

POLIMORFISMOS DEL GEN BUTIRILCOLINESTERASA RESPONSABLES DE REACCIONES ADVERSAS EN PACIENTES CONSUMIDORES DE “COCAÍNA”

CARLOS ESTRADA SERRATO

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ
2014**

POLIMORFISMOS DEL GEN BUTIRILCOLINESTERASA RESPONSABLES DE REACCIONES ADVERSAS EN PACIENTES CONSUMIDORES DE “COCAÍNA”

CARLOS ESTRADA SERRATO

**Trabajo de tesis para optar por el título de
Magister en Ciencias con énfasis en Genética Humana**

**Director:
Dr. Carlos Martín Restrepo Fernández MD, PhD**

**COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO
ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ÉNFASIS EN GENÉTICA HUMANA
BOGOTÁ
2014**

COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

POLIMORFISMOS DEL GEN BUTIRILCOLINESTERASA RESPONSABLES DE REACCIONES ADVERSAS EN PACIENTES CONSUMIDORES DE “COCAÍNA”

Línea de Investigación: Farmacogenética.

Instituciones Participantes: Unidad de Genética, Facultad de Medicina, Colegio Mayor de Nuestra Señora del Rosario – Grupo GeniURos; Genética Molecular de Colombia.

Tipo de Investigación: Postgrado.

Tesista: Carlos Estrada Serrato.

Director: Dr. Carlos Martín Restrepo Fernández MD, PhD.

Nota de aceptación:

Orietta Ivonne Beltrán Casas MD, MSc

Jurado del Trabajo de Grado

Jubby Marcela Gálvez Bermúdez MD, MSc

Jurado del Trabajo de Grado

Bogotá, Junio 17 de 2014

“La Universidad del Rosario no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velara por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Carlos Martín Restrepo Fernández MD, PhD
Director de Trabajo de Grado

Orietta Ivonne Beltrán Casas MD, MSc
Jurado del Trabajo de Grado

Jubby Marcela Gálvez Bermúdez MD, MSc
Jurado del Trabajo de Grado

Carlos Martín Restrepo Fernández MD, PhD
Director del Departamento de Ciencias Básicas

Nora Constanza Contreras Bravo Biol, MSc
Coordinador del Programa

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE TABLAS	11
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
RESUMEN	16
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1 COCAÍNA	20
1.1.1 Epidemiología del consumo de cocaína en el mundo	21
1.1.2 Variantes de cocaína y vías de consumo	22
1.1.3 Metabolismo de la cocaína	23
1.1.4 Manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas al consumo de cocaína	25
1.1.4.1 Intoxicación aguda	26
1.1.4.2 Intoxicación crónica	27
1.2 COLINESTERASAS	30
1.2.1 Origen de las colinesterasas	30
1.2.2 Butirilcolinesterasa	31
1.2.3 Estructura del gen <i>BCHE</i>	34
1.2.4 Variantes de Butirilcolinesterasa	35

1.2.4.1 Variante <i>D70G</i> o Atípica	39
1.2.4.2 Variante Silente	40
1.2.4.3 Variante <i>V142M</i> o Hammersmith	40
1.2.4.4 Variante <i>A184V</i> o Succinilcolina resistente	40
1.2.4.5 Variante <i>T243M</i> o Fluoruro resistente 1	41
1.2.4.6 Variante <i>E255D</i>	41
1.2.4.7 Variante <i>G390V</i> o Fluoruro resistente 2	41
1.2.4.8 Variante <i>E497V</i> o James	41
1.2.4.9 Variante <i>A539T</i> o Kalow	41
1.2.4.10 Variante C_5	42
1.2.4.11 Butirilcolinesterasa Cynthiana	42
1.2.4.12 Butirilcolinesterasa Johannesburgo	42
1.2.5 Papel fisiológico de la BChE	45
1.2.5.1 Metabolismo de lípidos, peso e Índice de Masa Corporal (IMC)	45
1.2.5.2 Ciclo celular y desarrollo embrionario	45
1.2.5.3 Tumorigénesis	46
1.2.5.4 Enfermedades neurodegenerativas	46
2. OBJETIVOS	47
2.1 OBJETIVO GENERAL	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3. ASPECTOS METODOLÓGICOS	48

3.1 TIPO DE ESTUDIO	48
3.2 POBLACIÓN	48
3.2.1 Criterios de inclusión	48
3.2.2 Criterios de exclusión	48
4. MATERIALES Y MÉTODOS	49
4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTREO	49
4.2 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN Y MEDIDA EN LA ADICCIÓN A COCAÍNA	49
4.3 EXTRACCIÓN DE ADN	49
4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	50
4.5 SECUENCIACIÓN	51
4.6 PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i>	51
5. RESULTADOS	55
5.1 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN Y MEDIDA EN LA ADICCIÓN A COCAÍNA	55
5.1.1 Consumo a lo largo de la vida	55
5.1.2 Consumo reciente	56
5.1.3 Dependencia psicológica	57
5.1.4 Intentos de abandono del consumo	58
5.2 ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN <i>BCHE</i>	58
5.3 PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i> PARA SNPs DEL GEN <i>BCHE</i>	62
6. DISCUSIÓN	69

BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXOS	95

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas al consumo de cocaína	28
Tabla 2. Variantes del gen <i>BCHE</i> identificados en la literatura y en bases de datos públicas.	37
Tabla 3. Factores que modifican los niveles de BChE	45
Tabla 4. Lista de <i>primers</i> utilizados en la PCR	51
Tabla 5. Distribución de la muestra según edad de inicio de consumo de cocaína (años)	55
Tabla 6. Distribución de la muestra según consumo de cocaína a lo largo de la vida	55
Tabla 7. Distribución de la muestra según frecuencia de mayor consumo de cocaína	56
Tabla 8. Distribución de la muestra según frecuencia de consumo de cocaína previo al ingreso a programas de desintoxicación (12 meses)	56
Tabla 9. Distribución de la muestra según frecuencia de consumo de cocaína previo al ingreso a programas de desintoxicación (1 mes)	57
Tabla 10. SNPs identificados en el gen <i>BCHE</i> en pacientes consumidores de cocaína	59
Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1799807 del gen <i>BCHE</i>	62
Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1803274 del gen <i>BCHE</i>	62

Tabla 13. Predicción <i>In silico</i> para SNPs del gen <i>BCHE</i> (I)	63
Tabla 14. Predicción <i>In silico</i> para SNPs del gen <i>BCHE</i> (II)	64
Tabla 15. Características de las variantes genéticas en estudio	64
Tabla 16. Cambios en la proporción de los elementos conformacionales de la estructura secundaria de la BChE y sus variantes Atípica (A) y Kalow (K)	65
Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1799807 del gen <i>BCHE</i> en diferentes poblaciones	72
Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1803274 del gen <i>BCHE</i> en diferentes poblaciones	73

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura cristalina del monómero de la enzima BChE humana	32
Figura 2. Estructura esquemática del sitio activo de la BChE	33
Figura 3. Localización cromosómica del gen <i>BCHE</i>	34
Figura 4. Diseño esquemático del gen <i>BCHE</i>	35
Figura 5. Electroferograma de productos de secuenciación del gen <i>BCHE</i> . Paciente BCHE-1	60
Figura 6. Electroferograma de productos de secuenciación del gen <i>BCHE</i> . Paciente BCHE-9	60
Figura 7. Electroferograma de productos de secuenciación del gen <i>BCHE</i> . Paciente BCHE-4	61
Figura 8. Estructura secundaria de la BChE obtenida con PSIPRED v.3.3	66
Figura 9. Estructura secundaria de la variante A obtenida con PSIPRED v.3.3	67
Figura 10. Estructura secundaria de la variante K obtenida con PSIPRED v.3.3	68

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
A	Atípica
AChE	Acetilcolinesterasa
<i>ACHE</i>	Gen de la acetilcolinesterasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AEME	Anhidro Ecgonina Metil Ester
Ala	Alanina
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
Asp	Ácido aspártico
BChE	Butirilcolinesterasa
<i>BCHE</i>	Gen de la butirilcolinesterasa
BEG	Benzoil Ecgonina
BME	Benzoil Metil Ecgonina
Csnp	Polimorfismos de Nucleótido Simple Codificantes
CYP	Citocromo P450
dbSNP	Base de Datos de Polimorfismo de Nucleótido Simple
DOI	Digital Object Identifier
DSM	Manual Diagnóstico y estadístico de los Trastornos Mentales
ECA	Epidemiological Catchment Area
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EME	Ecgonina Metil Ester
F-1	Fluoruro Resistente 1
F-2	Fluoruro Resistente 2
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
H	Hammersmith
HTA	Hipertensión Arterial
H-W	Hardy-Weinberg
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
IMC	Índice de Masa Corporal
J	James
K	Kalow
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LSI-C	Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder
Met	Metionina
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NSDUH	National Survey on Drug Use and Health
ONU	Organización de Naciones Unidas
PAS	Sitio aniónico periférico
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	Protein Data Bank

PhD-SNP	Predictor of human Deleterious SNPs
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2
S	Silente
SC	Succinilcolina
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIFT	SortingIntolerant From Tolerant
SNC	Sistema Nervioso Central
SNPs	Polimorfismos de Nucleótido Simple
Thr	Treonina
U	Usual
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Val	Valina
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VLDL	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad
WT	Wild-Type
A	Alfa
B	Beta
Ω	Omega

RESUMEN

La butirilcolinesterasa humana (BChE; EC 3.1.1.8) es una enzima polimórfica sintetizada en el hígado y en el tejido adiposo, ampliamente distribuida en el organismo y encargada de hidrolizar algunos ésteres de colina como la procaína, ésteres alifáticos como el ácido acetilsalicílico, fármacos como la metilprednisolona, el mivacurium y la succinilcolina y drogas de uso y/o abuso como la heroína y la cocaína. Es codificada por el gen *BCHE* (OMIM 177400), habiéndose identificado más de 100 variantes, algunas no estudiadas plenamente, además de la forma más frecuente, llamada usual o silvestre. Diferentes polimorfismos del gen *BCHE* se han relacionado con la síntesis de enzimas con niveles variados de actividad catalítica. Las bases moleculares de algunas de esas variantes genéticas han sido reportadas, entre las que se encuentra las variantes Atípica (A), fluoruro-resistente del tipo 1 y 2 (F-1 y F-2), silente (S), Kalow (K), James (J) y Hammersmith (H). En este estudio, en un grupo de pacientes se aplicó el instrumento validado *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)* para evaluar la gravedad del consumo de “cocaína” a lo largo de la vida. Además, se determinaron Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) en el gen *BCHE* conocidos como responsables de reacciones adversas en pacientes consumidores de “cocaína” mediante secuenciación del gen y se predijo el efecto de los SNPs sobre la función y la estructura de la proteína, mediante el uso de herramientas bio-informáticas. El instrumento *LSI-C* ofreció resultados en cuatro dimensiones: consumo a lo largo de la vida, consumo reciente, dependencia psicológica e intento de abandono del consumo. Los estudios de análisis molecular permitieron observar dos SNPs codificantes (cSNPs) no sinónimos en el 27.3% de la muestra, c.293A>G (p.Asp98Gly) y c.1699G>A (p.Ala567Thr), localizados en los exones 2 y 4, que corresponden, desde el punto de vista funcional, a la variante Atípica (A) [dbSNP: rs1799807] y a la variante Kalow (K) [dbSNP: rs1803274] de la enzima BChE, respectivamente. Los estudios de predicción *In silico* establecieron para el SNP p.Asp98Gly un carácter patogénico, mientras que para el SNP p.Ala567Thr, mostraron un comportamiento neutro. El análisis de los resultados permite proponer la existencia de una relación entre polimorfismos o variantes genéticas responsables de una baja actividad catalítica y/o baja concentración plasmática de la enzima BChE y algunas de las reacciones adversas ocurridas en pacientes consumidores de cocaína.

Palabras clave: Butirilcolinesterasa humana (BChE), cocaína, gen *BCHE*, Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs), reacciones adversas.

ABSTRACT

Human Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is a polymorphic enzyme synthesized in the liver and adipose tissue, widely distributed in the body and responsible for hydrolyze some choline esters such as procaine, aliphatic esters such as aspirin, drugs as methylprednisolone, mivacurium and succinylcholine and drug to use and abuse such as heroin and cocaine. It is coded by the *BCHE* gene (OMIM 147400), more than 100 variants have been identified, however not all of them have been studied fully, besides the most common form: usual or wild type. *BCHE* polymorphisms have been shown to produce enzymes with varying levels of catalytic activity. The molecular bases of some genetic variants of *BCHE* have been reported, such as the Atypical (A), fluoride-resistant 1 and 2 (F-1 and F2), silent (S), Kalow (K), James (J) and Hammersmith (H) variants. In this study, validated instrument *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)* was applied to evaluate the severity of the consumption of "cocaine" throughout life. In addition, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were identified in the *BCHE* gene, responsible for adverse reactions in patients consumers of "cocaine" by gene sequencing and the effect of these SNPs on the function and structure of the protein was predicted, using bio-informatics tools. The *LSI-C* instrument provided results in four dimensions: consumption throughout life, recent use, psychological dependence and quit attempt of cocaine use. Molecular analysis studies allowed to observe two coding SNPs (cSNPs) in 27.3% of the sample, c.293A>G (p.Asp98Gly) and c.1699G>A (p.Ala567Thr), located in exons 2 and 4, which are, from the functional point of view, to the atypical variant (A) [dbSNP: rs1799807] and Kalow variant (K) [dbSNP: rs1803274] of BChE enzyme, respectively. *In silico* prediction established for SNPs p.Asp98Gly a pathogenic character, while for the SNPs p.Ala567Thr showed neutral behavior. The analysis of the results allows proposing the existence of a relationship between polymorphisms or genetic variants responsible for the low catalytic activity and/or low plasma concentration of BChE enzyme and some of the adverse reactions in cocaine consumer patients.

Key Words: Human Butyrylcholinesterase (BChE), *BCHE* gene, cocaine, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), adverse reactions.

INTRODUCCIÓN

La cocaína, conocida como la *Benzoil Metil Ecgonina (BME)*, es un alcaloide obtenido de las hojas del arbusto *Erytroxylon coca*, cultivado y consumido en el nuevo mundo desde los 3.000 años a.C., y utilizado masivamente por los pobladores de Colombia y Perú desde el año 500 a.C. Según datos obtenidos del *Informe Mundial Sobre las Drogas* de la *Organización de Naciones Unidas (ONU)* para el año 2013, entre 167 y 315 millones de personas en el mundo con edades entre los 15 y 64 años han consumido algún tipo de droga ilícita (aproximadamente el 7% de la población mundial), siendo la cocaína consumida por 14 millones de personas (0.3% de la población mundial).

Tras administrar una dosis de cocaína, aproximadamente el 95% es metabolizado por la enzima butirilcolinesterasa (BChE) (Kamendulis y cols., 1996; Gorelick, 1997) y solo el 5% lo hace a través de la oxidación por el sistema microsomal hepático del citocromo P450 (Poet y cols., 1996).

La BChE (EC: 3.1.1.8) es una enzima sérica y polimórfica, producida en el hígado y en el tejido adiposo (Wescoe y cols., 1947; Lockridge, 1987) y distribuida en varios tejidos del organismo (Wescoe y cols., 1947). Es codificada por el gen *BCHE*, que está localizado en el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.1-q26.2) (Allderdice, 1991; Gaughan, 1991), con un tamaño de 73 Kb y constituido por cuatro exones separados por tres intrones. El producto del gen es la subunidad BChE, siendo necesarias cuatro de ellas para constituir la enzima activa.

Además de la forma más frecuente de la enzima, llamada usual o silvestre, más de 100 variantes han sido identificadas, no todas ellas estudiadas plenamente (Mikami y cols., 2008; Shields y cols., 2011) y algunas relacionadas con actividad deficitaria (Barta, 2001). Las bases moleculares de algunas de esas variantes genéticas han sido reportadas, entre las que se encuentra las variantes Atípica (A), fluoruro-resistente del tipo 1 y 2 (F-1 y F-2), silente (S), Kalow (K), James (J) y Hammersmith (H).

Asociado a las variantes del gen *BCHE*, que son los principales factores genéticos relacionados con la disminución de la actividad de la enzima BChE, existen diferentes factores biológicos y ambientales asociados con su baja actividad, como por ejemplo, las neoplasias (Kaniaris y cols., 1979), las enfermedades hepáticas (Schmidt y Schmidt, 1993) y renales (Phillips y Hunter, 1992), la gestación (Evans, 1980; De Peyster, 1990; Venkataram, 1990), la desnutrición (Umeki, 1993), el uso de anovulatorios orales (Robertson, 1967), entre otras.

En el presente estudio se evaluó la gravedad del consumo de la droga de uso y/o abuso “cocaína” a lo largo de la vida en un grupo de pacientes, mediante la aplicación del instrumento validado *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)*. Además, mediante el secuenciamiento del gen *BCHE* (Arpagaus y cols., 1990), se determinaron Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNPs) conocidos como responsables de reacciones adversas en pacientes consumidores, y se predijo el efecto de los SNPs sobre la función y la estructura de la proteína, mediante el uso de herramientas bioinformáticas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 COCAÍNA

La cocaína conocida como la *Benzoil Metil Ecgonina (BME)*, es un alcaloide obtenido de las hojas del arbusto *Erytroxylon coca*. La planta es originaria de los países de la región andina de América (Bolivia, Perú, Colombia y Ecuador) y su nombre proviene de una de las culturas más desarrolladas del Alto Perú, la Aymará, en donde se le llamaba KkoKa, que significa arbusto (Córdoba, 2001). Se estima que el cultivo y consumo en el nuevo mundo data de 3.000 años a.C., y que desde el año 500 a.C. se utiliza masivamente por los pobladores de Colombia y Perú. En toda la región andina desde el norte de Chile hasta la sierra nevada de Santa Marta, la coca jugó un papel importante en las culturas nativas y se involucró en ritos y tradiciones indígenas (Pérez Gómez, 1987; Escohotado, 1994; Ladrón de Guevara y cols., 1995).

Popular y comercialmente se da el nombre de cocaína a las sales de este compuesto (clorhidrato y sulfato de cocaína), que son los dos productos más puros en el proceso de refinación a partir del tratamiento de las hojas de coca desecadas con gasolina, queroseno, éter o soda cáustica, y que luego de ser tratadas con permanganato potásico, acetona, éter, amoniaco y ácido sulfúrico, dan origen a la denominada «pasta de coca», de la cual se refinan y preparan las distintas presentaciones de cocaína (Lizasoain y cols., 2001).

Las sales de cocaína son termo-resistentes, poco volátiles y su punto de fusión se alcanza a los 190°C (Ladrón de Guevara, 1995). También se conoce comúnmente a la cocaína con los nombres de "*talco*", "*nieve*", "*snow*", "*blow*", "*lady*" y "*flake*". En Colombia y otros países del mundo, en el círculo de consumidores, se le denomina "*perico*" o "*perica*" a las sales de la cocaína con concentraciones rebajadas de la misma. Por otra parte, se denomina *basuco* a una sustancia blanca o pardusca, sólida o semisólida, que se obtiene como producto intermedio de la refinación de las sales de cocaína y que contiene múltiples impurezas propias del procesamiento como otros alcaloides de la coca, metanol, éter, acetona, permanganato de potasio, ácido benzoico, queroseno, sustancias alcalinas, ácido sulfúrico o clorhídrico y otros elementos variables que se le adicionan con el objeto de aumentar el peso. Al basuco también se le conoce como "*crack*", "*rock*" y "*freebase*" (Giraldo, 2001). En razón a las impurezas del producto y a las sustancias agregadas, el basuco tiene un menor costo que el clorhidrato de cocaína y, por ello, su consumo es mayor en grupos económicos menos favorecidos.

1.1.1 Epidemiología del consumo de cocaína en el mundo

En el *Informe Mundial Sobre las Drogas* de la *Organización de Naciones Unidas (ONU)* en 2013, se estableció que entre 167 y 315 millones de personas en el mundo con edades entre los 15 y 64 años han consumido algún tipo de droga ilícita. Esto corresponde aproximadamente al 7% de la población mundial. Las tendencias de consumo no han variado sustancialmente en los últimos años, siendo la marihuana consumida por 180.6 millones de personas (3.9% de la población mundial de 15-64 años de edad), los estimulantes anfetamínicos (excluyendo el éxtasis) por 33.8 millones de personas (0.7% de la población mundial de 15-64 años de edad), el éxtasis por 19 millones de personas (0.5% de la población mundial de 15-64 años de edad), los opiáceos por 16 millones de personas (0.4% de la población mundial de 15-64 años de edad) y la cocaína por 14 millones de personas (0.3% de la población mundial de 15-64 años de edad) (ONU, 2013).

Desde 2009, la prevalencia de uso de cannabis, opioides, opiáceos (heroína y opio) y nuevas sustancias psicoactivas ha aumentado, mientras que la prevalencia del consumo de cocaína, estimulantes de tipo anfetamínico y éxtasis ha presentado una tendencia a la baja. Sin embargo, desde 2008 ha habido un aumento general del 18% en el número total de personas que han consumido una sustancia ilícita.

La *National Survey on Drug Use and Health (NSDUH)* mostró que entre los años 2011 y 2012 el 1,65% de la población norteamericana mayor de 12 años había consumido cocaína. Con frecuencia, el consumo de cocaína se asocia al de otras drogas; por ejemplo, el *Epidemiological Catchment Area (ECA) Study* mostró que el 84% de los dependientes de cocaína lo eran también del alcohol (ECA, 1984). La ONU ha estimado que las principales fuentes de suministro de cocaína en el mundo se encuentran en Sudamérica y especialmente en Colombia, de donde se estima que se surte más del 60% del mercado mundial de la cocaína. La tasa de consumo en varones sigue siendo mayor que en mujeres, pero la diferencia se ha acortado en las 2 últimas décadas (Van Etten y Anthony, 1999). Los hombres parecen tener respuestas más rápidas e intensas a la cocaína (Lukas y cols., 1996), más anomalías de la perfusión cerebral (Gottschalk y cols., 2001), más pérdida neuronal en la corteza frontal (Kaufman y cols., 2001) y menos ansiedad derivada del consumo (Kosten y cols., 1989). Las mujeres adictas suelen tener más trastornos afectivos y menos trastornos de la personalidad (Magura y cols., 1998). Algunos estudios sugieren que la adicción a la cocaína podría desarrollarse más rápidamente en la mujer que en el hombre (McCance-Katz y cols., 1999) y generar mayor desajuste psicosocial (Weis y cols., 1997; McCance-Katz y cols., 1999).

1.1.2 Variantes de cocaína y vías de consumo

El consumo de cocaína varía según la concentración del principio activo, ritmo, vía y combinación con otras sustancias (Caballero y Alarcón, 2000).

Según la Concentración del principio activo y el ritmo:

- Consumo controlado: habitualmente experimental o recreativo de cantidades moderadas (menos de 0.25 g) y con conservación del control voluntario sobre el consumo.
- Consumo intensificado o compulsivo: que caracteriza el abuso y la dependencia (puede llegar a consumirse varios gramos, durante horas o días seguidos y no se conserva íntegra la voluntad de dejar de consumirla, a pesar de las consecuencias negativas).

Según la Vía:

- Oral: de hojas frescas de la planta de coca masticadas, costumbre propia en algunas etnias de los países productores.
- Nasal o naso-alveolar: por inhalación mediante un tubo hueco de “líneas” o “rayas” de clorhidrato de cocaína pulverizada. Su absorción está limitada por el efecto vasoconstrictor de la sustancia a nivel de la mucosa nasal.
- Aspiración, fumada de pasta de coca o aspiración de base libre: fabricada a partir de clorhidrato o de “crack”. La cocaína fumada tiene una absorción muy rápida a la circulación cerebral (6-8 segundos), con un mayor volumen de distribución que la consumida por vía intranasal.
- Intravenosa: de clorhidrato de cocaína disuelto en agua mediante calentamiento en una cucharilla o similar. Este consumo añade los riesgos y complicaciones de la administración por vía parenteral.
- Otras vías menos frecuentes son la rectal o genital.

