocolinesterasa (Huizenga y Gips 1987; Kuroiwa y col. 1987). La actividad medida con este sustrato se relaciona estrechamente con la obtenida utilizando acetilcolina, por lo que los resultados son perfectamente comparables (Van der Heiden y col. 1987, Saruta 1988).

Por último, se han hecho algunos intentos de determinación mediante técnicas inmunoenzimáticas (Hangaard y col. 1984, Brimijoin y col. 1987).

**VALORES DE REFERENCIA
EN LA BIBLIOGRAFIA**

Lo primero que resalta al revisar la bibliografía es la confusión terminológica y frecuentes inexactitudes en la denominación de las enzimas, que conducen a contradicciones entre los diferentes autores.

Por ejemplo, un trabajo realizado con una buena base epidemiológica (3.372 individuos), cuyo título "Total Cholinesterase in Plasma" (Lepage y col., 1985), pueda inducir a pensar que se han valorado las colinesterasas totales del plasma. Sin embargo el sustrato utilizado fué butiriltiocolina, por lo que en realidad sólo se determinó la actividad de la pseudocolinesterasa.

Otro trabajo titulado "Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase" (Lewis y col., 1981), da valores especialmente bajos de ChE debido a que, lo que realmente mide en plasma es actividad acetilcolinesterásica de la ChE, ya que utiliza como sustrato acetiltiocolina.

Otra causa de confusión es variabilidad de muestras, de unidades, y de parámetros de referencia utilizados (hematocrito, hemoglobina, globulo rojo, litro de éstos, etc) por los distintos autores.

En la tabla adjunta exponemos unos ejemplos de los valores que se encuentran en la bibliografía, y que estimamos suficientes para demostrar nuestra afirmación.

EJEMPLOS DE VALORES BASALES EN LA BIBLIOGRAFIA

	COLINESTERASA			ACETILCOLINESTERASA			REFERENCIA
	<u>Hombres</u>	<u>Ambos</u>	<u>Mujeres</u>	<u>Hombres</u>	<u>Ambos</u>	<u>Mujeres</u>	
Media	5953.6 U/L			239.5 U/ht*			Graells y cols., 1990
Desviación	± 1189.9						
Rango							
Media		67 KU/L			10.2 U/gHb		Karlsen y cols., 1981
Desviación		± 12			± 17		
Media	6560 U/L		6530 U/L				Lepage y cols., 1985
Rango		2000-12000			-		
Media					7.77 Utotal/mL		Hackathorn y cols., 1983
Media	1822 U/L				14330 U/ht*		Lewis y cols., 1981
Desviación	± 412				± 814		
Rango					4.2-7.7 KU/L		George y Abernethy, 1983
Rango		5.4-13.20 KU/L					Knedel y Böttger, 1967
Rango					(1.08±0.13)10 ⁻¹⁵ KU/GR		Ellman y cols., 1961

* ht = hematocrito.

PARTE EXPERIMENTAL

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

Conforme queda recogido en los Antecedentes Bibliográficos, la determinación de la actividad de las colinesterasas puede ser de utilidad en el diagnóstico clínico de distintas patologías, además de las de etiología neurotóxica, así como para la evitación de efectos indeseables en situaciones laborales, terapéuticas farmacológicas y medicaciones anestésicas en cirugía. Efectivamente, cada vez es más frecuente la valoración de colinesterasa plasmática, que se ha llegado a incluir en protocolos rutinarios de análisis clínicos.

Sin embargo, en la práctica vemos que no se extrae de este parámetro bioquímico todo el provecho que puede ofrecer, debido, a nuestro juicio, a que la bibliografía no proporciona, a pesar de su amplitud y diversidad, referencias y criterios suficientemente concretos que sirvan de apoyo al clínico.

Entendemos que esta falta de concreción, e incluso las divergencias y contradicciones de los distintos autores, tiene su origen en múltiples causas, como las siguientes:

a. Subestimación de que ChE y AChE son dos enzimas diferentes y con distinta significación fisiológica.

b. Los amplios márgenes que se aceptan como normales en ambas enzimas.

c. Confusión entre los valores enzimáticos obtenidos de diferentes muestras (suero, plasma, sangre hemolizada, hematíes).

d. Unidades en que se expresan las actividades enzimáticas, especialmente la AChE, y parámetros a que se refieren (volumen de sangre total, hematocrito, por hematíe, por volumen de hematíes, expresado por litro o en valor hematocrito, etc).

e. Insuficiente atención a situaciones del paciente (ayunas, post-prandial, embarazo, consumo de alcohol o medicamentos, etc).

Con la intención de contribuir al mejor aprovechamiento clínico y científico de estos índices bioquímicos, hemos planteado nuestra Hipótesis de Trabajo intentando responder a las siguientes cuestiones:

I.- Dados los extensos rangos que en la bibliografía se admiten para la ChE, ¿podría resultar la actividad de la AChE un parámetro, de no mayor dificultad de obtención, y de menor variabilidad interindividual?

II.- ¿Cual de ambas actividades enzimáticas puede ser más representativa y útil en las diferentes situaciones clínicas?

III.- De la comparación de las distintas formas de expresión de los resultados analíticos ¿cual/es puede/n considerarse recomendable/s para su aplicación a los distintos medios?

IV.- ¿Cual es la estabilidad de las enzimas después de la extracción de las muestras biológicas?

V.- ¿Puede establecerse alguna correlación entre los valores de ambas enzimas y sus actividades en los distintos medios y tejidos humanos o animales?

VI.- En caso de disponer de suficiente casuística, ¿lograríamos encontrar los niveles de actividad característicos de distintas situaciones clínicas o terapéuticas?

PLAN DE TRABAJO

El Plan de Trabajo establecido ha abarcado las siguientes fases:

I.- Puesta a punto de los métodos analíticos seleccionados y comprobación de la influencia de la temperatura durante el ensayo en las actividades enzimáticas; normalización de las formas de expresión de la actividad.

1.- ChE en plasma (U/L)

2.- AChE en:

2.1.- Sangre total hemolizada (referido a 1 eritrocito)

2.2.- Sangre total hemolizada (referida a gramo de hemoglobina)

2.3.- Glóbulos rojos (referido a 1 eritrocito)

2.4.- Glóbulos rojos (referido a gramo de hemoglobina)

2.5.- Tejidos (referido a mg de proteína)

II.- Estudio de la estabilidad de las enzimas, mantenidas las muestras biológicas en frigorífico (4°C), durante 12, 24, 48 horas, 1 semana, 1 mes.

III.- Establecimiento de valores basales o normales de ambas enzimas, en los medios referidos en I, en rata y humanos sanos, de ambos sexos, en ayunas.

IV.- Estudio estadístico de la correlación de los niveles de

actividad entre los distintos medios (I).

V.- Determinación de las actividades tras absorción de alimentos, alcohol, anestésicos e inhibidores (compuestos organofosforados), así como en situaciones patológicas.

VI.- Tratamiento estadístico de los resultados analíticos.

MATERIAL Y METODOS

1.- MUESTRAS HUMANAS.

1.1 Muestras de sangre con EDTA dipotásico proporcionadas por la Clínica del Sagrado Corazón, de Sevilla, y procedentes de los siguientes grupos de individuos:

- a - Supuestamente normales. Sin alteraciones en la analítica clínica de rutina. Ambos sexos. En ayunas.
- b - Enfermos renales de la unidad de diálisis. Ambos sexos. No necesariamente en ayunas.
- c - Enfermos intervenidos quirúrgicamente, todavía en fase de anestesia. Ambos sexos. En ayunas.
- d - Individuos sometidos a estudio de curva de tolerancia a la glucosa. Se consideraron las muestras correspondientes a la glucemia basal (ayuna) y la correspondiente a los 120 minutos tras la administración de glucosa.
- e - Mujeres embarazadas, sin especificación del mes de gestación. En ayunas.
- d - Pacientes hepáticos sin especificación del diagnóstico.

1.2 Muestras procedentes del Instituto Nacional de Toxicología de personas intoxicadas por metales.

2.- MUESTRAS ANIMALES.

En experimentación animal no solo se han de considerar las características del animal y el estado de salud al comienzo del experimento, sino también se han de tener en cuenta los factores ecológicos, para lo cual el experimentador debe tomar conciencia de las condiciones de mantenimiento de estos animales. Por ello durante toda la experimentación se ha utilizado un estabulario o bioterio de mantenimiento que cumple las líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales (Directiva 86/609/CEE, 1986) y Real Decreto 223/1988 de 14 de Marzo; sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los factores que se han controlado, son tanto los que influyen en el macroambiente (sala en que se mantienen los animales), como en el microambiente (interior de la jaula en que se alojan):

- Factores microbianos:

Se han tenido en cuenta tanto el estado de salud de los animales, con análisis de rutina efectuados periódicamente, como el control sanitario de salas, aire, jaulas, accesorios, cama, dieta y agua. Asimismo se han cumplido las normas de higiene y protección para los propios cuidadores e investigadores en contacto directo o indirecto con los animales.

-Factores físicos:

El sistema de ventilación ha garantizado ciclos de 15-20 renovaciones de aire filtrado por hora, que alcanza por igual a todas las jaulas. La temperatura constante en todas las épocas del año, ha sido de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y la humedad relativa de 55 ± 10 . Se han alternado ciclos de luz oscuridad (12:12) con lámparas de luz fría de 40w de potencia.

-Factores químicos:

Se ha reducido al mínimo el posible contacto de los animales con productos químicos, mediante control de hipotéticos contaminantes de dieta y agua, y cumplimiento de las normas para la limpieza de animalarios y jaulas con utilización de los detergentes y desinfectantes recomendados.

A la recepción de los animales, se han mantenido en una sala de cuarentena durante 7 días, al final de la cual se someten a controles físicos y sanitarios antes de su utilización.

Las jaulas utilizadas para ratas han sido de metacrilato (Tecniplast Tipo 3) con suelo de rejilla de acero inoxidable, recomendadas para estudio de toxicidad para evitar el polvo y contaminantes procedentes de los lechos. Permiten una buena circulación de aire y evitan condensación de humedad y concentración de calor lo que daría lugar a microclimas en el interior de la jaula,

diferentes de las condiciones controladas en la sala correspondiente.

La alimentación, ad libitum, consistió en pienso Sanders, especial para ratas, de la siguiente composición:

Glúcidos.....	69%
Proteínas brutas.....	18%
Grasas.....	3%
Fibra bruta.....	5%
Sustancias minerales.....	5%

Los conejos recibieron también ad libitum, pienso de "Cereales y Piensos. M. Prieto. Brenes. Sevilla" de la siguiente composición:

Cereales.....	39.7%
Tortas vegetales.....	17%
Subproductos.....	10%
Alfalfa harinificada.....	13.15%
Vitaminas y Minerales.....	2.15%

El agua suministrada fue de la red local.

Todos los experimentos se han efectuado con los animales en ayunas, salvo aquellos en que se estudió la influencia de la alimentación, en donde se trabaja con muestras de sangre extraídas a distintos tiempos después de la ingesta.

Todos los datos, tanto los factores ambientales como



de los animales, se registran directamente y las hojas correspondientes se archivan cumpliendo así las normas de buena práctica de laboratorio, incluido lo referente a SOP (GLP, OCDE, 1981, CEE, 1987).

2.1 ANIMALES.

2.1.1 RATA.

La elección del animal de laboratorio está condicionada por el tipo de investigación a realizar. En nuestro caso se han utilizado roedores, pertenecientes a la categoría de agrobióticos y dentro de ella, haloxénicos o convencionales. Son por tanto individuos sanos procedentes de criaderos de máxima garantía con una flora microbiana normal lo que permite respuestas fisiológicas y metabólicas normales.

Se han utilizado 163 ratas Wistar, (128 machos y 35 hembras) adultas de 180-200 gramos de peso al inicio del tratamiento, suministradas por IFFA-CREDO Lyon (Francia) y remitidas por vía aérea.

El trabajo experimental se ha efectuado con ambos sexos, ya que en su desarrollo hemos comprobado variaciones de la actividad de la colinesterasa en función del mismo.

2.1.2 CONEJOS.

Se han utilizado 8 conejos albinos neozelandeses,

machos, adultos, suministrados por PANLAB (Barcelona).

2.2 EXTRACCION DE SANGRE.

2.2.1 Rata:

La sangre se extrajo por punción en seno venoso retro-orbitario con ayuda de una pipeta Pasteur heparinizada estéril, según el método de Hoffman, (Sainz Moreno y col., 1983).

Se presiona sobre saco conjuntival hasta que se perfora y se deja fluir la sangre por capilaridad.

2.2.2 Conejo:

Se utilizó la vena marginal de la oreja, con aguja.

En ambos casos la sangre se recoge en tubos con heparina.

2.3. ESTUDIO CON TEJIDOS ANIMALES.

2.3.1. Especies utilizadas.

Se utilizan las mismas ratas referidas en el apartado 2.2.1.

2.3.2. Extracción y preparación de órganos.

Tras el sacrificio de los animales con guillotina se extrae cerebro, ambos riñones y nervio ciático (bilateral). Se lavan en solución salina 0.9%. mantenida en frigorífico a

4°C. Se congelan inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantienen en congelación a -80°C hasta su análisis.

2.3.3. Homogeneización de órganos: obtención de un extracto crudo.

Los órganos descongelados se trocean y se homogeneizan en tampón fosfato 0.1M pH 8.0 en proporción 1:5(p/v) utilizando un homogeneizador Potter-Eveljem provisto de embolo de vidrio para el riñón y de teflón para el tejido nervioso. Todo el proceso se efectua en cámara fría a 4°C.

El extracto obtenido se somete a filtración a través de tejido de nilón y se centrifuga a 2000 rpm durante 10', se filtra de nuevo el sobrenadante a través de papel de filtro. El extracto crudo obtenido puede procesarse o conservarse - 80°C hasta su utilización. Las determinaciones enzimáticas se realizaron en extractos diluidos diez veces a partir del original(dilución final 1:50).

2.4 TRATAMIENTOS.

Después de un estudio previo de los valores de actividad enzimática en los animales control, sin tratamiento, de ambos sexos, se procede a estudiar la influencia de diferentes agentes sobre la actividad enzimática.

Para cada tratamiento los animales se agrupan en lotes de 10. Se efectuan determinaciones de actividad enzimática

en condiciones basales antes de la administración del producto ensayado, que nos sirven como control.

2.4.1 Productos administrados y pauta de tratamiento.

- Insecticidas organofosforados que se utilizan como modelo de sustancia inhibidora de colinesterasas.

DIMETOATO: (O,O-dimetil-S-(2-metilcarbamoilmetil)ditiofosfato). Bayer. DL-50, oral rata = 150 mg/Kg.

ETILPARATION: (O,O-dietyl-O-(4-nitrofenil)tiofosfato). Bayer. DL-50, oral rata = 2 mg/Kg.

MALATION: (S-(1,2-bis(etoxi-carbonil)-etil)-O,O-dimetil-ditiofosfato). Ehrenstorfer. DL-50, oral rata = 1400 mg/Kg.

Cada uno de estos productos se administró por vía oral, mediante intubación intragástrica, a 4 lotes de ratas, de 10 animales cada uno, tras 12 horas de ayuno, en cantidades correspondientes a 1/2, 1/3, 3/4 y 1 DL-50.

Los productos organofosforados se administran disueltos en aceite de oliva a razón de 0.5 - 1 mL por animal.

- Anestésicos generales:

CLORHIDRATO DE KETAMINA (Ketolar R): se administra via intravenosa, inyectando en la vena caudal, tras 12 h de ayuno, una dosis de 0.02944 g/kg correspondiente a la mitad de DL-50. El principio activo se presenta en viales con una concentración de 100 mg/kg y un volumen

total de 10 mL.

TIOPENTAL SODICO (Tiobarbital R): se administra via intravenosa, inyectando igual que antes en la vena caudal, tras 12 h de ayuno, una dosis de 21.8 mg/kg correspondiente a la mitad de DL-50. El principio activo está bajo la forma de polvo y se presenta en viales con 1 g del mismo. Se diluye el polvo en 10 mL de agua para inyectables, a partir de esta disolución se efectua la dilución pertinente conforme al volumen y cantidad de principio activo que se va a administrar al animal.

2.4.2 Tiempos de las extracciones hemáticas y del sacrificio.

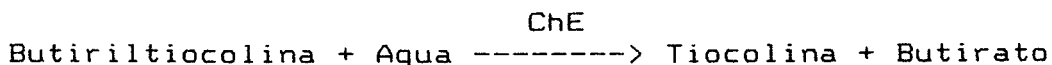
Organofosforados: Basal, 30', 1 h, 2 h, 4 h, 24 h.

Anestésicos: Basal, 2 h, 24 h.

3.- METODOS ANALITICOS.

3.1 **Determinación de colinesterasa sérica, ChE (EC 3.1.1.8),** (Método de Knedel y Bottger, 1967. Kit Boehringer nº cat 124.125 Monotest).

a.- **Fundamento:** se trata de una valoración colorimétrica, basada en la siguiente reacción:



Tiocolina + ditiobisnitrobenzoato ---> 2-nitro-5-mercapto-
-benzoato(1)

(1) Complejo coloreado que absorbe a 405 nm. La densidad óptica, medida en el espectrofotómetro, se relaciona a través de la fórmula $A = Ebc$ con la actividad de la enzima.

b.- Reactivos:

b.1- Substrato/cromógeno (polvo). Ioduro de butiriltiocolina (7 mmol/L) y ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (0'25 mmol/L).

b.2- Tampón: Tampón fosfato 50 mmol/L. pH = 7.7

c.- Procedimiento: Preparar dos frascos de reactivo b.1 (substrato/cromógeno) por muestra. Disolver el contenido con 3 mL de la solución de b.2 (tampón). Estabilidad 2 h. Los frascos se introducen en estufa a 37°C durante 15 minutos.

La muestra usada en este caso es plasma de sangre heparinizada.

- Ajustar el espectrofotómetro con agua destilada a 405 nm.

Luego de forma rápida:

- Añadir al frasco de reactivo 0.02 mL del plasma problema.

- Agitar, pasar a la cubeta y leer a 405 nm a los

40 mL de disolución de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.1 M.

900 mL de disolución de PO_4HNa_2 12 H_2O 0.1 M.

- Substrato: Ioduro de acetiltiocolina 0.075M (21.67 mg/mL). Disolución estable durante 10 a 15 días, a 4°C.

- DNTB= 2,2'-dinitro-5,5'-distiobenzoico 0.01M. Para su preparación se disuelven 39.6 mg de dicho agente en 10 mL de tampón fosfato 0.1 M, pH=7.0. Añadir 15 mg de CO_3HNa .

c.- Procedimiento:

Muestra: sangre heparinizada

Es aplicable para determinar tanto la actividad de AChE Total como la Eritrocitaria. En caso de sangre de rata, ambas determinaciones se efectúan con la muestra diluida al doble. Así para la Total, se diluye la sangre entera, lo que provoca su hemólisis. En el caso de la Eritrocitaria, se separa el plasma, se lavan los hematíes y luego se diluye al doble; con lo que la muestra también se hemoliza. Para la dilución de las muestras se utiliza tampón fosfato 0.1 M, pH=8.

En el caso de sangre humana, para la Eritrocitaria la muestra se prepara igual que en el caso de las ratas. Para la AChE Total se trabaja con la muestra sin diluir.

Ajustar el espectrofotómetro con agua destilada a 412nm. En tubo de centrifuga se añade 6 mL del tampón citado (0.1M, pH=8) y se incuba a 37°C. A continuación se añade 10

μL de la muestra, se agita y se separa una alícuota de 3 mL de dicha disolución en otro tubo de centrifuga.

Actuando de forma rápida se añade a cada tubo, primero 25 μL de la disolución de DNTB, y a continuación 20 μL de la disolución del sustrato. Agitar, pasar a cubeta y medir a 412 nm. Se hacen 6 medidas para una misma muestra a intervalos de un minuto.

d.- Cálculos:

Se determina el incremento de D.O./min a los 3 min y a los 6 min. El valor de la actividad se puede referir bien a glóbulos rojos, bien a hemoglobina. En el primer caso, expresándola en nanounidades por eritrocito, el cálculo se realiza conforme a la expresión:

$$n\text{U/GR} = 44117 \times 10^n (n=-3) \times \text{incremento de absorbancia por minuto / número de glóbulos rojos (en millones).}$$

Para expresar la actividad en relación con la hemoglobina, se calcula:

$$\text{U/g Hb} = 44117 \times \text{incremento de absorbancia por minuto / g Hb por litro.}$$

3.3.- **Determinación de acetilcolinesterasa en tejidos** (Método de Ellman, 1961).

a.- **Fundamento:** El mismo que se ha descrito para AChE eritrocitaria.

b.- Reactivos: Los mismos que se usaron para determinar AChE eritrocitaria.

c.- Procedimiento:

Se toma el tejido (cerébro, ciático o riñón), se pesa y se le añade 1:5 (P/V) de tampón fosfato 0.1 M, pH=8. Se homogeiniza en homogeneizador Potter. Se filtra con nilón. Se centrifuga el extracto a 2000 rpm durante 10 minutos, y se filtra por papel de filtro. Se separa una alícuota de 1 mL y se añade 9 mL de tampón fosfato, para obtener una dilución final de la muestra 1:50. En este extracto se efectuará la medida de actividad enzimática. Todo el proceso citado se realiza en cámara fría a 4°C.

Se efectua la determinación por duplicado. A cada tubo de centrifuga se añade 2.6 mL de tampón fosfato y luego 0.4 mL del extracto último obtenido. Antes de añadir la muestra, se incuba el tampón a 37°C. Se ajusta el espectrofotómetro con agua destilada a 412 nm. Entonces se actua de forma rápida, añadiendo a los tubos, primero 100 µL de la solución de DNTB y a continuación 20 µL de la solución del substrato que puede ser ioduro de acetiltiocolina o ioduro de butiriltiocolina. Las medidas se efectuan a 37°C, a los mismos tiempos que AChE eritrocitaria.

d.- Cálculos.

$$U/L=(\text{incremento D.O./mg Prot/LExt}^{\circ}) \times 573.53$$

3.4.- Determinación de proteínas (Método Bradford, 1976).

a.- Fundamento:

La determinación de proteínas por este método se basa en el incremento de la absorbancia desde 465 nm a 595 nm de una solución de azul brillante de Coomassie G-250 cuando este se une a proteínas.

b.- Reactivos:

- Disolución patrón de albumina bovina de 1 mg/mL de concentración. A partir de esta se preparan 3 patrones por dilución: Patrón 1:0.1 mg/mL, Patrón 2:0.2 mg/mL, Patrón 3:0.5 mg/mL.

- Reactivo: tampón fosfato adicionado de azul brillante de Coomassie G-250.

c.- Procedimiento:

Se preparan 5 tubos a los que añade 100 μ L de solución salina fisiológica al blanco, 100 μ L de cada disolución patrón preparada y 100 μ L del extracto de tejido: cerebro, riñón y ciático, que previamente se han diluido por 5 los dos primeros y a la mitad el último.

3.5.- Recuento de globulos rojos.

a.- Fundamento:

Los eritrocitos adoptan en la disolución de reactivo la forma de bolas (poco hipotónica frente a eritrocitos). Su

cantidad puede determinarse entonces mediante una medición de turbidez (turbidimetría) por medio de una curva de referencia.

b.- Reactivos:

Disolución de reactivo (pH=2.5)

Na₂SO₄ ----- 0.19 mol/L

CH₃COOH ----- 2.8 mol/L

c.- Procedimiento:

Se efectúa la medida a 546 nm. Se calibra el fotómetro con la solución a la que luego se agrega la muestra. Una vez hecho el calibrado, se ponen en la cubeta 2000 µL de disolución de reactivo, 5 µL de la muestra que no podrá estar hemolizada. Se agita la mezcla, y se mide la densidad óptica.

d.- Cálculos:

El número de eritrocitos por milímetro cúbico de sangre se calcula a partir de una curva patrón elaborada con sangre de rata o humana, según el caso, que se sometió a diferentes diluciones. El valor de densidad óptica se lleva a la curva patrón para obtener el número de globulos rojos.