Según la Mezcla o consumo junto con otras sustancias:

- Cocaína pura.

- Cocaína mezclada con alcohol, marihuana y otros estimulantes o sedantes, incluidos los de prescripción médica. Cuando esta se mezcla con heroína, en presentación intravenosa, se llama “*speedball*” (literalmente: pelotazo).

La cocaína es bien absorbida por la mayoría de las vías de administración. Las sales de cocaína son muy difusibles en agua y termolábiles; la hidro-solubilidad de las sales de cocaína permite que sean fácilmente absorbibles por las mucosas nasales (“*sniffin*”), pero no permite que sean fumadas. Una línea típica de cocaína para aspiración nasal contiene entre 20-30 mg. Las sales de cocaína también pueden ser absorbidas por vía parenteral (Jaffe, 1996).

El basuco o base de coca es una sustancia insoluble en agua, pero soluble en lípidos y solventes orgánicos. La composición química depende de las impurezas que lo acompañan, que son agregadas en el proceso de purificación. Tiene como vía de penetración principal la inhalatoria en forma fumada, pero no se utiliza por vía nasal ni se inyecta, ya que la absorción es escasa dado que no es hidrosoluble y además presenta riesgos por la vía parenteral en razón de los productos y sustancias acompañantes que trae (Jaffe, 1996).

1.1.3 Metabolismo de la cocaína

Una vez absorbida, la cocaína pasa rápidamente a la sangre y se distribuye por todo el organismo, teniendo especial afinidad por el cerebro. Atraviesa la barrera hemato-encefálica y feto-placentaria. La bio-transformación del principio activo se inicia en la sangre, siendo metabolizada en presencia de la enzima colinesterasa plasmática o butirilcolinesterasa (BChE), particularmente en el hígado, donde se hidroliza en dos metabolitos principales: *Benzoil Ecgonina (BEG)* y la *Ecgonina Metil Ester (EME)*. También se producen cantidades menores de *Norcocaína* (que se consideran poco relevantes). En el caso de las formas fumadas, se transforma en *Anhidro Ecgonina Metil Ester (AEME)*, activa en animales y de acción poco conocida en humanos. Todos los metabolitos de la cocaína tienden a acumularse en el tejido graso, desde el cual, se liberan lentamente. 15 a 30 minutos después de la administración de la droga, aparece la BEG que puede detectarse en plasma (hasta 24 horas después de la administración) y en orina (hasta 3-4 días después de un consumo moderado); por ello, es el metabolito utilizado para determinar el consumo reciente en ámbitos asistenciales. La BEG puede detectarse también en saliva, cabello o sudor, mediante las técnicas habituales de radio o enzimo-inmuno-análisis. El consumo conjunto de alcohol y cocaína da lugar por transesterificación hepática a *Etilencocaína* o *Cocaetileno*, potentes estimulante del Sistema Nervioso Central (SNC), con una vida media 2 a 3 veces mayor que la de la cocaína libre (Hart y cols., 2000).

Ni la cocaína o sus metabolitos se unen a proteínas plasmáticas, por lo que la vida media de los metabolitos es más larga que la de la cocaína libre (cerca de 60 minutos) (Jaffe, 1996). Por ello, la cantidad hallada en sangre corresponde fielmente con la cantidad a la que están expuestos los receptores en el SNC. Las personas con sobredosis muestran concentraciones diferenciales importantes entre el cerebro y la sangre, pudiendo ser hasta 10 veces mayor en el primero (Karch, 1991). La eliminación de los metabolitos o la forma libre se efectúa por vía renal.

En consumo agudo, la cocaína impide la recaptación del neurotransmisor dopamina en la célula pre-sináptica, aumentando la disponibilidad de ella en la hendidura sináptica. Las vías dopaminérgicas se relacionan con los sistemas de recompensa en el cerebro y con conductas de auto-administración y compulsión (Matthew, 1983). La mayor disponibilidad de neurotransmisores dopaminérgicos permite una estimulación mayor y más prolongada de los neuro-receptores D1, D2, D3, D4 y D5, convirtiéndose en un agonista dopaminérgico directo (Brody, 1998). En contraste con este efecto agudo, el efecto del uso crónico de la cocaína es el agotamiento de la dopamina en la hendidura sináptica (Nunes, 1990). La cocaína inhibe la recaptación de la serotonina y de su precursor, el triptófano, dentro de las neuronas serotoninérgicas. Esto lleva a la estimulación de los auto-receptores inhibitorios pre-sinápticos aumentando la concentración de la 5-hidroxitriptamina (5-HT) en la hendidura sináptica, llevando a una retroalimentación negativa que causa agotamiento rápido de 5-HT en el cerebro. En general el efecto sobre la 5-HT es inhibitorio. Esta vía serotoninérgica estaría relacionada con los efectos alucinatorios y psico-miméticos y puede explicar los cambios motores y estereotipias vistos en personas intoxicadas con esta droga de abuso (Jaffe, 1996).

La BEG y EME actúan como agonistas adrenérgicos directos bloqueando el sistema de transporte en la membrana de la célula nerviosa e impiden también la recaptación de los neurotransmisores norepinefrina y epinefrina en la célula pre-sináptica, aumentando la disponibilidad en la hendidura sináptica (Jaffe, 1996). La vía norepinefrínica tiene que ver con el sistema de alerta y vigilia (Cooper, 1982). La mayor disponibilidad de los neurotransmisores adrenérgicos, permite una estimulación mayor y más prolongada de los receptores adrenérgicos α_1 , α_2 , β_1 , β_2 y β_3 (DellaPuppa, 2000). También estimula la tirosina hidroxilasa que ayuda a producir más norepinefrina en la neurona.

Por otra parte, el cocaetileno (resultante del consumo conjunto de alcohol y cocaína), tiene acción dopaminérgica semejante a la cocaína, pero de menor afinidad por los transportadores de serotonina y norepinefrina (Henning y Wilson, 1996) y un mayor riesgo tóxico (Randall, 1992).

La dosis tóxica varía ampliamente y depende de la tolerancia individual, la vía de administración y la presencia de otros factores asociados y drogas. Cuando la cocaína se inyecta por vía endovenosa, produce efectos en 1-2 minutos, puede producir niveles altos transitorios en cerebro y corazón que pueden causar convulsiones o arritmias cardíacas, mientras que las mismas dosis aspiradas suelen producir sólo euforia (Klaassen, 1994). Se considera que niveles sanguíneos de cocaína entre 100 a 200 µgr% producen alteraciones clínicas evidentes.

Tras administrar una dosis de cocaína, aproximadamente el 95% es metabolizado por la butirilcolinesterasa (Kamendulis y cols., 1996; Gorelick, 1997) y solo el 5% lo hace a través de la oxidación por el sistema microsomal hepático del citocromo P450 (Poet y cols., 1996). Sin embargo, esta vía metabólica minoritaria produce metabolitos intermedios como la norcocaína, el nitróxido de norcocaína, el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, que causan disminución marcada de Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma reducida (NADPH) y del glutatión en el hepatocito (Van Thiel, 1992). La depleción de glutatión y NADPH agota los sistemas antioxidantes celulares, el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido y los radicales hidroxilos que estimulan la peroxidación lipídica, dañando las membranas celulares.

1.1.4 Manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas al consumo de cocaína

Se ha descrito una variada gama de manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas al uso de cocaína (Tabla 1). Las manifestaciones clínicas son consecuencia de la capacidad de la cocaína para estimular el SNC y el sistema cardiovascular, y como otros estimulantes, la sobredosis puede producir efectos paradójicos de depresión neurológica y cardiovascular (Jacobsen y cols., 1997). Las complicaciones anatómicas a largo plazo dependerán exclusivamente de la vía de administración de la sustancia (Garro, 2011). Los conocimientos actuales relacionados con la toxicidad de la cocaína se derivan de casos individuales y de algunas pequeñas series de pacientes observados (Solano y cols., 2006).

La intoxicación por consumo de cocaína puede clasificarse en dos grandes grupos (Garro, 2011):

1.1.4.1 Intoxicación aguda. Casi inmediatamente después del consumo de cocaína inhalada o inyectada y luego de 3 a 5 minutos de la ingesta de la droga, se presenta el cuadro clínico denominado “euforia intensa”, el cual se presenta en 4 etapas (Garro, 2011):

- Euforia: caracterizada por excitación placentera con hiperactividad, hiperhidrosis, hipervigilia, taquicardia y en algunos casos excitación sexual pasajera.
- Disforia: también llamada etapa de angustia, se caracteriza por apatía, melancolía, afán de consumir más droga, indiferencia sexual, agresividad y anorexia.
- Alucinosis: alucinaciones táctiles, visuales, auditivas y olfatorias, apatía sexual y tendencia a huir por el contenido persecutorio de las alucinaciones.
- Psicosis: días o meses después de consumir la droga se intensifican las alucinaciones y se genera más agresividad y en ocasiones psicosis paranoide que puede llevar a suicidios u homicidios.

Otras manifestaciones clínicas de intoxicación aguda en los diferentes órganos y sistemas son los siguientes (Garro, 2011):

- Sistema Cardiovascular: Dosis bajas de cocaína producen estimulación vagal y bradicardia; dosis altas producen taquicardia y vasoconstricción con aumento de la presión arterial y espasmo de las arterias coronarias debido al bloqueo de la reabsorción pre-sináptica de norepinefrina en el corazón. La administración venosa directa produce paro cardíaco por acción tóxica sobre el miocardio, Infarto Agudo de Miocardio (IAM), muerte súbita de origen cardíaco y con menor frecuencia aparecen arritmias, principalmente fibrilación auricular. La precordialgia se atribuye al espasmo de las arterias coronarias. Otros efectos que se describen son el aumento de la actividad física, hiperreflexia, midriasis y la producción de hemorragia sub-aracnoidea debido al aumento de la presión arterial.
- Sistema Gastrointestinal: Colitis, úlceras pépticas e isquemia intestinal.
- Sistema Nervioso Central: Disminución de la sensación de fatiga y cansancio. Dosis bajas de cocaína no alteran la coordinación motora, pero a dosis altas, por acción sobre otros centros, ocasiona temblor y convulsiones tónico-clónicas. La estimulación de los centros bulbares trae como consecuencia la aparición

de polipnea y emesis. La estimulación inicial vaseguida de depresión de todo el Sistema Nervioso Central y la muerte puede ocurrir generalmente por paro cardio-respiratorio.

- Sistema Respiratorio: El “crack” fumado es el responsable de la mayoría de las complicaciones que produce la cocaína a nivel respiratorio. Entre las complicaciones más frecuentes se encuentra el barotrauma: neumotórax, neumopericardio y neumomediastino (Murray y cols., 1988; Forrester y cols., 1990; García y cols., 1994); el edema pulmonar agudo no cardiogénico (Cucco y cols., 1897) cuyo mecanismo subyacente no está bien determinado, aunque se han barajado como posibles causas la disfunción ventricular izquierda transitoria o la alteración de la permeabilidad capilar pulmonar (Kleerup y cols., 2002); el “pulmón de crack” de posible origen isquémico caracterizado por fiebre, disnea, infiltrados pulmonares, bronco-espasmo, dolor torácico inespecífico, tos productiva con esputo hemoptoico, a veces hemoptisis franca y hemorragia pulmonar y la exacerbación de cuadros asmáticos.
- Sistema Renal y Músculo Esquelético: El riñón es uno de los órganos más afectados en la intoxicación por cocaína. Se han descrito varios efectos fisiopatológicos entre los que se encuentran la inducción de aterogénesis, cambios hemodinámicos y alteración en la síntesis de la matriz mesangial (Solano y cols., 2006). La insuficiencia renal secundaria a rbdomiolisis es la complicación renal más frecuente del consumo de cocaína (Herzlich y cols., 1988; Amoedo y cols., 1999; Vallina y cols., 2002). En estudios realizados en pacientes con efectos secundarios del consumo de cocaína hasta en un 24% se encontraron síntomas relacionados con la rbdomiolisis (Welch y cols., 1991; Di Paolo y cols., 1997). El mecanismo etiopatogénico de la rbdomiolisis es, aún en la actualidad confuso, pudiendo asociarse a hipertermia en algunas ocasiones (Vallina y cols., 2002).
- Embarazo, feto y recién nacido: El uso de cocaína se asocia con un riesgo elevado de aborto, malformaciones congénitas, muerte fetal in útero, desprendimiento de placenta, prematuridad, bajo peso al nacer y microcefalia. El riesgo de síndrome de muerte súbita neonatal es muy elevado. La cocaína atraviesa la placenta, produciendo lesiones cerebrales isquémicas.

1.1.4.2 Intoxicación crónica. El uso prolongado de la cocaína se asocia con síntomas constitucionales. La absorción de la droga por vía nasal produce vasoconstricción marcada con isquemia de la mucosa y del cartílago, con posterior necrosis y perforación, ocasionando epistaxis. En inhaladores y en fumadores se presenta disfonía y afonía. En fumadores, a nivel pulmonar se presenta congestión pasiva aguda severa asociada a ingurgitación de los tabiques, extravasación de algunos glóbulos rojos y edema focal, sin que existan signos de congestión

pasivacrónica. A nivel bronquial aparecen signos clínicos de bronquitis con expectoración hemoptoica o hemoptisis franca. En piel y faneras es frecuente encontrar pigmentación oscura de los pulpejos de los dedos, de las encías, de los carrillos y de los incisivos centrales. En el SNC se afecta la esfera psicológica, con percepción de alucinaciones táctiles, parestesias denominadas “bichos de la cocaína”, ruptura de las relaciones afectivas, pérdida de la autoestima y mitomanía. En el tracto gastrointestinal no suele haber signos específicos de consumo crónico (Garro, 2011).

En las autopsias no se han observado cambios morfológicos significativos en la médula ósea o en los ganglios linfáticos. A nivel del SNC no se han descrito hallazgos morfológicos característicos, a pesar de que en los casos mortales la mayor concentración de cocaína y sus metabolitos se encuentra en el encéfalo. En el corazón y arterias coronarias se han reportado bandas de contracción, fibrosis o infiltrados y/o infartos o trombosis (Garro, 2011).

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas al consumo de cocaína

Cardiacas	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Hipertensión arterial (HTA) Bradycardia Taquicardia Precordalgia Palpitaciones	<i>Complicaciones:</i> Infarto Agudo de Miocardio (IAM) Arritmias cardiacas Miocardiopatías Miocarditis Endocarditis
Pulmonares	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Taquipnea Polipnea Disnea Sibilancias Tos hemoptoica Hemoptisis franca	<i>Complicaciones:</i> Neumotórax Neumomediastino Neumopericardio Edema pulmonar Exacerbaciones de asma Bronquiolitis obliterante Hemorragia pulmonar
Endocrinas	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Diaforesis	<i>Complicaciones:</i> Hiperprolactinemia
Gastrointestinales	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Dolor abdominal Náuseas Emesis Anorexia	<i>Complicaciones:</i> Isquemia intestinal Perforación gastrointestinal Colitis

<i>Psiquiátricas</i>	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Ansiedad Depresión Delirios Confusión Alucinaciones visuales Alucinaciones auditivas Alucinaciones táctiles Alucinaciones olfatorias Agresividad	<i>Complicaciones:</i> Paranoia Psicosis Suicidio Mitomanía
<i>ORL y Oftalmológicas</i>	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Xeroftalmia Xerostomía Midriasis Rinorrea Epistaxis Disfonía Afonía Pigmentación de incisivos centrales, encías y carrillos	<i>Complicaciones:</i> Úlceras gingivales Erosiones dentales Queratitis Defectos corneales epiteliales Rinitis crónica Perforación septo nasal Granuloma de la línea media Alteraciones olfatorias Neuropatía óptica Sinusitis oteolítica
<i>Renales</i>	
<i>Complicaciones:</i> Rabdomiolisis Insuficiencia renal aguda Nefritis intersticial aguda Nefropatía tubular aguda	
<i>Neurológicas</i>	
<i>Manifestaciones clínicas:</i> Hiperreflexia Tremor Hipervigilia	<i>Complicaciones:</i> Eventos cerebro-vasculares Hemorragia sub-aracnoidea Crisis epiléptica Atrofia cerebral Vasculitis cerebral Cefaleas/migrañas
<i>Obstétricas</i>	
<i>Complicaciones:</i> Aborto Muerte fetal in útero Malformaciones congénitas Desprendimiento placentario Prematuridad Microcefalia Bajo peso Muerte súbita neonatal	
<i>Otras</i>	

<i>Manifestaciones clínicas:</i> Excitación sexual pasajera Eyacuación espontánea Palidez muco-cutánea	<i>Complicaciones:</i> Disfunción sexual Hiperpirexia Muerte súbita
---	--

1.2 COLINESTERASAS

Las colinesterasas son hidrolasas de éster carboxílico especializadas en la degradación de ésteres de colina. La definición y clasificación de las colinesterasas tuvo su origen en el descubrimiento de la especificidad particular de las enzimas por el sustrato presente en las esterasas de la sangre y el suero (Galehy y Plattner, 1927). Posteriormente, Stedman y Easson (1932) prepararon una enzima de suero de caballo que se consideró específica para hidrolizar ésteres de colina y se encontró que esta enzima era capaz de hidrolizar la butirilcolina más rápidamente que la acetilcolina. Alles y Hawes (1940) encontraron diferencias fundamentales entre las colinesterasas del eritrocito y el suero: mientras que la colinesterasa de eritrocito mostraba inhibición por exceso de sustrato, la correspondiente de suero no mostraba tal efecto, y además no era capaz de hidrolizar el sustrato sintético acetil- β -metilcolina.

Mendel y Rudney (1943) estudiaron los efectos de inhibidores sobre ambos tipos de colinesterasas y acuñaron los términos de colinesterasa real y pseudocolinesterasa para las enzimas de eritrocito y suero respectivamente (hoy acetilcolinesterasa y butirilcolinesterasa).

La Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, en 1964, acordó recomendar las denominaciones de colinesterasa (acilcolina, acilhidrolasa, butirilcolinesterasa, BChE, EC: 3.1.1.8) para las enzimas de suero y de otros tejidos que hidrolizan más rápidamente butirilcolina o propionilcolina (o sus tio-análogos) y acetilcolinesterasa (acetilcolina, acetilhidrolasa, AChE, EC: 3.1.1.7) para las enzimas que actúan más rápidamente sobre la acetilcolina (o sus tio-análogos).

1.2.1 Origen de las Colinesterasas

Las enzimas AChE y BChE son enzimas distintas, codificadas por dos genes diferentes, pero relacionados. Tanto la estructura del gen *BCHE* como de la enzima BChE son similares al gen *ACHE* y a la enzima AChE, lo que apoya la

hipótesis de que los dos genes son el fruto de la duplicación a partir de un gen ancestral común (Chatonnet y Lockridge, 1989).

La secuencia de aminoácidos de BChE humana tiene un 54% de identidad con la AChE de *Torpedo californica* y *Torpedo marmorata* y 38% de identidad con AChE de *Drosophila melanogaster* (McTiernan y cols., 1987). BChE y AChE tienen aproximadamente el mismo número de aminoácidos por subunidad catalítica, 574 y 575 respectivamente, y sus diferencias en peso molecular son debidas a diferencias en la glicosilación. AChE tiene 4 y BChE tiene 9 cadenas de carbohidratos por subunidad (Lockridge y cols., 1987a; Lockridge y cols., 1987b).

1.2.2 Butirilcolinesterasa

La butirilcolinesterasa (BChE; EC 3.1.1.8), también conocida como colinesterasa sérica, pseudocolinesterasa, colinesterasa inespecífica o acilcolina acilhidrolasa (isoforma de la acetilcolinesterasa), es una glicoproteína tetramérica con una masa molecular de 342 KDa, constituida por cuatro subunidades idénticas o monómeros unidos entre sí por puentes disulfuro, con un sitio catalítico activo en cada una de ellas (Bergmann, 1954). Cada monómero consiste en 574 aminoácidos y 9 cadenas de carbohidratos ancladas a 9 asparaginas, con un peso molecular aproximado de 85 KDa (Lockridge y cols., 1987a,b) (Figura 1).

La estructura cristalográfica de la BChE, descrita por Nachon y cols. (2002) a partir de una BChE humana recombinante, permitió determinar la forma de “garganta” del sitio activo, compuesto por aproximadamente 55 aminoácidos (Figura 2). El Sitio Aniónico Periférico (PAS), localizado en el vestíbulo de la garganta, está constituido por los aminoácidos ácido aspártico (D70) y tirosina (Y332), los cuales están relacionados con la unión inicial de sustratos cargados positivamente. El aminoácido D70 forma un bucle omega (Ω) con triptófano (W82), componente del sub-sitio de unión del sitio activo (Masson y cols., 2001). La cavidad axiónica localizada próxima al sub-sitio de unión incluye los aminoácidos glicina (G116 y G117) y alanina (A199). El sitio esterásico de la BChE es formado por la triada catalítica de los aminoácidos serina (S198), histidina (H438) y ácido glutámico (E325), responsable de la hidrólisis (Shafferman y cols., 1992).



Figura 1. Estructura cristalina de un monómero de la enzima BChE humana. 59% de la estructura corresponde a bucles (hebras blancas), 30% a α -hélices (espirales) y 11% a β -láminas plegadas (flechas). Fuente: Protein Data Bank (PDB). Digital Object Identifier (DOI): 10.2210/pdb1p0i/pdb.

La BChE es sintetizada en el hígado y en el tejido adiposo (Wescos y cols., 1947; Lockridge, 1987) y ampliamente distribuida en el organismo, encontrándose en piel, páncreas, mucosa intestinal, sustancia blanca cerebral, corazón, músculo liso, plasma y adipocitos (Wescos y cols., 1947), siendo su función la de hidrolizar algunos ésteres de colina como procaína (Lockridge, 1990) y tetracaína, ésteres alifáticos que no contienen colina como ácido acetilsalicílico (Harris, 1980), heroína, cocaína (Lockridge, 1980) y acetato de metilprednisolona o fármacos relajantes musculares como mivacurium (Cook y cols., 1989), suxametonio (Bourne y cols., 1952) y el muy empleado aún succinilcolina (Tood, 1992; Jacobs, 1994; Ángel, 1996). Otras funciones fisiológicas de la BChE han sido estudiadas por McQueen (1995) dentro de las que se encuentran metabolismo de lípidos y lipoproteínas, control de la concentración de colina libre, participación en mecanismos de detoxificación, prevención de acumulación de butirilcolina, crecimiento y carcinogénesis, entre otras. Chautard-Freire-Maia (1991) y Alcántara (2000) encontraron correlación entre la actividad de formas heterólogas de la BChE con el peso y el índice de masa corporal, sugiriendo una probable función de ésta enzima en el metabolismo de los lípidos.