Las muestras humanas se analizaron con un instrumento Technicon H*1.

3.6.- **Determinación de hemoglobina.** Método de la cianida de hemoglobina (Kampen E.J., Zijistra W.G.. Clin. Chim. Acta 6 538, 1961).

a.- Fundamento: La reacción es:

Hemoglobina + Cianida + Ferricianuro ----> Cianida de
hemoglobina

b.- Concentración de reactivos en la disolución usada en este caso: Tampón fosfato pH=7.2 (2.5 mmol/L), hexacianoferrato de potasio(III) (0.6 mmol/L), Cianida de potasio (1.0 mmol/L), Cloruro de sodio (1.5 mmol/L), Detergente c.s.

c.- Muestra: Se trabaja con sangre total heparinizada.

d.- Procedimiento:

Una vez seleccionado el programa, en la cubeta del espectrofotómetro COMPUR M2000, se pone 1 mL de solución de reactivo, se equilibra el fotómetro, se agrega 5 µL de la muestra (sangre entera), se agita y se espera 3 minutos de tiempo de reacción. Se obtienen los g Hb/dL de sangre, dato que luego se utilizará para efectuar los cálculos en lo referente a la actividad de AChE eritrocitaria.

La hemoglobina en la sangre humana se determinó en un instrumento Technicon H*1.

4.- INSTRUMENTOS Y PRODUCTOS UTILIZADOS

4.1. Aparatos utilizados.

Espectrofotómetro UV-vis Spectronic 20 Bausch & Lomb.

Espectrofotómetro Uvikon 860, Kontron Instruments, equipado con Plotter 800 y termostatzado.

Espectrofotómetro UV-vis Hitachi 704.

Autoanalizador Technicon H*1.

Fotómetro COMPUR M2000.

pHmetro HI-8418 Hanna Instruments.

Balanza granatario Mettler PE 2000 provista de cubilete para pesar animales y de integrador que hace la media de 10 pesadas.

Balanza semianalítica Mettler PI 3000.

Balanza analítica Mettler AE 240.

Centrífuga Sigma 201.

Baños Selecta Unitronic 320 DR.

Congelador Koxka de -80°C.

Agitador Heidolph REA x 2000

4.2. Productos empleados a los tratamientos en los animales.

Clorhidrato de Ketamina. Ketolar R. Parke-Davis, S.A.

Tiopental sódico. Tiobarbital. Andalucía Farmacéutica SA

Malation 98.2% . Labor Dr. Ehrenstorfer.

Etilparation. Bayer.

Dimetoato. Bayer.

4.3. Reactivos.

Ioduro de acetiltiocolina. Merck.

Ioduro de butiriltiocolina. Merck.

DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzoico). Merck.

Bio-Rad protein assay. GmbH.

Erythrozyten Kit. Bayer Diagnostic.

Kit Cholinesterase. Monotest. Boehringer-Mannheim.

Kit Haemoglobin. Bayer Diagnostic.

Kit Prot. Gesamt-Protein. Bayer Diagnostic.

Albúmina Bovina 98-99% . Sigma.

Fosfato monopotásico. Merck.

Fosfato disódico. Merck.

5.- METODO ESTADISTICO.

El análisis estadístico de los datos se realizó con un programa SIGMA en un ordenador personal IBM 5170.

De cada conjunto de datos por separado se calculó, mediante una estadística básica, la media, la desviación típica, coeficiente de variación y rango y se comprobó su distribución normal.

Seguidamente se realizó un contraste bilateral, por comparación de medias estandar, entre los valores de las actividades enzimáticas bajo la influencia de las diferentes variables (temperatura de ensayo, sexo, etc).

Se establecieron las ecuaciones de regresión que ligan las actividades y sus formas de expresión, así como la bondad del ajuste entre dicha recta teórica y los datos experimentales, aplicando un análisis de varianza ANOVA de la regresión y una comparación estadística de los coeficientes de correlación respecto a cero.

Dada la gran variabilidad en los valores encontrados para algunos grupos, se procedió a una depuración estadística de los datos.

El contraste bilateral utilizado calcula el nivel de significación a partir de una "t" de Student, si las varianzas son homogéneas y de una "F" de Fisher si no lo son. La homogeneidad de las varianzas se comprobó mediante un test de Cochran. Se considera un valor de $p < 0.1$ como

"casi significación" y "significación estadística" a partir de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se recogen seguidamente los resultados analíticos obtenidos en nuestro trabajo experimental.

Las tablas I a la XIII se refieren a datos obtenidos en humanos y a sus correspondientes estudios estadísticos.

Las tablas XIV a XXIII y figuras 2, 3 y 4 reflejan los resultados de la experimentación animal.

TABLA I. Influencia de la temperatura del ensayo en la actividad de la AChE en humanos.

	Tª AMBIENTE	37°C	NIVEL SIGNIF.
HOMBRES	n=39	n=10	
AChET/GR	1265.26	1541.00	p<0.001
AChET/HB	40.18	49.10	p<0.001
AChEe/GR	1187.59	1150.11	NO
AChEe/HB	36.57	38.30	NO
MUJERES	n=24	n=15	
AChET/GR	1335.56	1587.87	p<0.05
AChET/HB	42.50	49.27	p<0.01
AChEe/GR	1200.37	1206.60	NO
AChEe/HB	38.58	39.27	NO

TABLA II. Valores basales de ChE y AChE en la población estudiada.

	MEDIA	σ	C.V.	RANGO
HOMBRES (n=10)				
ChE	10313.16	2102.50	20.39%	4927 - 14271
AChET/GR	1541.00	247.54	16.06%	1212 - 1933
AChET/HB	49.10	4.53	9.23%	42 - 55
AChEe/GR	1150.11	175.03	15.22%	922 - 1382
AChEe/HB	38.30	5.94	15.52%	29 - 51
MUJERES (n=15)				
ChE	9337.77	2220.08	23.77%	6072 - 15762
AChET/GR	1587.87	237.86	15.73%	1100 - 1885
AChET/HB	49.27	7.08	14.38%	36 - 60
AChEe/GR	1206.60	122.78	10.17%	974 - 1419
AChEe/HB	39.27	4.16	10.61%	34 - 49

TABLA III. Influencia del sexo en ChE y AChE en humanos.

	NIVEL SIGNIFICACION	HOMOGENEIDAD VARIANZA
ChE	$p < 0.05$	SI
AChET/GR	NS	SI
AChET/HB	NS	SI
AChEe/GR	NS	SI
AChEe/HB	NS	SI

TABLA IV. Estabilidad de ChE y AChE, a 4°C, durante un mes.

IVa HOMBRES

		ChE	AChE TOTAL	
TIEMPO	Nº		GR	HB
0	12	8044.67 ± 1071.06	1265.26 ± 213.76	40.18 ± 5.96
12 horas	14	8923.61 ± 2498.92	1182.86 ± 185.41	39.68 ± 5.44
24 horas	12	8006.08 ± 1669.45	1131.46 ± 214.33	37.66 ± 7.28
48 horas	8	7871.08 ± 1662.64	1157.14 ± 128.37	39.37 ± 4.62
1 semana	12	7870.25 ± 1870.62	1132.86 ± 186.37	39.22 ± 6.09
1 mes	1	5667.50* ± 729.05	1134.58 ± 202.28	40.99 ± 6.19

* p<0.001

IVb MUJERES

		ACHE TOTAL	
TIEMPO	Nº	GR	HB
0	24	1335.56 ± 179.08	42.50 ± 6.78
12 horas	29	1295.41 ± 183.03	43.60 ± 7.72
24 horas	16	1249.78 ± 198.32	40.93 ± 7.86
48 horas	10	1201.25 ± 177.95	39.55 ± 8.09
1 semana	15	1244.12 ± 157.79	42.16 ± 7.63
1 mes	16	1289.33 ± 155.34	43.87 ± 7.65

* p<0.001

TABLA V. Coeficientes de regresión lineal entre ambas enzimas y sus formas de expresión en situación basal. Humanos.

		MACHOS		HEMBRAS	
X	Y	r	SIGNIFICAC	r	SIGNIFICAC
AChET/HB	ChE	-0.1452	NO	0.6343	p<0.05
AChET/GR	ChE	-0.1282	NO	0.6155	p<0.05
AChEe/HB	ChE	-0.5602	NO	0.0857	NO
AChEe/GR	ChE	-0.1512	NO	0.0667	NO
AChET/HB	AChET/GR	0.9380	p<0.01	0.9656	p<0.01
AChEe/HB	AChET/HB	0.7533	p<0.05	0.4548	NO
AChEe/GR	AChET/GR	0.8668	p<0.01	0.4047	NO
AChEe/HB	AChEe/GR	0.8195	p<0.01	0.9426	p<0.01

TABLA VI. Actividades de ChE y AChE total en embarazadas, antes y despues de la curva de glucemia.

	Nº	ChE	AChE TOTAL	
			GR	HB
BASAL***	24	9337.77 ± 2220.08	1335.56 ± 179.08	42.50 ± 6.78
EMBARAZADAS				
GLUCEMIA t=0	24	6936.25* ± 2276.25	1334.21 ± 242.06	43.73 ± 9.41
GLUCEMIA t=120	13	7408.92* ± 2223.03	1327.08 ± 282.34	42.75 ± 8.24

* p<0.001 respecto a basal

** significación estadística, comparación glucemia t=0 / t=120

*** Media ± σ en mujeres no embarazadas

TABLA VII. Coeficientes de regresión lineal entre actividades enzimáticas y sus formas de expresión en embarazadas antes y después de curva de glucemia.

	r	NIVEL SIGNIFICACION
GLUCEMIA t=0		
AChET/HB AChET/GR	0.8363	p<0.01
AChET/GR ChE	-0.1196	NO
AChET/HB ChE	-0.0339	NO
GLUCEMIA t=120		
AChET/HB AChET/GR	0.9784	p<0.01
AChET/GR ChE	-0.6384	p<0.05
AChET/HB ChE	-0.5881	p<0.05

TABLA VIII. Actividades de ChE y AChE en algunas patologías.

VIIIa. HOMBRES

	Nº	ChE	AChE TOTAL	
			GR	HB
BASAL**	39	10313.16 ± 2102.50	1265.26 ± 213.76	40.18 ± 5.96
E. HEPATICOS	7	8481.71* ± 2346.06	1200.50 ± 402.79	35.74 ± 6.41
E. RENALES	6	7562.67* ± 1107.35	1187.50 ± 257.47	39.60 ± 9.54
INTOXICADOS POR METALES	6	10466.67 ± 573.51	1086.17 ± 78.79	-

* $p < 0.01$

** Media $\pm \sigma$ en hombres sanos

VIIIb. MUJERES

	Nº	ChE	AChE TOTAL	
			GR	HB
BASAL**	24	9337.16 ± 2220.08	1335.56 ± 179.08	42.50 ± 6.78
E. RENALES	4	5752.50* ± 3615.29	1246.00 ± 165.72	45.37 ± 5.57

* $p < 0.01$

** Media $\pm \sigma$ en mujeres sanas

TABLA IX. Coeficientes de regresión lineal entre actividades enzimáticas y sus formas de expresión en humanos con patología.

		r	NIVEL SIGNIFICACION
HEPATICOS			
AChET/HB	AChET/GR	0.9376	p<0.01
AChET/GR	ChE	0.1435	NO
AChET/HB	ChE	0.0675	NO
RENALES			
AChET/HB	AChET/GR	0.9013	p<0.05
AChET/GR	ChE	0.4559	NO
AChET/HB	ChE	0.5201	NO

TABLA X. Actividades de ChE y AChE en enfermos previa y bajo anestesia.

Xa. HOMBRES (n=9)

	ChE	AChE			
		TOTAL		ERITROCITARIA	
		GR	HB	GR	HB
PRE-ANESTESIA	9662.78 ± 3922.01	1583.78 ± 199.23	53.00 ± 6.18	1457.11 ± 231.18	47.67 ± 6.67
BAJO ANESTESIA	8347.22 ± 3678.30	1563.33 ± 169.06	52.22 ± 6.73	1389.33 ± 128.87	45.56 ± 4.00

Xb. MUJERES (n=6)

	ChE	AChE			
		TOTAL		ERITROCITARIA	
		GR	HB	GR	HB
PRE-ANESTESIA	8440.83 ± 3077.31	1584.17 ± 78.86	52.50 ± 3.21	1344.00 ± 125.95	44.17 ± 3.76
BAJO ANESTESIA	7711.50 ± 3097.39	1625.33 ± 103.57	54.00 ± 2.37	1371.33 ± 112.81	44.83 ± 3.49

* p<0.05

TABLA XI. Coeficientes de relación lineal de las actividades enzimáticas y sus formas de expresión en enfermos antes y durante la anestesia.

	HOMBRES		MUJERES	
	r	SIGNIFICAC	r	SIGNIFICAC
PREANESTESIA				
ACHET/HB ACHET/GR	0.9490	p<0.01	0.8918	p<0.05
AChEe/HB AChEe/GR	0.9214	p<0.01	0.9205	p<0.01
AChEe/GR ACHET/GR	0.8078	p<0.05	-0.4992	NO
AChEe/HB ACHET/HB	0.7696	p<0.05	-0.3394	NO
ACHET/GR ChE	0.4497	NO	0.6618	NO
ACHET/HB ChE	-0.3974	NO	0.4127	NO
AChEe/GR ChE	-0.6525	CS	-0.6185	NO
AChEe/HB ChE	-0.7555	p<0.05	-0.7966	CS
BAJO ANESTESIA				
ACHET/HB ACHET/GR	0.9644	p<0.01	0.5745	NO
AChEe/HB AChEe/GR	0.9433	p<0.01	0.9059	p<0.05
AChEe/GR ACHET/GR	0.3828	NO	0.4266	NO
AChEe/HB ACHET/HB	0.4361	NO	0.4604	NO
ACHET/GR ChE	-0.2298	NO	-0.2106	NO
ACHET/HB ChE	-0.1394	NO	-0.4995	NO
AChEe/GR ChE	-0.8388	p<0.01	-0.5561	NO
AChEe/HB ChE	-0.8548	p<0.01	-0.6989	NO

TABLA XII. Seguimiento de las actividades de ChE y AChE en enfermo con intoxicación aguda por etilparation (**)

	ChE	ACTIVIDAD	AChE TOTAL	ACTIVIDAD
ANALITICA PREVIA	3359	100.0	-	-
ACCIDENTE*	2279	67.8	50	4.7
2 MESES	3022	89.9	1380	131.4
4 MESES	4223	125.7	1210	115.2
5 MESES	3789	112.8	1360	129.5
6 MESES	3522	104.8	1050	100.0

* Ingreso en hospital en UVI

** Cada valor es la media 4-6 determinaciones en una misma muestra de sangre.

TABLA XIII. Ejemplos de seguimiento de las actividades de ChE y AChE en trabajadores expuestos a etil parati6n.

	ChE	ACTIVIDAD	AChE TOTAL	ACTIVIDAD
CASO I				
INICIAL	6565	100.0	2430	100.0
15 DIAS	4590	69.9	1300	53.5
30 DIAS	4353	66.3	710	29.2
45 DIAS	5753	87.6	860	35.4
CASO II				
INICIAL	6318	100.0	1970	100.0
15 DIAS	6002	94.9	2350	119.3
30 DIAS	5302	83.9	1354	68.7
45 DIAS	4394	69.5	1021	51.8
CASO III				
INICIAL	4660	100.0	1880	100.0
15 DIAS	3155	67.7	2590	137.7
30 DIAS	3261	69.9	1662	88.4
45 DIAS	2858	61.3	1332	70.4

CASO I: Trabajador establecido. An6lisis inicial corresponde al comienzo de la temporada de fabricaci6n.

CASOS II Y III: Trabajadores nuevos.

TABLA XIV. Influencia de la temperatura del ensayo en la actividad de la ChE y AChE en rata.

	Tª AMBIENTE	37°C	NIVEL SIGNIF.
MACHOS (n=50)			
SANGRE			
ChE	270.86	394.54	p<0.001
AChE/GR	189.92	280.66	p<0.001
AChE/HB	10.39	13.30	p<0.001
CEREBRO			
ChE	-	2.35	-
AChE	27.77	33.12	p<0.001
RIÑON			
ChE	-	1.77	-
AChE	1.43	2.17	p<0.001
HEMBRAS (n=20)			
SANGRE			
ChE	1529.47	1492.10	ND
AChE/GR	236.07	295.65	p<0.001
AChE/HB	11.97	17.02	p<0.001
CEREBRO			
ChE	-	2.70	-
AChE	30.27	32.83	p<0.001
RIÑON			
ChE	-	2.11	-
AChE	1.76	2.43	p<0.001

TABLA XV. Influencia del sexo en ChE y AChE en rata.

	NIVEL SIGNIFICACION
SANGRE	
ChE	$p < 0.001$
AChET/GR	$p < 0.001$
AChET/HB	NO
AChEe/GR	NO
AChEe/HB	NO
CEREBRO	
ChE	$p < 0.01$
AChET/GR	NO
RIÑON	
ChE	$p < 0.001$
AChET/GR	$p < 0.05$

TABLA XVIa. Estabilidad de ChE y AChE de rata, a 4°C, durante 1 mes. Sangre.

		ChE	AChE TOTAL	
TIEMPO	Nº		GR	HB
0	77	270.85 ± 85.62	-	10.39 ± 1.57
24 horas	29	-	182.86 ± 30.97	10.01 ± 1.09
48 horas	23	-	174.93 ± 46.79	9.82 ± 1.03
1 semana	29	326.54 ± 70.96	196.93 ± 40.64	10.64 ± 1.53
1 mes	33	303.36 ± 63.98	214.00 2418.64	11.40 ± 1.77

* p<0.001

TABLA XVib. Estabilidad de AChE, de rata, a 4°C, durante un mes. Tejidos.

TIEMPO	Nº	AChE	
		CEREBRO	RIÑON
0	10	33.12 ± 4.18	2.17 ± 0.16
24 horas	21	25.88 ± 12.54	1.43 ± 0.35
48 horas	19	28.76 ± 15.37	1.34 ± 0.29
1 semana	10	28.84 ± 14.26	1.31 ± 0.33
1 mes	18	20.21 ± 11.46	1.02 ± 0.18

* $p < 0.001$.

TABLA XVII. Coeficientes de regresión lineal entre actividades enzimáticas y sus formas de expresión en ratas control.

		MACHOS		HEMBRAS	
X	Y	r	SIGNIFICAC	r	SIGNIFICAC
SANGRE	SANGRE				
AChET/HB	ChE	-0.4891	NO	0.0664	NO
AChET/GR	ChE	-0.3899	NO	0.0530	NO
AChEe/HB	ChE	-	-	0.0731	NO
AChEe/GR	ChE	-	-	-0.1863	NO
AChET/GR	AChET/HB	0.6527	p<0.05	0.9114	p<0.01
AChEe/HB	AChET/HB	-	-	-0.0340	NO
AChEe/GR	AChET/GR	-	-	0.4701	NO
AChEe/GR	AChEe/HB	-	-	0.7524	p<0.05
CEREBRO	CEREBRO				
AChE	ChE	0.2220	NO	0.6183	NO
RIÑON	RIÑON				
AChE	ChE	0.4331	NO	0.6486	p<0.05

TABLA XVII. bis.

		MACHOS		HEMBRAS	
X	Y	r	SIGNIFICAC	r	SIGNIFICAC
SANGRE	CEREBRO				
ChE	ChE	0.3964	NO	0.3896	NO
AChET/HB	AChE	0.2794	NO	0.3530	NO
AChET/GR	AChE	-0.3667	NO	0.4224	NO
AChEe/HB	AChE	-	-	-0.1772	NO
AChEe/GR	AChE	-	-	-0.1058	NO
SANGRE	RIÑON				
ChE	ChE	-0.5941	NO	0.2306	NO
AChET/HB	AChE	0.2005	NO	0.2861	NO
AChET/GR	AChE	0.2465	NO	0.3103	NO
AChEe/HB	AChE	-	-	0.5326	NO
AChEe/GR	AChE	-	-	0.6554	p<0.05
RIÑON	CEREBRO				
ChE	ChE	-0.6554	NO	-0.2029	NO
AChE	AChE	0.4752	NO	-0.1201	NO

TABLA XVIII. Estabilidad de ChE y AChE en conejo. (n=8).

TIEMPO	ChE	AChE TOTAL	
		GR	HB
0	760.25 ± 62.75	233.50 ± 30.30	12.20 ± 3.35
24 horas	757.12 ± 484.77	239.25 ± 28.57	12.51 ± 3.41
48 horas	966.25 ± 621.00	224.25 ± 26.10	11.70 ± 2.90
1 semana	841.50 ± 564.41	241.00 ± 42.87	12.62 ± 4.00
1 mes	886.00 ± 546.18	272.25 ± 35.41	14.20 ± 3.76

TABLA XIX. Influencia de la ingesta del alimento en las actividades de la ChE y AChE en rata.

	AYUNO	COMIDA	NIVEL SIGNIF.
MACHOS (n=11)			
ChE	192.90	218.09	NO
AChET/GR	174.36	200.36	p<0.01
AChET/HB	9.15	10.67	p<0.01
HEMBRAS (n=10)			
ChE	1921.40	2053.50	NO
AChET/GR	337.00	406.90	p<0.01
AChET/HB	19.8	18.7	NO
AChEe/GR	222.70	237.10	NO
AChEe/HB	11.04	12.55	p<0.01

TABLA XX. Actividades de ChE y AChE de rata tras administración i.v. de la mitad de la DL-50 en anestésicos.