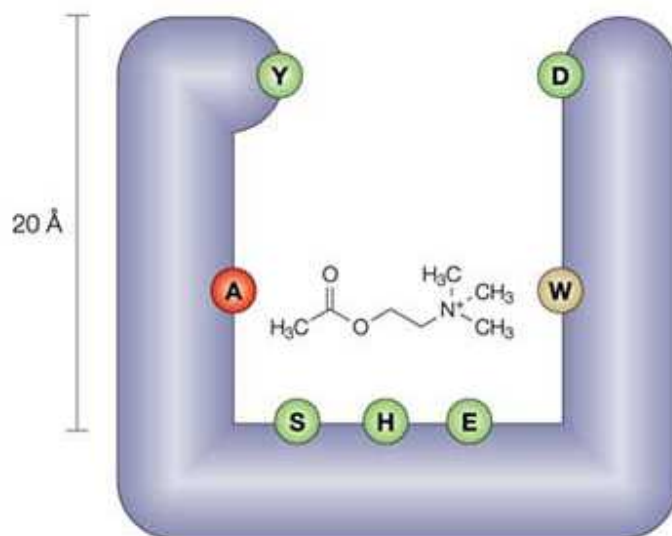


Figura 2. Estructura esquemática del sitio activo de la BChE. La triada catalítica está constituida por los aminoácidos serina (S), histidina (H) y ácido glutámico (E). El grupo acilo del sustrato (acetilcolina) está contenido en el bolsillo acilo (A), mientras que el nitrógeno cuaternario interactúa con el sitio aniónico formado por el aminoácido triptófano (W). Los sustratos interactúan con residuos de ácido aspártico (D) y tirosina (Y), localizados en el vestíbulo de la “garganta” del sitio activo. Fuente: Darvesh y cols. *Nature Reviews Neuroscience*.2003;4:131-138.

La BChE se presenta en el plasma humano en cinco diferentes formas moleculares identificadas a través de la electroforesis bi-dimensional en papel de filtro (Harris y cols., 1962; Masson, 1989). Puede estar apenas como monómero-C₁-, dímero-C₃-o tetrámero-C₄- (forma más abundante de la BChE plasmática), o componer formas heterólogas en las cuales un monómero se asocia a otras sustancias como la albúmina sérica -C₂-, la α2 macroglobulina o la transferrina, o un tetrámero se asocia a una proteína aún desconocida, constituyendo el complejo -C₅- (Alcántara y cols., 1999; Alcántara, 2000). Los dímeros -C₃- son formados por la unión de monómeros a través de puentes disulfuro y los tetrámeros -C₄- son formados por dímeros, con una masa molecular de 342 KDa. En la electroforesis en gel de poliacrilamida pueden ser vistos hasta 12 bandas con actividad de BChE, sugiriendo la existencia de, por lo menos, 8 formas heterólogas (Alcántara, 2000). Una nueva banda electroforética (C_{4/5}) fue descrita por Souza y cols. (1995), cuya movilidad es semejante al de la banda C₅. Actualmente se utiliza otra nomenclatura basada en las letras G y A para determinar las formas globulares y asimétricas de BChE, respectivamente. Por ejemplo, G1, G2, G3 y G4 hace referencia a los monómeros, dímeros, trímeros (resultantes de la degradación) y tetrámeros, respectivamente (Massoulié y Bon, 1982). En el caso de la forma heteróloga C2 se utiliza G1-ALB, evidenciando un monómero unido a una albúmina (Krejci y cols., 1997).

Varios factores han sido asociados con alteración en la actividad de la BChE, como por ejemplo estrógenos (disminuyen la actividad enzimática), el peso, el índice de masa corporal, la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (aumentan la actividad enzimática).

La acción de BChE es inhibida *In vitro* por el anestésico local dibucaína, que disminuye la capacidad de hidrolizar sustratos en un 80%. Los valores normales de BChE usualmente fluctúan entre 8 y 18 U/ml. Cuando existe una alteración hepática, la concentración disminuye en relación directa con el número de hepatocitos alterados (Sánchez, 1998; Cucuianu, 1999). No sólo las enfermedades hepáticas afectan la actividad de la BChE, sino también la acción de algunas drogas como relajantes musculares, estrógenos y anticonceptivos orales (Sonnerwith y Leonard, 1983).

1.2.3 Estructura del Gen *BCHE*

La BChE es una enzima polimórfica codificada por el gen *BCHE*, secuenciado por Arpagaus y cols. (1990) y mapeado en el cromosoma 3 y. Allderdice (1991) y Gaughan (1991) confirmaron la localización de este gen en la región 3q26.1-q26.2 (Figura 3), con un tamaño de 73 Kb y constituido por cuatro exones separados por tres intrones (Figura 4). El producto del gen es la subunidad BChE, siendo necesarias cuatro de ellas para constituir la enzima activa. El 83% de la subunidad BChE, incluyendo el extremo N-terminal y el sitio activo localizado el aminoácido 198, es sintetizado por el exón 2, el más grande de los cuatro exones. El exón 4 codifica el extremo C-terminal de la proteína, el cual incluye la región 3'UTR con sus dos sitios funcionales de poliadenilación.

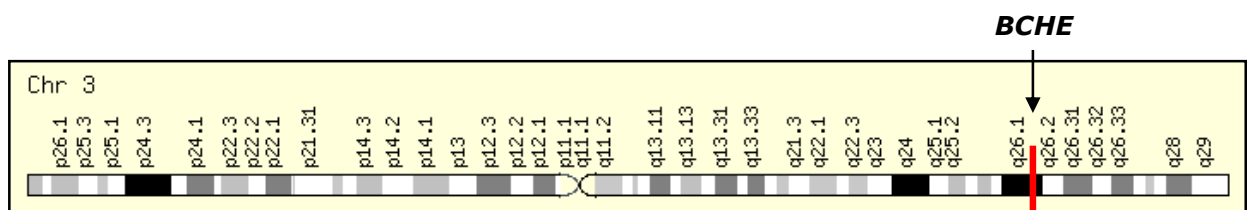


Figura 3. Localización cromosómica del gen *BCHE*. La flecha indica la posición del gen *BCHE* sobre el brazo largo del cromosoma 3 (3q26.1-q26.2) y la barra de color rojo su localización exacta. Fuente: <http://genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BCHE>

El promotor del gen *BCHE* está constituido en un 66% por adeninas y timinas, no tiene ningún elemento TATA o CAAT y no es rico en guaninas o citosinas, lo que

hace que el gen se exprese constitutivamente, siendo solo regulado durante la diferenciación celular y el desarrollo de organismo. El elemento iniciador del gen se caracteriza por ser una secuencia rica en pirimidinas seguida por una adenina que marca el sitio de inicio de la transcripción.



Figura 4. Diseño esquemático del gen *BCHE*, mostrando los cuatro exones y el número de pares de bases que lo componen. El exón 1 es no codificante. Las regiones en negrilla corresponden a la proteína madura. Fuente: Parnas y cols. *American Journal of Clinical Pathology*. 2011; 135:271-276.

1.2.4 Variantes de Butirilcolinesterasa

En 1950 se observó en el plasma de personas saludables que habían experimentado una respuesta prolongada a la succinilcolina (relajante muscular) la presencia de una colinesterasa anormal o atípica (Kalow, 1962). Dicha variante se caracterizaba por la incapacidad de hidrolizar la succinilcolina a dosis farmacológicas, causando apnea respiratoria y parálisis muscular prolongada en los pacientes, quienes requerían ventilación artificial en Unidad de Cuidados Intensivos (UCI). Esto evidenció que no todos los casos de apnea prolongada causada por niveles bajos de la enzima podrían atribuirse a la disminución en la síntesis ocasionada por una enfermedad hepática de base o la desnutrición, ya que se produjo en pacientes en los que ninguna de estas situaciones aplicaba.

Las primeras observaciones de ciertos casos de deficiencia familiar de BChE indicaban herencia autosómica recesiva (Lehman, 1956). Sin embargo, Kalow (1956) reportó en estudios del suero a personas y familiares con baja actividad enzimática que apuntaban al modo de herencia codominante y acuñó los fenotipos de "Usual" (U) y "Atípica" (A) para los dos tipos de BChE. Mediante la inhibición de la enzima *In vitro* con inhibidores conocidos de la colinesterasa, en particular el anestésico local dibucaína, Kalow demostró una distribución trimodal de la actividad residual, a la cual se le conoce con el nombre de "Porcentaje de Inhibición de la Dibucaína". Basados en dicho porcentaje, las personas son clasificadas en tres grupos: con *enzima usual* (inhibición del 80%), con *enzima atípica* (inhibición del 20%) y un tercer grupo con un 60% de inhibición llamado

intermedio (Kalow, 1957). Esto demostró que los homocigotos (A/A) para la forma atípica contaban con una enzima resistente a la dibucaína, mientras que los homocigotos para la forma usual (U/U) no lo eran. El nivel intermedio de inhibición representaba a los heterocigotos para la condición (A/U).

Hoy en día se conoce que las diferencias en el porcentaje de inhibición a la dibucaína se deben al procesamiento alternativo, durante la formación del Ácido Ribonucleico mensajero (ARNm), diferenciándose cada isoforma en la región terminal (entre 3 a 28 aminoácidos).

En 1986 se identificó la secuencia completa de los 1722 nucleótidos correspondientes a los 574 aminoácidos que codifican la variante normal de la BChE (La Du, 1996).

Una clasificación basada en variantes de la enzima fue propuesta por Primo-Parmo (1993). Las *variantes cualitativas* determinan proteínas diferentes a la enzima usual (o normal) y son identificadas por métodos de inhibición enzimática. Las *variantes cuantitativas* presentan características similares a la enzima usual, pero están presentes en el plasma a concentraciones bajas y solo se pueden detectar mediante pruebas de inhibición en algunas combinaciones genotípicas. Las *variantes silenciosas* tienen actividad inferior al 10% del nivel de la enzima usual.

Es posible identificar los fenotipos enzimáticos de la BChE, para lo cual existen diversos métodos y técnicas de medición de la actividad de la enzima frente a varios tipos de sustratos, pero ninguno ha sido aceptado universalmente. Hoy, mediante el análisis de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), es posible identificar los genotipos de *BCHE*. Aunque más de 100 variantes en el gen *BCHE* han sido identificadas (Tabla 2), no todas ellas han sido estudiadas plenamente (Mikami y cols., 2008; Shields y cols., 2011), algunas relacionándose con actividad deficitaria de la enzima (Barta, 2001). Es conocido que la frecuencia de estos polimorfismos varía entre poblaciones (Ruprecht, 2001). Además de las variaciones normales de índole genética como las antes referidas, los niveles de la enzima pueden verse afectados por variantes genéticas disfuncionales, por exposición a inhibidores enzimáticos (como la dibucaína) o por biosíntesis reducida (Trundle, 1988).

La mayor parte de las variantes descritas en el gen *BCHE* se encuentran localizadas en el exón 2 y aproximadamente el 92% de ellas presentan frecuencias poblacionales inferiores al 1%.

Tabla 2. Variantes del gen *BCHE* identificados en la literatura y en bases de datos públicas

Cambio de nucleótido	Nombre ^a	Referencia
<i>Exón 1</i>		
c.-116G>A		Bartels y cols., 1990.
c.-32G>A		Shields y cols., 2011.
<i>Exón 2</i>		
c.9_11delCAT	p.Ile4del	Maekawa y cols., 1997.
c.16delA	p.Ile6fs	Bartels y cols., 1992b; Primo-Parmo y cols., 1996.
c.35A>G	p.Lys12Arg	Mikami y cols., 2008.
c.45G>C	p.Gly15Gly	Mikami y cols., 2008.
c.67A>G	p.Ile23Val	dbSNP.
c.71C>T	p.Thr24Met	Maekawa y cols., 1997.
c.82T>A	p.Phe28Ile	Yen y cols., 2003.
c.98A>G	p.Tyr33Cys	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.109C>T	p.Pro37Ser	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.119A>G	p.Lys40Arg	dbSNP.
c.155C>T	p.Thr52Met	Maekawa y cols., 1997.
c.164C>A	p.Ala55Asp	dbSNP.
c.182A>G	p.Tyr61Cys (S)	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.193C>T	p.Pro65Ser	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.208G>C	p.Asp70His	Boeck y cols. 2002.
c.209A>G	p.Asp70Gly (A)	McGuire y cols., 1989.
c.223G>C	p.Gly75Arg	Souza y cols., 2005.
c.270A>C	p.Glu90Asp	Souza y cols., 2005.
c.286A>T	p.Asn96Tyr	Yen y cols., 2003.
c.293A>G	p.Asp98Gly (A)	McGuire y cols., 1989; Boeck y cols., 2002; Shields y cols., 2011.
c.297T>G	p.Ile99Met	Souza y cols., 2005.
c.298C>T	p.Pro100Ser	Maekawa y cols., 1997; Takagi y cols., 1997; Lu y cols., 1997.
c.318insA	p.Asn106fs	Yen y cols., 2003.
c.344G>A	p.Gly115Asp	Primo-Parmo y cols., 1997.
c.351delTinsAG	p.Gly117fs (S)	Nogueira y cols., 1990.
c.355C>T	p.Gln119X	Sudo y cols., 1996.
c.375A>T	p.Leu125Phe	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.382C>T	p.Pro128Ser	Maekawa y cols., 1997.
c.383A>G	p.Tyr128Cys	Hidaka y cols., 1997a.
c.395insA	p.Ala134fs	On-Kei Chan y cols., 2005.
c.424G>A	p.Val142Met (H)	Jensen y cols., 1992.
c.461A>T	p.Leu153Phe	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.486T>C	p.Ala162Ala	Souza y cols., 2005.
c.510T>G	p.Asp170Glu	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.514C>T	p.Gln172X	Gätke y cols., 2001.
c.551C>T	p.Ala184Val (SC)	Greenberg y cols., 1995.

c.592A>G	p.Ser198Gly	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.596C>T	p.Ala199Val	Sakamoto y cols., 1998.
c.601G>A	p.Ala201Thr	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.607T>C	p.Ser203Pro	Hidaka y cols., 2001.
c.635C>T	p.Ala212Val (SC)	Shields y cols., 2011.
c.728C>T	p.Thr243Met (F-1)	Nogueira y cols., 1992.
c.748A>C	p.Thr250Pro	Maekawa y cols., 1995.
c.765G>C	p.Glu255Asp	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.800A>G	p.Lys267Arg	Maekawa y cols., 1997.
c.811G>T	p.Glu271X	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.849G>C	p.Glu283Asp	Shields y cols., 2011.
c.880G>A	p.Val294Met	Mikami y cols., 2008.
c.884A>G	p.Lys295Arg	Maekawa y cols., 1997.
c.920T>C	p.Leu307Pro	Manoharan y cols., 2006.
c.934A>T	p.Thr312Ser	dbSNP.
c.943insA	p.Thr315fs	Hidaka y cols., 1992
c.943A>T	p.Thr315Ser	Liu y cols., 2002.
c.959C>T	p.Pro320Leu	dbSNP.
c.988T>A	p.Leu330Ile	Sudo y cols., 1997.
c.997G>T	p.Gly333Cys	Mikami y cols., 2008.
c.1062_1076insALU	p.Lys355insALU	Muratani y cols., 1991.
c.1072T>A	p.Leu358Ile	lida y cols., 1995.
c.1093G>C	p.Gly365Arg	Hada y cols., 1992; Hidaka y cols., 1992.
c.1156C>T	p.Arg386Cys	Yen y cols. 2003.
c.1169G>T	p.Gly390Val (F-2)	Nogueira y cols., 1992.
c.1177G>C	p.Gly393Arg	Hada y cols., 1992; Maekawa y cols., 1995.
c.1200C>A	p.Cys400X	Hidaki y cols., 1997b.
c.1240C>T	p.Arg386Cys	Yen y cols., 2003.
c.1253G>T	p.Gly418Val (F-2)	Nogueira y cols., 1992.
c.1253T>C	p.Phe418Ser	Maekawa y cols., 1995.
c.1270C>T	p.Arg424X	Yen y cols. 2003.
c.1273T>C	p.Ser425Pro	Gnatt y cols., 1990.
c.1294G>T	p.Glu432X	Levano y cols., 2005.
c.1303G>A	p.Gly435Arg	Dey y cols. 1997.
c.1336T>G	p.Phe446Val	Dey y cols., 1998.
c.1351G>T	p.Glu451X	Dey y cols., 1998.
c.1378G>A	p.Glu460Lys	Yen y cols. 2003.
c.1393A>T	p.Arg465X	Maekawa y cols., 1995.
c.1408C>T	p.Arg470Trp	Mikami y cols., 2008.
c.1411T>C	p.Trp471Arg	Primo-Parmo y cols., 1996.
c.1420T>C	p.Phe474Leu	On-Kei Chan y cols., 2005.
Intrón 2		
IVS2-8T>G		Primo-Parmo y cols., 1996.
Exón 3		
c.1490A>T	p.Glu497Val (J)	Bartels y cols., 1992a.

c.1492C>T	p.Arg498Trp	dbSNP.
c.1500T>A	p.Tyr500X	Bartels y cols., 1992b; Primo-Parmo y cols., 1996.
c.1543C>T	p.Arg515Cys	Maekawa y cols., 1995.
c.1553A>T	p.Gln518Leu	Primo-Parmo y cols., 1996.
Intrón 3		
IVS3-14T>C		Parmo-Folloni y cols.
Exón 4		
c.1613T>C	p.Ile538Thr	dbSNP.
c.1615G>A	p.Ala539Thr (K)	Bartels y cols., 1992b.
c.1655C>T	p.Ser552Leu	dbSNP.
c.1691T>C	p.Ile564Thr	dbSNP.
c.1699G>A	p.Ala567Thr (K)	Maekawa y cols., 1995; Maekawa y cols., 1997; Boeck y cols., 2002.
c.1719_1720delT	p.Leu574fsX576	Parmo-Folloni y cols.

^a Nombre común entre paréntesis.

Fuentes: Primo-Parmo y cols., 1996; Souza y cols.; 2005; Shields y cols., 2011; dbSNP.

Algunas variantes de baja actividad enzimática son las siguientes:

1.2.4.1 Variante D70G. Otros nombres: Atípica 1 (A), Dibucaína Resistente I, variante asociada a apnea pos-anestésica, ASP70GLY, CHE*70G o BChE*70G [dbSNP: rs1799807]. Fue la primera variante genética identificada (Kalow y Genest, 1957). Se detectó inicialmente en pacientes sometidos a dosis fisiológicas de succinilcolina (relajante muscular pre-operatorio). Estos pacientes, debido a la incapacidad de la enzima para hidrolizar la succinilcolina, presentan parálisis muscular y apnea respiratoria prolongada. McGuire y cols. (1989) describieron una mutación puntual en el nucleótido 209 (exón 2) que causaba la sustitución de ácido aspártico por glicina en el codón 70 (p.Asp70Gly), variante que corresponde a la forma clásica descrita por Kalow en 1957. Homocigotos para esta mutación además de presentar apnea, manifiestan efectos colaterales significativos como depresión, insomnio y pérdida de peso después de la ingesta de piridostigmina (Darvesh, 2003). A nivel de la proteína se observa un cambio de un aminoácido ácido por uno neutro, que da cuenta de la afinidad reducida de una BChE atípica para los ésteres de colina. En vista de esto, se presenta una reducción del 30% de su actividad cuando es comparada con la enzima usual. Existen estudios poblacionales de la frecuencia de la variante atípica de BChE. McGuire y cols. (1989) estimaron la frecuencia del alelo *D70G* en la población de origen europeo en cerca del 1.7% y en la población caucásica en cerca del 2%, con una frecuencia para el genotipo homocigoto de la variante de aproximadamente 3:10.000 en individuos de origen europeo y de 1:3.000 en norteamericanos blancos (McGuire y cols., 1989; OMIM, 2010). Mikami y cols. (2005) estimaron una frecuencia de 1.8% en donadores de sangre Euro-brasileros habitantes de la

población de Curitiba. En el sistema de nomenclatura de La Du y cols. (1991) ésta variante alélica es referida como CHE*70G.

1.2.4.2 Variante Silente. Otros nombres: Silente 1 (S), BChE Ann Arbor, CHE*FS117 o BChE*FS117. El fenotipo silente de BChE es caracterizado por reducción de más del 90% de la actividad de la enzima en relación con el fenotipo usual, pudiendo llegar a la ausencia total de actividad. Lidell y cols. (1962) fueron los primeros en describir un caso de deficiencia completa de actividad de la BChE. Nogueira y cols. (1989, 1990) identificaron mediante la secuenciación del gen *BChE* varios alelos silenciosos como responsables de la respuesta exagerada a succinilcolina. Fenotípicamente, las variantes silentes son heterogéneas. Algunos individuos presentan enzimas con estructura inadecuada para hidrolizar las uniones éster de la colina, mientras que otros, carecen completamente de una enzima funcional. Esto se ha demostrado por el hecho de que el fenotipo silente es producido por más de un polimorfismo, que puede ir desde deleciones de una sola base ocasionando codones de parada prematura y proteínas truncadas, inserciones de una sola base con corrimiento del marco de lectura y cambio en la secuencia de aminoácidos, hasta la combinación de mutaciones puntuales con inserciones, dando lugar al corrimiento del marco de lectura. La frecuencia en estado homocigoto de la variante es de aproximadamente 1:100.000 individuos (Whittaker, 1986), ocasionando la ausencia total de actividad de la colinesterasa plasmática.

1.2.4.3 Variante V142M. Otros nombres: Hammersmith (H) o VAL142MET. Identificada por Whittaker y Britten (1987) en dos pacientes tratados en el Hospital Hammersmith en Londres que presentaban una disminución de la actividad enzimática del 90%, con una susceptibilidad inusual a la succinilcolina. Esta variante tiene una actividad catalítica normal, pero muestra una concentración reducida de la enzima por cambios en la producción, estabilidad y vida media. Es causada por una mutación puntual que ocasiona la sustitución de valina por metionina en el codón 142 (p.Val142Met) (Jensen y cols., 1992).

1.2.4.4 Variante A184V. Otros nombres: Succinilcolina resistente (SC) o Ala184Val. Se caracteriza por una mutación puntual en el nucleótido 551 del exón 2, en la que se sustituye alanina por valina en el codón 184 (p.Ala184Val), condicionando una enzima con capacidad disminuida para hidrolizar succinilcolina, habilidad normal para hidrolizar otros sustratos y resistencia normal a inhibidores convencionalmente utilizados. Fue descrita por Greenberg y cols. (1995) en una paciente norteamericana con disminución significativa para hidrolizar succinilcolina, habilidad normal para hidrolizar otros sustratos y resistencia normal a los inhibidores dibucaína y fluoruro.

1.2.4.5 Variante T243M. Otros nombres: Fluoruro Resistente 1 (F-1), CHE*243M, BChE*243M o Thr243Met. [dbSNP: rs28933389]. Harris y Whittaker describieron esta variante, la cual presenta una frecuencia homocigótica de 1:150.000 (Harris, 1961). Es causada por una mutación puntual en la que se sustituye treonina por metionina en el codón 243 (p.Thr243Met). Se caracteriza por la incapacidad de hidrolizar succinilcolina en dosis farmacológicas debido a alteraciones en la estructura de la enzima, siendo resistente a la inhibición por fluoruro de sodio 0.050mM en los ensayos *In vitro* y mostrando menor inhibición por dibucaína que lo usual.

1.2.4.6 Variante E255D. [dbSNP: 16849700]. Caracterizada por una mutación puntual en el exón 2, nucleótido 765 (Primo-Parmo y cols., 1996), en la que se sustituye ácido glutámico por ácido aspártico. Mikami (2005) encontró individuos con la mutación clasificados en grupos de actividad alta, media y baja, sugiriendo que la mutación no altera la actividad de la BChE. La frecuencia de la variante en donadores de sangre de Curitiba es de 0.98% (Mikami, 2005).

1.2.4.7 Variante G390V. Otros nombres: Fluoruro Resistente 2 (F-2), CHE*390V, BChE*390V o Gly390Val. [dbSNP: 28933390]. Es causada por una mutación puntual en la que se sustituye glicina por valina en el codón 390 (p.Gly390Val) y presenta las mismas características que la variante T243M.

1.2.4.8 Variante E497V. Otros nombres: James (J) o Glu497Val. [dbSNP: 121918556]. Descrita por Garry y cols. (1976). Se caracteriza por una reducción del 66% de la concentración de enzima circulante en plasma y, en consecuencia, una disminución correspondiente en la actividad total de la enzima. Los individuos con la variante J son susceptibles a la apnea prolongada después de la administración de succinilcolina. Bartels y cols. (1992a) encontraron el fenotipo J asociado a dos mutaciones puntuales en la región codificante del gen *BCHE*: p.Ala539Thr (sustitución de alanina por treonina en el codón 539) y p.Glu497Val (sustitución de ácido glutámico por valina en el codón 497). Como la variante E497V fue encontrada en desequilibrio de ligamiento con la variante A539T, se desconoce el efecto aislado de la variante E497V. La frecuencia homocigótica de la variante es de aproximadamente 1:150.000 (Garry y cols., 1976; Evans y Wardell, 1984).

1.2.4.9 Variante A539T. Otros nombres: Kalow (K), CHE*539T, BChE*539T, ALA539THR. [dbSNP: rs1803274]. Se caracteriza por la reducción cercana al 33% de la concentración de enzima circulante en plasma, que puede ser debida a disminución en la síntesis o degradación acelerada (Rubinstein y cols., 1978). Es causada por una mutación puntual en el exón 4 que ocasiona la sustitución de alanina por treonina en el codón 539 (p.Ala539Thr) (Bartels y cols., 1992b).

Estudios poblacionales basados en el análisis directo de ADN demostraron que el alelo *A539T* es el más frecuente entre las variantes de BChE en los grupos étnicos europeos: Escocia 19.6% (Gaffney y Campbell, 1994) y Dinamarca 18% (Jensen y cols., 1996); asiáticos: Japón 17.5% (Shibuta y cols., 1994; Izumi y cols., 1994) y caucasoides norteamericanos: 12.8% (Bartels y cols. 1992b). En la población euro-brasilera el alelo se encuentra en un 18.4% y en la población afro-brasilera en un 17.1% (Souza y cols., 1998). Rubinstein y cols. (1978) y Whittaker y Britten (1988) estimaron la frecuencia de homocigotos en 1:1.000, mientras que Evans y Wardell (1984) la estimaron en 1:76.

La inactividad del gen *BCHE* se conoce con el nombre de *acolinesterasemia*, y fue descrita por Muratani (1991).

Las variantes de alta actividad son:

1.2.4.10 Variante C₅. Variante electroforética que contiene una banda de movimiento lento adicional a las cuatro bandas vistas en sueros normales (Harris y cols., 1962, 1963). Se creyó por algún tiempo que esta variante era codificada por un segundo *locus* genético, pero Masson y cols. (1990) demostraron claramente que su producción no es ocasionada por un segundo gen *BCHE*. Ahora parece claro que C₅ es formada por la unión de la enzima BChE tetramérica con otra proteína. Individuos con la variante C₅ han presentado acortamiento del bloqueo neuromuscular después de la administración de suxametonio (Sugimori, 1986), lo que indica que se requieren dosis más altas del medicamento para obtener el efecto clínico deseado.

1.2.4.11 Butirilcolinesterasa Cynthiana. Caracterizada por marcada resistencia a la succinilcolina, con una actividad enzimática tres veces superior a la usual (Yoshida y Motulsky, 1969), explicada por un aumento en la concentración plasmática, hecho del que se desconoce si se trata de duplicaciones del gen, tal y como se ha observado en los genes de la familia Citocromo P450 (CYP).

1.2.4.12 Butirilcolinesterasa Johannesburgo. Reportada por Krause y cols. (1988) en una familia sudafricana. Caracterizada por una actividad enzimática dos veces superior a la usual, la cual se asocia con un número normal de moléculas de enzima. La BChE Johannesburgo presenta la misma movilidad electroforética que la enzima usual, pero tiene mayor estabilidad térmica.

Además de los polimorfismos genéticos que originan actividad variable de la enzima, se han descrito otros factores que modifican los niveles de colinesterasa plasmática así (Tabla 3):

- **Género y Hormonas:** Los valores promedio de colinesterasa plasmática en hombres son estadísticamente superiores a los encontrados en mujeres debido a una aparente modulación hormonal negativa desencadenada por los estrógenos (EQM ResearchInc, 1994; Carmona-Fonseca, 2000).
- **Edad:** Es confusa la relación colinesterasa-edad (Henaó, 1991). Los recién nacidos tienen bajos niveles de actividad de BChE (aproximadamente un 50% con respecto a los adultos), que se eleva gradualmente hasta lograr un pico máximo aproximadamente a los 6 años de edad. Durante la pubertad los niveles comienzan a descender hasta normalizarse en la edad adulta (Hutchinson y Widdowson, 1952).
- **Gestación:** Durante la gestación hay una reducción de la actividad colinesterásica (Evans, 1980; De Peyster, 1990; Venkataram, 1990), aunque algunas mujeres no presentan cambios (Evans, 1980). Fisiológicamente la colinesterasa plasmática muestra una caída brusca en el primer trimestre del orden del 20%, con recuperación leve en el tercer trimestre y un nuevo descenso del segundo al séptimo día posparto. La recuperación total (nivel de no embarazada) ocurre de 3 a 6 semanas después del parto (Evans, 1980; Robson, 1986; De Peyster, 1990). Se han identificado tres patrones de comportamiento temporal de la enzima plasmática asociados al embarazo, así: reducción pos-concepción con no retorno a nivel pre-concepción (disminución continua); reducción pos-concepción con retorno parcial o total a nivel pre-concepción (disminución transitoria) y no reducción o aumento durante gestación (no cambio).
- **Aborto:** En aborto espontáneo ocurre una intensa reducción de la actividad enzimática plasmática (Whittaker, 1988).
- **Hemoglobina, hematocrito y edad de los eritrocitos:** La BChE se disminuye en las células eritrocitarias de mayor edad. En los niños, la máxima actividad se presenta en el período inicial de la vida eritrocitaria, la cual se reduce al 70% al final del ciclo de vida. En los adultos, la mayor actividad ocurre en los primeros 30 días de vida del eritrocito para luego decaer hasta menos del 50% (Galbraith, 1981).

- Medicamentos: El uso de anovulatorios orales cuyo principio activo sea estrógeno, provoca una reducción del 20% de la actividad de la enzima, probablemente por disminución de la síntesis hepática de BChE inducida por hormonas esteroideas (Whittaker, 1988).
- Enfermedades y estados clínicos: Diversas enfermedades y condiciones mórbidas alteran los niveles de la actividad colinesterásica plasmática, ya sea disminuyéndolos (Hayes, 1982; Whittaker, 1988) o elevándolos (Kaloyanova, 1982; Reuter, 1987; Whittaker, 1988). Desnutrición (Umeki, 1993), anemia crónica, falla renal (Phillips y Hunter, 1992), neoplasias (Kaniaris y cols., 1979), hepatopatías (Schmidt y Schmidt, 1993), infecciones, uso de anovulatorios orales (Robertson, 1967), estrógenos y corticoesteroides están entre las causas de reducción de la enzima plasmática, mientras que estados de ansiedad, obesidad, alcoholismo e hipertensión figuran entre las que ocasionan incremento.
- Factores fisicoquímicos: Ando y colaboradores describieron en 1984 una relación lineal entre la actividad de la colinesterasa plasmática y varios factores fisicoquímicos tales como los niveles de transaminasa glutámico-pirúvica, de hemoglobina y de colesterol total (Ando, 1984). Las estimaciones de la actividad enzimática obtenidas con este modelo, concuerdan con la medida y los cambios significativos de actividad que pueden ser atribuidos a efectos tóxicos de plaguicidas o a anomalías de la función hepática.
- Condición genética: Un 3% de los caucásicos y menos del 1% de los negros presentan niveles bajos de actividad colinesterásica plasmática (Garry, 1971; Coye, 1986). Se ha informado de una posible relación entre el factor Rh con la colinesterasa plasmática en mujeres gestantes, asociación no encontrada en las no grávidas ni en hombres (Evans, 1980). Otros autores no han hallado tal asociación (Primo-Parmo, 1982). El análisis de un polimorfismo de supresión/inserción del gen *BCHE* ha mostrado afectar los niveles séricos de la BChE, afección que varía en poblaciones de diferente origen étnico (Ruprecht, 2001). Además de las variaciones normales de índole genética como las antes referidas, los niveles de la enzima pueden verse afectados por variantes genéticas disfuncionales (por ejemplo, BChE Newfoundland y BChE Fluoruro Resistente tipo Japonés), por exposición a inhibidores enzimáticos, por biosíntesis reducida o por degradación aumentada (Gerreiro, 1985; Morton, 1988; Rosalki, 1988).

Tabla 3. Factores que modifican los niveles de BChE

Factores
Género femenino
Periodo perinatal e infancia
Hormonas
Primer trimestre de gestación
Desnutrición
Anovulatorios orales
Variantes del gen <i>BCHE</i>
Anemia crónica
Hepatopatías
Falla renal
Neoplasias
Infecciones agudas
Niveles bajos de transaminasas
Niveles altos de colesterol y triglicéridos

1.2.5 Papel fisiológico de la BChE

1.2.5.1 Metabolismo de lípidos, peso e Índice de Masa Corporal (IMC). El aumento en la actividad de la BChE está asociada con el metabolismo anormal de lípidos y dislipidemia, caracterizada por el aumento en la síntesis de triglicéridos y/o colesterol, exceso de ácidos grasos derivados del metabolismo de carbohidratos, obesidad y diabetes mellitus (Kutty, 1980). Crook y cols. (1994) y Lejus y cols. (1998) concluyeron que existe una correlación positiva entre la actividad de la BChE y las concentraciones de triglicéridos y apolipoproteína B, la cual está presente en las partículas de Lipoproteínas de Baja Densidad (LDL) y Lipoproteínas de Muy Baja Densidad (VLDL). Individuos con complejo C₅⁺ en plasma presentan un IMC y un peso más bajo al ser comparados con individuos C₅⁻, sugiriendo que la presencia del complejo C₅⁺ eleva en cerca del 25% la actividad de la BChE (Chautard-Freire-Maia y cols., 1991; Alcántara, 2000).

1.2.5.2 Ciclo celular y desarrollo embrionario. El papel de las colinesterasas en la regulación de los procesos de diferenciación y proliferación celular ha sido demostrado por muchos autores. Tanto la AChE como la BChE se expresan durante el desarrollo embrionario. Hay pruebas de que la BChE está presente transitoriamente en algunas células embrionarias, siendo posteriormente sustituida, en algunos casos, por la AChE. Esto sugiere una función de colinesterasa embrionaria para la BChE y una complementariedad en el papel de las enzimas (Chatonnet y Lockridge, 1989). Esta expresión transitoria se produce en una gran población de neuronas y también en células no neuronales, y se ha

interpretado como evidencia de la participación de esta enzima en el desarrollo del sistema nervioso, ya sea por su actividad enzimática o su capacidad para regular otras proteínas (Darvesh y cols., 2003). La BChE se expresa desde el principio y durante la mitosis, mientras que la AChE se expresa unas 11 horas después de la división celular. Esto sugiere la participación de la BChE en la regulación de la proliferación celular y también en la expresión de la AChE, además de la participación de esta última en el proceso de diferenciación celular (Layery cols., 1992).

1.2.5.3 Tumorigénesis. Las evidencias indican que las colinesterasas pueden tener cierta influencia en el proceso de la tumorigénesis. Está demostrado que los genes de las colinesterasas están estructuralmente alterados o se expresan de manera aberrante en una serie de tumores tales como gliomas (Vidal, 2005), carcinomas primarios de ovario (Zakut y cols., 1990), leucemias (Lapidot y cols., 1989), cáncer de pulmón (Brass y cols., 1997), cáncer de próstata (Jung y cols., 2006), cánceres de cabeza y cuello (Hibi y cols., 2000). El gen *BCHE* es uno de los pocos ejemplos de genes que se activan durante los procesos de inmortalización celular.

1.2.5.4 Enfermedades neurodegenerativas. Varios autores han investigado el papel de la variante K de la BChE en el progreso del deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer y su relación con el gen *APOE*. Déniz-Naranjo y cols. (2007) concluyeron que la variante K se asocia con la forma tardía de la enfermedad de Alzheimer.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar mediante la secuenciación del gen de la butirilcolinesterasa (*BCHE*), algunos de los polimorfismos responsables de reacciones adversas en una muestra de pacientes consumidores de “cocaína”.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar los polimorfismos del gen *BCHE* con la aparición de efectos adversos en un grupo de pacientes consumidores de “cocaína”.
- Predecir *In silico* el impacto funcional y estructural de la proteína para cada uno de los polimorfismos identificados.

3. ASPECTOS METODOLÓGICOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio de corte transversal, descriptivo.

3.2 POBLACIÓN

La población de referencia del estudio está conformada por 11 pacientes colombianos, con residencia habitual en el Municipio de Neiva (Huila), con antecedente confirmado de consumo de “cocaína”.

3.2.1 Criterios de inclusión

- Edad mayor de 18 años.
- Antecedente confirmado de consumo actual o antiguo de “cocaína”.
- Deseo voluntario de participar en el estudio.
- Diligenciamiento completo y firmado del consentimiento informado.

3.2.2 Criterios de exclusión

- Edad menor a 18 años.
- Deseo voluntario de ser retirado del estudio.
- Diligenciamiento incompleto y/o no firmado del consentimiento informado.
- Muestra de ADN insuficiente, degradado y/o contaminado.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MUESTREO

El muestreo por conveniencia (Creswell, 2008) se llevó a cabo en el Municipio de Neiva (Huila), Colombia. La población de estudio fueron hombres y mujeres mayores de 18 años de edad, con antecedente de consumo de cocaína. En 11 personas (91% hombres y 9% mujeres) entre los 21 y los 40 años de edad, con la precedencia de la firma de un consentimiento informado, se aplicó el instrumento validado de “evaluación y medida de la adicción a cocaína” (*Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)*, Hser y cols., 1999), junto con la toma de muestras sanguíneas a partir de punción venosa, para realizar los estudios de polimorfismos del gen *BCHE*.

4.2 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN Y MEDIDA EN LA ADICCIÓN A COCAÍNA

El instrumento *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)* (Hser y cols., 1999) (Anexo 1) se aplicó a cada una de las personas participantes en el estudio. El instrumento proporciona una evaluación de la gravedad del consumo a lo largo de la vida. Tiene 28 preguntas y ofrece resultados en cuatro dimensiones: 1. *Consumo a lo largo de la vida*: trata de obtener un promedio entre el nivel de consumo más intenso y el nivel de consumo durante el año anterior a la evaluación; también recoge información sobre el número de años con consumo regular de cocaína, es decir, la frecuencia mínima de consumo por semana. 2. *Consumo reciente*: se refiere a la frecuencia de consumo de cocaína en el período previo a la evaluación; tal frecuencia se pondera en función de lo reciente del último consumo. 3. *Dependencia psicológica*: consiste en la suma de respuestas positivas de cada uno de 9 criterios del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM), que valoran el abuso y la dependencia a la cocaína (versión DSM-III-R) y 4. *Intentos de abandono del consumo*: recoge el número de veces que el paciente ha conseguido estar abstinente de cocaína (al menos 30 días), así como la duración más larga de un período de abstinencia y la realización o no de algún tipo de tratamiento de deshabituación (Hser y cols., 1999).

4.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras se tomaron a partir de sangre venosa en tubos con el anticoagulante Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Una vez fueron tomadas las muestras, se

identificaron de forma anónima y se transportaron adecuadamente al laboratorio de la Unidad de Genética de la Universidad del Rosario.

Los leucocitos fueron separados del resto de los componentes celulares y se extrajo el ADN de acuerdo con las instrucciones del estuche comercial PROBE® (Holben, 1988), de la siguiente manera: 1. Lavado con 6 ml de solución de lisis de glóbulos rojos (8,3 g de Cloruro de Amonio, 1 g de Bicarbonato de Potasio y 2 mL de EDTA 0,5 M), seguido de mezcla por inversión; el tubo con la muestra de cada persona se almacenó durante 10 minutos en un congelador y luego se realizó centrifugación por otros 10 minutos a 4.500 rpm. 2. Se repitió el paso anterior y se descartó el sobrenadante líquido para luego re-suspender el paquete celular de células blancas. 3. Se adicionó 2,5 mL de solución de lisis de glóbulos blancos (50 mL de EDTA 0,5M a pH 8,0, 200 MI de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% y 750 mL de H₂O), se homogenizó la mezcla utilizando un agitador (Vortex-Mixer 16700). 4. Posteriormente, se realizó digestión proteica adicionando 10 µL de proteinasa K, mezcla que se incubó en un baño húmedo (Memmert W350) a 55°C durante cuatro horas. 5. Luego se añadieron 800 µL de solución precipitante de proteínas (385g de acetato de amonio y 615 mL de H₂O), se mezcló por inversión y se mantuvo durante 10 minutos en congelador para después centrifugar el tubo durante 20 minutos a 4.500 rpm. 6. Se extrajo el sobrenadante en tubos Falcon (10 mL), con 2,4 mL de isopropanol (Merck) previamente almacenado en frío. 7. Se extrajo el ADN precipitado mediante una pipeta Pasteur. 8. Finalmente, se almacenó el ADN extraído en tubos Eppendorf, mezclado con 400 µL de TE1X en una nevera a 8°C.

4.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

El ADN extraído fue enviado a Macrogen Corea para su amplificación y secuenciación. Los cuatro exones del gen *BCHE* fueron amplificados utilizando los iniciadores o *primers* listados en la tabla 4. La PCR se realizó con 20 ng de ADN genómico como plantilla, en una mezcla de 30 µl de reacción, mediante el uso de *EF-Taq* (Solgent, Corea) como sigue: activación de la Taq polimerasa a 95°C durante 2 minutos, 35 ciclos de 1 minuto, cada uno a 95°C, 56°C y 72°C, finalizando con un ciclo de 10 minutos a 72°C. Los productos de amplificación se purificaron con una placa de filtro Multi Screen (Millipore Corp., Bedford, MA, EE.UU.).

4.5 SECUENCIACIÓN

La secuenciación de los productos de la PCR fue realizada mediante la utilización del estuche comercial ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras de ADN que contienen los productos de extensión fueron re-suspendidas en Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems, Foster City, CA). La mezcla se incubó a 95°C durante 5 minutos, seguida por 5 minutos en hielo y posteriormente se procedió a su análisis en un equipo analizador de ADN ABI PRISM® 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Las secuencias fueron analizadas mediante el programa bio-informático CLC Main Workbench 7.0 (QIAGEN® Company, Denmark).

Tabla 4. Lista de *Primers* Utilizados en la PCR

Primer	Secuencia (5'3')
Exón 1-F	AGTTGCTGCTGCCAACTCTC
Exón 1-R	TCATCCCACAGAATGAGCTTT
Exón 2.1-F	GCTATATGCAGAAGGCTTATAAAACA
Exón 2.1-R	TGAACAATGAATGGCTTCCA
Exón 2.2-F	CTCCAGGGAACATGGGTTTA
Exón 2.2-R	GGATCAAACCAAGCCAGAGA
Exón 3-F	TCTTGTGAACAGTGTTAGAAAACAATA
Exón 3-R	AAAATAATGTGTTTCATTAACCAAG
Exón 4-F	TTCAGGCAAAGCGAGCTAAT
Exón 4-R	TCATTTTAAGATTCTTTCTTGCCTTT

4.6 PREDICCIÓN *IN SILICO*

Se utilizaron herramientas *In silico* para predecir el impacto funcional y estructural de los polimorfismos hallados en las secuencias del gen *BCHE* de los participantes en el estudio. Las herramientas utilizadas para predecir el impacto funcional fueron Align-GVGD, PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), PANTHER 9.0, SNPs&GO, SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant), nsSNPAnalyzer, SNPdryad, MutPred, PMut y PhD-SNP (Predictor of human Deleterious SNPs). Las herramientas utilizadas para predecir el impacto en la estructura secundaria de la proteína fueron Predict Protein y PSIPRED v3.3.

Align-GVGD (http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php). Este programa atendiendo a las características biofísicas de los aminoácidos y a la realización de alineamientos múltiples entre especies, establece un *score* que predice el impacto del cambio aminoacídico en la proteína, y por tanto el grado de patogenicidad (deletérea o neutra) de las sustituciones *missense*. Además, permite valorar el grado de conservación aminoacídico del cambio analizado, ya que las regiones con importancia funcional se conservan evolutivamente. Así, según el *score* se establecen rangos que estiman la patogenicidad de la variante, siendo el C_0 la de menos probabilidad de patogenicidad y el C_{65} la de mayor probabilidad de patogenicidad.

PolyPhen-2 (prediction of functional effects of human nsSNPs, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). La predicción del grado de patogenicidad se basa en la realización de tres tipos de aproximaciones: caracterización de la secuencia donde se produce la sustitución, grado de conservación de la sustitución proteica y posible alteración de la estructura 3D de la proteína. Atendiendo a estas predicciones, PolyPhen establece las siguientes clasificaciones: *probablemente deletérea*: alta probabilidad de patogenicidad por afectar a la estructura o función proteica; *posiblemente deletérea*: se supone que la sustitución aminoacídica puede afectar a la función o estructura proteica; *benigna*: alta probabilidad de que no tenga ningún efecto deletéreo e *incierto*: cuando no existen datos suficientes para que el programa realice una predicción.

PANTHER 9.0 (<http://www.pantherdb.org/>). Estima la verisimilitud de un cambio de aminoácido que causa un impacto funcional sobre la proteína, prediciendo efectos deletéreos. Este calcula el puntaje subPSEC (substitution position-specific evolutionary conservation) basado en el alineamiento de proteínas relacionadas evolutivamente. Los puntajes subPSEC son valores continuos que van desde 0 (neutro) hasta aproximadamente -10 (mayor probabilidad de ser deletéreo). Puntajes iguales o mayores a -3 son el punto de corte para que la mutación sea descrita como neutra, mientras que mutaciones con puntajes por debajo de -3 son descritas como deletéreas.

SNP&GO (<http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go/>). Predice las mutaciones a partir de la secuencia de la proteína, colectando un único marco de información derivado de la secuencia proteica, del perfil de la secuencia proteica y de su función. Los resultados muestran un efecto neutro o patógeno, con un índice de confiabilidad (RI) con valores entre 0 y 10, donde puntajes cercanos al 10 indican que la mutación está relacionada con patogenicidad.

SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant, <http://sift.jcvi.org/>). Permite conocer los posibles efectos de una sustitución aminoacídica sobre la función proteica con base a homología entre secuencias y propiedades físicas de los aminoácidos. El programa busca secuencias similares, las alinea y posteriormente calcula los *score* con base a los diferentes aminoácidos que aparecen en cada posición del alineamiento, proporcionando el resultado de si afecta o no la función de la proteína.

nsSNPAnalyzer (<http://snpanalyzer.uthsc.edu/>). Herramienta desarrollada para predecir si un nsSNPs es capaz de generar un efecto fenotípico en el individuo. Utiliza la información contenida en la alineación de secuencias múltiples y en la estructura 3D de la proteína para realizar predicciones, mejorando la precisión de la información. Los resultados de la predicción permiten determinar el efecto neutro o patogénico del nsSNPs.

SNPdryad (<http://snps.cabr.utoronto.ca:8080/SNPdryad/>). Nuevo algoritmo de predicción que solamente incluye secuencias de proteínas ortólogas para la realización de alineamiento de secuencias múltiples. Los resultados del alineamiento permiten determinar el efecto neutro o patogénico del cambio aminoacídico.

MutPred (<http://mutpred.mutdb.org/>). Herramienta desarrollada para clasificar la sustitución de un aminoácido como asociado a enfermedad o neutral en humanos y adicionalmente predice la base molecular de la enfermedad. Fue creado utilizando las mutaciones deletéreas de la base de datos de mutaciones del genoma humano y los polimorfismos neutrales de Swiss-pro. La salida de MutPred contiene una puntuación general (g) relacionada con la probabilidad de patogenicidad o no del cambio aminoacídico y cinco puntajes de propiedades (p) relacionados con la posible afectación funcional y estructural de la proteína.