	Nº	TIEMPO	ChE	AChEt/HB
CONTROL	77	0	270.85 ± 85.62	10.39 ± 1.57
TIOPENTAL	4	2 HORAS	302.75 ± 39.12	10.80 ± 0.55
		24 HORAS	265.00 ± 31.71	10.90 ± 0.67
KETAMINA	9	2 HORAS	306.44 ± 57.59	11.52 ± 1.21
		24 HORAS	286.55 ± 42.02	11.56 ± 2.45

* p<0.001

TABLA XXI. Modificación de las actividades de ChE y AChE de rata por administración por vía oral de distintas dosis de etilparation. (n=5 para cada nivel de dosis)

	1/3 DL-50	1/2 DL-50	3/4 DL-50	DL-50
SANGRE				
ChE	354.20 ± 74.42	445.20** ± 118.96	174.20 ± 31.35	363.60 ± 28.60
AChET/HB	12.25* ± 0.56	12.30 ± 0.67	14.20 ± 3.39	14.80 ± 0.84
AChET/GR	248.00 ± 67.76	234.40 ± 22.97	252.60 ± 64.65	308.80 ± 51.00
AChEe/HB	9.60 ± 1.34	8.86 ± 0.96	10.88 ± 1.34	10.50 ± 1.00
AChEe/GR	163.60 ± 20.45	151.20 ± 23.66	205.00* ± 30.14	190.60* ± 9.91
CEREBRO				
ChE	2.34* ± 0.27	2.54* ± 0.19	2.74 ± 0.17	2.76 ± 0.16
AChE	29.55 ± 4.18	24.87 ± 3.77	35.72** ± 5.77	34.58 ± 3.04
RIÑON				
ChE	1.88* ± 0.08	1.97 ± 0.13	1.88* ± 0.17	2.01 ± 0.10
AChE	2.10 ± 0.10	2.15 ± 0.21	2.28 ± 0.33	2.34 ± 0.44

* p<0.05

** p<0.01

TABLA XXII. Modificación de las actividades de ChE y AChE de rata por administración por vía oral de distintas dosis de dimetoato. (n=5 para cada nivel de dosis)

	½ DL-50	¼ DL-50
SANGRE		
ChE	272.60** ± 57.58	297.00** ± 40.53
AChET/HB	7.34*** ± 1.25	14.80 ± 1.92
AChET/GR	234.20 ± 40.92	272.60 ± 21.07
AChEe/HB	6.52*** ± 0.78	11.00 ± 1.22
AChEe/GR	164.00** ± 32.15	186.20 ± 35.52
CEREBRO		
ChE	2.08 ± 0.42	1.86 ± 1.01
AChE	13.56*** ± 4.77	20.55*** ± 2.09
RIZON		
ChE	1.80 ± 0.29	1.66 ± 0.06
ACHE	1.96 ± 0.25	1.80** ± 0.06

* p<0.05

** p<0.01

***p<0.001

TABLA XXIII. Modificación de las actividades de ChE y AChE de rata por administración por vía oral de distintas dosis de malation. (n=5 para cada nivel de dosis)

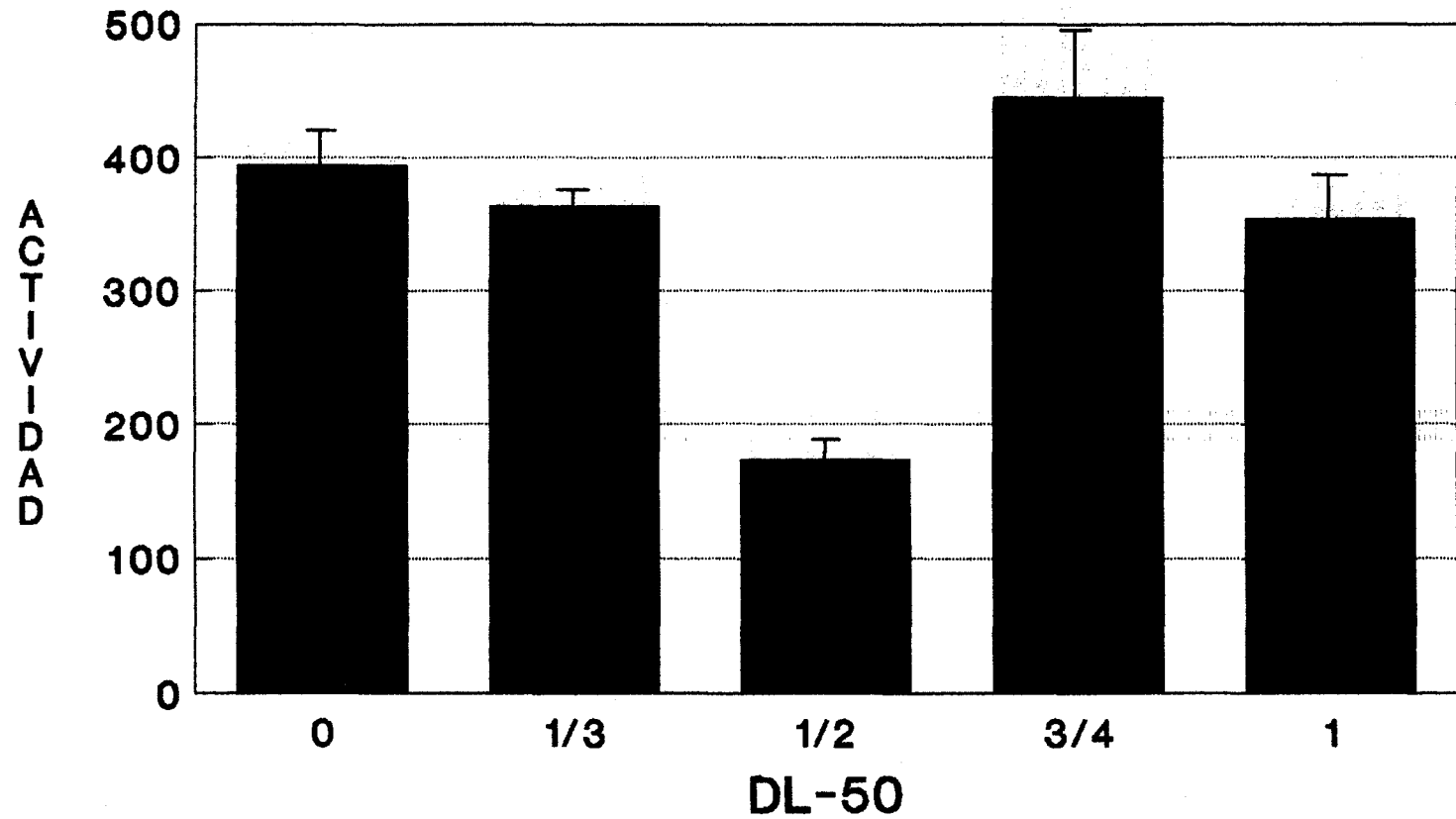
	½ DL-50	¼ DL-50
SANGRE		
ChE	408.80 ± 57.45	401.40 ± 55.05
AChET/HB	15.72 ± 2.06	14.22 ± 2.49
AChET/GR	284.80 ± 16.71	288.60 ± 7.82
AChEe/HB	8.70* ± 1.51	12.06 ± 2.62
AChEe/GR	150.60** ± 25.05	190.20 ± 27.95
CEREBRO		
ChE	2.11 ± 0.12	2.44 ± 0.23
AChE	25.91*** ± 1.16	28.53 ± 5.94
RINON		
ChE	1.75 ± 0.14	1.65 ± 0.28
AChE	2.09 ± 0.26	1.98 ± 0.18

* p<0.05

** p<0.01

***p<0.001

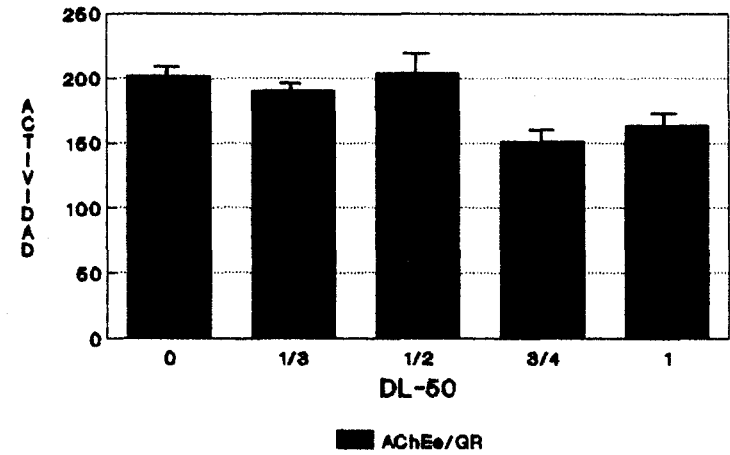
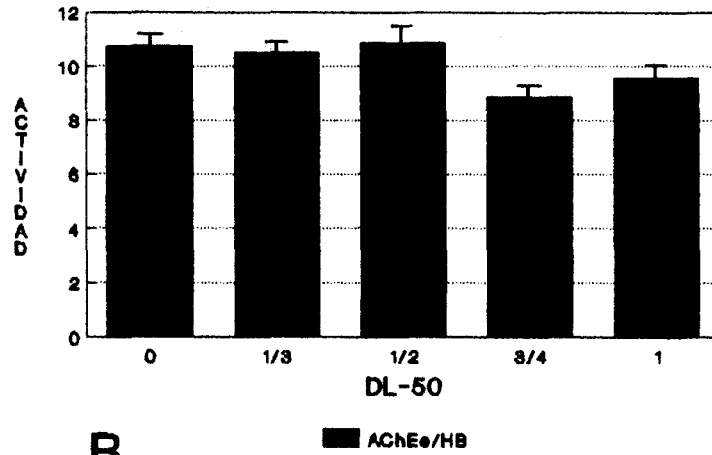
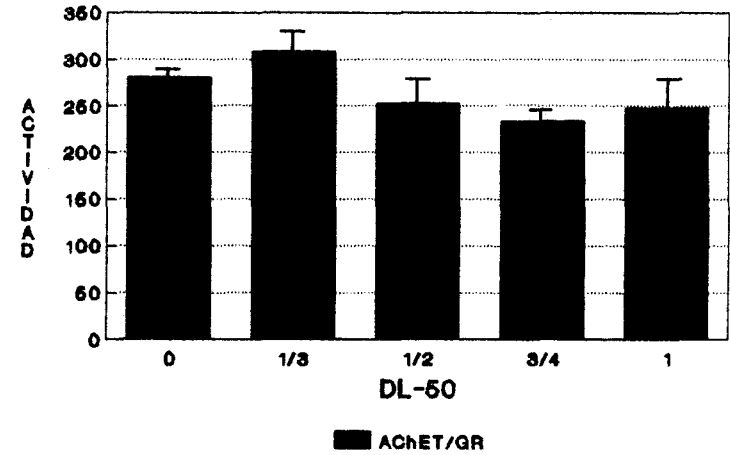
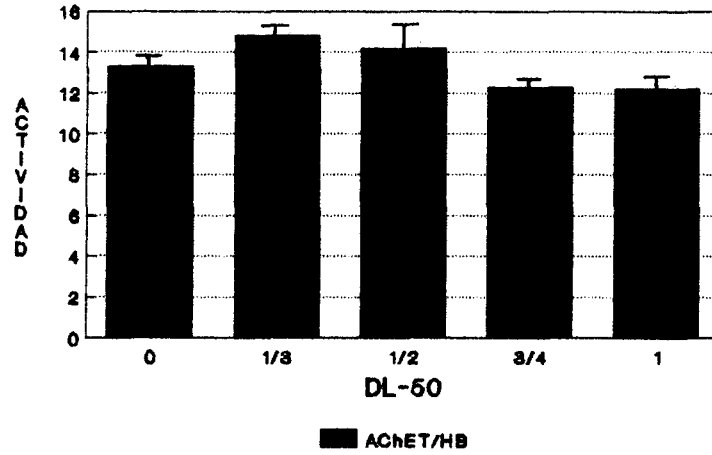
ETILPARATION



A

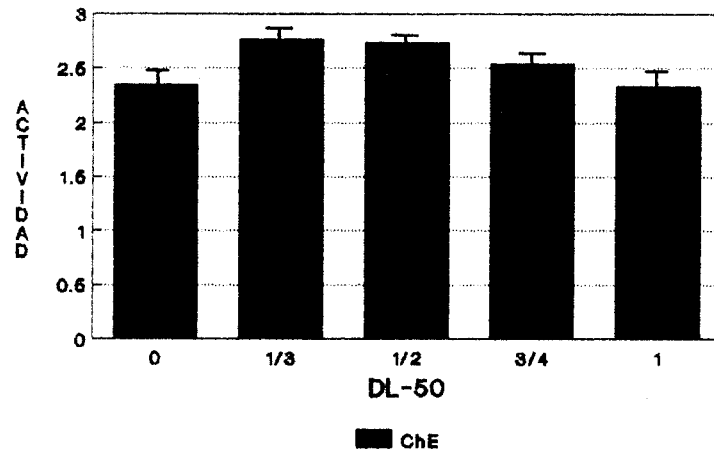
■ ChE

ETILPARATION

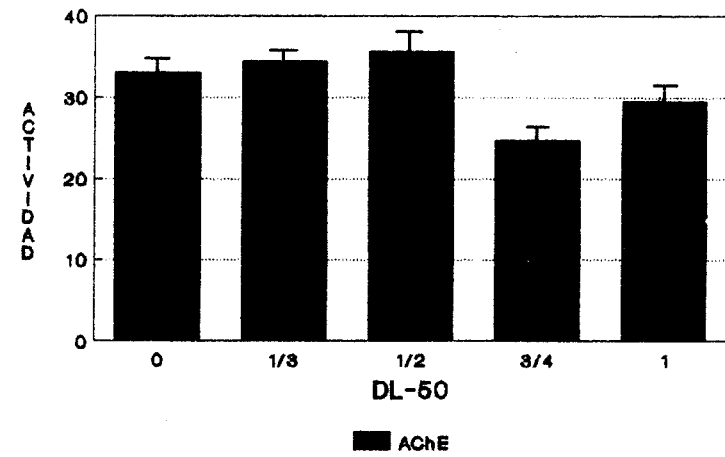


B

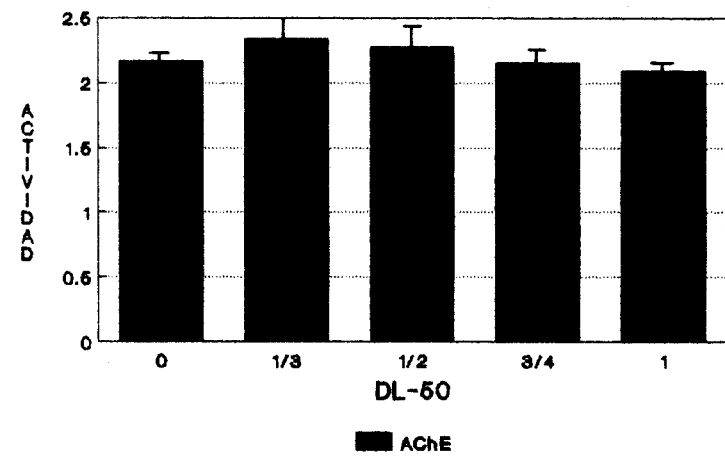
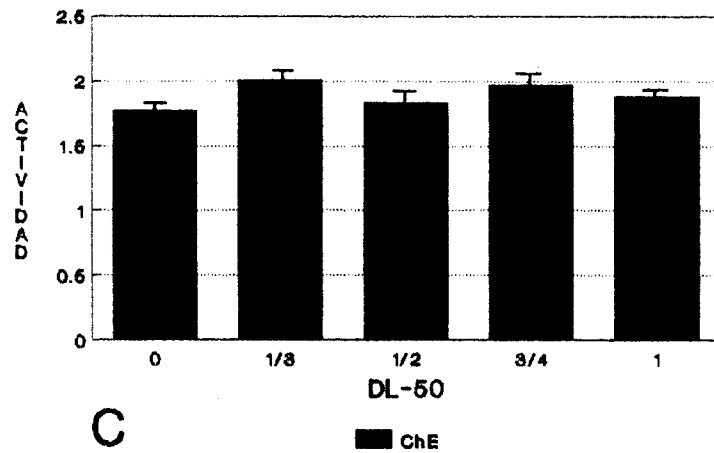
CEREBRO



ETILPARATION



RIÑÓN

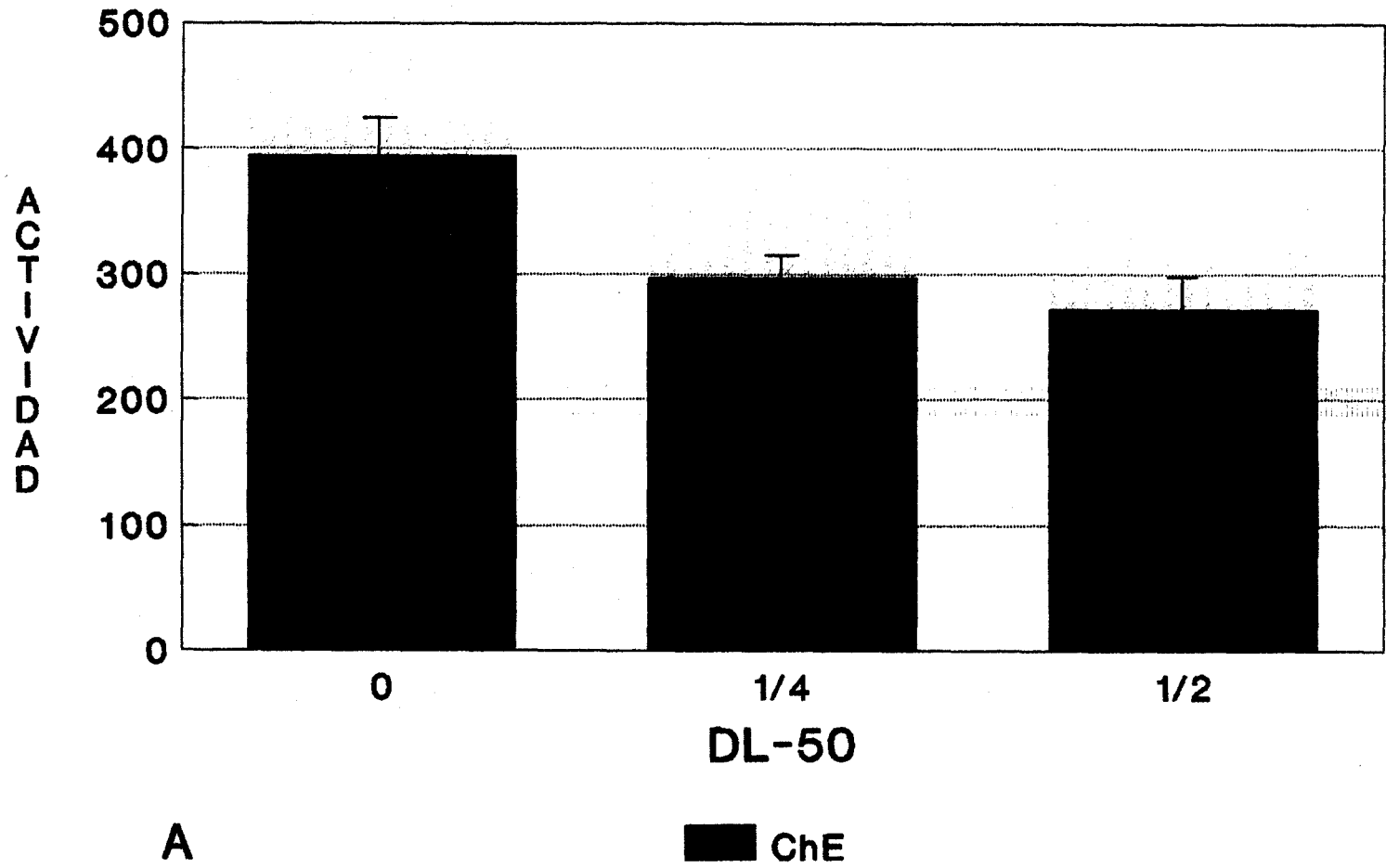


C

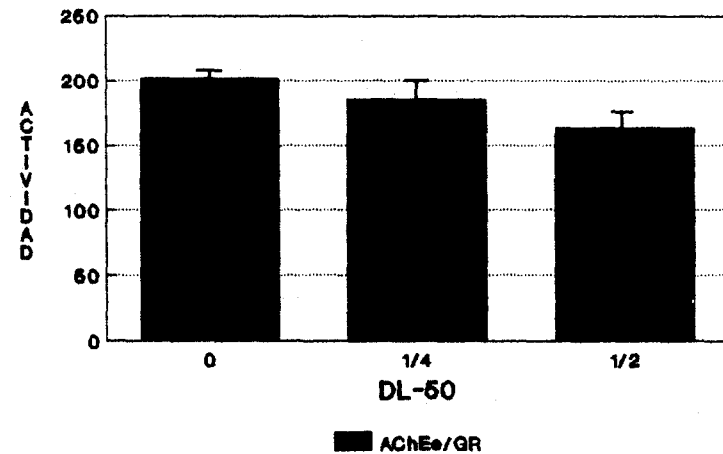
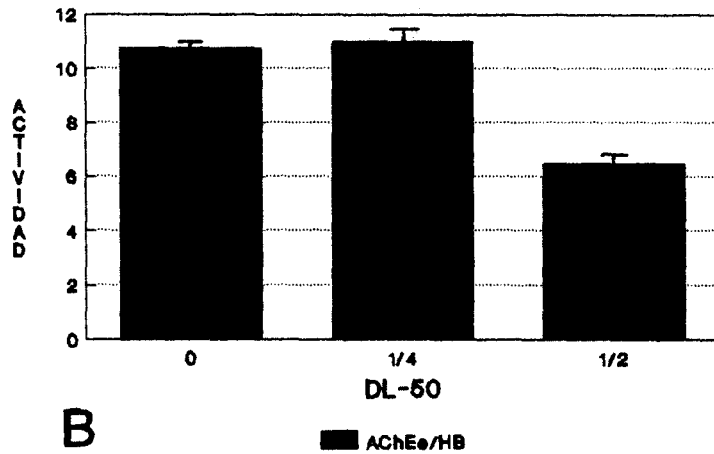
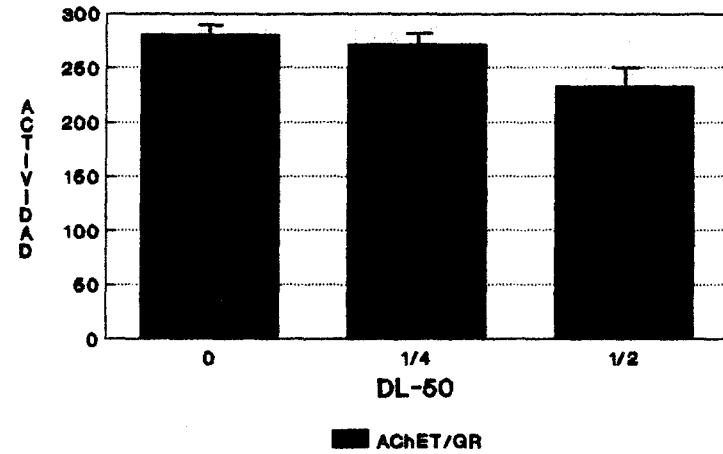
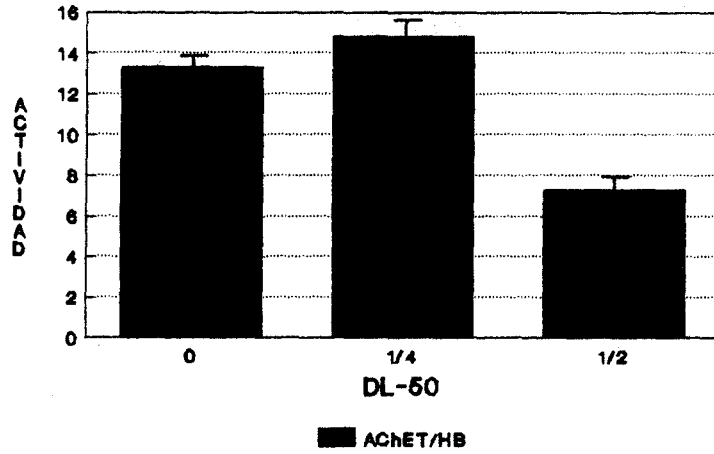
Fig. 2.- Representación gráfica de las modificaciones de la actividad de ChE y AChE en ratas tratadas con etilparation.

- A. ChE plasmática
- B. AChE total y eritrocitaria
- C. ChE y AChE de tejidos

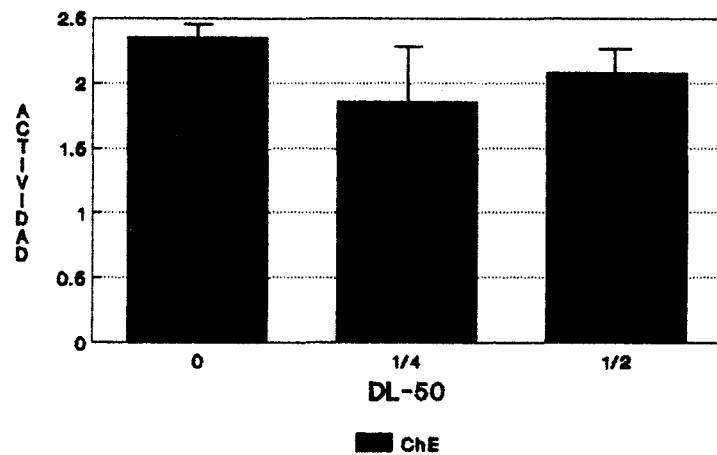
DIMETOATO



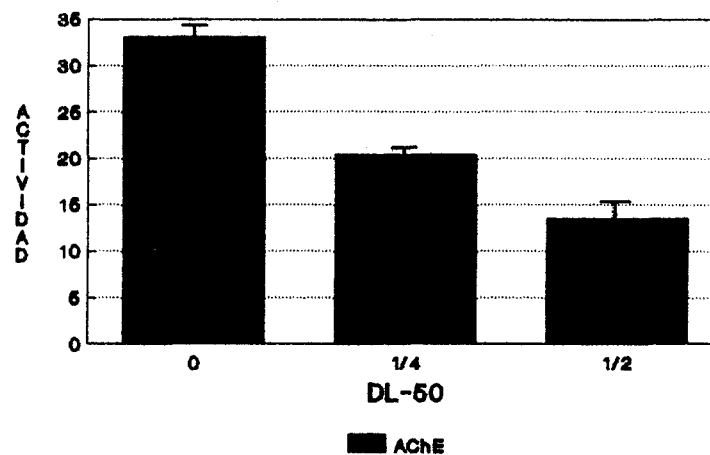
DIMETOATO



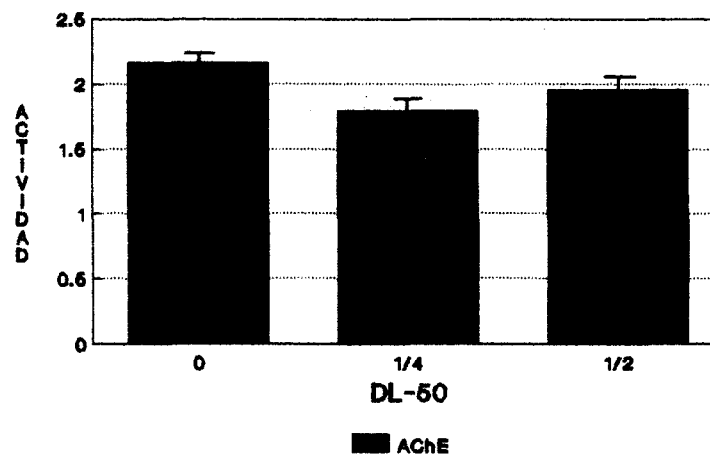
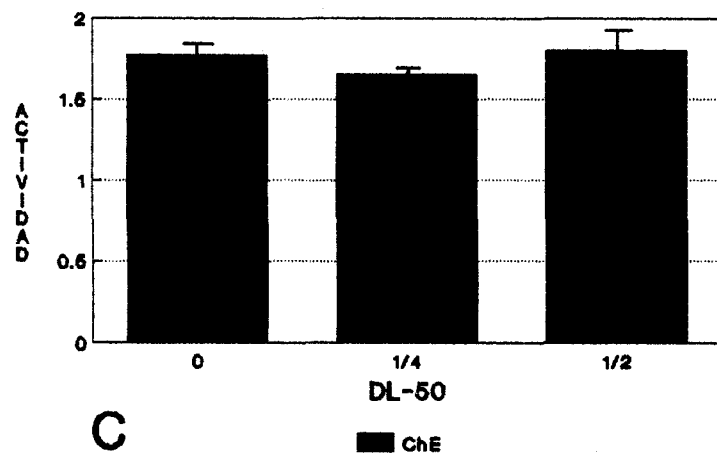
CEREBRO



DIMETOATO



RIÑON

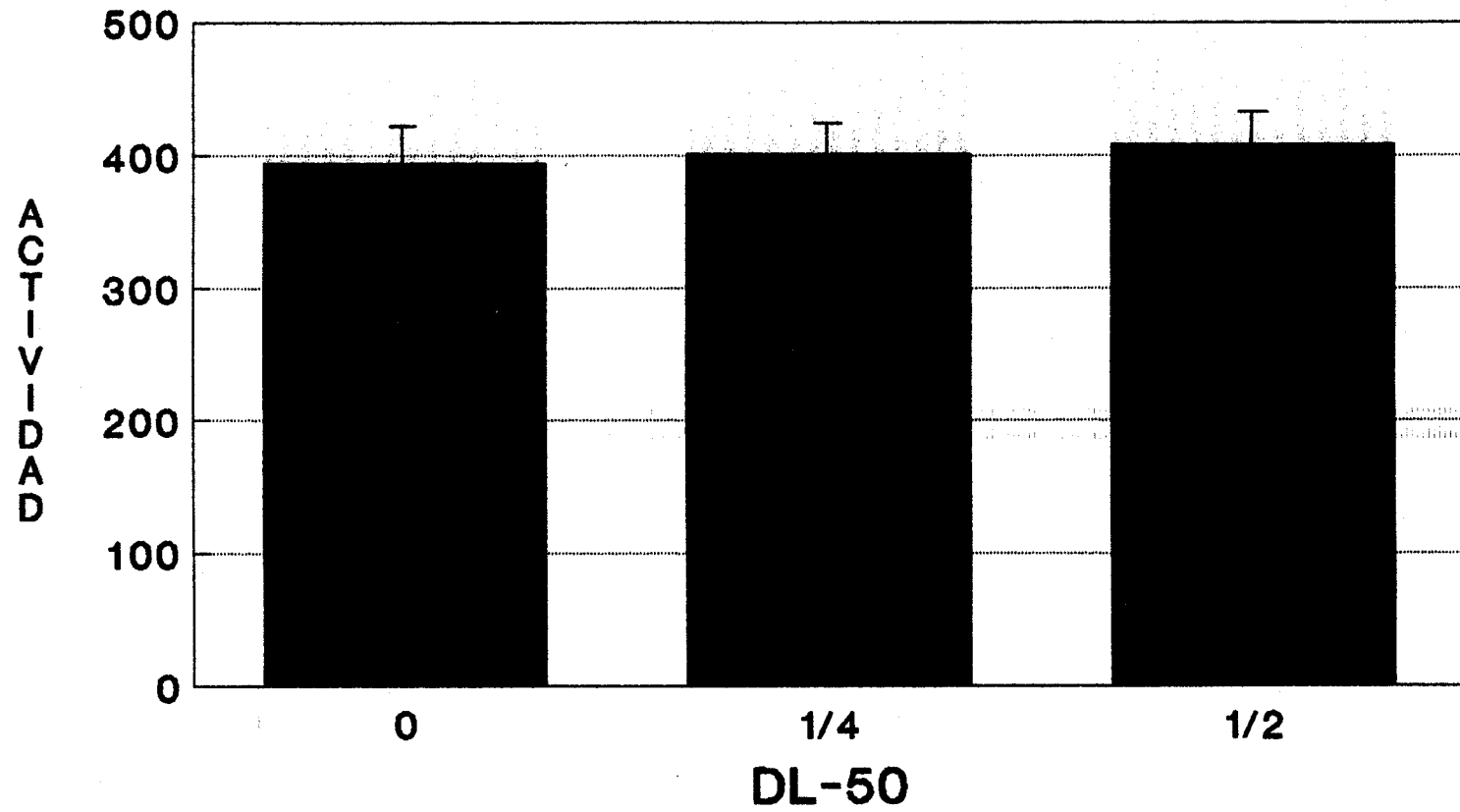


C

Fig. 3.- Representación gráfica de las modificaciones de la actividad de ChE y AChE en ratas tratadas con dimetoato.

- A. ChE plasmática
- B. AChE total y eritrocitaria
- C. ChE y AChE de tejidos

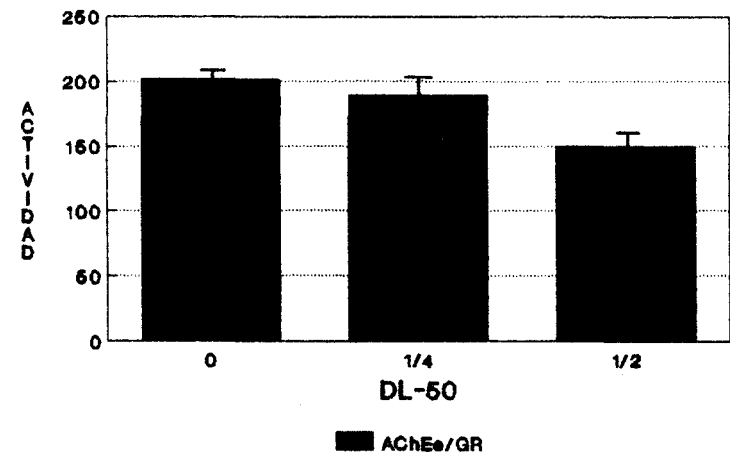
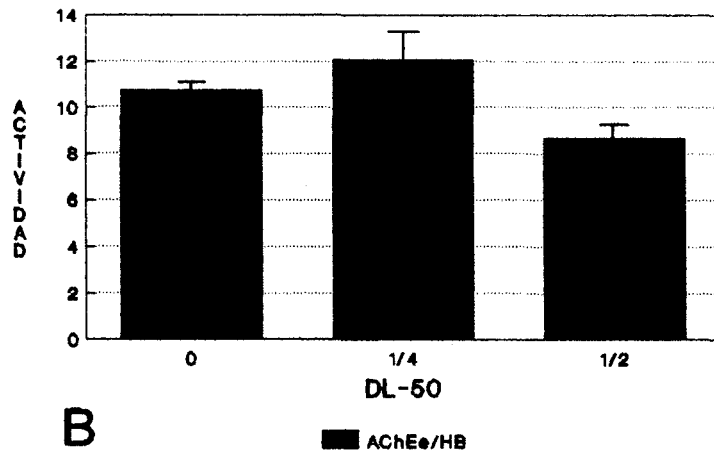
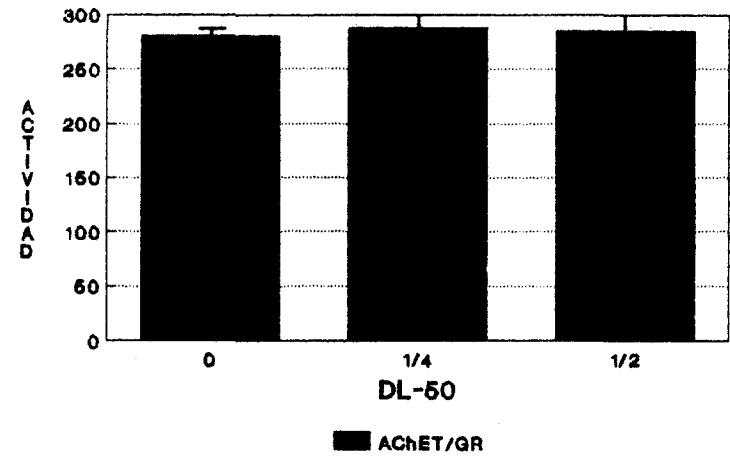
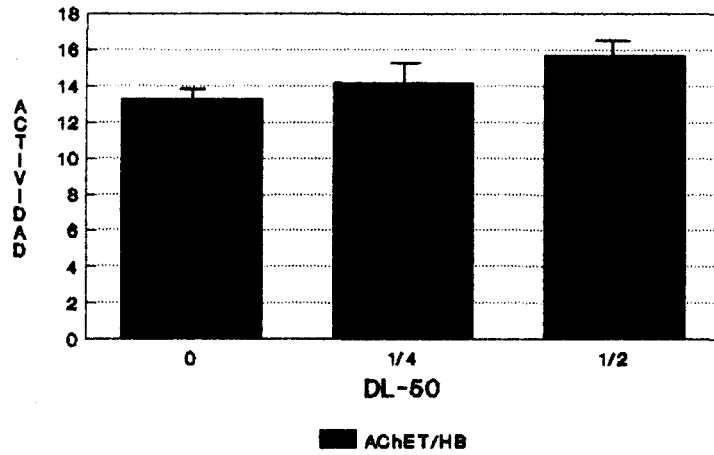
MALATION



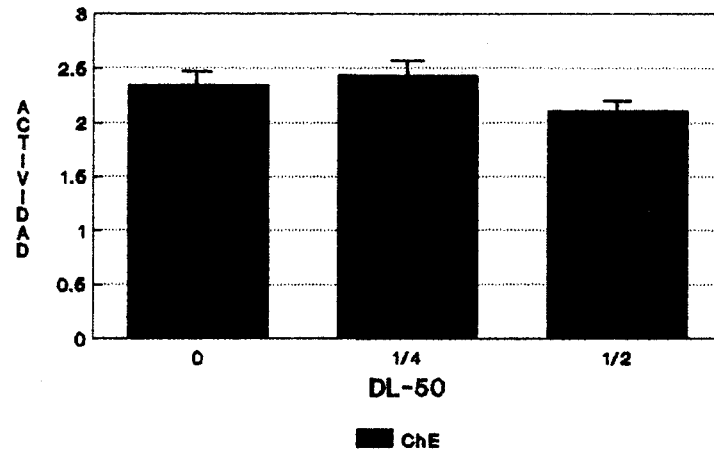
A

■ ChE

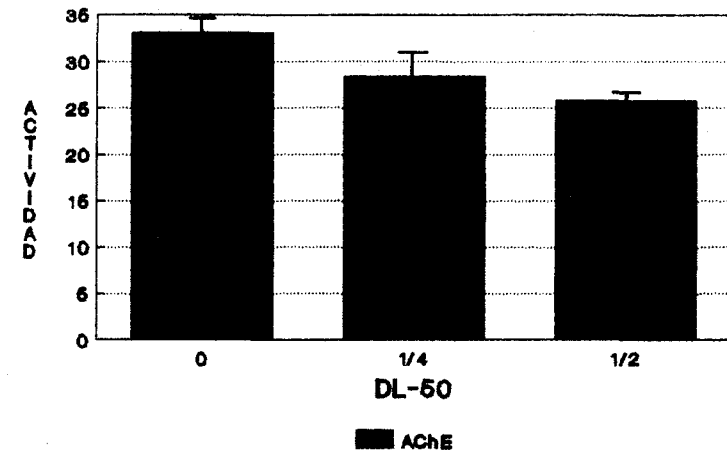
MALATION



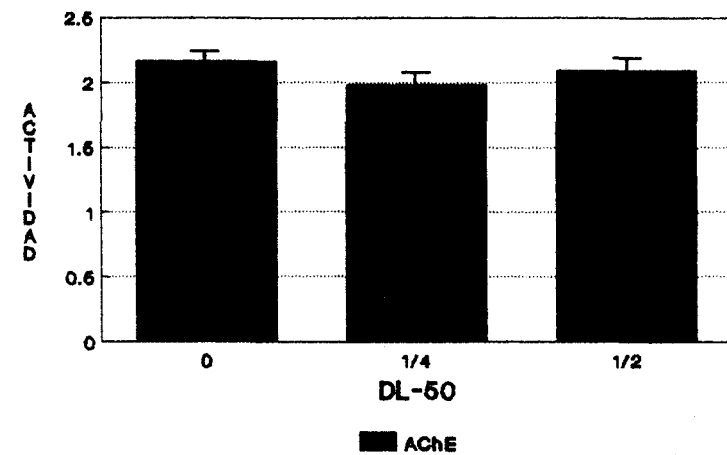
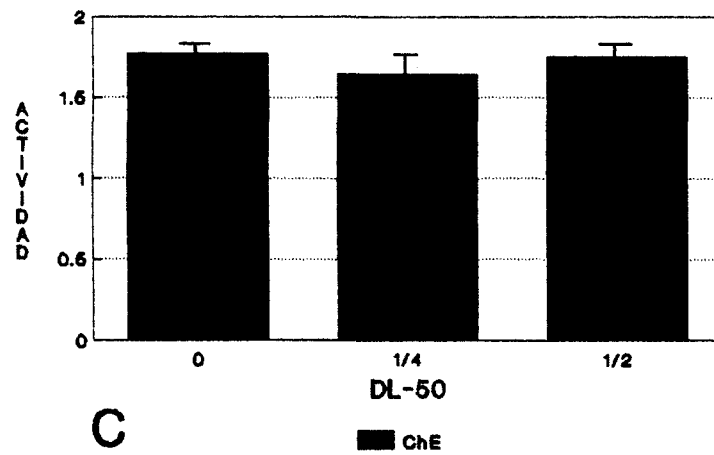
CEREBRO



MALATION



RIÑÓN



C

Fig. 4.- Representación gráfica de las modificaciones de la actividad de ChE y AChE en ratas tratadas con malation.

- A. ChE plasmática
- B. AChE total y eritrocitaria
- C. ChE y AChE de tejidos

DISCUSSION

Los métodos analíticos empleados por nosotros son habituales en el laboratorio y utilizados durante años, por lo que no han precisado especial dedicación de puesta a punto. Conforme hemos visto en la revisión bibliográfica las condiciones operativas para la determinación de la colinesterasa plasmática están bien establecidas, como ocurre con el conocimiento de la influencia de la temperatura en el medio de reacción.

La cuestión está actualmente solventada dado que en la mayoría de los laboratorios clínicos la ChE se determina con autoanalizadores, a temperatura controlada.

Sin embargo no ocurre igual con las de la acetilcolinesterasa.

Dado que varios de los reactivos se conservan en frigorífico, el medio de la reacción enzimática de hidrólisis del sustrato/cromógeno adquiere una temperatura resultante de la de los diferentes componentes, y puede ser muy variable. Por ello hemos considerado dos situaciones, una sin control de temperatura y otra mediante termostatación a 37°C durante toda la cinética. De nuestros resultados en humanos se deduce que los valores

medios de AChE total, se afectan por la temperatura del ensayo, y son a 37°C aproximadamente un 20% superiores que a temperatura ambiente, con nivel de significación alto ($p < 0.001$) para AChE referida tanto a hemoglobina como a glóbulos rojos en los hombres, y algo menos ($p < 0.01$ y $p < 0.05$) en mujeres.

Sin embargo la AChE eritrocitaria no se modifica al termostatar la reacción.

Estos resultados se han repetido con los datos obtenidos en ratas.

Por ello estimamos resulta recomendable una adecuada termostatación a 37°C durante todo el proceso.

El estudio de estabilidad de las actividades enzimáticas a lo largo del tiempo se ha efectuado con muestras de hasta 30 individuos (humanos, de ambos sexos), mantenidas en frigorífico a 4°C.

Los resultados a las 12, 24, 48 horas, 1 semana y 1 mes y la comparación de sus medias con valores inmediatos a la extracción (plazo inferior a 12 horas) evidencia que la actividad de la AChE total es estable al mes de extraídas las muestras, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo los valores de ChE plasmática muestran en este período una fuerte disminución (30%) respecto a los valores iniciales ($p < 0.001$).

También aquí los resultados fueron similares en

animales, tanto en rata como en conejo.

Se sabe que existen diferencias de actividad colinesterásica en ambos sexos. Por nuestra parte, el establecimiento de los valores y márgenes normales o basales de estas actividades enzimáticas en humanos se ha realizado con 49 muestras de hombres y 39 mujeres, todos ellos sanos y en ayunas. La AChE tanto total como eritrocitaria no se ha mostrado influida por el sexo.

Es de destacar que la ChE presentó los más amplios márgenes o rangos, con coeficientes de variación del 20.39% en hombres y 23.77% en mujeres. Frente a ellos, la AChE total y la eritrocitaria expresada tanto en hemoglobina como en góbulo rojo presentan menores coeficientes de variación (9 - 16%), desviación estandar y rangos.

En nuestros ensayos con animales (rata) destaca aún más la influencia del sexo, con valores de ChE superiores en hembras que en machos, en todos los tejidos estudiadas, y especialmente en plasma donde la actividad en hembras es 4 veces mayor ($p < 0.0001$). También la AChE total referida a hemoglobina y la AChE son algo más altas en hembras que en machos.

A la vista de nuestros datos en humanos y en animales entendemos que con las colinesterasas ocurre, como con otras actividades enzimáticas, que la gran variabilidad de las mismas en hembras hace que la valoración estadística resulte

diferente en un sexo que en otro y que se extraigan interpretaciones bioquímicas más correctas a partir de los datos obtenidos con los machos.

La correlación estadística de ChE y AChE total y eritrocitaria muestra que, en sangre humana, ambas actividades son totalmente independientes por lo que no son sustituibles con fines diagnósticos, a pesar de lo que suele entenderse.

Por otra parte, dada la gran dispersión de valores, sobre todo de la ChE plasmática, que presentó coeficientes de variación del 51.13% en rata macho y del 36.60% en hembras, en el momento de realizar los estudios estadísticos resultó insuficiente el número de animales ensayados, para establecer las ecuaciones de relación lineal entre los valores tisulares y sanguíneos.

Al estudiar la influencia que sobre estas actividades enzimáticas tiene la ingesta de alimento frente a los valores basales en ayunas, observamos en ratas que la ChE plasmática no parece modificarse. En cambio se obtienen valores más altos de AChE ($p < 0.001$) especialmente en machos.

En un grupo de mujeres en que se valoraron las enzimas a lo largo de un ensayo de tolerancia a la glucosa, no se vió que ésta afectara a la ChE ni a la AChE sanguíneas. Sin embargo, se comprobó que el embarazo disminuye la actividad de la ChE en un 26% ($p < 0.001$), pero no vimos alteración de la AChE.

En los restantes grupos estudiados con diferentes patologías, unicamente se detectó alteración de la ChE plasmática, que disminuye en enfermos hepáticos y renales de distinta etiología, pero no se modifica la AChE. Ninguna de las dos enzimas se alteró significativamente despues de las anestias investigadas, respecto a sus actividades previas. La administración de la mitad de la DL-50 de tiopental o de ketamina tampoco afectó a estas actividades en ratas.

En el caso del trabajador intoxicado por un insecticida organofosforado (etilparatió), se aprecia claramente que, aunque se afectaron las dos colinesterasas, la AChE se inhibió más fuertemente (un 95%) que la ChE (32%), aunque se recuperó antes (60 días) coincidiendo con la evolución favorable del enfermo. En los 3 individuos expuestos al mismo organofosforado, a pesar de ausencia de sintomatología, el seguimiento mostró un decremento progresivo de ambas, más acusado en la AChE. Debe resaltarse que los dos trabajadores recién incorporados a la empresa, y nunca anteriormente expuestos a este tipo de sustancias, evidenciaron un incremento inicial de la AChE total referida a hemoglobina o a glóbulo rojo; los experimentos con animales, programados para profundizar en este fenómeno, muestran que ésto solo ocurre con el etilparatió, y no con dimetoato ni malatió, a dosis inferiores a la mitad de la DL-50.

Atendiendo a todo lo espuesto, queda evidente que la

AChE es más estable que la ChE con respecto al sexo, presenta menor variabilidad interindividual, no se afecta por estados fisiológicos y patológicos de distinta etiología, que alteran la ChE, pero es más sensible a los inhibidores organofosforados. Por tanto, la determinación de ambas enzimas puede contribuir al diagnóstico diferencial de intoxicaciones frente a otras enfermedades.

Por otra parte, dado que el coeficiente de correlación entre la AChE eritrocitaria y la total, en condiciones basales, es de 0.87, referido a glóbulo rojo, y de 0.75, referido a hemoglobina, queda evidente que la AChE total supone un parámetro válido para la determinación de la AChE, y desde el punto de vista práctico, su abordaje es más sencillo que el de la eritrocitaria, por no requerir los pasos previos de separación y lavado de hematíes.

Así mismo, como el coeficiente de correlación entre la valoración de AChE total respecto a hemoglobina y a glóbulo rojo es de 0.94, siempre que no haya un desequilibrio entre recuento globular y contenido de hemoglobina, puede ser más cómoda la valoración de ésta.

Por todo lo cual, estimamos que la AChE total expresada por gramo de hemoglobina, y determinada como cinética a 37°C, es el parámetro de elección en la valoración clínica y de investigación de la AChE.

CONCLUSIONES

PRIMERA.- La ChE y la AChE son enzimas diferentes entre cuyas actividades no existe correlación cuantitativa.

SEGUNDA.- La AChE es una enzima estable a 4°C durante un mes. Sin embargo la ChE pierde actividad con el tiempo.

TERCERA.- La AChE es una enzima con menores variaciones interindividuales que la ChE.

CUARTA.- A diferencia de la ChE, la AChE no presenta diferencias de un sexo a otro.

QUINTA.- La AChE se mantiene estable en el embarazo, al contrario que la ChE cuya actividad disminuye.

SEXTA.- La AChE no se modifica en situaciones patológicas que afectan a la ChE . Ninguna de las dos enzimas se alteró con los anestésicos habituales en humanos, (tiopental sódico, bromuro de pancuronio, diazepam, cloruro de suxametonio, fentanilo, halotano, droperidol) ni en ratas anestesiadas con tiopental o ketamina.