PMut (<http://mmb.irbbarcelona.org/PMut/>). La predicción del grado de patogenicidad se basa en la determinación del grado de conservación de la sustitución proteica y la posible alteración de la estructura 3D de la proteína. Este algoritmo genera un *score* que es designado como patógeno para valores >0,5 y neutro para valores inferiores.

PhD-SNP (Predictor of human Deleterious SNPs, <http://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html>). Basa sus análisis en máquinas de soporte vectorial (SVM). Clasifica el cambio aminoacídico en patogénico o neutral.

PredictProtein (<https://www.predictprotein.org/>). Es un servidor automático que busca en bases de datos públicas secuencias actualizadas de proteínas para crear alineamientos y predecir aspectos relacionados con la estructura secundaria y función de la proteína. El usuario envía una secuencia proteica y recibe un único archivo con los resultados de las comparaciones con las bases de datos y los métodos de predicción.

PSIPRED v3.3 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Herramienta que utiliza la información de las proteínas relacionadas evolutivamente para predecir la estructura secundaria de una nueva secuencia de aminoácidos. Emplea redes neuronales u otros algoritmos con capacidad de aprendizaje para captar la relación entre secuencia y estructura, para después aplicarla como método de predicción. No utiliza un conjunto de secuencias para deducir reglas o parámetros, sino que durante el periodo de aprendizaje ajusta las conexiones (los parámetros) entre el *input* (la secuencia problema) y el *output*, hasta que el *output* (la estructura) sea lo más certero posible. Una vez entrenado, el método está listo para hacer predicciones. A pesar de que este método no se ajusta a ningún modelo físico que relacione la estructura y la función, es el que hoy en día ofrece mejores predicciones.

5. RESULTADOS

5.1 APLICACIÓN DEL INSTRUMENTO DE EVALUACIÓN Y MEDIDA EN LA ADICCIÓN A COCAÍNA

La tabulación de la información obtenida luego de la aplicación del instrumento *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)* (Hser y cols., 1999) a los 11 participantes del estudio, permitió obtener los siguientes resultados en cada una de las cuatro dimensiones:

5.1.1 Consumo a lo largo de la vida

La edad de inicio de consumo regular de cocaína fluctuó entre los 15 y 20 años (Tabla 5), con un promedio de 17.5 años. El 91% de los pacientes ha consumido cocaína en cualquiera de sus preparaciones 200 veces o más a lo largo de su vida, mientras que el 9% restante lo ha hecho entre 100 a 199 veces (Tabla 6).

Tabla 5. Distribución de la muestra según edad de inicio de consumo de cocaína (años)

Edad	n	%
15	2	18
16	1	9
17	3	27
18	1	9
19	1	9
20	3	27
Total	11	100

Tabla 6. Distribución de la muestra según consumo de cocaína a lo largo de la vida

Frecuencia	n	%
100 – 199 veces	1	9
200 veces o más	10	91
Total	11	100

Durante los momentos de mayor consumo por parte de los pacientes, la frecuencia de uso de la sustancia varió entre el hábito diario o casi diario en el 9% de los casos y de 2 a 3 veces por día en el 46% (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de la muestra según frecuencia de mayor consumo de cocaína

Frecuencia	n	%
3-4 veces por semana	2	18
5-6 veces por semana	2	18
Diario o casi diario	1	9
2-3 veces por día	5	46
4 veces o más por día	1	9
Total	11	100

La frecuencia de consumo durante los 12 meses anteriores al ingreso a programas de desintoxicación y rehabilitación osciló entre 4 o más veces al día en el 9% de los casos y diario en el 37% (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de la muestra según frecuencia de consumo de cocaína previo al ingreso a programas de desintoxicación (12 meses)

Frecuencia	n	%
3-4 veces por semana	2	18
5-6 veces por semana	2	18
Diario o casi diario	4	37
2-3 veces por día	2	18
4 veces o más por día	1	9
Total	11	100

5.1.2 Consumo reciente

El último consumo regular de cocaína, en cualquiera de sus presentaciones, ocurrió durante el mes anterior al ingreso a programas de desintoxicación y rehabilitación en el 100% de los casos. La edad promedio al momento del último consumo fue de 26 años.

La frecuencia de consumo durante el mes anterior al ingreso a programas de desintoxicación y rehabilitación osciló entre 4 o más veces al día en el 9% de los casos y 2-3 veces por día en el 37% (Tabla 9).

5.1.3 Dependencia psicológica

En la totalidad de los encuestados se cumplió con los criterios del DSM-III-R para el diagnóstico de dependencia y abuso de sustancias psicoactivas.

El 100% de los pacientes refirió haber consumido cocaína en cantidades mayores y durante periodos más prolongados de los que inicialmente pretendía, siendo difícil suspender el consumo una vez iniciado.

El deseo incontrolable de consumo asociado al desarrollo de actividades que implican riesgo físico bajo el efecto del estimulante (conducir, cruzar calles, escalar, nadar, utilización de máquinas y herramientas, etc.), se evidenció en la totalidad de la muestra.

Tabla 9. Distribución de la muestra según frecuencia de consumo de cocaína previo al ingreso a programas de desintoxicación (1 mes)

Frecuencia	n	%
3-4 veces por semana	2	18
5-6 veces por semana	2	18
Diario o casi diario	2	18
2-3 veces por día	4	37
4 veces o más por día	1	9
Total	11	100

La tolerancia farmacológica, con disminución de los efectos que provoca la sustancia tras el uso continuado de una misma cantidad de droga, asociado a un aumento progresivo de las dosis consumidas con el fin de conseguir los efectos deseados, se encontró en todos los casos.

Los problemas físicos relacionados con el consumo de cocaína se presentaron en el 55% de los encuestados. Dentro de los síntomas comunes se encuentra epistaxis, cefalea, infecciones recurrentes, tos persistente, heridas, esguinces, abscesos cutáneos y palpitaciones. Un solo paciente (BCHE-5) refirió al momento de realización de la encuesta padecer VIH y hepatitis B secundario al consumo de cocaína por vía endovenosa. Dos pacientes (BCHE-4 y BCHE-9) refirieron haber presentado episodios convulsivos secundarios a sobredosis accidental.

En las once personas se observó persistencia del consumo de la sustancia a pesar de reconocer los problemas físicos, psicológicos, laborales y/o sociales que conlleva su uso. Así mismo, se determinó una reducción considerable o el abandono de las actividades sociales, laborales y/o recreativas como consecuencia del consumo de cocaína y el uso de gran parte del tiempo para conseguir, consumir y recuperarse de los efectos de la droga en el mismo número de sujetos.

Los síntomas característicos de abstinencia (insomnio, ansiedad, depresión, diaforesis, taquicardia, etc.), al intentar reducir o suprimir el consumo de cocaína, fueron referidos por el 82% de los pacientes.

5.1.4 Intentos de abandono del consumo

El número de veces de suspensión del consumo en períodos de 30 días o más fue de cero en el 73% de los casos. El mayor tiempo de permanencia libre de consumo después del uso regular fue de cero semanas en el 73% de los casos; el restante 27% suspendió el consumo entre 6 semanas y 3 meses de manera voluntaria.

En el 91% de los casos, se reconoció el uso excesivo de la sustancia, con intentos inútiles de reducirlo o controlarlo.

5.2 ANÁLISIS MOLECULAR DEL GEN *BCHE*

En el presente estudio se identificaron SNPs documentados previamente para el gen *BCHE* en 11 individuos consumidores de cocaína. En la muestra se observaron 2 SNPs codificantes (cSNPs) no sinónimos asociados con fenotipos heterogéneos en 3 pacientes (3/11), esto es, en el 27.3% de la muestra. Los genotipos y fenotipos resultantes se observan en la Tabla 10.

Los casos BCHE-1, BCHE-4 y BCHE-9 presentaron los cSNPs c.293A>G (p.Asp98Gly) y c.1699G>A (p.Ala567Thr) (Tabla 10). Estos cSNPs se localizan en los exones 2 y 4 y corresponden, desde el punto de vista funcional, a la variante Atípica (A) [dbSNP: rs1799807] y a la variante Kalow (K) [dbSNP: rs1803274] de la enzima BChE, respectivamente. La muestra BCHE-4 fue heterocigota compuesta. Para la variante K, la muestra BCHE-1 fue homocigota para el alelo mutante y BCHE-9 fue heterocigota (figuras 5, 6 y 7).

Tabla 10. SNPs identificados en el gen *BCHE* en pacientes consumidores de cocaína

ID	SNPs	Variante	Genotipo*	Fenotipo*	dbSNP
BCHE-0		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-1	c.1699G>A p.Ala567Thr	Kalow (K)	<i>K/K</i> <i>BCHE*567T/BCHE*567T</i>	KK	rs1803274
BCHE-2		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-3		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-4	c.293A>G p.Asp98Gly	Atípica (A)	<i>A/K</i> <i>BCHE*98G/BCHE*567T</i>	A/K	rs1799807
	c.1699G>A p.Ala567Thr	Kalow (K)			rs1803274
BCHE-5		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-6		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-7		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-8		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	
BCHE-9	c.1699G>A p.Ala567Thr	Kalow (K)	<i>U/K</i> <i>BCHE/BCHE*567T</i>	UK	rs1803274
BCHE-10		Usual (U)	<i>U/U</i> <i>BCHE/BCHE</i>	UU	

Los nombres oficiales de los genotipos y los fenotipos fueron designados de acuerdo a la nomenclatura estandarizada por La Du y cols. (1991).

ID: Identificación del paciente. SNPs: Polimorfismos de Nucleótido Simple. dbSNP: Base de Datos de Polimorfismo de Nucleótido Simple.

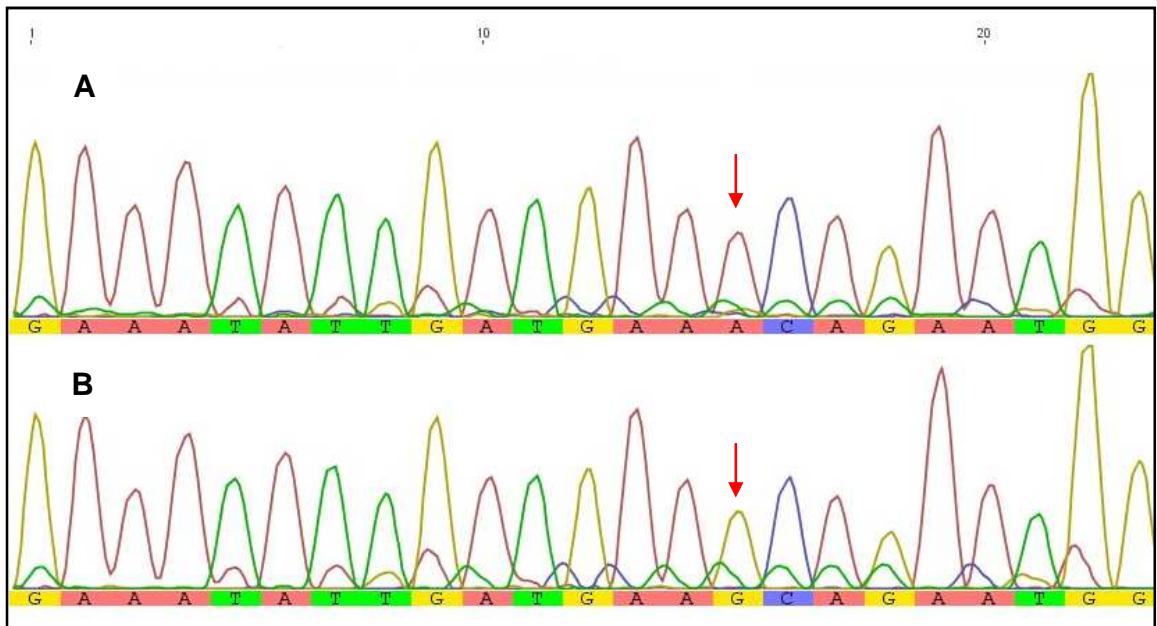


Figura 5. Electroferograma de productos de secuenciación del gen *BCHE*. **A.** Paciente BCHE-1, homocigoto para la sustitución c.1699G>A (p.Ala567Thr) responsable de la variante Kalow (K). Corresponde al genotipo *BCHE**567T/*BCHE**567T de acuerdo a la nomenclatura estandarizada por La Du y cols. (1991). **B.** Secuencia normal o Wild-Type (WT).

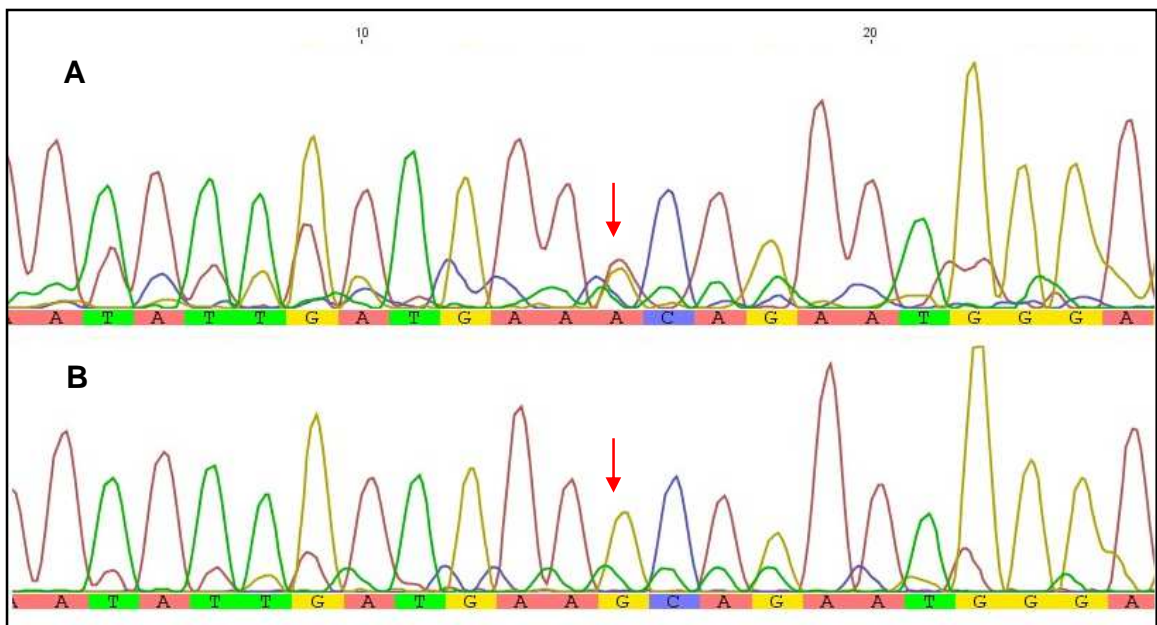


Figura 6. Electroferograma de productos de secuenciación del gen *BCHE*. **A.** Paciente BCHE-9, heterocigoto para la sustitución c.1699G>A (p.Ala567Thr) responsable de la variante Kalow (K). Corresponde al genotipo *BCHE*/*BCHE**567T de acuerdo a la nomenclatura estandarizada por La Du y cols. (1991). **B.** Secuencia normal o Wild-Type (WT).

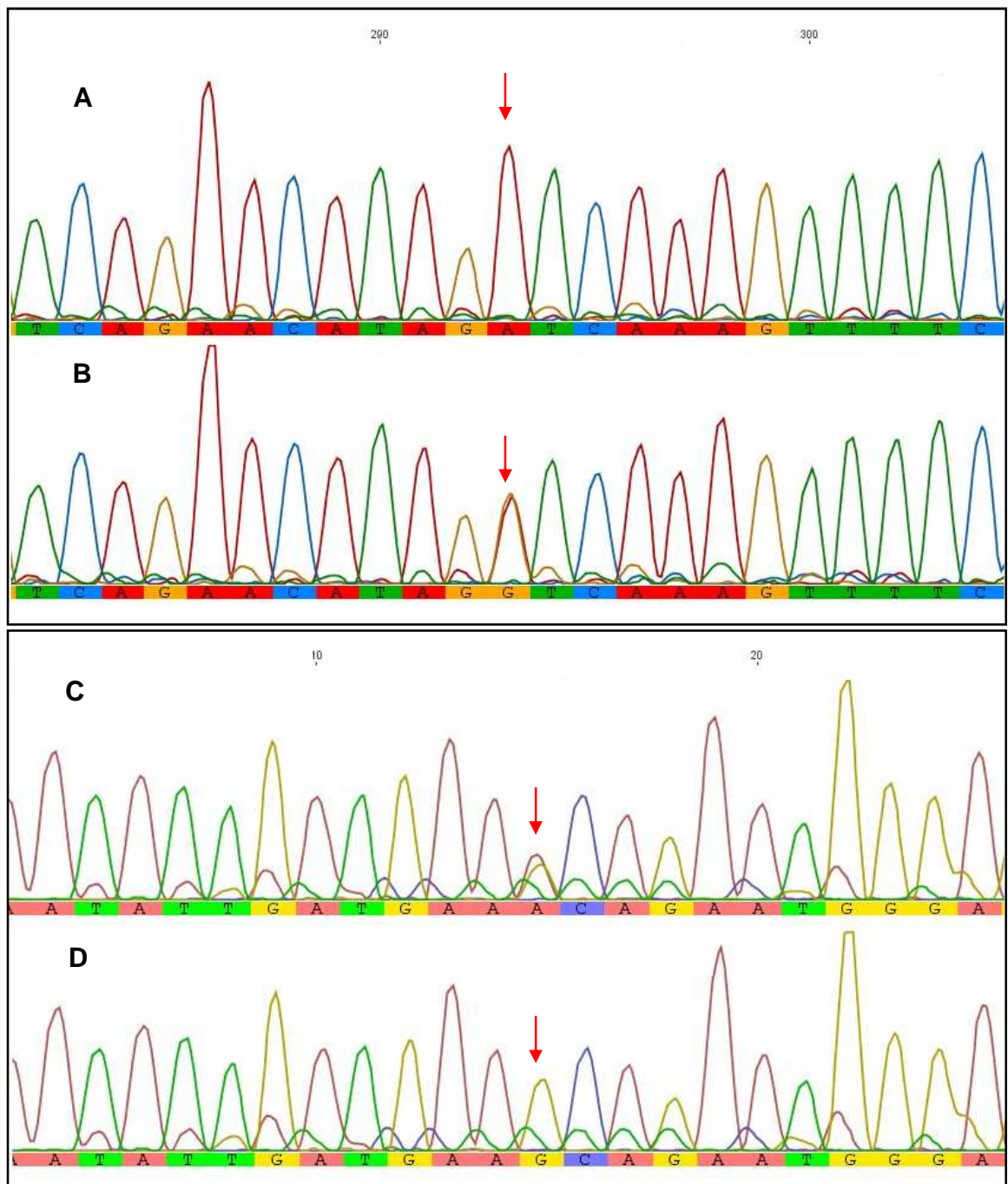


Figura 7. Electroferograma de productos de secuenciación del gen *BCHE* en el paciente BCHE-4, heterocigoto compuesto. **A.** Secuencia normal o Wild-Type (WT). **B.** Sustitución c.293A>G (p.Asp98Gly) responsable de la variante Atípica (A). **C.** Sustitución c.1699G>A (p.Ala567Thr) responsable de la variante Kalow (K). **D.** Secuencia normal o Wild-Type (WT). Corresponde al genotipo *BCHE**98G/*BCHE**567T de acuerdo a la nomenclatura estandarizada por La Du y cols. (1991).

Las frecuencias genotípicas y las frecuencias alélicas para cada cSNP se muestran en las tablas 11 y 12. El equilibrio de Hardy-Weinberg (H–W) se evaluó mediante la prueba de probabilidad exacta de Fisher, teniendo en cuenta el tamaño pequeño de la muestra y las frecuencias genotípicas esperadas inferiores a 5 en más del 20% de los resultados, por lo que no se cumplen las condiciones necesarias para la aplicación de la prueba de chi cuadrado (X^2).

Tabla 11. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1799807 del gen *BCHE*

Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas		
A/A	A/G	G/G	G/X*	A	G	X
0,89	0	0	0,11	0,89	0,055	0,055

Prueba de probabilidad exacta de Fisher $p = 0,111$

*Heterocigoto compuesto, donde X representa un alelo no A.

Tabla 12. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1803274 del gen *BCHE*

Frecuencias genotípicas				Frecuencias alélicas		
G/G	G/A	A/A	A/X*	A	G	X
0,73	0,09	0,09	0,09	0,18	0,77	0,05

Prueba de probabilidad exacta de Fisher $p = 0,0545$

*Heterocigoto compuesto, donde X representa un alelo no G.

5.3 PREDICCIÓN *IN SILICO* PARA SNPs DEL GEN *BCHE*

El análisis de polimorfismos realizado a través de la secuenciación completa de los cuatro exones del gen *BCHE*, resultó en la identificación de dos cSNPs con un posible efecto patogénico, p.D98G y p.A567T, debido a la presencia de un cambio de aminoácidos no sinónimos en la cadena proteica.

Los estudios de predicción de la alteración de la función y de la estructura proteica, basados en criterios de selección de mutaciones con impacto en la estructura y función de la proteína (Martin y cols., 2002) y en estudios *In vitro* de la actividad de la BChE (Valentino y cols., 1981; Bartels y cols., 1992, McGuire y cols., 1989), establecieron para el primero, el SNPs p.D98G, un carácter patogénico, mientras que para el segundo, el SNPs p.A567T, mostraron un comportamiento neutro (Tablas 13 y 14).

Los criterios para esta clasificación partieron del análisis de las características bioquímicas de los aminoácidos que pudieran tener un impacto sobre la estructura proteica y, en consecuencia, pudieran afectar las propiedades biológicas; estos fueron (Martin y cols., 2002):

- Cambios de aminoácidos de acuerdo a la hidrofobicidad.
- Capacidad para donar o aceptar puentes de hidrógeno.
- Cambios de cualquier aminoácido por prolina o viceversa.
- Cambios de cualquier aminoácido por glicina o viceversa.
- Cambio de un aminoácido aromático por uno que no lo es.

Tabla 13. Predicción *In silico* para SNPs del gen *BCHE* (I)

SNPs	Exón	FrGe	FrAl	Predicciones <i>In silico</i>					<i>In vitro</i> ^f
				GVGD ^a	SIFT ^b	pMUT ^c	Poly Phen ^d	PANTHER ^e	
c.293A>G (p.Asp98Gly)	2	U/U=0,73 K/K= 0,09 U/K= 0,09 A/K= 0,09	U = 0,78 K = 0,18 A = 0,04	3	2	2	2	2	2
c.1699G>A (p.Ala567Thr)	4			2	1	2	1	1	1

FrGe: Frecuencias Genotípicas calculas por el programa *Population Genetic Analysis (PopGen)*.

FrAl: Frecuencias Alélicas calculas por el programa *Population Genetic Analysis (PopGen)* (Anexo 2).

^a Predicción GVG: (1) Clase C₀ o bajo riesgo; (2) Clase > C₀ - Clase < C₆₅ o riesgo moderado; (3) Clase C₆₅ o riesgo alto.

^b Predicción SIFT: (1) No afecta la proteína; (2) Afecta la proteína.

^c Predicción pMUT: (1) Score < 0.5, Neutra; (2) Score > 0.5 Patógena.

^d Predicción con Polyphen: (1) Benigna; (2) Posiblemente deletérea; (3) Probablemente deletérea.

^e Predicción con PANTHER: (1) sub-PSEC Score </- -3, Neutra (Pdeleterius</- 0.5); (2) sub-PSEC Score > -3, Deletérea (Pdeleterius> 0.5).

^f Estudios *In vitro*: (1) Neutra; (2) Patógena. Referencias: Valentino y cols., 1981; Bartels y cols., 1992, McGuire y cols., 1989, Podoly y cols., 2010.