SEPTIMA.- La AChE es más sensible que la ChE a la inhibición por compuestos organofosforados.

OCTAVA.- La AChE sufre un incremento inicial transitorio en

humanos ante una primera exposición a dosis bajas de determinados inhibidores organofosforados (etilparati6n); hemos confirmado este hallazgo por experimentaci6n animal.

NOVENA.- Estimamos que la determinaci6n de AChE debe incluirse en los protocolos analiticos para contribuir al diagn6stico diferencial.

DECIMA.- Para la determinaci6n de la AChE se recomienda un m6todo cin6tico con termostatazi6n de la mezcla de reacci6n a 37°C durante todo el proceso.

UNDECIMA.- Aunque no se han conseguido suficientes datos de humanos, por los resultados con animales se puede estimar conveniente determinar la AChE en ayuna.

DUODECIMA.- De acuerdo con la interpretaci6n estadistica de las diferentes formas de expresi6n y muestras utilizadas en la determinaci6n de AChE, podemos recomendar el uso de AChE total valorada en sangre entera hemolizada referida a hemoglobina.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ACHAVAL M.; SCHNEIDER F.L. (1984) Topographical distribution of acetylcholinesterase in the subfornical organ of the rat. *Acta Anat.* 118(3), 144-6.

ACHESON S.A.; DEDOPOULOU D.; QUINN D.M. (1987) Simple general acid-base catalysis and virtual transition states for acetylcholinesterase-catalysed hydrolysis of phenyl esters. *J. Am. Chem. Soc.* 109(1), 139-45.

ADAMS G.K.III; YAMAMURA H.I.; O'LEARY J.F. (1976) Recovery of central respiratory function following anticholinesterase intoxication. *Eur. J. Pharmacol* 38(1), 101-112.

ADAMSON E.D. (1977) Acetylcholinesterase in mouse brain erythrocytes and muscle. *J. Neurochem.* 28(3), 605-615.

ADEJUNO D.O.; EGBUNIKE G.N.; GABRIEL N. (1987) Changes in acetylcholinesterase activity and total protein in the developing fetal brain. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 196(8), 531-3.

ADEM A.; NORDBERG A.; BUCHT G.; WINBLAD B. (1986) Extraneural cholinergic markers in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 10(3-5), 247-57.

ALDRIDGE W.N.; DAVIES D.R.(1952) Determination of Cholinesterase Activity in Human Blood. British Medical Journal, 3 Mayo, 945.

ALEXANDROVA M.; HOLZBANER M.; RACKE K.; SHARMAN D.F.(1987) Acetylcholinesterase in the rat neurohypophysis in decreased after dehydration and released by stimulation of the pituitary stalk. Neuroscience 21(2), 421-7.

ALLES G.A.; HAWES R.C. (1940) Cholinesterases in the blood of man. Journal of Biological Chemistry. 133, 375-90.

AMMON (1934) Pfluegers Arch. f. ges. Physiol. 233, 486.

AMPULSKI R.S.; AYER V.E.; MORELL S.A. (1969) Determination of the reactive sulfhydryl groups in heme proteins with 4,4'-dipyridinedisulfide. Anal. Biochem. 32, 163-9.

ANAND M.; KHANNA R.N.; MISTRA D.; SHARMA H.K. (1977) Changes in brain acetylcholine of rats after dermal application of fenitrothion (sumithion). Indian. J. Physiol. Pharmacol. 21(2), 121-4.

ANCA Z. (1983) Lead and cadmium interaction with glucose metabolism and acetylcholinesterase activity in the rat brain. Rev. Roum. Biochim. 20 (4), 229-32.

ANDERSEN R.A.; AARAAS I.; GAARE G.; FONNUM F. (1977) Inhibition of acetylcholinesterase from different species by organophosphorus compounds, carbamates and



methylsulfonylfluoride. Gen. Pharmacol. 8 (5-6), 331-4.

ANGLADE P. (1987) Ultrastructural study of acetylcholinesterase activity in the intrapancreatic ganglia of the rat. Cell. Mol. Biol. 33 (1), 63-7.

ANTOPOL W.; TUCHMAN T.; SCHIFIN (1973) Choline-esterase activity of human sera, with special reference to hyperthyroidism. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 36, 46 .

AONO M.; MORIKA M.; MIZUDA K.; MIZUDA K.; NARUSAWA H.; UCHINO H. (1984). Inhibition of acetylcholinesterase by histamine H₂-receptor antagonists. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi 81(7), 1653.

AONO M.; MORIKA M.; MIZUTA K.; NARUSAWA H. (1986) Cholinergic effects of histamine-H₂ receptor antagonists partly through inhibition of acetylcholinesterase. Gastroenterol. Jpn. 21 (3), 213-9.

ASLANIAN D.; GROF P.; NEGRERIE M.; BALKANSKI M.; TAYLOR P. (1987) Raman spectroscopic study on the conformation of 11S form acetylcholinesterase from *Torpedo californica*. FEBS Lett. 219 (1), 202-6.

ATAK J.R.; PERRY E.R.; PERRY R.H.; WILSON, I.D.; BOBER M.J.; BLESSED G.; TOMLINSON B.E. (1985). Blood acetyl- and butyrylcholinesterases in senile dementia of Alzheimer type.. J. Neurol. Sci. 70(1), 1-16.

ATAK J.R.; PERRY E.K.; BONHAM J.R.; CANDY J.M.; PERRY R.H.

(1986) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the aged human central nervous system. *J. Neurochem.* 47 (1), 263-77.

ATAK J.R.; PERRY E.K.; BONHAM J.R.; PERRY R.H. (1987) Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 48 (6), 1845-50.

ATAK J.R.; MAY C.; KAYE J.A.; KAY A.D.; RAPOPORT S.I. (1988) Cerebrospinal fluid cholinesterases in aging and in dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 23 (2), 161-7.

AUGUSTINSSON K.B. (1948) Cholinesterases: A study in comparative enzymology. *Acta Physiologica Scandinavica*, 15, supplement 52, 1-182.

AUGUSTINSSON K.B. (1971) Determination of activity of cholinesterases. In: *Analysis of Biogenic Amines and their Related Enzymes*, edited by D. Glick. Interscience Press, New York, 217-73.

BABLOYAN R.S. (1986) Change in acetylcholinesterase activity in rat skeletal muscle in hypoparathyroidism. *Zh. Eksp. Klin. Med.* 26(1), 16-8.

BAJGAR J.; FUSEK J.; PATOCKA J.; HRDINA U. (1981) Continual monitoring of the reactivation effect of oximes on blood acetylcholinesterase in the rats poisoned with organophosphates. *Toxicology* 21 (1), 71-5.

BAJGAR J.; PATOCKA J.; FUSEK J.; HRDINA V. (1986) Some possibilities of protection against acetylcholinesterase inhibition by organophosphates in vivo. Sb. Ved. Pr. Lek. Fak. Karlovy Hradci Kralove 27(4), 425-35.

BAJGAR, J.; PATOCKA J. (1986) The differences in thermal stability of multiple molecular forms of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the rat brain. Sb. Ved. Pr. Lek. Fak. Univ. Karlovy Hradci Kralove 29 (4-5), 443-55.

BALASUBRAMANIAN A.S. (1984) Have cholinesterases more than one function? Trends Neurosci. 7 (12), 467-8.

BALLANTYNE B. (1968) Histochemical and biochemical aspects of cholinesterase activity of adipose tissue. Arch. Intl. Pharmacodyn. 173, 343-50.

BALYKIN N.S.; SEDOV K.R. (1982) Change of the blood enzymes under the action of a toxic combination of mercury and chlorine. Sov. Med. 45 (8), 12-4.

BANKS W.A.; KASTIN A.J. (1985) The aluminium-induced increase in blood-brain barrier permeability to delta-sleep-inducing peptide occurs throughout the brain and is independent of phosphorus and acetylcholinesterase levels. Psychopharmacology 86(1-2),84-9.

BAREGGI S.R.; GIACOBINI E. (1978) Acetylcholinesterase activity in ventricular and cisternal CSF of dogs: Effect of chlorpromazine. J. Neurosci. Res. 3 (5-6), 335-9.

BARTHOVA J.; KAMBORA M.; LEBLOVA S. (1986) Mechanism of action of organophosphate pesticides on animal cholinesterases. *Biologia* 41 (4), 405-11.

BARTON P.L.; FUTERMAN A.H.; SILMAN I. (1985) Arrhenius plots of acetylcholinesterase activity in mammalian erythrocytes and in Torpedo electric organ. Effect of solubilization by proteinases and by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem. J.* 231 (1), 237-40.

BASTONE A.; FRONTALI N.; MALLOZZI C.; SBRACCIA M.; SETTINI L. (1987) Cholinesterases in blood plasma and tissues of rats treated with n-hexane or with its neurotoxic metabolite 2,5-hexanodione. *Arch. Toxicol.* 61(2), 138-44.

BAUMANN M.; DEML E.; SCHAFFER E.; GREIM H. (1983) Effects of polychlorinated biphenyls at low dose levels in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12 (5), 509-15.

BAUR X. (1986) Isocyanate-induced asthma. *New Trends Allergy* 2, 209-15.

BEAR M.F.; CARNES K.M.; EBNER F. (1985) Postnatal changes in the distribution of acetylcholinesterase in kitten visual cortex. *Gov. Rep. Announce. Index (U.S.)* 85 (11), 64.

BECKER R.E.; GIACOBINI E. (1988) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylcholinesterase inhibition: can acetylcholine levels in the brain be improved in Alzheimer's disease? *Drug Dev. Res.* 14 (3-4), 235-46.

BEDFORD C.D.; HOWD R.A.; DAILEY O.D.; MILLER A.; NOLEN H.W. III; KENLEY R.A.; KERN J.R.; WINTERLE J.S. (1986a) Nonquaternary cholinesterase reactivators. 3. 3(5)-substituted 1,2,4-oxadiazol-5(3)-aldoximes and 1,2,4-oxadiazole-5(3)-thiocarbohydroximates as reactivators of organophosphate-inhibited eel and human acetylcholinesterase in vitro. J. Med. Chem. 29 (11), 2174-83.

BEDFORD C.D.; MIURA M.; BOTTARO J.C.; HOWD R.A.; NOLE (1986b) Nonquaternary cholinesterase reactivators. 4. Dialkylaminoalkyl thioesters of α -keto thiohydroxamic acids as reactivators of ethyl methyl-phosphonyl- and 1,2,2-trimethylpropyl methyl-phosphonyl-acetylcholinesterase in vitro. J. Med. Chem. 29 (9), 1689-96.

BEGUM S.J.; REDDY M.M.; INDIRA K.; SWAMI K.S. (1987) Effect of dieldrin on catalytic potential of field mouse *Mus booduga* brain acetylcholinesterase. Arch. Int. Physiol. Biochim. 95 (2), 101-4.

BELL J.U.; VAN PETTEN G.R.; TAYLOR P.J.; AIKEN M.J. (1979) The inhibition and reactivation of human maternal and fetal plasma cholinesterase following exposure to the organophosphate dichlorvos. Life Sci. 24 (3), 247-254.

BENSCHOP H.P.; KONINGS C.A.G.; VAN GENDEREN J.; DE JONG L.P.A. (1984) Isolation anticholinesterase properties, and acute toxicity in mice of the four stereoisomers of the nerve agent soman. Toxicol. Appl. Pharmacol. 72 (1), 61-74.

BERMAN H.A.; DECKER M.M.; NOWAK M.W.; LEONARD K.J.; MCCAULEY M.; BAKER W.M.; TAYLOR P. (1987) Site selectivity of fluorescent bisquaternary phenanthridinium ligands for acetylcholinesterase. *Mol. Pharmacol.* 31 (6), 610-6.

BERMAN H.A.; DECKER M.M.; JO S. (1987) Reciprocal regulation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in mammalian skeletal muscle. *Dev. Biol.* 120 (1), 154-61.

BHATNAGAR M.; TEWARI H.B. (1985) Age-related changes in acetylcholinesterase patterns in rat brain. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Part B* 51 (2), 211-7.

BIEGON A.; GREENBERGER V.; SEGAL M. (1986) Quantitative histochemistry of brain acetylcholinesterase and learning rate in the aged rat. *Neurobiol. Aging* 7 (3), 215-7.

BJERRUM O.J.; SELMER J.; HANGAARD J.; LARSEN F. (1985) Isolation of human erythrocyte acetylcholinesterase using phase separation with Triton X-114 and monoclonal immunosorbent chromatography. *J. Appl. Biochem.* 7 (4-5), 356-69.

BON S.; CHANG J.Y.; STROSBURG A.D. (1986) Identical N-terminal peptide sequences of asymmetric forms and of low-sulf-soluble and detergent-soluble amphiphilic dimers of Torpedo acetylcholinesterase comparison with bovine acetylcholinesterase. *FEBS Lett.* 209(2), 206-12.

BONDAR A.A. (1983) Study of some properties of

acetylcholinesterase from intact erythrocytes. Fiziol. Biokhim. Osn. Povysh. Prod. S-Kh. Zhivoth. 6-10.

BONHAM J.R.; ATACK J.R. (1983) A neural tube-defect-specific form of acetylcholinesterase in amniotic fluid. Clin. Chim. Acta 135 (2), 233-7.

BONHAM J.R.; DALE G.; SCOTT D.; WAGGET J. (1985) Molecular forms of acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease. Clin. Chim. Acta 145 (3), 297-305.

BONHAM J.R.; DALE G.; ATACK J.R. (1987) Neural tube defect-specific acetylcholinesterase: its properties and quantitation in the detection of anencephaly and spina bifida. Clin. Chim. Acta 170 (1), 69-78.

BONHAM J.R.; DALE G.; SCOTT D.J.; WAGGET J.; ATACK J.R. (1988) The characterization of molecular forms of acetylcholinesterase in Hirschsprung's disease. Clin. Chim. Acta 171 (2-3), 263-9.

BOOPATHY R.; BALASUBRAMANIAN A.S. (1987) A peptidase activity exhibited by human serum pseudocholinesterase. Eur. J. Biochem. 162 (1), 191-7.

BRASWELL L.M.; KITZ R.J. (1977) The effect in vitro of volatile anesthetics on the activity of cholinesterases. J. Neurochem. 29 (4), 665-71.

BREGOVEC I.; MAKSIMOVIC M.; DELJAC V.; BINENFELD Z. (1983) Reactivators of phosphorylated and phosphonylated

acetylcholinesterases. Dicarbamoyl substituted pyridinium monoamines. Acta Pharm. Jugosl. 33 (3-4), 177-82.

BRESTKIN A.P.; KABACHNIK M.I.; ROZENGART E.V. (1984) Substrate specificity of cholinesterases. Dokl. Akad. Nauk SSSR 274 (4), 960-5.

BRESTKIN A.P.; ZHUKOVSKII Y.G.; KOLCHANOVA N.A.; MIRZABAEV E.A.; ROZENGART E.V.; FARTSEIGER N.L. (1986) Inhibition of cholinesterases by quaternary phosphonium compounds. Ukr. Biokhim. Zh. 58 (2), 26-30.

BRIMIJOIN S.; RAKONCZAY Z.R.; HAMMOND P. (1987) Immunoassay of acetylcholinesterase. Fed. Proc. 46(8), 2557-62.

BRZIN M.; SKETELJ J.; GRUBIC Z.; KIAUTA T. (1980) Cholinesterase of neuromuscular junction. Neurochem. Int. Vol. 2, 149-59.

BUTCHER L.L.; HODGE G.K. (1976) Postnatal development of acetylcholinesterase in the caudate putamen nucleus and substantia nigra of rats. Brain Res. 106(2), 223-240.

BUTLER E.G.; ENGLAND P.J.; WILLIAMS G.M. (1988) Effect of peroxisome proliferating hypolipidemic agents on serum activity levels of arylesterase and cholinesterase in rats and mice. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 60(1), 125-8.

CATALAN R.E.; MARTÍNEZ A.M.; MATA F.; ARAGONES M.D. (1981) Effect of insulin on acetylcholinesterase activity.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 101(4), 1216-20.

CATALAN R.E.; MARTINEZ A.M.; ARAGONES M.D.; MIGUEL B.G.; BLAZQUEZ J. (1983) Evidence for a regulatory action of indomethacin and aspirin on gastrointestinal acetylcholinesterase. Med. Sci.: Libr. Compend. 11(12), 1060-1.

CATALAN R.E. (1984a) Effects of substance P on acetylcholinesterase activity. Biochem. Int. 8(2), 203-8.

CATALAN R.E. (1984b) Ecdysterone induces acetylcholinesterase in mammalian brain. Comp. Biochem. Physiol., C: Comp. Pharmacol. Toxicol. 78C(1), 193-5.

CATALAN R.E. (1984c) Somatostatin action on intestinal enzyme system, effects on protein kinase and acetylcholinesterase activities. Mol. Physiol. 5(3-4), 149-50.

CATALAN R.E.; MARTINEZ A.M.; ARAGONES M.D.; GODOY J.E. (1985) Activation of acetylcholinesterase by vanadate. Neuropharmacology 24(11), 1119-22.

CATALAN R.E.; HERNANDEZ F. (1987) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat brain capillaries. Med. Sci. Res. 15(6), 291-2.

CHATONNET A.; LOCKRIDGE O. (1989) Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. Biochem. J. 260(3), 625-34.

CHEDER, F.; VINCENT, J.P. (1989) Peptidasic activities associated with acetylcholinesterase are due to contaminating enzymes. *J. Neurochem.* 53(3), 924-8.

CHEMNITIUS J.M.; HASELMEYER K.H.; ZECH R. (1982) Identification of isoenzymes in cholinesterase preparations using kinetic data of organophosphate inhibition. *Anal. Biochem.* 125-2, 442-52.

CHOW F.L.; TELEN M.J.; ROSSE W.F. (1985) The acetylcholinesterase defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence that the enzyme is absent from the cell membrane. *Blood* 66(4), 940-5.

CHU M.I.; FONTAINE P.; KUTTY K.M.; MURPHY D.; REDHEENRAN R. (1978) Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin. Chim. Acta* 85, 55-9.

CHUMAKOVA O.V.; USTROVSKII Y.M. (1984) Acetylcholinesterase and high affinity choline uptake in brain synaptosomes of rats with different ethanol tolerances. *Neirokhiyima* 3(4), 388-91.

CLEMENT J.G.; LOCKWOOD P.A. (1982) HI-6, and oxime which is an effective antidote of soman poisoning: A structure activity study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 64(1), 140-6.

CLEMENT G.J.; LOCKWOOD P.A.; THOMPSON H.G. (1988) The acetylcholinesterase reactivator HI-6 (1-[[[4-(aminocarbonyl)pyridino]methoxy]methyl]-2-

[(hydroxyimino)methyl]-pyridinium dichloride): A comparative study of HI-6 samples of various sources. Toxicol. VOL 62 N° 2/3 220-3.

CLITHEROW J.W.; Mitchard M.; Harper N.J. (1963) The possible biological function of pseudocholinesterase. Nature 199, 1000-1.

CRUZ M.E.; CHAVEZ R.; MARTINEZ R.; DOMINGUEZ R. (1987) Differences in the acute changes in acetylcholinesterase activity in several brain structures induced by bilateral or unilateral section of the vagi nerves in the adult male rat. Med. Sci. Res 15(24), 1531-2.

CUCUIANU M.; POPESCU T.A.; HARAGUS S. (1968) Pseudocholinesterase in obese and hyperlipemic subjects. Clin. Chim. Acta. 22, 151-5.

CUCUIANU M.; ZRENGHEA D.; POP M.; OPINCURU A. (1976) Increased serum glutamyltransferase in hypertriglyceridemia: Comparison with serum pseudocholinesterase. Clin. Chim. Acta 71, 419-27.

CURATOLA G.; MAZZANTI L.; LENAZ G.; PASTUSZKO A. (1979) General anesthetics inhibit erythrocyte acetylcholinesterase only when membrane-bound. Bull. Mol. Biol. Med. 4(2), 139-46.

DAHL A.R.; HOBBS C.H.; MARSHALL T.C. (1986) The inhibition of rat and guinea pig cholinesterases by anionic hydrolysis

products of methylphosphonic difluoride (difluoro). Toxicol. Appl. Pharmacol. 84(3), 561-6.

DALE H.H. (1914) The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 6, 147-90.

DALIMOV D.N.; KARIMOV D.T.; ABDUVAKHABOV A.A.; MUKHAMEDZHANOV R.S. (1984) Interaction of O-alkyl-O-lupinine phenylphosphonate chlorohydratesn with cholinesterases. Dokl. Akad. Nauk UzSSR (5), 44-5.

DAROSZEWSKI J.; SERAFIN B.; BORKOWSKA G.; RUMP S. (1986) Potential acetylcholinesterase reactivators: pyridine and α -oxooxime derivatives. Pharmazie 41(10), 699-702.

DAS P.K. (1976) On genetically determined human serum cholinesterases. Enzyme 21(3), 253-74.

DATSOV E.; IZMIROVA N.; SHALASH S. (1984) EMG alterations in relation to methyl parathion level, its metabolites and acetylcholinesterase activity in blood. Khig. Zdraveopaz. 27(5), 432-6.

DATTA P.K.; BANERJEE A.; BASU P.S.; DATTA T.P. (1988) Acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7), a neurotransmitter enzyme in scorpion hemolymph. Biochem. Pharmacol. 37(5), 963-6.

DAVIES D.R. (1963) Handbook of Experimental Pharmacology. Vol. 15 En: Cholinesterase and Anticholinesterase Agent. G.B. Koelle, Springer-Verlag, Berlin, 860-82.

DAVIES D.R.; GREEN A.L. (1958) The mechanism of hydrolysis by cholinesterase and related enzymes. En: Advance in Enzymology. Vol 20. Academic Press.

DAVIS K.L.; HOLLISTER L.E.; LIVESEY J.; BERGER P.A. (1979) Cerebrospinal fluid acetylcholinesterase in neuropsychiatric disorders. Psychopharmacology 63(2), 155-9.

DAWSON R.M.; FREMAN S.E.; PADDLE B.M. (1985) Comparative effects of aprofen, atropine and benactyzine on central and peripheral cholinceptors and on acetylcholinesterase. Biochem. Pharmacol. 34(9), 1577-9.

DAWSON R.M.; PORETSKI M. (1985) Carbamylated acetylcholinesterase: acceleration of decarbamylation by bispyridinium oximes. Biochem. Pharmacol. 34(24), 4337-40.

DE JONG L.P.A.; WOLRING G.Z. (1980) Reactivation of acetylcholinesterase inhibited by 1,2,2'-trimethylpropyl methyl-phosphonofluoridate (soman) with HI-6 and related oximes. Biochem. Pharmacol. 29(17), 2379-87.

DE JONG L.P.A.; WOLRING G.Z. (1985) Aging and stereospecific reactivation of mouse erythrocyte and brain acetylcholinesterase inhibited by soman. Biochem. Pharmacol. 34(1), 142-5.

DEKORT W.L.A.M.; KIESTRA S.H.; SANGSTER B. (1988) The use of atropine and oximes in organophosphates intoxications: A modified approach. J. Toxicol., Clin. Toxicol. 26(3-4), 199-

208.

DELICONSTANTINOS G.; TSAKIRIS S. (1985) Differential effect of anionic and cationic drugs on the synaptosome associated acetylcholinesterase activity of dog brain. *Biochem. J.* 229(1), 81-6.

DELJAC V.; MAKSIMOVIC M.; RADOVIC L. (1982) Reactivators of organophosphate-inhibited cholinesterase: phenylhydroxymethyl and cyclohexylhydroxymethyl substituted bis-pyridinium monooximes. *Arch. Toxicol.* 49(3-4), (285-91).

DE NEEF J.H.; PORSIUS A.J. (1982) The influence of obidoxime, diacetylmonoxime, pralidoxime, and two less hydrophilic derivatives of pralidoxime upon the cholinesterase inhibition and the pressor effect by paraoxon in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 66(2), 244-51.

DENGLER R.; RUEDEL R.; WARELAS J.; BIRNBERGER K.L. (1979) Corticosteroids and neuromuscular transmission: Electrophysiological investigation of the effects of prednisolone on normal and anticholinesterase-treated neuromuscular junction. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 380(2), 145-51.

DE SARNO P.; GIACOBINI E.; DOWNEN M. (1987) Release of acetylcholinesterase from the caudate nucleus of the rat. *J. Neurosci. Res.* 18(4), 578-90.

DESCHAMPS J.; MORRIS S. (1987) Rapid isolation of acetylcholinesterase from snake venom. *UCLA Symp. Mol. Cell.*

Biol. New Ser. 68, 207-15.

DESHMUKH M.B. (1986) Changes in serum cholinesterase activity and lipoprotein cholesterol levels in rats during diabetes. IRCS Med. Sci. 14(3), 234.

DIETZ A.A.; RUBINSTEIN H.M.; LUBRANO T.; HODGES L-VK (1972) Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. Am. J. Hum. Genet 24, 58-64.

DLIN V.V.; MISHCHENKO B.P.; FOKEEVA U.V.(1985) Urine cholinesterase activity as a criterion of glomerular filter damage. Lab. Delo 11, 670-2.

DOEBLER J.A.; WALL T.J.; MARTIN L.J. (1984) Effects of HI-6 on brain neuronal RNA and acetylcholinesterase: Metabolic responses during acute soman intoxication. Toxicology 33(3-4), 311-22.

DREMOV D.P.; SOLONSKII A.V.; MURAV'EVA L.I. (1985) Acetylcholinesterase activity in rat brain under alcoholic embryopathy stimulation. Neuropatol. Psikhiatr. im. SS.Korsakova 85(7), 993-6.

DREYFUS P.; VERDIERE M.; GOUDOU D.; GARCÍA L.; RIEGER F. (1985) Acetylcholinesterase in mammalian skeletal muscle and sympathetic ganglion cells. Extra- and asymmetric forms. Mol. Basis Nerve Act., Proc. Int. Symp. Mem. David Nachmansohn, 729-39.

DUBILEI P.V.; TENYAKOV V.V. (1985) Blood levels of

physiologically active substances in acute pneumonia. Ter. Arkh. 57(3), 123-6.

DUFFY P.; WALLACH J.M. (1988) Determination of the cholinesterase activity of whole blood or biopsies by conductometry. Gov. Rep. Announce. Index 88(19).

EARL C.J.; THOMPSON R.H.S. (1952) The inhibitory action of tri-ortho cresyl phosphate on cholinesterase. Brit. J. Pharmacol. 2, 685-92.

ECOBICHON D.J. (1970) Can. J. Biochem. 48, 1359.

EDWARDS Y.H.; SHAW M.A. (1983) The isoenzymes of membrane-associated enzymes: acetylcholinesterase, succinate dehydrogenase and glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Isozymes: Curr. Top. Biol. Med. Res. 10, 125-46.

EIKENBURG D.C.; STICKNEY J.L. (1979) Anti-cholinesterase activity of 1- α -acetylmethadol: Relationship to bradycardia. Gen. Pharmacol. 10(3), 195-200.

ENGELHARDT E.; LOEWI E. (1930) FERMENTATIVE AZETYLCHOLINSPALTUNG IM BLUT UND IHRE HEMMUNG DURCH PHYSOSTIGMIN. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 150, 1-13.

ELLMAN G.L.; COURTNEY K.D.; ANDRES V.; FEATHERSTONE (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology Vol. 7, pp 88-95.

EVANS D.M.; RICHARDSON P.J.; FINE A. (1988) Relationship of acceptors for botulinum neurotoxins (types A and B) in rat CNS with the cholinergic marker, Chol-I. *Neurochem. Int.* 13(1), 25-36.

EVANS R.T. (1986) Cholinesterase phenotyping: clinical aspects and laboratory applications. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 23(1), 35-64.

FALUGI C. (1985) Histochemical localization of acetylcholinesterase in blood cells. *Basic. Appl. Histochem.* 29(2), 105-13.

FERNANDEZ H.L.; SEITER T.C. (1984) Subcellular distribution of acetylcholinesterase asymmetric forms during postnatal development of mammalian skeletal muscle. *FEBS Lett.* 170(1), 147-51.

FERRANTE R.J.; BEAL M.F.; KOWALL N.W.; RICHARDSON E.P., JR; MARTIN J.B. (1987) Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res.* 411(1), 162-6.

FIELD T.; MCNELLY A.; SADAVA D. (1977) Effect of maternal methadone addiction on offspring in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 228(2), 300-3.

FISHMAN E.B.; SIEK G.C.; MACCALLUM R.D.; BIRD E.D.; VOLICER L.; MARQUIS J.K. (1986) Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in

dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 19(3), 246-52.

FLOREZ J.; ARMIJO J.A.; MEDIAVILLA A. (1980) *Compendio de farmacología humana*. Ediciones Universidad de Navarra. Pamplona.

FRANCIS B.M.; FARAGE-ELAWAR M. (1987) Peripheral and central enzyme inhibition by fenthion, fenitrothion and desbromoleptophos. *NATO ASI Ser., Ser. H.* 13, 279-83.

FRENCH M.C.; WETHERELL J.R.; WHITE P.D.T. (1983) The reversal by oximes and their oximinomethyl analogues of neuromuscular block produced by soman. *Eur. J. Pharmacol.* 91(4), 399-409.

FRITZE J.; KECKMANN H. (1987) Erythrocyte acetylcholinesterase in psychiatric disorders and controls. *Biol. Psychiatry* 22(9), 1097-106.

FRITZE J.; FROELICH U.; BECKMANN H. (1987) Horizontal two-dimensional electrophoresis of plasma butyrylcholinesterase. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 368(3), 295-8.

FROEDE H.C.; WILSON I.B. (1985) The slow rate of inhibition of acetylcholinesterase by fluoride. *Mol. Pharmacol.* 27(6), 630-3.

FROINES J.R. (1985) Inhibition of acetylcholinesterase by neurotoxic aminonitriles. *Biochem. Pharmacol.* 34(17), 3185-7.

FU L.; LI L.; TANG X.; GAO X.; WANG S.; QIAO S. (1986) Toxicological studies on mevinphos. Zhonghua Yufangyixue Zazhi 20(1), 12-4.

FUENTES M.E.; INESTROSA N.C. (1988) Characterization of a tetrameric G4 form of acetylcholinesterase from bovine brain: a comparison with the dimeric G2 form of the electric organ. Mol. Cell. Biochem. 81(1), 53-64.

GAJEWSKI D.; LIS T.; CZAJA L. (1988) Effect of protection of certain cholinesterases by galanthamine in fluostigmine intoxication. Med. Weter. 44(5), 289-91.

GALLI A.; MANTONAVI P.; PEPEU G. (1984) Effect of ranitidine on ileal myenteric plexus preparation and on acetyl- and butyrylcholinesterase. Biochem. Pharmacol. 33(12), 1845-50.

GALLI A.; MALMBERG AIELLO P.; RENZI G.; BARTOLINI A. (1985) In-vitro and in-vivo protection of acetylcholinesterase by eseroline against inactivation by diisopropyl fluorophosphate and carbamates. J. Pharm. Pharmacol. 37(1), 42-8.

GALOSI A.; DELJAC A.; DELJAC V.; BINENFELD Z.; MAKSIMOVIC M. (1988) Reactivator of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. Imidazole derivatives. Acta Pharm. Jugosl. 38(1), 23-9.

GANELIN R. (1964) Measurement of Cholinesterase Activity of the Blood. Arizona Medicine, 710.

GARCIA Z. E. (1988) Fluorine in Peruvian foods and its relation to] phosphatase, cholinesterase and potassium. Rev. Peru. Bioquim 8(2), 22-31.

GARDNER P.E.; GOLDIE D.J.; JEHANLI A.M.T. (1986) Isolation and partial characterization of the secretory form of human brain acetylcholinesterase. Biochem. Soc. Trans. 14(6), 1234-5.

GENESER F.A. (1986) Distribution of acetylcholinesterase in the hippocampal region of the rabbit: I. Entorminal area, parasubiculum and presubiculum. J. Comp. Neurol. 254(3), 352-68.

GENNARI K.; BRODBECK U. (1985) Molecular forms of acetylcholinesterase from human caudate nucleus: comparison of salt-soluble and detergent-soluble tetrameri enzymic species. J. Neurochem. 44(3), 697-704.

GENNARI K.; BRUNNER J.; BRODBECK U. (1987) Tetrameric detergent-soluble acetylcholinesterase from human caudate nucleus: subunit composition and of active sites. J. Neurochem. 49(1), 12-8.

GENTINETTA R.; BRODBECK U. (1976) Differences in subunit activities in acetylcholinesterase as possible cause for apparent deviation from normal Michaelis Menten kinetics. Biochem. Biophys. Acta 438-2, 437-48.

GEORGE P.M.; ABERNETHY M.H. (1983) Improved Ellman Procedure

for Erythrocyte Cholinesterase. Clin. Chem. 29(2), 365-8.

GEREBTZOFF M.A. (1959) Cholinesterase: International series of monographs on Pure and Applied Biology. Pergamon Press, New York, London. Vol. 3, pp. 12-6.

GERRI C. (1982) Effect of lithium on synaptosomal brain enzymes. Effect of lithium on synaptosomal brain enzymes. Biochem. Pharmacol. 31(3), 449-53.

GIACOBINI E. (1987) Modulation of brain acetylcholine levels with cholinesterase inhibitors as a treatment of Alzheimer disease. Keio J. Med. 36(4), 381-91.

GIBNEY G.; MACPHEE-QUIGLEY K.; THOMPSON B. (1988) Divergence in primary structure between the molecular forms of acetylcholinesterase. J. Biol. Chem. 263(3), 1140-5.

GIBSON K.; GUIBAULT G.G.(1975) A potentiometric assay of cholinesterase. Anal. Chim. Acta 76(2), 245-51.

GODIN D.V.; AU T.; GARNETT M.E. (1978) Acetylcholinesterase: A probe for the study of antiarrhythmic drug membrane interactions. Biochim. Biophys. Acta 512(2), 388-96.

GOEDDE H.W.; GEHRING D.; HOFFMAN R.A. (1965) On the problem of the 'silent gen'in pseudocholinesterase polymorphism. Biochimica et Biophysica Acta 107, 391.

GOEDDE H.W.; AGARWAL D.P.; BENKMANN H.G. (1979) Pharmacogenetics of cholinesterase: New variants and suxamethonium sensitivity. Arztl. Lab. 25(9), 219-24.

GONGORA J.L. et al. (1988) Physostigmine stimulates phosphoinositide break down in the rat neostriatum. Eur. J. Pharmacol. 155(1-2), 49-55.

GONZALEZ-RODRIGUEZ CORDOBA J.M.; CANABAS-ESPEJO J.M.; LUQUE ROMERO M.; MUÑOZ-BLANCO J. (1987) Alterations in acetylcholinesterase activity in plasma and synaptosomal fractions from C.N.S. of rats acutely intoxicated with lindane. Effect of succinylcholines. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 39(4), 647-54.

GORDON J.J.; LEADBETTER L.; MAIDMENT M.P. (1978) The protection of animals against organophosphate poisoning by pretreatment with a carbamate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 43(1), 207-16.

GRASSETI D.R.; MURRAY J.F.; MA R.; MEZYNSKI V.R. (1975) The determination of thiols and of total glutathione in human blood using 6,6'-dithionicotinic acid (CPDS). Biochem. Med. 12, 149-53.

GRAY A.J.; THOMPSON C.M.; FUKUTO T.R. (1982) Distribution and excretion of [¹⁴CH₃S] methamidophos after intravenous administration of a toxic dose and the relationship with anticholinesterase activity. Pestic. Biochem. Physiol. 18(1), 28-37.

GRAY P.J.; DAWSON R.M. (1987) Kinetic constants for the inhibition of eel and rabbit brain acetylcholinesterase by

some organophosphates and carbamates of military significance. Toxicol. Appl. Pharmacol. 91(1), 140-4.

GREEN A.L. (1983) A theoretical kinetic analysis of the protective action exerted by eserine and other carbamate anticholinesterase against poisoning by organophosphorus compounds. Biochem. Pharmacol. 32(11), 1717-22.

GREENFIELD S.A.; CHUBB I.W.; SMITH A.D. (1979) The effect of chlorpromazine on the concentration of acetylcholinesterase in the cerebrospinal of rabbit. Neuropharmacology 18(2), 127-32.

GROFF W.A.; ELLIN R.I.; SKALSKY R.L. (1977) Quantitative assay of physostigmine in human whole blood. J.Pharm. Sci. 66(3), 389-91.

GRUSS R.; SCHELLER F.; KLIWES N.; FAHRENBRUCH B. (1986) Bioelectrode for cholinesterase or cholinesterase inhibitor determination. Appl. 289,874.

GRUSS R.; SCHELLER F.; KLIMES N.; FAHRENBRUCH B. (1988) Direct determination of serum cholinesterase activity with a GKM 02 glucometer modified for calibration. Z. Med. Laboratoriumsdiagn. 29(5), 263-7.

GULYAMOV M.; TILYABAEV Z.; DALIMOV D.N.; ABDUVAKHABOV A.A. (1987) Effect of hydrophobic interaction in the reaction of O-propyl-S-(β -ethylmercaptoalkyl)methylthiophosphonates and their methylsulfomethylates with the cholinesterases of warm-blooded animals. Khim. Prir. Soedin. 5, 696-700.

GUPTA M.; SASMAL D. BANDYOPADHYAY S.; BAGCHI G. (1982) Influences of ochratoxin A and critinin on acetylcholine and acetylcholinesterase activity of mouse brain and whole blood. *Ircs Med. Sci.* 10(9), 719-20.

GUPTA R.C.; PATTERSON G.T.; DETTBARN W.D. (1987) Acute Tabun toxicity; biochemical and histochemical consequences in brain and skeletal muscles of rat. *Toxicology* 46(3), 329-41.

HAAS R.; BRANDT P.T.; KNIGHT J.; ROSENBERRY T.L. (1986) Identification of amine components in a glycolipid membrane-binding domain at the C-terminus of human erythrocyte acetylcholinesterase. *Biochemistry* 25(11), 3098-105.

HALLANGER A.E.; WAINER B.H.; RYE D.B. (1986) Localization of gamma-aminobutyric acid and acetylcholinesterase in rodent cortical neurons. *Neuroscience* 19(3), 763-9.

HAMANN J.; HEESCHEN W.; LUBS M. (1984) Experimental animal tests on residues and physiological-biochemical parameters in milk and blood after application of ectoparasiticidic drug. *Milchwissenschaft* 39(2), 71-5.

HAMMOND P.; BRIMIJOIN S. (1988) Acetylcholinesterase in Huntington's and Alzheimer's diseases: simultaneous enzyme assay and inmunoassay of multiple brain regions. *J.Neurochem.* 50(4), 1111-6.

HANGAARD J.; SOERENSEN K.; BRODBEK U.; NOERGAARD-PEDERSEN B. (1984) Quantitative determination of acetylcholinesterase by

enzyme antigen immunoassay: methodological aspects and clinical use. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 44(8), 717-24.

HAQUE S.J.; PODDAR M.K. (1983) Lignocaine: inhibitory effect on synaptosomal and erythrocyte membrane-bound acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 32(22), 3443-6.

HAQUE S.J.; PODDAR M.K. (1985) Effect of tetracaine on membrane-bound acetylcholinesterase activity and anilino naphthalene sulfonate-induced membrane fluorescence. *Biochem. Pharmacol.* 34(15), 2599-603.

HARRIS H.; WHITTAKER M. (1961) Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride: recognition of two new phenotypes. *Nature* 191, 496-8.

HARRIS L.W.; STITCHER D.L.; HEYL W.C. (1979) The effects of atropine-oxime therapy on cholinesterase activity and survival of animals intoxicated with p-nitrophenyl di-n-butylphosphinate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49(1), 23-9.

HARRIS L.; TALBOT B.; ANDERSON D.; LENNOX W.; GREEN M.D. (1985) Oxime induced decarbamylation of pyridostigmine inhibited acetylcholinesterase. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 28, 281-5.

HARRIS L.W.; TALBOT B.G.; ANDERSON D.R.; LENNOX W.J.; GREEN M.D. (1987) Oxime-induced decarbamylation and atropine/oxime therapy of guinea pigs intoxicated with pyridostigmine. *Life*

Sci. 40(6), 577-83.

HARRISON M.F.; BROWN L.M. (1951) The effects of starvation on the pseudocholinesterase activity of the liver and serum of rats. *Biochem. J.* 48, 151-4.

HARTFORD J.T.; HSU L.; SAMORAJSKI T.; ORDY J.M. (1984) Changes in blood choline and cholinergic enzymes during aging in man. *Aging (N.Y.)* 26, 227-41.

HARVEY B.; SELLERS D.J.; WATTS P. (1984) The reactivation by oximes of phosphonylated acetylcholinesterase: the possible erroneous interpretation of reactivating potency. *Biochem. Pharmacol.* 33(21), 3499-501.

HARVEY B.; SCOTT R.P.; SELLERS D.J.; WATTS P. (1986) In vitro studies on the reactivation by oximes of phosphylated acetylcholinesterase. II. On the formation of O,O-diethyl phosphorylated AchE and O-ethylmethylphosphonylated AchE and their reactivation by P2S. *Biochem. Pharmacol.* 35(5), 745-51.

HAUSER W.; WEGER N. (1979) Therapeutic effects of the bis-pyridinium salts HGG-12, HGG-42, and atropine, benactyzine in organophosphate poisoning of dogs. *Arch. Toxicol.* 41(2), 393-6.

HE M. (1986) Preliminary study on revising the formula in determination of the whole blood cholinesterase activity (colorimetry). *Gongye Weisheng Yu Zhiyebing* 12(3), 177-8.

HENDERSON Z.; GREEFIELD S.A. (1984) Ultrastructural localization of acetylcholinesterase in substantia nigra: a comparison between rat and guinea pig. J. Comp. Neurol. 230(2), 278-86.

HERMAN Z.S.; ZIELINSKI M.; KMIECIAK KOLADA K. ET AL. (1977) Effects of apomorphine and clonidine on the cerebral cholinergic system. J. Pharmacol. Pharm. 29(6), 619-28.

HERRADOR M.M.; SAENZ DE BURUAGA J.; DOLORES SUAREZ M. (1985) Reactivators of organophosphorus-inhibited acetylcholinesterase. I. Imidazole oxime derivatives. J. Med. Chem. 28(1), 146-9.

HESTRIN S. (1949) J. Biol. Chem. 180,249.

HOLMES J.H.; KANFER I.; ZWARENSTEIN H. (1978a) Effect of benzodiazepine derivatives on human blood cholinesterase in vitro. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 21(2), 367-70.

HOLMES J.H ; KANFER I.; ZWARENSTEIN H. (1978b) Effect of benzodiazepine derivatives on purified blood cholinesterases in vitro. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 22(2), 431-2.

HOLMSTEDT B. (1971) Distribution and determination of cholinesterases in mammals. Bull. World Health Org. 44, 99.

HONMA T. (1983) Changes in acetylcholine metabolism in rat brain after a short-term exposure to toluene and n-hexane. Toxicol. Lett. 16(1-2), 17-22.

HOOVER D.B.; MUTH E.A.; JACOBOWITZ D.M. (1978) A mapping of the distribution of acetylcholinesterase, choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in discrete areas of rat brain. Brain Res. 153(2), 295-306.

HOPFF W.H.; RIGGIO G.; WASER P.G. (1984) Sarin poisoning in guinea pigs compared to reactivation of acetylcholinesterase in vitro as a basis for therapy. Acta Pharmacol. Toxicol. 55(1), 1-5.

HOZ DE LA D.; DOCTOR B.P.; RALSTON J.S.; RUSH R.S. WOLFE A.D. (1986) A simplified procedure for the purification of large quantities of fetal bovine serum acetylcholinesterase. Life Sci. 39(3), 195-9.

HUERGA DE LA J.; Yesinick C.; Popper H. (1952) Colorimetric method for the determination of serum cholinesterase. Amer. J. Clin. Path. 22, 1126-1133.

HU C.Y.; HUNG C.Y.; ROBINSON C.P. (1988) Effects of daily soman administration on rabbit blood pressure, temperature, body weight, and erythrocyte and plasma cholinesterases. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 40(3), 365-72.

HUGHES R.J.; BENNETT J. (1985) Effects of metal ions on the activity of acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) Biochem. Soc. Trans. 13(1), 219-20.

HUIZENGA J.R.; GIPS C.H. (1987) Evaluation of the UV-340 spectrophotometric determination for pseudocholinesterase

activity (E.C. 3.1.1.8) in human serum. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 25(3), 161-5.

IKEMOTO M.; TODANI M. (1985) Measurement of cholinesterase. (1985) Med. Technol. 13(6), 568-77.

INESTROSA N.C.; ROBERTS W.L.; MARSHALL T.L.; ROSENBERRY T.L. (1987) Acetylcholinesterase from bovine caudate nucleus is attached to membranes by a novel subunit distinct from those of acetylcholinesterases in other tissues. J. Biol. Chem. 262(10), 4441-4.

INESTROSA N.C.; ALVAREZ J. (1988) Axons grow in the aging rat but fast transport and acetylcholinesterase content remain unchanged. Brain Res. 441(1-2), 331-8.

ISHIKAWA N.; ICHIKAWA T.; TSURU H.; SHIGEI T. (1980) An extension of pA principle to the potentiation of drug effects and its application to the biological assay of some anticholinesterases and cardenolides. JPN. J. Pharmacol. 30(1), 49-58.

ISRAEL D.; SKAU K.A. (1986) The molecular forms of acetylcholinesterase in rat thymus. Thymus 8(4), 193-9.

JAARV J. (1984) Stereochemical aspects of cholinesterase catalysis. Bioorg Chem. 12(4), 259-78.

JAKL A.; FUSEK J. BAJGAR J. (1986) Anticholinergic action of cholinesterase reactivator methoxime (bis(4-hydroxyiminomethylpyridinium)methane dichloride). Sb. Ved.

Pr. Lek. Fak. Univ. Karlovy Hradci Kralove 29(4-5), 457-72.

JAVANOVIC D. (1983) The effect of bis-pyridinium oximes on neuromuscular blockade induced by highly toxic organophosphates in rat. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 262(2), 231-41.

JENSEN J.C.; GUGLER R. (1984) Relevant inhibition of acetylcholinesterase by H₂-receptor antagonists? Z. Gastroenterol. 32(3), 109-12.

JOHNS C.A.; HAROUTUNIAN V. DAVIS B.M.; HORVATH T.B.; MOHS R.C.; DAVIS KENNETH L. (1984) Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease and animal models. Alzheimer Dis.: Adv. Basic Res. Ther., Proc. Meet. Int. Study Group Treat. Mem. Disord. Assoc. Aging, 3rd, 349-73.

JOLKKONEN J.T.; SOININEN H.S.; RIEKKINEN P.J. (1984) Cerebrospinal fluid cholinesterase β -endorphin and somatostatin in Alzheimer's disease. Acta Univ. Tampere, Ser. B, 21, 104-9.

KAGAN Y.S.; KOKSHAREVA N.V.; SASINOVICH L.M.; KRIVENCHUK V.E. (1975) Experimental data on a new cholinesterase reactivater from the group of thiohyroximic esters. Pharmacol. Toxicol. 38(3), 105-11.

KALEMBA K. (1983) Liver function in workers employed in the vinyl resins plant. Med. Pr. 34(3), 211-7.

KALOW W.; GENEST K. (1957) A method for the detection of

atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. Canadian Journal of Biochemistry. 35, 339-46.

KAMYSHEVA A.S. (1986) The effect of delta shep-inducing peptide on the activity of cholinesterase-enriched fractions of neurons, glia and neuropil in several formation of the brains motor system. Nervn. Sist. 25, 37-48.