En el SNP p.Asp98Gly se evidenció el cambio de ácido aspártico (ácido y aceptor de puentes de hidrógeno) por glicina (polar y sin carga). Debido a que la glicina es el aminoácido más pequeño de todos y no cuenta con cadena lateral, es capaz de encajar en regiones de la estructura tridimensional de las proteínas inaccesibles para otros aminoácidos, adoptando múltiples conformaciones estéricas. Por lo tanto, la sustitución de un residuo de glicina capaz de adoptar cualquiera de esas conformaciones, dará lugar a una proteína incorrectamente plegada (Martin y cols., 2002), con su consecuente patogenicidad.

En el SNP p.Ala567Thr se evidenció el cambio de alanina (apolar) por treonina (polar, sin carga, donador y aceptor de puentes de hidrógeno). Esta sustitución ocasiona la formación de una proteína funcional pero ligeramente inestable (Martin

y cols., 2002). De acuerdo a los parámetros publicados (Chou y Fasman, 1974), la alanina es uno de los más fuertes formadores de α -hélices, mientras que la treonina se ocupa de plegamientos formadores de β -láminas que afectan la estabilidad de la proteína más que la funcionalidad (Chasman y cols., 2001). La localización de la sustitución A567T en el extremo C-terminal de la proteína, distante del sitio hidrolítico de la enzima, indica que la alteración en la estabilidad de la variante BCHE Kalow es ocasionada por una capacidad disminuida para su tetramerización, responsable de una menor actividad (Podoly y cols., 2010).

Tabla 14 Predicción *In silico* para SNPs del gen *BCHE* (II)

SNPs	Exón	FrGe	FrAl	Predicciones <i>In silico</i>					<i>In vitro</i> ^f
				SNP&GO ^a	nsSNP Analyzer ^b	SNP dryad ^c	PhD-SNP ^d	Mut Pred ^e	
c.293A>G (p.Asp98Gly)	2	U/U=0,73 K/K= 0,09 U/K= 0,09 A/K= 0,09	U = 0,78 K = 0,18 A = 0,04	1	1	2	2	2	2
c.1699G>A (p.Ala567Thr)	4			1	1	1	1	2	1

FrGe: Frecuencias Genotípicas calculas por el programa *Population Genetic Analysis (PopGen)*.

FrAl: Frecuencias Alélicas calculas por el programa *Population Genetic Analysis (PopGen)* (Anexo 2).

^a Predicción SNP&GO: (1) Neutra; (2) Patógena.

^b Predicción nsSNPAnalyzer: (1) Neutra; (2) Patógena.

^c Predicción SNPdryad: (1) Neutra; (2) Patógena.

^d Predicción PhD-SNP: (1) Neutra; (2) Patógena.

^e Predicción MutPred: (1) Neutra; (2) Patógena.

^f Estudios *In vitro*: (1) Neutra; (2) Patógena. Referencias: Valentino y cols., 1981; Bartels y cols., 1992, McGuire y cols., 1989, Podoly y cols., 2010.

En la Tabla 15 se resumen algunas de las características más importantes de las variantes genéticas en estudio (Atípica y Kalow).

Tabla 15. Características de las variantes genéticas en estudio

Variante	Posición (nucleótido)	Cambio de nucleótido en el codón y tipo de mutación	Sitio de la proteína en el que se encuentra la mutación	Cambio y posición de aminoácido	Naturaleza del cambio del aminoácido
Atípica	293	GAU/GGU Transición	Cerca del sitio activo.	Asp98Gly	Ácido/Polar sin carga
Kalow	1699	GCA/ACA Transición	Cerca de la región reguladora.	Ala567Thr	Apolar/Polar sin carga

La predicción *in silico* mediante la herramienta PredictProtein, permitió determinar, a partir de la información contenida en las secuencias de aminoácidos, la ausencia de cambios en la proporción de los elementos conformacionales de la estructura

secundaria (α -hélices, β -láminas y bucles) de la BChE en comparación con las variantes atípica (A) y Kalow (K) (Tabla 16).

Tabla 16. Cambios en la proporción de los elementos conformacionales de la estructura secundaria de la BChE y sus variantes atípica (A) y Kalow (K)

	α -hélices (%)	β -láminas (%)	Bucles (%)
BChE	30	11	59
Variante A	30	11	59
Variante K	30	11	59

La predicción *in silico* mediante el servidor PSIPRED v3.3, que toma en cuenta el grado de conservación de proteínas homólogas encontradas por el programa PSI-BLAST en una base de datos no redundante (Bryson y cols., 2005), mostró tanto para la proteína silvestre como para las variantes A y K, una estructura rica en bucles y en menor proporción β -láminas plegadas (Figura 8, 9 y 10).

6. DISCUSIÓN

La adicción a las drogas es una enfermedad compleja, crónica y recidivante, caracterizada por la búsqueda y el consumo compulsivo de sustancias, con persistencia del comportamiento a pesar de las graves consecuencias que conlleva (Camí y cols., 2003; Deroche-Gamonet y cols., 2004). En las etapas iniciales, las sustancias adictivas inducen estados placenteros (euforia), pero su uso continuado produce cambios adaptativos en el SNC que llevan a la tolerancia, a la dependencia física, a la sensibilización, al deseo incontrolable de búsqueda y, en algunos individuos con antecedentes de suspensión de consumo, a la recaída (Camí y cols., 2003).

Múltiples teorías se han desarrollado en torno a la adicción a las drogas, principalmente a partir de la evidencia neurobiológica y de datos obtenidos de estudios basados en el comportamiento del aprendizaje y mecanismos de la memoria, pero ninguna de ellas ha podido explicar por sí sola todos los aspectos relacionados con la adicción. En general, las drogas adictivas pueden actuar como reforzador positivo produciendo euforia o como reforzador negativo aliviando los síntomas de la abstinencia o disforia (Maldonado y cols., 2006); además, los estímulos ambientales pueden inducir respuestas condicionadas de uso, deseo y recaída, en presencia o ausencia de la sustancia (Stolerman y cols., 1992; Spanagel y cols., 1999).

Otros factores que influyen en el consumo de drogas y su dependencia son las propiedades farmacológicas y físico-químicas de la sustancia (solubilidad, volatilidad y resistencia al calor) (Farre y cols., 1991); los rasgos de personalidad y las enfermedades psiquiátricas (esquizofrenia, trastorno afectivo bipolar, depresión y trastorno por déficit de atención e hiperactividad), considerados como condicionantes principales de la drogadicción (Helmus y cols., 2001; Leri y cols., 2003; Kavanagh y cols., 2002); los factores ambientales que llevan al individuo a experimentar con la droga y los factores genéticos que influyen en el metabolismo y que, en conjunto con el efecto de la droga, contribuyen al riesgo de adicción (Crabbe y cols., 2002).

Por tanto, la adicción a la cocaína es una enfermedad compleja, donde interactúan factores genéticos y ambientales que contribuyen a las diferencias individuales de vulnerabilidad a la droga (Ibáñez, 2008). Cada vez son más las investigaciones que sugieren que los factores genéticos controlan en gran medida la influencia que los factores psicosociales tienen en cada individuo (Kendler y cols., 1986 y 1997; Bergeman y cols., 1990; Kessler y cols., 1992). Se ha estimado que los factores genéticos contribuyen al 40-60% de la vulnerabilidad para el desarrollo de

adicciones, mientras que los factores ambientales explicarían el resto (Nestler, 2000). Estudios en gemelos idénticos han demostrado que la heredabilidad de la adicción a la cocaína es del 72%, ajustándose a un modelo de herencia complejo (Goldman y cols., 2006).

La búsqueda de factores genéticos relacionados con la adicción a la cocaína se ha encaminado a determinar la relación existente entre la sustancia y la expresión génica neuronal (Nestler y cols., 2004). Específicamente, se ha demostrado que la administración de cocaína afecta la expresión de un amplio número de genes en diferentes regiones cerebrales. Estos genes controlan diversas vías moleculares, desde factores de transcripción, receptores de neurotransmisores y transportadores, hasta mecanismos de traducción de señales (Palomino, 2008). Kelz y cols. (1999) demostraron que algunos de estos cambios en la expresión génica son la base de los efectos comportamentales frente a la cocaína, ocasionado dos tipos de respuestas cerebrales diferentes: *adaptaciones neuronales*, las cuales son principalmente respuestas homeostáticas a una estimulación excesiva, y la *plasticidad sináptica*, la cual conduce a la asociación de estímulos relacionados con la droga y comportamientos de aprendizaje específicos (Berke y cols., 2000).

Sin restarle importancia al papel que juega la neuroplasticidad en la adicción, la capacidad de un individuo para metabolizar la cocaína por alteraciones en la actividad catalítica de la enzima Butirilcolinesterasa (BChE) o por la presencia de variantes genéticas de baja actividad enzimática puede también contribuir e influir en la susceptibilidad a la dependencia (Negráo y cols., 2013).

La BChE es la enzima metabolizadora de cocaína más importante en primates, incluyendo humanos (Inaba, 1989; Carmona y cols., 1996; Carmona y cols., 2005), que cataliza la hidrólisis de cocaína a metilester ecgonina (Matsubara y cols., 1984). Diversos estudios en roedores han demostrado la disminución de los efectos conductuales agudos de la cocaína tras la administración endovenosa de la forma usual de la BChE y de variantes mejoradas con mayor actividad (Carmona y cols., 1998; Koetzner and Woods, 2002; Lynch y cols., 1997; Mattes y cols., 1997; Sun y cols., 2002). Por el contrario, la inhibición de la actividad enzimática, reduce el metabolismo de la cocaína y disminuye las concentraciones de Benzoil Ecgonina (BEG) y la Ecgonina Metil Ester (EME) en plasma (Carmona et al., 2000; Hoffman et al., 1992; Kambam et al., 1992, 1993), incrementando el riesgo de toxicidad.

En el presente estudio se realizó el análisis de los 4 exones del gen *BCHE* mediante la secuenciación de 11 muestras de ADN de pacientes consumidores

regulares y dependientes de cocaína en cualquiera de sus presentaciones como lo demostró la aplicación del instrumento *Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)*, observándose 2 cSNPs no sinónimos, c.293A>G (p.Asp98Gly) y c.1699G>A (p.Ala567Thr), localizados en los exones 2 y 4, que corresponden, desde el punto de vista funcional, a la variante Atípica (A) [dbSNP: rs1799807] y a la variante Kalow (K) [dbSNP: rs1803274] de la enzima BChE respectivamente, caracterizadas por bajos niveles de actividad catalítica en comparación con la enzima silvestre.

La variante Atípica (A), distinguida por presentar una reducción del 30% en su actividad cuando es comparada con la enzima usual, fue identificada por McGuire y cols. (1989) a través de la secuenciación de clones genómicos y de regiones seleccionadas de ADN mediante amplificación por PCR. Los autores informaron una frecuencia alélica cercana al 2% en la población caucásica y cercana al 1.7% en poblaciones de origen europeo, con una frecuencia para el genotipo homocigoto de la variante de aproximadamente 3:10.000 en individuos de origen europeo y de 1:3.000 en norteamericanos blancos (McGuire y cols., 1989). En tres estudios distintos realizados por Fadel-Picheth (1991), Souza y cols. (2001) y Mikami y cols. (2005) en población brasilera habitante de la ciudad de Curitiba, se estimó la frecuencia de la variante A en 1.11%, 1.21% y 1.8% respectivamente. Del total de individuos analizados en nuestro estudio, solamente en 1 de ellos (BChE-4) se observó la presencia de ésta variante localizada en el nucleótido 293, en estado heterocigoto compuesto, que corresponde al cSNPs c.293A>G (p.Asp98Gly).

Los datos de las frecuencias alélicas representados en la tabla 17 obtenidos de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs1799807) muestran que dicho cSNP no está presente en poblaciones asiáticas ni de África Sub-Sahariana. El HAPMAP-TSI muestra una frecuencia alélica de 4% (Tabla 17), similar a la estimada en el presente estudio (Tabla 11). Frecuencias alélicas altas en la población general harían suponer la no existencia de una relación directa entre el polimorfismo y el riesgo incrementado de presentar reacciones adversas tras el consumo de cocaína. No obstante, estudios de correlación genotipo – fenotipo como el realizado por Parnas y cols. (2011) han demostrado que la asignación de fenotipos absolutos de BChE es a menudo inexacta, por lo que recomiendan la realización de secuenciación del gen *BChE* en combinación con la realización de pruebas bioquímicas (actividad enzimática y uso de inhibidores como la dibucaína y el carbamato, entre otros) para proporcionar una evaluación completa y detallada de la sensibilidad del paciente a sustancias metabolizadas por la enzima como succinilcolina, mivacurium, procaína y cocaína (Lee, 2009).

Tabla 17. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1799807 del gen *BCHE* en diferentes poblaciones

Población	Grupo étnico	N	Genotipos		Alelos	
			A/A	A/G	A	G
AFD_EUR_PANEL	Europeo	24	0,958	0,042	0,979	0,021
AFD_AFR_PANEL	Afro-Americano	23	0,957	0,043	0,978	0,022
AFD_CHN_PANEL	Asiático	24	1,000		1,000	
HapMap-HCB	Asiático	45	1,000		1,000	
HapMap-JPT	Asiático	44	1,000		1,000	
HapMap-YRI	África Sub-Sahariana	49	1,000		1,000	
HapMap-TSI	Múltiple	88	0,920	0,080	0,960	0,040
HapMap-CEU	Europeo	60	0,983	0,017	0,992	0,008
HapMap-MEX	Mexicano	50	0,980	0,020	0,990	0,010

HCB: población de Beijing, China.

JPT: población de Tokio, Japón.

YRI: Población de Yoruba, Nigeria.

TSI: población de Toscana, Italia.

CEU: residentes en Utah con ancestros del norte y oeste de Europa.

MEX: mexicanos con ancestro en Los Ángeles.

Fuente: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs1799807)

La variante Kalow (K), caracterizada por presentar una reducción cercana al 33% de la concentración circulante en plasma debido a disminución en la síntesis o a degradación acelerada, fue reconocida por primera vez por Rubinstein y cols. (1978) mediante el uso de dibucaína para la inhibición. Estudios poblacionales basados en el análisis directo de ADN demostraron que el alelo A539T es el más frecuente entre las variantes de BChE en los grupos étnicos europeos (Gaffney y Campbell, 1994; Jensen y cols., 1996), asiáticos (Shibuta y cols., 1994; Izumi y cols., 1994) y caucasoides norteamericanos (Bartels y cols. 1992b), con frecuencias alélicas entre el 13% y 20%. Rubinstein y cols. (1978) y Whittaker y Britten (1988) estimaron la frecuencia de homocigotos en 1:1.000, mientras que Evans y Wardell (1984) la estimaron en 1:76. De total de individuos analizados en nuestro estudio, en 3 de ellos se observó la presencia de esta variante localizada en el nucleótido 1699 en estado homocigoto (BCHE-1), heterocigoto (BCHE-9) y heterocigoto compuesto (BCHE-4), que corresponde al cSNPs c.1699G>A (p.Ala567Thr).

La Tabla 18 representa datos de frecuencias alélicas y genotípicas obtenidos de NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs1803274) en diferentes poblaciones para el nucleótido 1699. Las frecuencias alélicas obtenidas en nuestro estudio (Tabla 12) son coherentes con las reportadas en las muestras europeas (AFD_AUE_PANEL y HapMap-CEU). Esto indicaría la relación inexistente entre el polimorfismo y el riesgo incrementado de presentar reacciones adversas tras la exposición a la sustancia. Sin embargo, estudios realizados por Negrão y cols. (2013) demostraron una relación significativa entre la variante Kalow (K) y el consumo preferencial de cocaína en forma fumada o crack.

Tabla 18. Frecuencias genotípicas y alélicas referentes al SNP rs1803274 del gen *BCHE* en diferentes poblaciones

Población	Grupo étnico	N	Genotipos			Alelos	
			A/A	A/G	G/G	A	G
AFD_EUR_PANEL	Europeo	24	0,042	0,250	0,708	0,167	0,833
AFD_AFR_PANEL	Afro-Americano	23		0,304	0,696	0,152	0,848
AFD_CHN_PANEL	Asiático	24		0,167	0,833	0,083	0,917
HapMap-HCB	Asiático	45	0,022	0,356	0,622	0,200	0,800
HapMap-JPT	Asiático	45	0,067	0,267	0,667	0,200	0,800
HapMap-YRI	África Sub-Sahariana	60		0,317	0,683	0,158	0,842
HapMap-GIH	Indígena	84		0,190	0,810	0,095	0,905
HapMap-CEU	Europeo	60	0,017	0,317	0,667	0,175	0,825

HCB: población de Beijing, China.

JPT: población de Tokio, Japón.

YRI: Población de Yoruba, Nigeria.

GIH: Indios Gujarati, Houston, Texas.

CEU: residentes en Utah con ancestros del norte y oeste de Europa.

Fuente: NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs1803274)

Apoyados en los resultados obtenidos en la prueba de probabilidad exacta de Fisher aplicada para los cSNPs c.293A>G y c.1699G>A, podemos determinar que los dos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy – Weinberg ($p = 0,111$ y $p = 0,0545$ respectivamente); ello puede ser indicativo de que los polimorfismos no podrían estar relacionados con la enfermedad (Clayton, 2001), en este caso con la aparición de reacciones adversas.

Con el propósito de determinar los efectos funcionales y estructurales de las variantes A y K sobre la proteína, se realizó predicción *in silico* para cada una de ellas. Los estudios funcionales, utilizando 10 diferentes herramientas (Align GVD, PolyPhen-2, PANTHER 9.0, SNPs&GO, SIFT, nsSNPAnalyzer, SNPdryad, MutPred, PMut y PhD-SNP) y basados en criterios de selección de mutaciones con impacto en la estructura y función de la proteína (Martin y cols., 2002) y en estudios *In vitro* de la actividad de la BChE (Valentino y cols., 1981; Bartels y cols., 1992, McGuire y cols., 1989), establecieron para el SNPs p.Asp98Gly un carácter patogénico, mientras que para el SNPs p.Ala567Thr, mostraron un comportamiento neutro. La predicción de las estructuras secundarias mediante la utilización de los programas Predict Protein y PSIPRED v3.3, permitieron determinar la ausencia de cambios en los elementos conformacionales de la estructura secundaria de la BChE en comparación con las variantes atípica (A) y Kalow (K), con una conformación estructural rica en bucles y en menor proporción con β -láminas plegadas (Figura 8, 9 y 10).

Basados en el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede proponer la existencia de una relación entre polimorfismos o variantes genéticas que son responsables de una baja actividad catalítica y/o baja

concentración plasmática de la enzima BChE y el aumento de la susceptibilidad para la aparición de algunas de las reacciones adversas ocurridas en personas consumidoras de cocaína, como las acontecidas en el 55% de la muestra estudiada, dentro de las que sobresalen la sobredosis accidental y los episodios convulsivos secundarios presentados por los pacientes BCHE-4 y BCHE-9. Aunque dicha relación no ha sido completamente establecida, la disminución en la actividad enzimática de hasta un 30%, asociada al plegamiento incorrecto de la proteína en la variante atípica y la reducción en la concentración plasmática de hasta un 33%, asociada a inestabilidad y capacidad disminuida para la tetramerización en la variante Kalow, llevarían a alteraciones en el metabolismo normal de la cocaína, con incremento de las concentraciones de la sustancia a nivel de las áreas cerebrales relacionadas con el reforzamiento de conductas adictivas y la acumulación de los metabolitos secundarios Benzoil Ecgonina (BEG) y Ecgonina Metil Ester (EME) en el plasma, en el tejido adiposo y en el cerebro, pudiendo ser hasta 10 veces mayor en este último (Karch, 1991), potenciando el riesgo de dependencia, toxicidad y reacciones adversas como las evidenciadas en la Tabla 1, incluso con dosis bajas.

Fundamentados en el conocimiento de la etiología compleja de la adicción a la cocaína, es probable que, en condiciones ambientales no favorables, y considerando los factores genéticos como sustrato, ocurra una combinación de elementos que conduzca a la aparición de reacciones adversas en el individuo.

Hasta el momento, solo se ha realizado un reporte en la literatura donde se estudia la asociación entre variantes genéticas de la enzima BChE y dependencia a la cocaína. En este estudio realizado por Negráo y cols. (2013) se reportó una relación significativa entre la variante Kalow (K) [dbSNP: rs1803274] y el consumo preferencial de cocaína en forma fumada o crack ($p < 0,005$), la cual es más adictiva que la cocaína en polvo, lo que respaldaría nuestra hipótesis de riesgo de dependencia, toxicidad y reacciones adversas por baja concentración plasmática de la enzima. Las frecuencias alélicas reportadas en éste estudio para la variante Kalow fueron similares a las reportadas por nosotros (Tabla 12), y también similares a los valores reportados en las muestras europeas (AFD_AUE_PANEL y HapMap-CEU) (Tabla 18).

Aunque las variantes Atípica y Kalow han demostrado previamente asociación con otras condiciones médicas y del comportamiento, no se han encontrado estudios diferentes hasta la fecha que investiguen el papel de estas variantes en la aparición de reacciones adversas o dependencia al consumo de sustancias, al igual que su relación con otros trastornos psiquiátricos relacionados con sustancias (Negráo, 2013). Por la razón anteriormente enunciada y debido a que los sujetos consumidores de cocaína constituyen un grupo heterogéneo, no solo

desde el punto de vista genético, sino también desde el punto de vista clínico, recomendamos continuar con la realización de estudios de farmacogenética y farmacogenómica en muestras poblacionales mayores, en donde junto con los estudios de genes o genomas, se practiquen estudios funcionales, encaminados a correlacionar los polimorfismos evidenciados con la actividad enzimática, contribuyendo a la prevención de reacciones adversas y toxicidad en el paciente consumidor de cocaína.

BIBLIOGRAFÍA

Alcântara V, Cipriani T, Rea R, Suplicy H, Chautard-Freire-Maia E. Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). *Genet. Mol. Biol.* 1999; 22: 213. Suplemento.

Alcântara V. Fenótipo da butirilcolinesterase e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonais e pressão arterial em obesos e na população geral de Curitiba, PR. Curitiba, 2000; 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Amoedo M, Craver L, Marco M, Fernández E. Cocaine-induced acute renal failure without rhabdomyolysis. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1999; 14:2970-1

Ando M, Hirosaki S, Tamura K, Taya T. Multiple regression analysis of the cholinesterase activity with certain physiochemical factors. *Environ. Res.* 1984; 33 (1): 96-105.

Ángel G. Interpretación Clínica de Laboratorio. 5ta Edición. Bogotá: editorial médica panamericana, 1996.

Arpagaus M, Kott M, Vatsis K, Bartels C, La Du B; Lockridge O. Structure of the gene for human butyrylcholinesterase. Evidence for a single copy. *Biochemistry.* 1990; 29: 124-131.

Barta C, Sasvari-Szekely M, Devai A, Kovacs E, Staub M, Enyedi P. Analysis of mutations in the plasma cholinesterase gene of patients with a history of prolonged neuromuscular block during anesthesia. *Mol. Genet. Metab.* 2001; 74: 484-8.

Bartels C, Van Der Spek A, La Du B. Two polymorphisms in the noncoding regions of the BCHE gene. *Nucleic. Acids. Res.* 1990; 18: 61-71.

Bartels C, James K, La Du B. DNA mutations associated with the human butyrylcholinesterase J-variant. *Am. J. Hum. Genet.* 1992; 50: 1104-1114.

Bartels C, Jensen F, Lockridge O, Van Der Spek A, Rubinstein H, Lubrano T, La Du B. DNA mutation associated with the human butyrylcholinesterase K-variant and its linkage to the atypical variant mutation and other polymorphic sites. *Am. J. Hum. Genet.* 1992b; 50: 1086-1103.