KARLSSON E.; MBUGA P.M.; RODRIGUEZ-ITHURRALDE D. (1984) Fasciculins, anticholinesterase toxins from the venom of the green mamba *Dendroaspis angusticeps*. J.Physiol. 79(4), 232-40.

KELLNER J. (1988) The use of a potassium-ion-selective electrode for measuring kinetic parameters of enzymatic hydrolysis of butyrylcholine. Collect. Czech. Chem. Commun 53(12), 3206-13.

KIRAN R.; VARMA M.N. (1988) Biochemical studies on endosulfan toxicity in different age groups of rats. Toxicol. Lett. 44(3), 247-52.

KISH S.J.; OLIVER A.; DUBEAU F.; ROBITAILLE Y; SHERWIN A.L. (1988) Increased activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in actively epileptic human cerebral cortex. Epilepsy Res. 2(4), 227-31.

KJELLSTRAND P.; BJERKEMO M.; ADLER-MAIHOFFER M.; HOLMQUIST B. (1986) Effects of methylene chloride on body and organ weight and plasma butyrylcholinesterase activity in mice.

Acta Pharmacol. Toxicol. 59(1), 73-9.

KLEINBERGER N.; YANAI J. (1985) Early phenobarbital-induced alterations in hippocampal acetylcholinesterase activity and behavior. Dev. Brain Res. 22(1), 113-23.

KNEDEL M.; BOTTGER R. (1967) Eine Kinetische Methode zur Bestimmung der Aktivität der Pseudocholinesterase. Klin. Wochenstr. 45, 325-8.

KOELLE W.A.; KOELLE G.B.; SMYRL E.G. (1976) Effects of persistent selective suppression of ganglionic butyrylcholinesterase on steady state and regenerating levels of acetylcholinesterase: implications regarding function of butyrylcholinesterase and regulation of protein synthesis. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA. 73(8), 2936-8.

KOELLE G. B.; MASSOULIE J.; EUGENE D.; MELONE M.A.B.; BOULLA G. (1987) Distributions of molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in nervous tissue of the cat. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 84(21), 7749-52.

KOELLE G.B.; MASSOULIE J. EUGENE D.; MELONE M.A.B. (1988) Effects of glycyl-L-glutamine in vitro on the molecular forms of acetylcholinesterase in the preganglionically denervated superior cervical ganglion of the cat. PROC. NAT. ACAD. SCI. USA 85(5), 1686-90.

KOKSHAREVA N.V. (1982) Therapeutic efficacy of diethyxime in

poisoning with carbamate pesticides with anticholinesterase action. *Farmakol. Toksikol.* 45(4), 61-4.

KOLATAJ A.; GILL J. (1984) The effect of adrenaline, acetylcholine and histamine on aminotransferases AlAT and AspAT and cholinesterase activity in blood serum of 1 to 3-day-old chicks. *Gen. Pharmacol.* 15(1), 71-4.

KORPELA M.; TAHTI H. (1986) The effect of selected organic solvents on intact human red cell membrane acetylcholinesterase in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85(2), 257-62.

KORPELA M.; TAHTI H. (1988) Human and rat erythrocyte membranes as a model for studying the effects of organic solvents on membrane-bound acetylcholinesterase in vitro. *Toxicol. Vitro* 2(2), 135-9.

KOSTOVIC I.; SKAVIC J.; STRINOVIC D. (1988) Acetylcholinesterase in the human frontal associative cortex during the period of cognitive development: early laminar shifts and late innervation of pyramidal neurons. *Neurosci. Lett.* 90(1-2), 107-12.

KOUNINIOTOU-KRONTIRI P.; TSAKIRIS S. (1984) Direct effect of lithium on acetylcholinesterase of the rat diaphragm. *IRCS Med. Sci.* 12(12), 1081-2.

KRIVOI I.I.; KULESHOV V.I.; MATYUSHKIN D.P.; SANOTSKII V.I.; SEI T.P. (1985) Miniature end-plate currents of muscle fibers from the rat diaphragm during acetylcholinesterase

inhibition with galanthamine. Neurofiziologiya 17(5), 607-14.

KRIVOI I.I. (1988) Quantitative estimation of synaptic acetylcholinesterase inhibition with galanthamine using parameters of miniature end-plate currents. Byull. Eksp. Biol. Med. 105(6), 665-7.

KUHNEN H.; SCHRICHTEN A.; SCHOENE K. (1985) Influence of atropine upon ageing and reactivation of soman inhibited acetylcholinesterase from human erythrocytes. Preliminary communication. Arzneim-Forsch/Drug Res. 35(9), 1454-6.

KUMARI K.V.; MOHAN P.M.; RAO M.R.; VENKATES WARLU Y.; BABU K.S. (1985) Effects of scorpion venom on the cholinesterase system of guinea pig. Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B. 55(3), 203-8.

KUNEC-VAJIC E.; BRADAMANTE V.; UROIC B. (1985) The effect of local anesthetics and phenothiazine derivatives on cholinesterase, investigated by a chemiluminescence method. Acta Pharm. Jugosl. 35(2), 133-6.

KUROIWA K.; KATAYAMA K.; NAGASAWA T. (1987) Method for determining cholinesterase activity using dihydroxybenzoylcholine and kit thereof. Eur. Pat. Appl. EP 241,915.

KUTTY K.M.; REDHEENDRAN R.; MURPHY D. (1977) Serum cholinesterase: function in lipoprotein metabolism.

Experientia 33(4), 420-22.

KUTTY K.M.; HILLMAN D.A.; CHANDRA R.K.; CASHIN J. (1979a) A study of the function of cholinesterase in obesity. Abstract presented at XIth International Congress of Biochemistry, Toronto July 8-13.

KUTTY K.M.; MURPHY D.M.; O'DONNELL J.; CHU M.I. (1979b) Cholinesterase in the atherosclerosis intima and in fibroblast cultures. Experientia 35, 377.

KUTTY K.M. (1980) Review: Biological function of cholinesterase. Clin. Biochem. 13(6), 239-43.

KUTTY K. M.; JAIN R.; KEAN K.T.; PEPER C. (1984) Cholinesterase activity in the serum and liver of Zucker fat rats and controls. Nutr. Res. (N.Y.) 4(1), 99-104.

LA DU B.N.; LOCKRIDGE O. (1986) Molecular biology of human serum cholinesterase. Fed. Proc. 45(13); 2965-9.

LAI J.C.K.; LEUNG T.K.C.; LIM L. (1982) The ontogeny of acetylcholinesterase activities in rat brain regions and the effect of chronic treatment with manganese chloride. J. Neurochem. 39(6), 1767-9.

LANGEL U.; SILLARD R.; JARV J.; GODOVIKOV N.; KARDANOK N.; TRIFONOVA S. (1986) Interaction on n-alkylcholinebenzylates with cholinesterases. Org. React. 23(2), 134-43.

LASKOWSKI M.B.; OLSON W.J.; DETTBARN W.D. (1975) Ultrastructural changes at the motor end-plate produced by

and irreversible cholinesterase inhibitor. *Exp. Neurol.* 47(2), 290-306.

LASKOWSKI M.B.; DETTBARN W.D. (1977) The pharmacology of experimental myopathies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 17, 387-409.

LAWRENCE S.H.; MELNICK P.J. (1961) Enzymatic activity related to human serum beta lipoproteins: histochemical, immuno-electrophoretic and quantitative studies. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 107, 998-1001.

LAYER P.G.; ALBER R.; SPORNS O. (1987) Quantitative development and molecular forms of acetyl- and butyrylcholinesterase during morphogenesis and synaptogenesis of chick brain and retina. *J. Neurochem.* 49(1), 175-82.

LEHMANN H.; SILK E. (1953) Succinylmonocholine. *British Medical Journal.* 1, 767-8.

LEWIS P.R.; SCHON F.E.G. (1975) The localization of acetylcholinesterase in the locus coeruleus of the normal rat and after 6 hydroxydopamine treatment. *J. Anat.* 120(2), 373-85.

LIDELL J.; LEHMAN H.; SILK E. (1962) A 'silent' pseudo-cholinesterase gene. *Nature.* 193, 561-2.

LIN W.W.; LEE C.Y.; CARLSSON F.H.H.; JOUBERT F.J. (1987) Anticholinesterase activity of angusticeps type toxins and

protease inhibitor homologs from mamba venoms. *Pac. J. Pharmacol.* 2(2), 79-85.

LOCKRIDGE O.; MOTTERSHAW-JACKSON N.; ECKERSON H.W.; LADU B.N. (1980) Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *J.Pharmacol. Exp. Ther.* 215(1), 1-8.

LOCKRIDGE O. (1987) Amino acid sequence of human cholinesterase. *Gov. Rep. Announce Index* 87(21).

LOCKRIDGE O.; ADKINS S.; LA DU B.N. (1987a) Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262(27), 12945-52.

LOCKRIDGE O.; BARTELS C.F.; VAUGHAN T.A.; WONG C.K.; NORTON S.E.; JOHNSON L.L. (1987b) Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 262(2), 549-57.

LOCKRIDGE O. (1988) Structure of human serum cholinesterase. *Bioassays* 9(4), 125-8.

LOEWI O. (1921) Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. *Pflugers Archiv für die gesamte. Physiologie des Menschen und der Tierc.* 189, 239-42.

LOEWI O.; NAVRATIL E. (1921) Über humorale übertragbarkeit der herznervenwirkung. XI. Über den mechanismus du vagus wirkung von physostygmín und ergotamin. *Pflugers Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 214, 689-96.

LONG K. (1975) Cholinesterase activity as a biological indicator of exposure to pesticides. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 36:75.

LOUIS-FERDINAND R.T.; BROWN D.R.; FIDDLER S.F. ET AL. (1978) Morphometric and enzymatic effects of neonatal lead exposure in the rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 43(2), 351-60.

LOW M.G.; FUTERMAN A.H.; ACKERMANN K.E.; SHERMAN W.R.; SILMAN I. (1987) Removal of covalently bound inositol from Torpedo acetylcholinesterase and mammalian alkaline phosphatases by deamination with nitrous acid. Evidence for a common membrane anchoring structure. *Biochem. J.* 241(2), 615-19.

LU Y.; LU P.; XUE S.; GU X. (1984) Investigation on the chronic effects of Dipterex in occupational exposure. *Med. Lav.* 75(5), 376-84.

MACKAY A.V.P.; DAVIES P.; DEWAR A.J.; YATES C.M. (1978) Regional distribution of enzymes associated with neurotransmission by monoamines, acetylcholine and GABA in the human brain. *J. Neurochem.* 30(4), 827-39.

MACPEE-QUIGLEY K.; TAYLOR P.; TAYLOR S. (1985) Primary structures of the catalytic subunits from two molecular forms of acetylcholinesterase. A comparison of amino-terminal and active center sequences. *J. Biol. Chem.* 260(22), 12185-9.

MAEKAWA M.; SUDO K.; KANNO T. (1987) Heterogeneity in the

silent type serum cholinesterase variant. Seibutsu Butsuri Kagaku 31(1), 15-8.

MAKHAEVA G.F.; SHATAEVA G.A.; YANKOVSKAYA V.L. FETISOV V.I.; LOSHADKIN N.A.; MARTYNOV I.V.; KHASKIN B.A.; SHELUCHENKO O.D. (1984) Interaction of diphosphorylated methanes with mammalian esterases. Bioorg. Khim. 10(10), 1347-52.

MANAVALAN P.; TAYLOR P.; JOHNSON W. CURTIS, Jr. (1985) Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11S and 5.6S species and the differences induced by inhibitory ligands. Biochim. Biophys. Acta 829(3), 365-70.

MANCHE DE LA I.S.; VERGE D.E.; BOUCHAUD C. ET AL. (1979) Penetration of oximes across the blood-brain barrier. A histochemical study of the cerebral cholinesterases reactivation. Experientia 35(4), 531-2.

MARQUIS J.K. (1984) Heterogeneity of mammalian brain acetylcholinesterase. Alzheimer's Dis: Adv. Basic Res. Ther., Proc. Meet. Int. Study Group Treat. Mem. Disord. Assoc. Aging, 3rd 161-84.

MASHIGE F.; OHKUBO S.; KAMEI S.; OHKUBO A.; YAMANAKA M. (1985) Measurement of serum cholinesterase activity by a kinetic method using acetylcholine as substrate with a Hitachi 736 automated analyzer system. Rinsho Kagaku 14(2), 112-7.

MASSA E.M.; MORERO R.D.; BLOJ B.; FARIAS R.N. (1975) Hormone action and membrane fluidity effect of insulin and cortisol on the Hill coefficients of rat erythrocyte membrane bound acetyl cholinesterase and (Na + K)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66(1), 115-22.

MATSUBARA T.; HORIKOSHI I. (1984) Chemical reactivations of inactivated acetylcholinesterase after 2-PAM therapy in fenitrothion-poisoned rat and rabbit. *J. Pharmacobiodyn.* 7(2), 131-7.

MAZZANTI L.; CESTER N.; MEME E.; VALENSISE H.; ROMANINI C.; FERRARA P.; MARINELLI F.; BIAGINI G.; BERTOLI E.; LENZA G. (1988) Effect of general anesthesia on syncytio-trophoblast plasmz membranes from human placenta. *Biochem. Int.* 16(6), 1095-101.

MENDEL B.; RUDNEY H. (1943a) Studies on cholinesterase. I. Cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochemical Journal* 37, 59-63.

MENDEL B.; MUNDELL D.B. (1943b) Studies on cholinesterase. II. A method for the purification of a pseudocholinesterase from dog pancreas. *Biochemical Journal* 37, 64-6.

MENDEL B.; MUNDELL D.B.; RUDNEY H. (1943c) Studies on cholinesterase. III. Specific tests for true cholinesterase and pseudocholinesterase. *Biochemical Journal* 37, 473-6.

MESULAM M.M.; GEULA CH.; MORAN M.A. (1987) Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of

physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann. Neurol.* 22(6), 683-91.

MICHALEK H.; PINTOR A.; FORTUNA S.; BISSO G.M. (1985) Effects of diisopropylfluorophosphate on brain cholinergic systems of rats at early developmental stages. *Fundam. Appl. Toxicol.* 5(6II), 5204-12.

MICHEL H.O. (1949) An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 34, 1564-8.

MIYAMOTO Y. (1972) *Jap. J. Clin. Path.* 20, 350.

MIZOBE F.; IWAMOTO M. (1984) Veratridine-evoked release of intracellular and external acetylcholinesterase from cultured adrenal chromaffin cells. *Biomed Res.* 5(1), 83-7.

MODAK A.T.; WEINTRAUB S.T.; STAVINOHA W.B. (1975) Effect of chronic ingestion of lead on the central cholinergic system in rat brain regions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 34(2), 340-7.

MOLINENGO L.; ORSETTI M. (1988) Action of diisopropyl fluorophosphate and of diacetylmonoxime on acetylcholine levels and on cholinesterase activity in the central nervous system. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 295,17-27.

MOSS D.E.; RODRIGUEZ L.A.; HERNDON W.C.; VINCENTI S.P.; CAMARENA M.L. (1986) Sulfonylfluorides as possible therapeutic agents in Alzheimer's disease:

structure/activity relationships as CNS-selective cholinesterase inhibitors. *Adv. Behav. Biol.* 29, 551-6.

MULLER F.; DUMEZ Y.; MASSOULIE J. (1985) Molecular forms and solubility of acetylcholinesterase during the embryonic development of rat and human brain. *Brain Res.* 331(2), 295-302.

MUÑOZ-BLANCO J.; YUSTA B.; MARTÍNEZ-LUQUE M.; GONZALEZ J. MARIA (1985) Acetylcholinesterase activity in blood plasma and several CNS areas of rats poisoned by lindane. Effect of pentobarbital sodium. *Rev. Esp. Fisiol.* 41, 89-93.

MURAI M. (1981) Effects of benzoylcholine on ChE activity in rabbit and rat brain and erythrocytes. *Folia Pharmacol. JPN.* 77(2), 115-22.

NABB D.P., WHITFIELD F. (1967) Determination of cholinesterase by an automated Delta pH Stat method. *Arch. Environ. Health* 15:147.

NACHMANSOHN D.; WILSON J.B. (1951) Acetylcholinesterase. In: *Methods in Enzymol.* Colornick and Kaplan, ed., Acad. Press, 259-61.

NAKANO S.; KATO T.; NAKAMURA S.; KAMEYAMA M. (1986) Acetylcholinesterase activity in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and senile dementia. *J. Neurol. Sci.* 75(2), 213-23.

NASSAV A.Y.; MEGALLA S.E.; HAFEZ A.H. (1987) Esterogenic

effect of zearalenone on the uterine acetylcholinesterase in female rats. *Mycopathologia* 97(3), 173-8.

NAVRATIL L.; BAJGAR J.; POUCKOVA P. (1985) Postirradiation changes in the activity of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in platelets of rats after whole-body irradiation. *Sb. Lek.* 87(7), 177-84.

NIDAY E.; WANG C.S.; ALANPOVIC P.(1977) Studies on the characterization of human erythrocyte acetylcholinesterase and its interaction with antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 469(180-93).

NIELSEN-KUDSK F.; JAKOBSEN P.; MAGNUSSEN I. (1980) Plasma induced biotransformation of thymoxamine and its kinetics. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 47(1), 11-6.

NYQUIST-BATTIE C.; HODGES-SAVOLA CH.; FERNÁNDEZ H.L. (1987) Acetylcholinesterase molecular forms in rat heart. *J.Mol. Cell. Cardiol.* 19(9). 935-43.

DETE T.; MASUI K.; MIYAUCHI M. (1985) Comparison of substrates for measuring serum choline esterase activity in hepatobiliary disease. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23(10), 669-75.

OMATA S.; HIRAKAWA E.; DAIMON Y. (1982) Methylmercury-induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rat. *Arch. Toxicol.* 51(4), 285-94.

ORD M.G.; THOMPSON R.H.S.(1952) Pseudocholinesterase activity in the central nervous system. Biochemical Journal 51, 245-51.

ORIAKU E.T.; SOLIMAN K.F.A. (1986) Effect of estress and glucocorticoids on the gastrointestinal and cholinergic enzymes. Arch. Int. Pharmacodym. Ther. 280(1), 136-44.

OZER N.; OZER I. (1987) Differential reactivity of active sites in human plasma cholinesterase toward 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. Arch. Biochem. Biophys. 255(1), 89-94.

PANTEGHINI M.; BONORA R. (1984) Evaluation of a new continuous colorimetric methods for determination of serum pseudocholinesterase catalytic activity and its application to a centrifugal fast analyzer. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22(10), 671-6.

PANTEGHINI M.; BONORA R.; PAGANI F. (1986) Evaluation of a new method for cholinesterase determination. Clin. Biochem. 19(3), 161-5.

PARVEEN S.; TEWARI H.B. (1986) On the distributive pattern of acetylcholinesterase(AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) in the medulla oblongata of the golden hamster (*Misocricetus auratus*). A study on the topographical and functional linkages of the two enzymes. Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp. 75(1), 45-9.

PATOCKA J.; BAJGAR J. (1987a) Protective effect of bis-bipyridinium compounds on the rat brain acetylcholinesterase inhibition by carbamate in vitro. *Biomed. Biochim. Acta* 46(6), 455-9.

PATOCKA J.; BAJGAR J. (1987b) Aluminium activation and inhibition of human brain acetylcholinesterase in vitro. *Inorg. Chim. Acta* 135(2), 161-3.

PAYNER T.D.; DRAKE R.L.; SAKER D.M.; SHIPLEY M.T. (1987) Determination of molecular forms of brain acetylcholinesterase: technical considerations. *Brain Res. Bull.* 19(2), 287-90.

PEAT D.; BROCK D.J.H. (1984) Quantitative estimation of the density ratios of cholinesterase bands in human amniotic fluids. *Clin. Chim. Acta* 138(3), 319-24.

PELLIN M.C. (1987) Interacciones neurotóxicas entre n-hexano y triortocresilfosfato. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

PEREZ-GUILLERMO F.; MUÑOZ DELGADO E.; VIDAD C.J. (1987) Inhibition of human serum and rabbit muscle cholinesterase by local anesthetics. *Biochem. Pharmacol.* 36(21), 3593-6.

PICKERING C.E.; PICKERING R.G. (1977) The interference by erythrocyte Acetylthiocholinesterase in the estimation of the blood cholinesterase activity of the chicken. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39(2), 229-37.

PILLANS P.I.; STEPHENSON B.A.; FOLB P.I. (1988) Vitamin A effects on fetal mouse cephalic acetylcholinesterase and choline acetyltransferase. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 17(6), 665-71.

PRINCE A.K.(1966) Biochem. Pharmacol. 15, 411.

PRINCE A.K.(1966) Arch. Biochem. Biophys. 113, 195.

PRODDY C.A.; DREYFUS P. (1989) De novo amplification within a "silent" human cholinesterase gene in a family subjected to prolonged exposure to organophosphorous insecticides. Proc. Natl. Acad. Sci. 86(2), 690-4.

PROZOROVSKII V.B.; KHRAMOVA E.A.; ARDAB'EVA T.E. (1983) Testing of cholinesterase reactivators as proserine antagonists. Byull. Eksp. Biol. Med. 96(10), 66-8.

PUU G.; ARTUSSON E.; BUCHT G. (1986) Reactivation of nerve agent-inhibited human acetylcholinesterases by HI-6 and obidoxime. Biochem. Pharmacol. 35(9), 1505-10.

PUU G. (1988) Ketamine protects acetylcholinesterase against in vitro inhibition by sarin. Biochem. Pharmacol. 37(5), 969-70.

QUINN D.M. (1987) Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics and virtual transition states. Chem. Rev. 87(5), 955-79.

RADIC Z.; REINER E.; SIMEON V. (1984) Binding sites on acetylcholinesterase for reversible ligands and

phosphorylating agents. A Theoretical model tested on naloxon and phosphostigmine. *Biochem. Pharmacol.* 33(4), 671-7.

RAITERI M.; MARCHI M.; CAVIGLIA A.M. (1986) Studies on a possible functional coupling between presynaptic acetylcholinesterase and high-affinity choline uptake in the rat brain. *J. Neurochem.* 47(6), 1696-9.

RAJENDRA W.; OLOFFS P.C.; BANISTER E.W. (1986) Effects of chronic intake of diazinon on blood and brain monoamines and amino acids. *Drug Chem. Toxicol.* 9(2), 117-31.

RAJESWARI K.R.; SATYANARAYANA M.; NARAYAN P.V. (1985) Effect of extremely low frequency magnetic field on serum cholinesterase in humans and animals. *Indian J. Exp. Biol.* 23(4), 194-7.

RAMIREZ G.; GOMEZ-BARRIOCANAL J.; BARAT A.; RODRIGUEZ-BORRAJO C. (1984) Two classes of collagen-tailed molecular forms of acetylcholinesterase. *Dev. Neurosci.* 17, 519-22.

RATNAIKE S.; GRAY F.; DEAM D. (1987) Cholinesterase assay automated in the Cobas-Bio centrifugal analyzer. *Clin. Chem.* 33(8) 1460-2.

RAY A.; KHAMA N.; BHATTACHARGA S.K.; ALKODON M.; SEN P. (1987) Modulation of analgesic and anti-inflammatory effects of aspirin. *Indian J. Med. Res.* 86, 264-8.

REINER E. (1986) Inhibition of acetylcholinesterase by 4,4'-

bipyridine and its effect upon phosphorylation of the enzyme. Croat. Chem. Acta 59(4), 925-31.

REINIKAINEN K.J.; RIEKKINEN P.J.; PALJARVI L.; SOININEN H.; HELKALA E.L.; JOLKKONEN J.; LAAKSO M. (1988) Cholinergic deficit in Alzheimer's disease: a study based on CSF and autopsy data. Neurochem. Res. 13(2), 135-46.

RELIMPIO A.M. (1978) Relation between chemical structure and biological activity of anticholinesterases. Gen. Pharmacol. 9(1), 49-53.

ROBERTS W.L.; LEWIS W. (1989) Structural characterization of the membrane anchor of human erythrocyte cholinesterase. Diss. Abstr. Int. B. 49(8), 3169-70.

ROBERTSON L.T.; LOGAN K. (1986) Relationship of parasagittal bands of acetylcholinesterase activity to the climbing fiber representation. Neurosci. Lett. 72(2), 128-34.

ROMERO-VECCHIONE E.; FATRANSKA M.; KVETNASKY R. (1987) Acetylcholinesterase activity in several hypothalamic and brain stem nuclei after acute and chronic immobilization stress in rats. Endocrinol. Exp. 21(2), 159-65.

RONEY P.L.; COSTA L.G.; MURPHY S.D. (1986) Conditioned taste aversion induced by organophosphate compounds in rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 24(3), 737-42.

RORHBACH M.S.; HUMPHRIES B.A.; YOST F.J. et al. (1973) The reaction of 4,4'-bis-dimethylaminodiphenylcarbinol with the

sulfhydryl groups. Anal. Biochem. 52, 127-42.

ROSEN G.M.; RAUCKMAN E.J.; HORD W.W. (1977) Spin-labeled TMA analogs as probes to study the anionic site of acetylcholinesterase. Gen. Pharmacol. 8(5-6), 355-7.

ROSENBERRY T.L.; SCOGGIN D.M. (1984) Structure of human erythrocyte acetylcholinesterase. Characterization of intersubunit disulfide bonding and detergent interaction. J. Biol. Chem. 259(9), 5643-52.

ROSENBERRY T.L. (1985) Structural distinctions among acetylcholinesterase forms. Enzymes Biol. Membr. 3, 403-29.

ROSENBERRY T.L.; HAAS R.; ROBERTS W.L.; KIM B.H. (1985) The hydrophobic domain of human erythrocyte acetylcholinesterase contains nonamino acid components. Mol. Basis Nerve Act., Proc. Int. Symp. Mem. David Nachmansohn, 651-66.

ROSENBERRY T.L.; ROBERTS W.L.; HAAS R. (1986) Glycolipid membrane-binding domain of human erythrocyte acetylcholinesterase. Fed. Proc. 45(13), 2970-5.

ROTUND R.L.; GOMEZ A.M.; FERNANDEZ-VALLE C.; RANDALL W.R. (1988) Allelic variants of acetylcholinesterase: genetic evidence that all avian nerves and muscles are encoded by a single gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 85(20), 7805-9.

ROUFOGALIS B.D.; BEAUREGARD G. (1979) Role of phospholipid (cardiolipin) in the modulation of substrate and inhibitor interactions with erythrocyte acetylcholinesterase. Mol.

Pharmacol. 16(1), 189-95.

RUBERG M.; RIEGER F.; VILLAGEOIS A.; BONNET A.M.; AGID Y. (1986) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in frontal cortex and cerebrospinal fluid of demented and non-demented patients with Parkinson's disease. Brain Res. 362(1), 83-91.

RUSH R.S.; DOCTOR B.P.; WOLFE A.D. (1986) Kinetic investigation into the interactions of aprophen with cholinesterases and a carboxylesterase. Biochem. Pharmacol. 35(23), 4167-70.

SADASIVUDU B.; MURTHY C.R.K.; RAO G.N.; SWAMY M. (1983) Studies on acetylcholinesterase and gammaglutamyltranspeptidase in mouse brain in ammonia toxicity. J. Neurosci. Res. 9(2), 127-34.

SAHA U.K.; SENGUPTA D. (1987) In vitro effects of oxazepam, lorazepam and chlordiacepoxide on the cholinesterase activity of human fetal and adult brain. Indian. J. Med. Res. 86, 90-4.

SAKOGUCHI T.; HASHIMOTO M.; KOBAYASHI K.; KIMURA M.; IGAKI A.; MATSUOKA A. (1986) Effects of heavy metals and alkaline earth metals on serum cholinesterase activity and reversal of the effects by serum proteins. Rinsho Kagaku 15(5), 304-9.

SARUTA H. (1988) Reagents for p-hydroxybenzoic acid

determination, and determination of serum cholinesterase based on p-hydroxybenzoic acid formation and measurement. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63 07,796 (88 07,796) (CL. C12Q1/26).

SAVOLAINEN H.; VALKONEN S. (1986) Dose-dependent brain tin concentration in rats given stannous chloride in drinking water. Toxicol. Lett. 30(1), 35-9.

SETO Y.; SHINOHARA T. (1987) Inhibitory effects of paraquat and its related compounds on the acetylcholinesterase activities of human erythrocytes and electric eel. (*Electrophorus electricus*) Agric. Biol. Chem. 5(8), 2131-8.

SETO Y.; SHINOHARA T. (1988) Substrate specificity of cholinesterase activities in blood from different animal species. Hokoku Hokagaku Heu 41(2), 100-6.

SETO Y.; SHINOHARA T. (1988) Structure-activity relationship of reversible cholinesterase inhibitors including paraquat. Arch. Toxicol. 62(1), 37-40.

SCHEGG K.M.; FUTAMACHI K.J.; PEACOCK J.H. (1986) Characterization of acetylcholinesterase iso-forms in septal and hippocampal cultures and cocultures. Dev. Brain Res. 30(2), 221-30.

SCHUH F.T. (1976) On the molecular mechanism of action of galanthamine, an antagonist of nondepolarizing muscle relaxants. Anaesthesist 25(9), 444-8.

SCHUH F.T. (1977) On the inhibition of cholinesterases by

pancuronium. *Anaesthesist* 26(3), 125-9.

SCHUMACHER M.; CAMP S.; MAULET Y.; NEWTON M.; MACPEE-QUIGLEY K.; TAYLOR S.S.; FRIEDMANN T.; TAYLOR P. (1986) Primary structure of acetylcholinesterase: implications for regulation and function. *Fed. Proc.* 45(13), 2976-81.

SCHUMACHER M.A. (1987) The primary structure of acetylcholinesterase. *Diss. Abstr. Int B* 48(6), 1653.

SHIBANOV S.E. (1984) Combined effect of inhaled carbofos and ammonia. *Gig. Sanit.* 1, 81-2.

SHIBATA S.; TAKAHASHI H. (1953) *Bull. Yamaguchi Med. Sch.* 1, 188.

SHINOHARA T.; SETO Y. (1986) In vitro inhibition of acetylcholinesterase by paraquat. *Agric. Biol. Chem.* 50(1), 255-6.

SHINO TEST KENKYUSHO K.K. (1984) Detection of genetic variants of cholinesterase. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP* 59,2 2,100.

SIDDIQUE A.B.; ALSENSY A.M. (1985) The concentration and activity of the brain acetylcholinesterase of some animals. *Indian Vet. J.* 62(9), 756-60.

SILK E.; KING J.; WHITTAKER M. (1979) Assay of cholinesterase in clinical chemistry. *Annals Clin. Biochem.* 16, 57-75.

SILMAN I.; FUTERMAN A.H. (1987) Modes of attachment of acetylcholinesterase to the surface membrane. Eur. J. Biochem. 170(1-2), 11-22.

SILVER A.(1974) In the biology of cholinesterase. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, Oxford. pp. 443-9.

SIMON G.; BIROK K.; KARPATI E.; TUBA Z. (1980) The effect of the steroid muscle relaxant pipecuronium bromide on the acetylcholinesterase activity of red blood cells in vitro. Arzneim-Forsch 30(2A), 360-3.

SINE J.P.; COLAS B. (1987) Soluble form of acetylcholinesterase from rabbit enterocytes: Comparison of its molecular properties with those of the plasma membrane species. Biochemie 69(P1), 75-80.

SINGH A.K. (1986) Kinetic analysis of acetylcholinesterase inhibition by combinations of acephate and methamidophos. Toxicology 42(2-3), 143-56.

SKAN K.A. (1985) Acetylcholinesterase molecular forms in serum and erythrocyte of laboratory animals. Comp. Biochem. Physiol. , C.; Comp. Pharmacol. Toxicol. 80C(1), 207-10.

SKET D.; BRZIN M. (1986) Effect of HI-6, applied into the cerebral ventricles, on the inhibition of brain acetylcholinesterase by soman in rats. Neuropharmacology 25(1), 103-7.

SKOPEC F.(1986) Changes in cholinesterase activity in

selected systems of rabbits after ionizing irradiation. Hradci Kralove 29(2), 69-162.

SKRINJARIC-SPOLJAR M.; SIMEON V.; REINER E.; KRANTHACKER B. (1988) Bispyridinum compounds : inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase and protection of the enzyme against phosphorylation. Acta Pharm. Jugosl. 38(2), 101-9.

SLAVIKOVA J.; TUCEK S. (1986) Postnatal changes in the activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in rat heart atria. Physiol. Bohemoslov. 35(1), 11-6.

SMALL D.H.; ISMAEL Z.; CHUBB I.W. (1989) Acetylcholinesterase exhibits trypsin-like and metalloexopeptidase-like activity in cleaving a model peptide. Neuroscience 21(3), 991-5.

SOLLET GUILARTE S.; ULACIA N.; MORERA L.; RAMIREZ PEREZ R.; GUEVARA ANDREU T.; CABRERA GUERRA C. (1988) Some biochemical parameters in workers exposed to mercury. Rev. Cubana Med. 27(2), 55-61.

SONAWANE B.R.; BAKSI S.N. (1980) Altered thyroid hormone status and dichlorvos toxicity in rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 30(2), 369-72.

SOOD P.P.; MOHANAKUMAR K.P. (1985) Acetylcholinesterase fluctuations in the brain of mice during morphine dependence development, withdrawal and naloxone-induced withdrawal. Cell. Mol. Biol. 31(6), 475-88.

SORENSEN K.; BRODBECK U.; RASMUSSEN A.G.; NORGAARD-PEDERSEN B. (1986) Normal human serum contains two forms of acetylcholinesterase. *Clin. Chim. Acta* 158(1), 1-6.

SOREG H.; PRODY C.A. (1989) Sequence similarities between human acetylcholinesterase and related proteins: putative implications for therapy of anticholinesterase intoxication. *Prog. Clin. Biol. Res.* 289, 347-59.

SOYLEMEZ Z.; OZER I. (1985) Multiple effects of isoproterenol on horse plasma cholinesterase. *Pharmacol. Toxicol.* 81C(2), 433-7.

SOYLEMEZ Z.; RUDOLPH R.; JAENICKE R. (1986) Isoproterenol inhibition of horse serum cholinesterase is connected with subunit dissociation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367(8), 705-13.

SPRINGER J.E.; TAYRIEN M.W.; LOY R. (1987) Regional analysis of age-related changes in the cholinergic system of the hippocampal formation and basal forebrain of the rat. *Brain Res.* 407(1), 180-4.

STEDMAN E.; STEDMAN E.; EASSON L.H. (1932) Cholinesterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. *Biochemical Journal* 26, 2056-66.

STEDMAN E.; STEDMAN E. (1931). Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. III. The inhibitory action of certain synthetic urethanes on the

activity of liver esterase. *Biochemical Journal* 25, 1147-67.

STERRI S.H. (1985) Esterase activities and soman toxicity in developing rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 57(2), 136-40.

STIEGER S.; BRODBECK O.; WITZEMANN V. (1987) Inactive monomeric acetylcholinesterase in the low-salt-soluble extract of the electric organ from *Torpedo marmorata*. *J. Neurochem.* 49(2), 460-7.

SUGIMORI T. (1986) Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isozyme. *Can. Anaesth. Soc. J.* 33 (3 pt 1), 321-7.

SUN M.; LI F.; CHOU T. (1986) Reactivation of Sarin -or Soman- phosphorylated human acetylcholinesterase by bispyridinium monooximes. *Biochem. Pharmacol.* 35(2), 347-9.

SUNG S.C.; RUFF B.A. (1987) Intracellular distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in rat brain and changes after diisopropyl fluorophosphate treatment. *Neurochem. Res.* 12(1), 15-19.

SUZUKI; TAUCHI K. (1975) Modification of Michael's method for determination of serum acetyl choline esterase activity. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 14(6), 674-80.

SVENSMARK O. (1965) Molecular properties of cholinesterase. *Acta Physiol. Scand.* 64 Suppl. 245, 1-74.

SWATDITAT A.; TSEN C.C. (1972) Determinig simple sulfhydryl

compounds (low molecular weight) and their contents in biological samples by using 2,2'-dithiobis-(5-nitropyridine). Anal. Biochem. 45, 349-56.

SWILLENS S.; LUDGATE M.; MERCKEN L. (1986) Analysis of sequence and structure homologies between thyroglobulin and acetylcholinesterase: possible functional and clinical significance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137(1), 142-8.

SZABO M.; TEICHMANN F.; SZOOZ A.; PAPP Z. (1983) Activity of cholinesterase in the amniotic fluid in abnormal fetal development. Ideggyogy. Sz. 35(suppl.), 825-30.

TAGUCHI R.; IKEZAWA H. (1987) Properties of bovine erythrocyte acetylcholinesterase solubilized by phosphatidylinositol specific phospholipase C. J. Biochem. 102(4), 803-11.

TIWARI R.K.; BANDYOPADHYAY S.K.; CHATTERJEE K. (1982) Effects of high dose application of lindane to rats and influence of L-ascorbic acid supplementation. Init. J. Vitamin. Nutr. Res. 52(4), 448-55.

TOMITA K.; KAMEI S.; SHIRAIISHI T.; HASHIMOTO Y.; YAMANAKA M. (1985) Ultraviolet spectrophotometric method for determination of cholinesterase activity with acetylcholine as a substrate. J. Appl. Biochem. 7(4-5) 303-10.

TOMLINSON G.; MUTUS B.; McLENNAN I. (1980) Modulation of acetylcholinesterase activity by peripheral site ligands. Mol. Pharmacol. 18(1), 33-9.

TOMOKUNI K.; HASEGAWA T. (1985) Diazinon concentrations and blood cholinesterase activities in rats exposed to diazinon. *Toxicol. Lett* 25(1), 7-10.

TOPILKO A.; CAILLON B. (1985) Acetylcholinesterase in human thymus cells. *Blood* 66(4), 891-5.

TORP H.E. (1986) Hemolytic effect of the enzyme system acetylcholine erythrocyte-cholinesterase. The enzyme systems possible connection with H⁺ -ion activity relating to erythrocytes from the spleen. *Scand. J. Haematol. Suppl.* 46, 11 pp.

TOUTANT J.P.; ROBERTS W.L.; MURRAY N.R.; ROSENBERRY T.L. (1989) Conversion of human erythrocyte acetylcholinesterase from an amphiphilic to anhydrophilic form by phosphatidylinositol specific phospholipase C and serum phospholipase D. *Enz. J. Biochem.* 180(3), 503-8.

TOUTANT J.P.; MASSOULIE J.; BON S. (1985) Polymorphism of pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* tissues: comparative study of the catalytic and molecular properties of this enzyme with acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* 44(2), 580-92.

TROCCOLI R.; BIAGIONI S.; STELLA F.; PACHI A.; ERMINI M.; TOSCHI M.; SCARSELLA G.; GIORGI M. (1985) Cholinesterase evaluation in the prenatal diagnosis of open neural tube defects. *Ric. Clin. Lab.* 15(1), 53-62.

TRUHANT R.; VERNIN A. (1964) Mesure de l'activité du sang total. Méthode par spectrophotométrie d'absorption dans le visible. Ann. Biol. Clin. 22, 419-28.

TSIM K.W.K.; RANDALL W.R.; BARNARD E.A. (1988a) An asymmetric form of muscle acetylcholinesterase contains three submit types and two enzymic activities in one molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(4), 1262-6.

TSIM K.W.K.; RANDALL W.R.; BARNARD E.A. (1988b) Identification of a 17S asymmetric butyrylcholinesterase in chick muscle by monoclonal antibodies. Neurosci. Lett. 86(2), 245-9.

ULRICHOVA J.; KOVAC J.; SIMANEK V. (1985) Interaction of quaternary aromatic isoquinoline alkaloids with acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. Collect. Czech. Chem. Commun. 50(4), 978-83.

VACCA C.; MAIONE S.; TOZZI A.; MARMO E. (1987) Benzamides and cholinesterases. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 55 (2), 193-201.

VALENTINO R.J.; LOCKRIDGE O.; ECKERSON H.W.; LA DU B.N. (1981) Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies. Biochem. Pharmacol. 30(12), 1643-9.

VAN DER HEIDEN C.; HUIZENGA J.R.; BRINK W.; GIPS C.H. (1987) Pseudo-cholinestrase in serum measured

spectrophotometrically. Tijdschr. Ned. Ver. Klin. Chem. 12(3), 95-9.

VAN DONGEN C.J.; ELSKAMP R.M.; DE JONG L.P.A. (1987) Influence of atropine upon reactivation and ageing of rat and human erythrocyte acetylcholinesterase inhibited by soman. Biochem. Pharmacol. 36(7), 1167-9.

VERJEE Z.H.; BEHAL R.; AYIM E.M. (1977) Effect of glucocorticoids on liver and blood cholinesterases. Clin. Chim. Acta. 81(1), 41-6.

VIDAL C.J.; MUÑOZ-DELGADO E.; YAGUE-GUIRAO A. (1987) Acetylcholinesterase in membrane fractions derived from sarco-tubular system of skeletal muscle: presence of monomeric acetylcholinesterase in sarcoplasmic reticulum and transverse tubule membranes. Neurochem. Int. 10(3), 329-38.

VILLAR PALASI V.; CABEZAS FERNANDEZ CAMPO J.A.; SANTOS RUIZ A. (1977). Tratado de Bioquímica.

VLASOV G.P.; GLUSHENKOVA V.R.; ZHUKORSKII Y.G.; LUKASHEVICH O.V. NOVOZHILOV K.V. FARTSEIGER N.L.; SYCHEVA E.N.; SHVETS E.K. (1987) Purification of acetylcholinesterase from horse erythrocytes by affinity chromatography. Ukr. Biokhim. Zh. 59(3), 12-19.

VOSS; SACHSSE (1970) Toxicol. Appl. Pharmacol. 16, 764-72.

WASHIO H.; IMAZATO-TANAKA C.; KANDA K.; NOMOTO S. (1987) Choline acetyltransferase and acetylcholinesterase

activities in muscles of aged mice. Brain. Res. 416(1); 69-74.

WATERLOW J.C. (1950) Liver cholinesterase in malnourished infants. Lancet 258, 908-9.

WAY R.C.; HUTTON C.J.; KUTTY K.M. (1975) Relationship between serum cholinesterase and low density lipoprotein in children with nephrotic syndrome. Clin. Biochem. 8, 103.

WEE V.T.; SINHA B.K.; TAYLOR P.W.; CHIGNELL C.F. (1976) Interaction of spin labeled bisquaternary ammonium ligands with acetylcholinesterase. Molec. Pharmacol. (N.Y.) 12(4), 667-77.

WEINSTOK M.; RAZIN M.; CHOREV M.; TASHMA Z. (1986) Pharmacological activity of novel anticholinesterase agents of potential use in the treatment of Alzheimer's disease. Adv. Behav. Biol. 29, 539-49.

WHITTAKER M.; BRITTEN J.J.; WICKS R.J. (1981) Inhibition of the plasma cholinesterase variants by propranolol. Br. J. Anaesth. 53(5), 511-6.

WILSON I.B. (1985) Cholinesterase: two surprising inhibitors. Mol. Basis Nerve Act., Proc. Int. Symp. Mem. David Nachmansohn, 667-78.

WITTER R. (1963) Measurement of blood cholinesterase. Arch. Environ. Health 6, 537.

WOLTHUIS O.L.; KEPNER L.A. (1978) Successful oxime therapy

one hour after soman intoxication in the rat. Eur. J. Pharmacol. 49(4), 415-25.

WONG R.K.M.; NICHOL C.P.; SEKAR M.C.; ROUFOGALIS B.D. (1987) The efficiency of various detergents for extraction and stabilization of acetylcholinesterase from bovine erythrocytes. Biochem. Cell. Biol. 65(1); 8-18.

WORTSMAN J.; FOLEY P.J.; TACKER W.A.; GIACOBINI E.; CRYER P.E.; FRANK S. (1987) Cerebrospinal fluid changes in experimental cardiac arrest (maximal stress). Am. J. Physiol. 252(6, Pt1), E756-E761.

WYSOCKA-PARUSOZEWSKA B.; BIEL-BARANOWSKA M. (1979) Effects of chronic lead administration on noradrenaline level and cholinesterase activity in adult rat brain. Pol. J. Pharmacol. Pharm. 31 (4), 399-405.

XUE S.Z.; DING X.J.; DING Y. (1985) Clinical observation and comparison of the effectiveness of several oxime cholinesterase reactivators. Scand. J. Work., Environ. Health 11, 46-8.

YAGUE-GUIRAO A.; MUÑOZ-DELGADO E.; VIDAL G.J. (1986) Thermal stability of molecular forms of acetylcholinesterase from muscle microsomes. Biochem. Int. 12(5), 685-92.

YAMAMICHI H.; ASHIDA H.; KITAZOE N. (1985) Standardization of the determination of serum cholinesterase activity using p-hydroxybenzoylcholine as substrate. Rinsho Kensa 29(7),

825-9.

YAMANAKA S.; NISHIMURA M. (1984), Effects of organophosphorus compounds and PAM on cholinesterase activity in rat tissues. Nippon. Eiseigaku Zasshi 39(5), 795-806.

YAO T.; WASA T. (1984) Rapid measurement of cholinesterase activity in blood serum. Bunseki Kagaku 33(6). 342-4.

YIN G.; LUO Q.; ZHANG N.; RU L.; AI M. (1985) Observations on cholinesterase activity in the brain of hemicholinium-3 (HC-) -pretreated rats after electroacupuncture. Wuhan Yixueyuan Xuebao 14(5), 325-7.

YOSHIDA M. (1983) Na⁺, K⁺ -ATPase activity of red cell membranes in workers exposed to mercury vapor. Ind. Health. 21(1), 11-8.

YOUKIN S.G.; GOODRIDGE B.; KATZ J.; LOCKETT G. (1986) Molecular forms of acetylcholinesterases in Alzheimers disease. Fed. Proc. 45 (13), 2982-8.

YUCEL D.; TOP S. (1988) Relationship between serum cholinesterase activity and duration of succinylcholine action in subjects with the "usual" phenotype for the enzyme. Clin. Chem. 34(12), 2579-80.

ZAKUT H.; MATZKEL A.; SCHEJTER E. (1985) Polymorphism of acetylcholinesterase in discrete regions of the developing human fetal brain. J. Neurochem. 45(2), 382-9.

ZELYAK V.I.; BAZAREVICH G.Y.; NORMAN T.N.; LEKSINA A.K.
(1984) Effects of exogenous cholinesterase on the pulmonary
surfactant system after massive blood loss. Patol. Fiziol.
Eksp. Ter. 5, 8-11.

ZELLER E.A.; BISSEGER A. (1943) Uber die Cholinesterase des
Gehirns und der Erythrocyten. Helvetia Chimica Acta 26,
1619-30.

ZEMAITIS M.A.; OBERHOLSER K.M.; GREENE F.E. (1976) Effects
of acute and chronic dieldrin administration on liver and
plasma esterases of the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol.
37(1), 29-37.

ZHANG Z.; YANG J.; ZHANG Z.; CAU H. (1984) Measurement of
active sites of acetylcholinesterases by the phosphorylating
agent O-ethyl-S-(diisopropylamino ethyl)
methanethiophosphonate. Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli
Xuebao 16(6), 586-91.

ZORKO M.; PAULIC M.R. (1986) Multiple binding of D-
tubocurarine to acetylcholinesterase. Biochem. Pharmacol.
35(14), 2287-96.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. JESÚS REPETTO JIMENEZ

titulada Estudios de la Acetil Colinesterasa (ACHE) y la Colinesterasa (CHE) en animales y humanos de la población andaluza. Su significación clínica.
acordó otorgarle la calificación de Apt. Cum. Satisf.

Sevilla, 20 de Noviembre 1971.

El Vocal

Miquel...

El Presidente

Juiz...

El Vocal

Luís...

El Secretario

A. Alvar...

El Vocal

[Signature]

El Secretario

[Signature]

[Signature]