Bergmann F, Wurzel M. The structure of the active surface of serum cholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1954; 13(2):251-9.

- Bergeman C, Plomin R, Pedersen N, McClearn G, Nesselroade J. Genetic and environmental influences on social support: The Swedish Adoption Twin Study of Aging (SATSA). *J. Gerontol.* 1990; 45: 101-106.
- Berke J, Hyman S. Addiction, dopamine and the molecular mechanisms of memory. *Neuron.* 2000; 25: 515-32.
- Boeck A, Fry D, Sastre A, Lockridge O. Naturally occurring mutation, Asp70His, in human butyrylcholinesterase. *Ann. Clin. Biochem.* 2002; 39:154–156.
- Bourne J, Collier H, Somers G. Succinylcholine (succinylcholine); Muscle relaxant of short action. *Lancet* 1. 1952; 1225-1229.
- Brass N, Racz A, Heckel D, Remberger K, Sybrecht G, Meese E. Amplification of the genes *BCHE* and *SLC2A2* in 40% of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer Research.* 1997; 57: 2290-2294.
- Brody T, Kenneth M, Lerner J. Human Pharmacology, molecular to clinical. Third edition. St Louis, Missouri E.U.: Mosby-year Book, inc., 1998. 101-140.
- Bryson K, McGuffin L, Marsden R, Ward J, Sodhi J, Jones D. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucl. Acids* 2005; Res. 33 (Web Server issue):W36-38. 2005.
- Caballero L, Alarcón A. Cocaína y cocaínomanía en atención primaria. Drogas y drogodependencia en atención primaria. Volumen II. Madrid: Fundación Ciencias de la Salud, 2000. 205-244.
- Camí J, Farré M. Drug addiction, mechanisms of disease. *N. Engl. J. Med.* 2003;349:975-86.
- Carmona-Fonseca J, Henao S, Garcés R. Valores de referencia de actividad colinesterásica sanguínea en población laboral activa no expuesta a plaguicidas inhibidores de colinesterasa. *Rev. Fac. Nal. Sal.Públ. (Medellín)* 2000; 18 (2): 55-72.
- Carmona G, Baum I, Schindler C, Goldberg S, Jufer R, Cone E, Slaughter E, Belendiuk G, Gorelick D. Plasma butyrylcholinesterase activity and cocaine half-life differ significantly in rhesus and squirrel monkeys. *Life. Sci.* 59: 939–943.
- Carmona G, Schindler C, Greig N, Holloway H, Jufer R, Cone E, Gorelick D. Intravenous butyrylcholinesterase administration and plasma and brain levels of cocaine and metabolites in rats. *European Journal of Pharmacology.* 1996; 517: 186 – 190.

- Carmona G, Schindler C, Shoaib M, Jufer R, Cone E, Goldberg S, Greig N, Yu Q, Gorelick D. Attenuation of cocaine-induced locomotor activity by butyrylcholinesterase. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 1998; 6: 274–279.
- Carmona G, Jufer R, Goldberg S, Gorelick D, Greig N, Yu Q, Cone E, Schindler C. Butyrylcholinesterase accelerates cocaine metabolism: in vitro and in vivo effects in nonhuman primates and humans. *Drug. Metab. Dispos.* 2000; 28: 367–371.
- Ceppa F, Gidenne S, Benois A, Fontan E, Burnat P. Rapid identification of atypical variant of plasma butyrylcholinesterase by PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002; 40:799-801.
- Chasman D, Adams R. Predicting the functional consequences of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms: structure-based assessment of amino acid variation. *J. Mol. Biol.* 2001; 307 (2): 683–706.
- Chattonet A, Lockridge O. Comparisons of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. *Biochem. J.* 1989;260: 625-634.
- Chautard-Freire-Maia E, Primo-Parmo S, Picheth G, Lourenco M, Vieira M. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Hum. Hered.* 1991;41: 330-339.
- Chou p, Fasman G. Conformational parameters for amino acids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins. *Biochemistry.* 1974; 13(2): 211–222.
- Clayton D. Population association. En: Balding DJ, Bishop M, Cannings C, editors. *Handbook of statistical genetics.* West Sussex: Wiley 2001.
- Córdoba D, Toledo D. Cocaína y base de cocaína. Basuco. En: *Toxicología.* Cuarta edición. Bogotá: editorial manual moderno, 2001. 445-449.
- Cook D, Stiller R, Weakly J, Chakrovorti S, Brandon B, Welch R. In vitro metabolism of mivacurium chloride (BW B1090U) and succinylcholine. *Anesth. Analg.* 1989; 68(4): 452-456.
- Cooper J, Blomm F. Roth. *The Biochemical basis of neuropharmacology.* New York, Oxford: Oxford Press, 1982.
- Coye M, Lowe J, May K. Biological monitoring of agricultural workers exposed to pesticides. *J. Occupational. Med.* 1986; 28 (8): 619-627 (part I); 628-638 (part II).
- Crook M, Haq M, Tutt P. Serum lipids, acute phase proteins and serum cholinesterase in normal subjects. *Scand. J. Lab. Invest.* 1994; 54: 601-603.

Creswell J. Educational research: Planning, conducting, and evaluating quantitative and qualitative research. Fourth edition. Upper Saddle River, NJ. Pearson/Merrill Education, 2008.

Cucco R, Yoo O, Cregler L, Chang J. Nonfatal pulmonary edema after "freebase" cocaine smoking. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136: 179-181.

Cucuianu M. Serum gamma-glutamyltransferase and/or serum cholinesterase as markers of the metabolic syndrome. *The. Med. Clin.* 1999; 22(8): 1381-1382.

Darvesh S, Hopkins D, Geula C. Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003; 4 (2): 131-138.

De Peyster A, Willis W, Liebhaber M. Cholinesterase activity in pregnant women and newborns. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1994; 32 (6): 683-696.

DellaPuppa T, Gallo C, Mencias E. Sustancias de abuso: Cocaína. *Manual de Toxicología Básica.* Madrid: ediciones Díaz de Santos, 2000. 487-404.

Déniz-Naranjo M, Muñoz-Fernández C, Alemany-Rodríguez M, Del Carmen Pérez-Vieitez M, Aladro-Benito Y, Irurita-Latasa J, Sánchez-García J. Butyrylcholinesterase, ApoE and Alzheimer's disease in a Population From the Canary Islands (Spain). *Neurosci. Lett.* 2007; 29 (1): 34-38, Suppl. 427.

Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza P. Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science.* 2004; 5686: 1014-1017.

Dey D, Kanno T, Sudo K, Maekawa M. Genetic analysis of 6 patients with no detectable butyrylcholinesterase activity – three novel silent genes and heterogeneities of mutations in BCHE gene in Japan. *Am. J. Hum. Genet.* 1997; 61: Suppl. 2307.

Dey D, Maekawa M, Sudo K, Kanno T. Butyrylcholinesterase genes in individuals with abnormal inhibition numbers and with trace activity: one common mutation and two novel silent genes. *Ann. Clin. Biochem.* 1998; 35: 302-310 (Part 2).

Di paolo N, Fineschi V, Di Paolo M, Wetly C, Garosi G, Del Vecchio M. Kidney vascular damage and cocaine. *Clin. Nephrol.* 1997; 47:298-303.

EQM Research Inc. Cholinesterase kit for the field determination of pesticide exposure. Instruction manual. Cincinnati (Ohio): EQM, 1994.

Escotado A. La antigüedad remota. Las drogas: De los orígenes a la prohibición. Madrid (España): Alianza editorial S.A., 1994. 5-11.

- Evans R, Wroe J. Plasma cholinesterase changes during pregnancy. Their interpretation as a cause of suxamethonium-induced apnea. *Anaesthesia*. 1980; 35 (7): 651-654.
- Evans R, Wardell J. On the identification and frequency of the J and K cholinesterase phenotypes in a Caucasian population. *J. Med. Genet.* 1984; 21: 99-102.
- Fadel-Picheth C. Variabilidade do loco BCHEda butirilcolinesterase e pesodo adulto em amostra de Curitiba. Curitiba, 1991. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- Farre M, Cami J. Pharmacokinetic considerations in abuse liability evaluation. *Br. J. Addict.* 1991;86:1601-1606.
- Forrester J, Steele A, Waldron J, Parsons P. Crack lung: an acute pulmonary syndrome with a spectrum of clinical and histopathologic findings. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1990; 142: 462-467.
- Gaffney D, Campbell R. A PCR method to determine the Kalow allele frequency and its significance in the normal population. *J. Med. Genet.* 1994;31: 248-250.
- Galbraith D. Human erythrocyte acetylcholinesterase in relation to cell age. *Biomedical. J.* 1981; 195: 221-228.
- García J, Muiño A, González C, Gilsanz C. Complicaciones pulmonares y cocaína. A propósito de un nuevo caso de neumomediastino. *An. Med. Interna.* 1994; 11:519.
- Garro K. Cocaína: actualización médico legal. *Medicina Legal de Costa Rica.* 2011; 28 (2): 57-62.
- Garry P. A manual and automated procedure for measuring serum cholinesterase activity and identifying enzyme variants. *Clin. Chem. Acta.* 1971; 17 (3): 192-198.
- Garry P, Deitz A, Lubrano T, Ford P, James K, Rubinstein H. New allele at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.* 1976; 13: 38-42.
- Gätke M, Ostergaard D, Bundgaard J, Varin F, Viby-Mogensen J. Response to mivacurium in a patient compound heterozygous for novel and a known silent mutation in the butyrylcholinesterase gene: genotyping by sequencing. *Anesthesiology.* 2001; 95: 600–606.

- Gerreiro J, Santos S, Black F. Frequencies of the atypical and C5 variants of serum cholinesterase in Wayana - Apalai Indians. *Rev. Bras. Genet.* 1985; 8 (1): 123-129.
- Giraldo C. Cocaína Base: aspectos patológicos. En: *Toxicología Córdoba*. Cuarta edición. Bogotá: editorial manual moderno, 2001.451-453.
- Gnatt A, Prody C, Zamir R, Lieman-Hurwitz J, Zakut H, Soreq H. Expression of alternatively terminated unusual humanbutyrylcholinesterase messenger-RNA transcripts, mapping to chromosome 3q26-ter, in nervous-system tumors, *Cancer Res.* 1990; 50: 1983–1987.
- Gorelick D. Enhancing cocaine metabolism with butyrylcholinesterase as a treatment strategy. *Drug Alcohol Depend.* 1997; 48:159–165.
- Goldman D, Oroszi G, Ducci F. The Genetics of addictions: Uncovering the genes. *FOCUS.* 2006;4:401-415.
- Goodall R. Association of clinical biochemists analytical investigations standing committee. Cholinesterase: phenotyping and genotyping. *Ann. Clin. Biochem.* 2004; 41: 98-110.
- Gottschalk C, Beauvais J, Hart R. Cognitive function and cerebral perfusion during cocaine abstinence. *Am. J. Psychiatr.* 2001; 158: 540-545.
- Greenberg C, Primo-Parmo S, Pantuck E, La Du B. Prolonged response to succinylcholine: a new variant of plasma cholinesterase that is identified as normal by traditional phenotyping methods. *Anest. Analg.* 1995; 81: 419–421.
- Hada T, Muratani K, Ohue T, Imanishi H, Moriwaki Y, Ito M, Amuro Y, Higashino K. A variant serum cholinesterase and a confirmed point mutation at Gly-365 to Arg found in a patient with liver cirrhosis. *Intern. Med.* 1992; 31: 357–362.
- Hart C, Jatlow P, Sevarino K. Comparison of intravenous cocaine and cocaine in humans. *Psychopharmacology.* 2000; 149: 153-62.
- Harris H, Hopkinson D, Robson E. Two dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal serum. *Nature.* 1962;196: 1296-1298.
- Harris H, Hopkinson D, Robson E, Whittaker M. Genetical studies on a new variant of serum cholinesterase detected by electrophoresis. *Ann. Hum. Genet.* 1963; 26: 359-382.
- Harris H. *The principles of human biochemical genetics.* Amsterdam: Elsevier, 1980.

Hayes W Jr. Pesticides studies in man. Baltimore (Maryland, USA): Williams and Wilkins, 1982.

Helmus T, Downey K, Arfken L, Henderson M, Schuster C. Novelty seeking as a predictor of treatment retention for heroin dependent cocaine users. *Drug Alcohol Depend.* 2001; 61:287-295.

Henao S, Corey G. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Serie Vigilancia 11. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Metepec (México): ECO, OPS, OMS, 1991.

Henning R, Wilson L. Cocaine is as cardiotoxic as cocaine but is less toxic than cocaine plus ethanol. *Life. Sci.* 1996; 59: 615-27.

Herzlich B, Arsur E, Pagala M, Grob D. Rhabdomyolysis related to cocaine abuse. *Ann. Intern. Med.* 1988; 109: 335-336.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra W, Caballero O, Hill D, Ratovitski E, Jen J, Sidransky D. *hMS1* is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000; 97 (10): 5462-5467.

Hidaka K, Iuchi I, Yamasaki T, Ohhara M, Shoda T, Primo-Parmo S, La Du B. Identification of two different genetic mutations associated with silent phenotypes for human serum cholinesterase in Japanese. *Jpn. J. Clin. Pathol.* 1992; 40: 535-540.

Hidaka K, Iuchi I, Tomita M, Watanabe Y, Minatogawa Y, Iwasaki K, Gotoh K, Shimizu C. Genetic analysis of a Japanese patient with butyrylcholinesterase deficiency. *Ann. Hum. Genet.* 1997; 61: 491-496.

Hidaka K, Iuchi I, Yamasaki T, Ueda N, Hukano K. Nonsense mutation in exon 2 of the butyrylcholinesterase gene: a case of familial cholinesterasemia. *Clin. Chim. Acta.* 1997; 261: 27-34.

Hidaka K, Watanabe Y, Tomita M, Ueda N, Higashi M, Minatogawa Y, Iuchi I. Gene analysis of genomic DNA from stored serum by polymerase chain reaction: identification of three missense mutations in patients with cholinesterasemia and ABO genotyping. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 303: 61-67.

Hoffman R, Henry G, Wax P, Weisman R, Howland M, Goldfrank L. Decreased plasma cholinesterase activity enhances cocaine toxicity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1992; 263: 698-702.

Hser Y, Shen H, Grella C, Anglin M. Lifetime Severity Index for cocaine use disorder (LSI-Cocaine): A predictor of treatment outcomes. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1999; 187 (12):742-750.

Hutchinson A, Widdowson E. Cholinesterase levels in the serum of healthy British children. *Nature.* 1952; 169:284-285.

Ibáñez A. Genética de las adicciones. *Adicciones.* 2008; 20 (2): 103-110.

Inaba T. Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. *Can. J. Physiol. Pharm.* 1989; 67: 1154–1157.

Iida S, Kinoshita M, Fujii H, Moriyama Y, Nakamura Y, Yura N, Moriwaki K. Mutations of human butyrylcholinesterase gene in a family with hypocholinesterasemia. *Hum. Mutat.* 1995; 6:349-351.

Izumi M, Maekawa M, Kanno T. Butyrylcholinesterase K-variant in Japan: frequency of allele and associated enzyme activity in serum. *Clin. Chem.* 1994; 40:1606-1607.

Jacobs D. *Laboratory Test Handbook.* 3ra Ed. EEUU: Lexi Comp. Inc, 1994.

Jacobsen T, Grayburn P, Snyder II R, Hansen J, Chavoshan B, Landau C. Effects of intranasal cocaine on sympathetic nerve discharge in humans. *J. Clin. Invest.* 1997; 99: 628-634.

Jaffe J. Drogadicción y abuso de drogas. En: *Las bases farmacológicas de la Terapéutica Goodman and Gilman.* Séptima edición. McGraw-Hill, 1996. 510-554.

Jensen F, Bartels C, La Du B. Structural basis of the butyrylcholinesterase H-variant segregating in two Danish families. *Pharmacogenetics.* 1992; 2: 234-240.

Jensen F, Nielsen L, Schwartz M. Detection of the plasma cholinesterase K variant by PCR using an amplification-created restriction site. *Hum. Hered.* 1996; 46: 26-31.

Jung V, Kindich R, Kamradt J, Jung M, Müller M, Schulz W, Engers R, Unteregger G, Stöckle M, Zimmermann R, Wullich B. Genomic and expression analysis of the 3q25-q26 amplification unit reveals *TLOC1/SEC62* as a probable target gene in prostate cancer. *Molecular Cancer Research.* 2006; 4 (3): 169-176.

Kaloyanova F. Toxicity of selected groups of pesticides: organophosphates. World Health Organization, Regional Office for Europe. *Toxicology of pesticides.* Copenhagen, Denmark: WHO, 1982: 133-144. *Health Aspects of Chemical Safety; Interim Document N° 9.*

Kalow W, Genest K. A method for the detection of atypical forms of human cholinesterase: determination of dibucaine numbers. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1957; 35: 339-346.

Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can. J. Med. Sci.* 1957; 35 (12):1305–1320.

Kalow W. *Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs.* Philadelphia: W. B. Saunders, 1962. p. 69-93; 192-194.

Kambam J, Naukam R, Berman M. Inhibition of pseudocholinesterase activity protects from cocaine-induced cardiorespiratory toxicity in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 119: 553– 556.

Kambam J, Mets B, Hickman R, Janicki P, James M, Kirsch R. The effects of inhibition of plasma cholinesterase activity on systemic toxicity and blood catecholamine levels from cocaine infusion in pigs. *J. Lab. Clin. Med.* 1993; 122: 188–196.

Kamendulis, L, Brzezinski M, Pindel E, Bosron W, Dean R. Metabolism of cocaine and heroin is catalyzed by the same human liver carboxylesterases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996; 279:713–717.

Kaniaris P, Fassoulaki A, Liarmakopoulou K, Dermitzakis E. Serum cholinesterase in patients with cancer. *Anesth. Analg.* 1979; 58: 82-84.

Kaufman M, Levin J, Maas L. Cocaine-induced cerebral vasoconstriction differs as a function of sex and menstrual cycle phase. *Biol. Psychiatr.* 2001; 49: 774-781.

Kavanagh D, McGrath J, Saunders J, Dore G, Clark D. Substance misuse in patients with schizophrenia: epidemiology and management. *Drugs* 2002; 62:743-55.

Kelz M, Chen J, Carlezon W Jr, Whisler K, Gilden L, Beckmann A, Steffen C, Zhang Y, Marotti L, Self D, Tkatch T, Baranaukas G, Surmeier D, Neve RL, Duman R, Picciotto MR, Nestler E. Expression of the transcription factor delta FosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature.* 1999; 401: 272-276.

Kendler K, Eaves J. Models for the joint effect of genotype and environment on liability to psychiatric illness. *Am. J. Psychiatry.* 1986; 143: 279-289.

Kendler K. Social Support: A Genetic-Epidemiologic Analysis. *Am J Psychiatry* 1997; 154/10: 1398-1404.

- Kessler R, Kendler K, Heath A, Neale M, Eaves L. Social support, depressed mood and adjustment to stress: A genetic epidemiologic investigation. *J. Pers. Soc. Psychol.* 1992; 62: 257-272.
- Klaassen C, Amdur M, Dull J, Casarett and Doull's. *Toxicology the Basic Science of Poisons*. Fifth edition. International Edition, McGraw-Hill. 1994. 487-527.
- Kleerup E, Koyal S, Marques-Magallanes J, Goldman M, Taskhin D. Chronic and acute effects of "crack" cocaine on diffusing capacity, membrane diffusion and pulmonary capillary blood volume in the lung. *Chest.* 2002; 122: 629-638.
- Koetzner L, Woods J. Characterization of butyrylcholinesterase antagonism of cocaine-induced hyperactivity. *Drug. Metab. Dispos.* 2002; 30: 716– 723.
- Kosten T. Pharmacotherapeutic interventions for cocaine abuse. Matching patients to treatments. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1989; 177: 379-389.
- Krause A, Lane A, Jenkins T. A new high activity plasma cholinesterase variant. *J. Med. Genet.* 1988; 25: 677-681.
- Krejci E, Thomine S, Boschetti N, Legacy C, Sketelj J, Massoulié J. The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biological.* 1997; 272: 22840-22847.
- Kutty K. Review: Biological function of cholinesterase. *Clin. Biochem.* 1980; 13: 239-243.
- La Du B, Bagels C, Nogueira C, Hajra A, Lightstone H, Van Der Speck A, Lockridge O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* 1990; 23: 423-431.
- La Du B, Bartels C, Nogueira C, Arpagaus M, Lockridge O. Proposed nomenclature for human butyrylcholinesterase genetic variants identified by DNA sequencing. *Cell. Mol. Neurol.* 1991; 11: 79-89.
- La Du B. The hereditary deficiencies of serum cholinesterase: an update for anesthesiologist. *ASA Newsletter.* 1996; 60(8): 18-22.
- Ladrón de Guevara J, Moya P. *Psicoestimulantes*. Toxicología médica, clínica y laboral. Primera edición. Madrid (España): McGraw-Hill- Interamericana, 1995. 605-615.
- Lapidot-Lifson Y, Prody C, Ginzberg D, Meytes D, Zakut H, Soreq H. Coamplification of human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes in blood cells: correlation with various leukemias and abnormal

megakaryocytopoiesis. National Academy of Sciences of the United States of America, Washington. 1989; 86 (12): 4715-4719.

Layer P, Weikert T, Willbold E. Chicken retinospheroids as developmental and pharmacological in vitro models: acetylcholinesterase is regulated by its own and by butyrylcholinesterase activity. *Cell. Tissue. Res.* 1992;268 : 409-418.

Lejus C, Blanloeil Y, Burnat P, Souron R. Les colinestérases. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 1998; 17: 1122-1135.

Lee C. Goodbye suxamethonium! *Anaesthesia.* 2009; 64 (suppl1):73-81.

Lehman, H. The familial incidence of low pseudocholinesterase level. *Lancet*. 1956; 124.

Leri F, Bruneau J, Stewart J. Understanding polydrug use: review of heroin and cocaine co-use. *Addiction.* 2003; 98:7-22.

Levano S, Ginz H, Siegemund M, Miodrag F, Voronkov E, Urwyler A, Girard T. Genotyping the butyrylcholinesterase in patients with prolonged neuromuscular block after succinylcholine. *Anesthesiology.* 2005; 102: 531–535.

Liu W, Cheng J, Iwasaki A, Imanishi H, Hada T. Novel mutation and multiple mutations found in the human butyrylcholinesterase gene. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 326: 193–199.

Lizasoain I, Moro M, Lorenzo P. Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones.* 2001; 13: 37-46 (supl. 2).

Lockridge O, Mottershaw-Jackson N, Eckerson H, La Du B. Hydrolysis of diacetylmorphine (heroin) by human serum cholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1980; 215(1):1–8.

Lockridge O, Adkins S, La Du B. Location of disulfide bonds within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 1987; 262(27): 12945–12952.

Lockridge O, Bartels C, Vaughan T, Wong C, Norton S, Johnson L. Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* 1987a; 262: 549-557.

Lockridge O. Genetic variants of human serum cholinesterase influence metabolism of the muscle relaxant succinylcholine. *Pharmacol. Ther.* 1990;47(1): 35–60.

- Lu W, Hada T, Fukui K, Imanishi H, Matsuoka N, Iwasaki A, Higashino K. Familial hypocholinesterasemia found in a family and a new confirmed mutation. *Intern. Med.* 1997; 36: 9–13.
- Lukas S, Sholar M, Lundahl L. Sex differences in plasma cocaine levels and subjective effects after acute cocaine administration in human volunteers. *Psychopharmacology.* 1996; 125: 346-354.
- Lynch T, Mattes C, Singh A, Bradley R, Brady R, Dretchen K. Cocaine detoxification by human plasma butyrylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 145: 363– 371.
- Matsubara K, Kagawa M, Fukui Y. In vivo and in vitro studies on cocaine metabolism: ecgonine methyl ester as a major metabolite of cocaine. *Forensic. Sci. Int.* 1984; 26: 169– 180.
- Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Kotani K, Dey D, Ishikawa J, Izumi M, Etoh K. Genetic basis of the silent phenotype of serum butyrylcholinesterase in three compound heterozygotes. *Clin. Chim. Acta.* 1995; 235:41-57.
- Maekawa M, Sudo K, Kanno T, Kotani K, Dey D, Ishikawa J, Izume M. Genetic mutations of butyrylcholinesterase identified from phenotypic abnormalities in Japan. *Clin. Chem.* 1997; 43:924–929.
- Magura S, Kang SY, Rosenblum A. Gender differences in psychiatric comorbidity among cocaine-using opiate addicts. *J. Addict. Dis.* 1998; 17: 49-61.
- Maldonado R, Valverde O, Berrendero F. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends. Neurosci.* 2006; 29: 225-232.
- Manoharan I, Wieseler S, Layer P, Lockridge O, Boopathy R. Naturally occurring mutation Leu307Pro of human butyrylcholinesterase in the Vysya community of India. *Pharmacogenet. Genomics.* 2006; 7: 461-468.
- Martin A, Facciano A, Cuff A, Hernandez-Boussard T, Olivier M, Hainaut P, Thornton J. Integrating mutation data and structural analysis of the TP53 tumor-suppressor protein. *Hum. Mutat.* 2002; 19(2):149-64.
- Masson, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989; 988: 258-266.
- Masson E, Chatonnet A, Lockridge O. Evidence for a single butyrylcholinesterase gene in individuals carrying the C5 cholinesterase variant. *FEBS. Lett.* 1990; 262(1): 115-118.

Masson P, Xie W, Froment M, Lockridge O. Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1544: 166-176.

Massoulié J, Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Annual Review of Neurosciences.* 1982; 5: 57-106.

Mattes C, Lynch T, Singh A, Bradley R, Kellaris P, Brady R, Dretchen K. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997; 145: 372-380.

Matthew J, Collins A. Interactions of cocaine and cocaine congeners with sodium channels. *Biochem. pharmacol.* 1983; 32:455-460.

McCance-Katz F, Carroll K, Rounsaville B. Gender differences in treatment seeking cocaine abusers-implications for treatment and prognosis. *Am. J. Addict.* 1999; 8:300-311.

McGuire M, Nogueira C, Bartels C, Lightstone H, Hajra A, Van der Spek A, Lockridge O, La Du B. Identification of the structural mutation responsible for the dibucaine-resistant (atypical) variant form of human serum cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; 86:953-957.

McQueen M. Clinical, Analytical Considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clin. Chim. Acta.* 1995; 237:91-105.

McTiernan, C, Adkins, S, Chatonnet, A, Vaughn, T, Bartels, C, Kott, M, Rosenberry, T, La Du, B, Lockridge, O. Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington.* 1987; 84: 6682-6686.

Mikami L. Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com atividade da butirilcolinesterase. Curitiba, 2005. 180f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Mikami L, Wieseler S, Souza R, Schopfer L, Nachon F. Five new naturally occurring mutations of the *BCHE* gene and frequencies of 12 butyrylcholinesterase alleles in a Brazilian population. *Pharmacogenet. Genomics.* 2008; 18: 213-218.

Mesulam M, Guillozet A, Shaw P, Levey A, Duysen E, Lockridge O. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience.* 2002; 110: 627-639.

Morton F. Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1988; 18 (5); 345-452.

Murray R, Albin R, Mergner W, Criner G. Diffuse alveolar hemorrhage temporally related to cocaine smoking. *Chest.* 1988; 93: 427-429.

Nachon F, Nicolet Y, Viguie N, Masson P, Fontecilla-Camps J, Lockridge O. Engineering of a monomeric and low glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystalization. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269: 630-637.

Negráo A, Pereira A, Guindalini C, Santos H, Messas G, Laranjeira R, vallada H. Butyrylcholinesterase genetic variants: association with cocaine dependence and related phenotypes. *PLoS ONE.* 2013; 8(11): e80505. doi:10.1371/journal.pone.0080505

Nestler E. Genes and addiction. *Nature Genetics.* 2000; 26: 277-281.

Nestler E. Historical review: molecular and cellular mechanism of opiate and cocaine addiction. *Trends. Pharmacol. Sci.* 2004; 25: 208-210.

Nogueira C, McGuire M, Graeser C, Bartels C, Arpagaus M, Van der Spek A, Lightstone H, Lockridge O, La Du B. Identification of a frameshift mutation responsible for the silent phenotype of human serum cholinesterase, GLY 117(GGT→GGAG). *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 40: 934–940.

Nogueira C, Bartels C, McGuire M, Adkins S, Lubrano T, Rubinstein H, Lightstone H, Van der Spek A, Lockridge O, La Du B. Identification of two different point mutations associated with the fluoride-resistant phenotype for human butyrylcholinesterase, *Am. J. Hum. Genet.* 1992;51:821–828.

On-Kei Chan A, Lam C, Tong S, Man Tung C, Yung K, Chan Y, Au K, Yuen Y, Hung, C, Ng K, Shek C. Novel mutations in the *BCHE* gene in patients with no butyrylcholinesterase activity. *Clin. Chim. Acta.* 2005; 351: 155-159.

Palomino A. Adicción a la cocaína: estudio genómico de moduladores de la transmisión glutamérgica. Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2008. ISBN: 978-84-692-0108-4.

Parnas L, Procter M, Schwarz M, Mao R, Grenache D. Concordance of butyrylcholinesterase phenotype with genotype. *Am. J. Clin. Pathol.* 2011; 135:271-276.

Pérez Gómez A. La cocaína en la historia y la cultura. Cocaína surgimiento y evolución de un mito. Bogotá: Editorial Presencia, 1987.

- Phillips, B.J., Hunter, J.M. (1992). Use of mivacurium chloride by constant infusion in the anephric patient. *Br. J. Anaesth.* 1992; 68: 492-498.
- Podoly E, Hanin G, Soreq H. Alanine-to-threonine substitutions and amyloid diseases: Butyrylcholinesterase as a case study. *Chemico Biological Interactions.* 2010; 187: 64–71.
- Poet T, McQueen C, Halpert J. Participation of cytochromes P4502B and P4503A in cocaine toxicity in rat hepatocytes. *Drug Metab. Dispos.* 1996; 24:74–80.
- Primo-Parmo S, Chautard-Freire-Maia E. Absence of linkage between the serum cholinesterase (CHE1) and rhesus (RH) loci. *Hum. Genet.* 1982; 60 (3): 284-286.
- Primo-Parmo S, Bartels C, Wiersema B, Van der Spek A, Innis J, La Du B. Characterization of 12 silent alleles of the human butyrylcholinesterase (BCHE) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 1996; 58: 52–64.
- Primo-Parmo S, Lightstone H, La Du B. Characterization of an unstable variant (BChE115D) of human butyrylcholinesterase. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 27–34.
- Randall T. Cocaine, alcohol mix in body to form even longer lasting, more lethal drugs. *JAMA.* 1992; 267: 1043-1044.
- Reuter W, Geus P. Behavior of cholinesterase activity in lipid metabolism disorders. *Z. Gesamte. Inn. Med.* 1987; 42(13):371.
- Robertson G. Serum protein and cholinesterase changes in association with contraceptive pills. *Lancet* 1. 1967; 232-325.
- Robson N, Robertson I, Whittaker M. Plasma cholinesterase changes during the puerperium. *Anaesthesia.* 1986; 41 (3): 243-249.
- Rosalki S. Genetic influences on diagnostic enzymes in plasma. *Enzyme.* 1988; 39 (2): 95-109.
- Rubinstein H, Dietz A, Lubrano T. E₁^(k), another quantitative variant at cholinesterase locus 1. *J. Med. Genet.* 1978; 15: 27-29.
- Ruprecht B, Schurmann M, Ziegenhagen M, vom Bauer E, Meir D, Schlaak M. Corrected normal values for serum ACE by genotyping the deletion/insertion-polymorphism of the ACE gene. *Pneumologie.* 2001; 55:326-332.
- Sakamoto N, Hidaka K, Fujisawa T, Maeda M, Iuchi I. Identification of a point mutation associated with a silent phenotype of human serum butyrylcholinesterase, a case of a familial cholinesterasemia. *Clin. Chim. Acta.* 1998; 274: 159–166.

Sánchez C. La seudocolinesterasa como indicador de la función de síntesis hepatocelular comparado con la clasificación de Child-Pugh en pacientes con enfermedad hepática avanzada. Rev. Colombiana de Gastroenterología. 1998; 14(1): 1-4.

Schmidt E, Schmidt E. Enzyme diagnosis of liverdiseases. Clin. Biochem. 1993; 26: 241-25.

Shafferman A, Kronman C, Flashner Y, Leitner M, Gorsfed H, Ordentlich A, Gozes Y, Cohen S, Ariel N, Barak D, Hare M, Silman I, Sussman J, Velan B. Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues involved in catalytic activity and in polypeptide folding. J. Bio. Chem. 1992; 267: 17640-17644.

Shibuta K, Abe M, Suzuki T. A new detection method for the K variant of butyrylcholinesterase based on PCR primer introduced restriction analysis (PCR-PIRA). J. Med. Genet. 1994; 31: 576-579.

Shields K, Lewis J. The identification of butyrylcholinesterase (BCHE) polymorphisms in a small Australian Defense Force cohort. Department of Defense, Defense Science and Technology Organization, Australian Government, 2011.

Solano M, Velilla J, Álvarez M. Intoxicación aguda por cocaína. A propósito de un caso. AN.MED.INTERNA. 2006; 23 (1): 31-33.

Sonnerwith A, Leonard J. Métodos y Diagnósticos de Laboratorio Clínico. 8va Ed. Buenos Aires: editorial médica panamericana, 1983.

Souza R. Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana ($C_{4/5}$) verificada em eletroforese. Curitiba, 1995. 74f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Souza R, Castro R, Pereira I, Freund A, Culp L, Chautard-Freire-Maia E. Frequencies of the butyrylcholinesterase K mutation in the Brazilian population of European and African origin. Hum. Biol. Detroit. 1998; 70: 965-970.

Souza R. Variação fenotípica e genotípica da butirilcolinesterase humana e sua relação com altura e índice de massa corporal. Curitiba, 2001. 146f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Souza R, Mikami L, Maegawa R, Chautard-Freire-Maia E. Four new mutations in the *BCHE* gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. Molecular Genetics and Metabolism. 2005; 84: 349–353.

Spanagel R, Weiss F. The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends. Neurosci.* 1999;22:521-527.

Stolerman I. Drugs of abuse: behavioral principles, methods and terms. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1992;13:170-176.

Sudo K, Maekawa M, Kanno T, Akizuki S, Magara T. Three different point mutations in the butyrylcholinesterase gene of three Japanese subjects with a silent phenotype: possible Japanese type alleles. *Clin. Biochem.* 1996; 29: 165–169.

Sudo K, Maekawa M, Akizuki S, Magara T, Ogasawara H, Tanaka T. Human butyrylcholinesterase L330I mutation belongs to a fluoride-resistant gene, by expression in human fetal kidney cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 240:372–375.

Sugimori T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C5 isozyme. *Can. Anaesth. Soc. J.* 1986; 33(3): 321-327.

Sun H, Shen M, Pang Y, Lockridge O, Brimijoin S. Cocaine metabolism accelerated by a re-engineered human butyrylcholinesterase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002; 302: 710–716.

Takagi H, Narahara A, Takayama H, Shimoda R, Nagamine T, Mori M. A new point mutation in cholinesterase: relationship between multiple mutation sites and enzyme activity. *Int. Hepatol. Commun.* 1997; 6: 288–293.

Tood D. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 17th Ed. England: W. B Saunders Company, 1992.

Trundle D, Marcial G. Detection of cholinesterase inhibition. The significance of cholinesterase measurements. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1988; 18: 345-352.

USDHHS (U.S. Department of Health and Human Services). Drug abuse warning network, 1992. Washington: US Government Printing Office, 1993.

Umeki, S. Biochemical abnormalities of the serum in anorexia nervosa. *J. Nervous. Mental. Dis.* 1993; 176: 503-506.

Valentino R, Lockridge O, Eckerson H, La Du B. Prediction of drug sensitivity in individuals with atypical serum cholinesterase based on in vitro biochemical studies. *Biochem. Pharmacol.* 1981;30(12):1643-1649.

Vallina E, Suárez R, García A, Arribas J. Síndrome de rabdomiolisis e hipertermia secundario al consumo de cocaína y/o éxtasis. Comunicación de dos nuevos casos y revisión del problema. *An. Med. Interna.* 2002; 19 (2): 85-88.

Van Etten M, Anthony J. Comparative epidemiology of initial drug opportunities and transitions to first use: Marijuana, cocaine, hallucinogens and heroin. *Drug Alcohol Depend.* 1999; 54: 117-125.

Van Thiel D, Perper J. Hepatotoxicity associated with cocaine abuse. *Recent developments in alcoholism.* New York: Plenum Press, 1992. 335-341.

Venkataram B, Iyer G, Narayanan R, Joseph T. Erythrocyte and plasma cholinesterase activity in normal pregnancy. *Indian. J. Physiol. Pharmacol.* 1990; 34 (1): 26-28.

Vidal C. Expression of cholinesterases in brain and non-brain tumors. *Chemico-Biological Interactions.* 2005; 15 (157-158): 227-232.

Welch R, Todd K, Krause G. Incidence of cocaine-associated rhabdomyolysis. *Ann. Emerg. Med.* 1991; 20: 154-157.

Wescow W, Hunt C, Riker W, Litt I. Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. *Am. J. Physiol.* 1947; 149: 549-551.

Whittaker M. Cholinesterase. New York: Karger, 1986. 1-126.

Whittaker M, Britten J. E₁^H, a new allele at cholinesterase locus 1. *Hum. Hered.* 1987; 37: 54-58.

Whittaker M, Crawford J, Lewis M. Some observations of levels of plasma cholinesterase activity within an obstetric population. *Anaesthesia.* 1988; 43 (1): 42-45.

Whittaker M, Britten J. Recognition of two new phenotypes segregating the E1(k) allele for plasma cholinesterase. *Hum. Hered.* 1988; 38: 233-239.

Weiss R, Griffin M, Hufford C. Early prediction of initiation of abstinence from cocaine: use of a craving questionnaire. *Am. J. Addict.* 1997; 6: 224-231.

World Health Organization (WHO). Against drugs, Adopted resolution of the World Health Organization. Ginebra, 1997.

World drug report 2013. United Nations, Office on Drug and crime. New York, 2013.

Yen T, Nightingale B, Burns J, Sullivan D, Stewart P. Butyrylcholinesterase (BCHE) genotyping for post-succinylcholine apnea in an Australian population. *Clin. Chem.* 2003; 49:1297–1308.

Yoshida A, Motulsky A. A pseudocholinesterase variant (E Cynthiana) associated with elevated plasma enzyme activity. *Am. J. Hum. Genet.* 1969; 21: 486-498.

Zakut H, Ehrlich G, Ayalón A, Prody C, Malinger G, Seidman S, Ginzberg D, Kehlenbach R, Soreq H. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation.* 1990; 86 (3): 900–908.

ANEXOS

Anexo 1 – Instrumento de evaluación y medida en la adicción a cocaína

Lifetime Severity Index for Cocaine Use Disorder (LSI-C)

(Hser y cols., 1999)

1. ¿Cuántas veces a lo largo de su vida ha consumido cocaína en cualquiera de sus preparaciones como polvo, crack, base libre o pasta de coca?

- No he consumido nunca
- 1 ó 2 veces
- De 3 a 4 veces
- De 6 a 10 veces
- De 11 a 49 veces
- De 50 a 99 veces
- De 100 a 199 veces
- 200 veces o más

2. En promedio, ¿con qué frecuencia ha consumido cocaína durante los 12 meses anteriores a la entrada en este programa?

- No he consumido en todo el tiempo
- Menos de una vez al mes
- De 1 a 3 veces al mes
- De 1 a 2 veces a la semana
- De 3 a 4 veces a la semana
- De 5 a 6 veces a la semana
- Diariamente o casi cada día
- De 2 a 3 veces al día
- 4 veces o más al día

3. Piense en la época en la que consumía más cocaína (el máximo). ¿Con qué frecuencia la consumía?

- Menos de una vez al mes
- De 1 a 3 veces al mes
- De 1 a 2 veces a la semana
- De 3 a 4 veces a la semana
- De 5 a 6 veces a la semana
- Diariamente o casi cada día
- De 2 a 3 veces al día
- 4 veces o más al día

4. ¿Cuántos años tenía cuando empezó a consumir cocaína con regularidad (al menos una vez a la semana)?

Edad _____

5. Desde que empezó a consumir cocaína con regularidad (al menos 1 vez a la semana), ¿cuántas veces ha dejado de consumir cocaína durante 30 días o más?

_____ Veces

6. Desde que empezó a consumir cocaína con regularidad, ¿Cuál es el mayor tiempo que pasó sin consumir cocaína?

_____ Años _____ Meses _____ Semanas

7. Durante este tiempo, ¿estaba en un programa de tratamiento, en la cárcel o en una correccional de menores; o la dejó solo?

En un programa de tratamiento

En la cárcel o en un correccional de menores

Lo dejé yo solo por mi cuenta

Otros (especificar) _____

8. ¿Cuándo fue la última vez que consumió cocaína con regularidad?

Durante el mes anterior a mi entrada en este programa

Durante los últimos 12 meses

¿Cuántos meses hace? _____ Meses

Hace más de 1 año

¿Cuántos años tenía? Edad _____

9. ¿Cuándo fue la última vez que consumió cocaína en cualquiera de sus preparaciones?

Durante el mes anterior a mi entrada en este programa

Durante los últimos 12 meses

¿Cuántos meses hace? _____ Meses

Hace más de un año

¿Cuántos años tenía? Edad _____

10. ¿Con qué frecuencia la consumía en esa época?

Menos de una vez al mes

De 1 a 3 veces al mes

- De 1 a 2 veces a la semana
- De 3 a 4 veces a la semana
- De 5 a 6 veces a la semana
- Diariamente o casi cada día
- De 2 a 3 veces al día
- 4 veces o más al día

11. ¿Ha consumido con frecuencia cocaína en cantidades mayores de las que inicialmente pretendía?

Sí No

12. ¿Ha consumido cocaína durante un período más largo del que pretendía?

Sí No

13. ¿A menudo ha empezado a consumir cocaína y le ha sido difícil parar?

Sí No

14. ¿Ha querido o intentado alguna vez parar o reducir el consumo de cocaína, pero se ha encontrado que no puede?

Sí No

15. ¿Ha sentido alguna vez tantas ganas o necesidad de consumir cocaína que no ha podido resistirla?

Sí No

16. ¿Ha necesitado alguna vez cocaína tan intensamente que no puede pensar en nada más?

Sí No

17. ¿Alguna vez ha empezado a necesitar mucha más cocaína de la habitual para conseguir el mismo efecto?

Sí No

18. ¿Ha observado alguna vez que la misma cantidad de cocaína le producía un efecto menor que anteriormente?

Sí No

19. ¿Ha estado con frecuencia bajo los efectos de la cocaína o sintiendo sus secuelas en una situación que aumentaba sus posibilidades de resultar lesionado como conducir un vehículo o una embarcación, utilizar cuchillos, maquinaria o pistolas, cruzar las calles habiendo mucho tráfico o hacer montañismo o nadar?

Sí No

20. ¿Ha tenido alguna vez problemas físicos como sobredosis accidental, tos persistente, ataque epiléptico, infección, hepatitis, abscesos, un corte, esguinces, alguna otra herida o el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) como consecuencia de tomar cocaína?

Sí No

21. ¿La cocaína le ha causado alguna vez problemas importantes con su familia o amigos, en el trabajo, en la escuela o con la policía?

Sí No

22. ¿Ha tenido alguna vez algún problema emocional o psicológico por tomar cocaína, como sentir que las cosas no le importaban, sentirse deprimido, suspicaz de la gente, paranoide o tener ideas extrañas?

Sí No

23. ¿Ha estado con frecuencia bajo los efectos de la cocaína o sufriendo sus secuelas en el trabajo, en la escuela o mientras cuidaba niños?

Sí No

24. ¿Su consumo de cocaína se ha vuelto alguna vez tan regular que cada día tiene que tomar la misma cantidad a la misma hora, independientemente de lo que estuviera haciendo o de donde estuviera?

Sí No

25. ¿Parar o reducir el consumo de cocaína le pone enfermo o le causa problemas de abstinencia, como ser incapaz de dormir, sentirse ansioso o deprimido, sudar, sentirse enfermo o sentir que su corazón late con rapidez?

Sí No

26. ¿Ha habido algún momento en el que haya empleado mucho tiempo consumiendo cocaína, en actividades relacionadas con su obtención o en recuperarse de sus efectos?

Sí No

27. ¿Ha tenido alguna vez un período de un mes o más en el que la mayoría de los días, haya empleado mucho tiempo haciendo algo para asegurarse que tenía cocaína? Por ejemplo, ¿ha tenido alguna vez un período de un mes o más en el que, la mayoría de los días, haya empleado mucho tiempo escondiendo cocaína, robando dinero o pidiéndolo para comprar cocaína?

Sí No

28. ¿Ha abandonado o reducido de forma significativa actividades importantes con el fin de conseguir o consumir cocaína, como deportes, trabajo o pasar un rato con amigos o familiares?

Sí No

Anexo 2 – Frecuencias alélicas calculadas mediante la utilización del programa *Population Genetic Analysis (PopGen)* para el gen *BCHE*

POPULATION GENETIC ANALYSIS

Date:19114/6/3
Time:18:52:42

Data Description: BCHE Diploid Test Data

Single-Population Descriptive Statistics

population ID: 1
population name: none

* Population : 1 @ Locus : BCHE *

Genotypes	Obs. (O)	Exp. (E)	(O-E) ² /E	2*O*Ln(O/E)
(A, A)	8	6.4762	0.3585	3.3809
(B, A)	1	3.2381	1.5469	-2.3500
(B, B)	1	0.2857	1.7857	2.5055
(C, A)	0	0.8095	0.8095	0.0000
(C, B)	1	0.1905	3.4405	3.3165
(C, C)	0	0.0000	0.0000	0.0000

Chi-square test for Hardy-Weinberg equilibrium:

Chi-square: 7.941176
Degreeoffreedom: 3
Probability: 0.047243

Likelihood ratio test for Hardy-Weinberg equilibrium:

G-square: 6.852957
Degreeoffreedom: 3
Probability: 0.076735

~~~~~

Allele Frequency of population 1:

```
=====
Allele\Locus          BCHE
=====
Allele A              0.7727
Allele B              0.1818
Allele C              0.0455
=====
```

Summary Statistics of population 1:

\*\*\*\*\*

Summary of Genic Variation Statistics for All Loci  
[See Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p.176-187)]

\*\*\*\*\*

```
=====
Locus      Sample Size      na*
=====
BCHE              22      3.0000

Mean              22      3.0000
St. Dev          0.0000
=====
```

\*na= Observed number of alleles

\*\*\*\*\*

Summary of Heterozygosity Statistics for All Loci\*\*

\*\*\*\*\*

```
=====
Locus Sample Size  ObsHom  ObsHet  ExpHom*  ExpHet*  Nei**  Ave Het
=====
BCHE      22  0.8182  0.1818  0.6147  0.3853  0.3678  0.3678
Mean      22  0.8182  0.1818  0.6147  0.3853  0.3678  0.3678
St. Dev           0.0000  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000  0.0000
=====
```

\*Expected homozygosity and heterozygosity were computed using Levene(1949)

\*\*Nei's(1973)expected heterozygosity