

ATIVIDADE COLINESTERÁSICA NO PLASMA E EM ERITRÓCITOS DE PORTADORES DE MEGACOLO CHAGÁSICO

Valdemar Hial, Juarez Pimentel de Ulhõa, Vander Figueiredo Reis, Roseli A S Gomes
Adriana C Perez

A atividade colinesterásica foi medida no plasma e em eritrócitos de 32 indivíduos. Em 16 pacientes, seguramente portadores de megacolo chagásico, os níveis de colinesterase no plasma (1.540 ± 318 UI/L) e nos eritrócitos ($53,2 \pm 9,1$ UI/g Hb) estavam significativamente diminuídos, quando comparados com os níveis enzimáticos no plasma (2.554 ± 826 UI/L) e nos eritrócitos ($63,6 \pm 11$ UI/g Hb) do grupo controle ($n=16$). Os resultados mostram um paralelismo entre a atividade colinesterásica sistêmica e os achados histopatológicos.

(Palavras-chaves: Acetilcolinesterase, Pseudocolinesterase, Megacolo, Doença de Chagas)

A acetilcolina é hidrolisada por duas enzimas distintas: acetilcolinesterase (E.C.3.1.1.7) ou colinesterase "verdadeira", encontrada principalmente nos neurônios, nas junções neuromusculares e em eritrócitos, e pseudocolinesterase ou butirilcolinesterase (E.C.3.1.1.8), amplamente distribuída em diversos tecidos, incluindo o plasma sangüíneo e as células de Schwann. Elas são facilmente distinguíveis bioquimicamente pois, enquanto a pseudocolinesterase é inibida por sulfato de quinidina, a acetilcolinesterase não apresenta o mesmo comportamento frente àquele inibidor⁵.

Está bem estabelecido que no homem e em animais de laboratório, o *Trypanosoma cruzi* causa lesões no sistema nervoso autônomo com consecutiva redução numérica dos neurônios, especialmente no coração, esôfago e colo^{8 9 11 12 14}. O fato é tão proeminente que Koberle^{8 9} acredita que os megas de origem chagásica são devidos à desnervação parassimpá-

tica. A maioria dos investigadores brasileiros parece estar de acordo com Koberle e admite que no megaesôfago e megacolo as lesões do plexo de Auerbach constituem a principal alteração anatômica responsável pela modificação da motilidade do órgão e, mais precisamente, dos reflexos peristálticos extrínsecos e intrínsecos.

Tarufi & Maria¹³ estudando o componente vesicular do plexo de Auerbach no esôfago, admitem que os distúrbios da peristalse observados nos megas são devidos, pelo menos em parte, a distúrbios na biossíntese e liberação de aminas farmacologicamente ativa nas vesículas granulares. Ehrenpreis e Pernov³ encontraram alterações quantitativas de substância P no megacolo congênito (doença de Hirschprung). Observaram baixas concentrações desse peptídeo no segmento aganglionar e altas concentrações na porção ganglionar. Hial e cols.⁶ realizaram uma análise quantitativa de

Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq no Departamento de Bioquímica e Biofísica e no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro.

Endereço para correspondência: Prof. Valdemar Hial, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 38.100 Uberaba MG, Brasil

Recebido para publicação em 18/09/82

substância P no megaesôfago chagásico. Nos megas e nos esôfagos controles os valores de substância P variam de caso para caso e o teste t aplicado às médias, não mostrou diferenças estatisticamente significativas entre mega e controle normal.

Certamente, não poderíamos ignorar o possível papel que devem desempenhar outros bem conhecidos e estabelecidos mediadores químicos, tais como, acetilcolina, catecolaminas, histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas na doença de Chagas. Em diferentes tipos de inflamações, alguns desses mediadores desempenham funções mais proeminentes, devido à relativa sensibilidade dos tecidos nos quais eles são produzidos. Este é um aspecto interessante a ser analisado nos megas e na doença de Chagas como um todo. Qual ou quais daqueles mediadores seriam mais importantes para explicar as alterações locais e sistêmicas encontradas nos chagásicos? Não podemos ainda deixar de referir ao papel que desempenhariam certas enzimas ou sistemas enzimáticos envolvidos no metabolismo daqueles mediadores químicos, como por exemplo, acetilcolinesterase, monoamino-oxidase, histidina descarboxilase, calicreínas e prostaglandina sintetase.

A determinação da atividade colinesterásica no plasma e em eritrócitos de portadores de megacolo chagásico e o seu envolvimento na fisiopatogênese desta moléstia, constituiu-se no objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O grupo controle constou de 16 indivíduos considerados clinicamente normais e com reações de Machado-Guerreiro e imunofluorescência para *T. cruzi* negativas. O grupo chagásico constou de 16 indivíduos, com reações de Machado-Guerreiro e imunofluorescência para *T. cruzi* positivas e, portadores de megacolo, diagnosticado através de exames clínico e radiológico; teve-se o cuidado de eliminar indivíduos possuidores de outras entidades patológicas.

O sangue era colhido de indivíduos em jejum de 12 h em frasco contendo heparina. A seguir dosava-se a hemoglobina e o sangue total era centrifugado a 3.000 rpm durante 10 minutos, separando-se o plasma e as hemácias que eram lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio a 0,85%.

Dosagem da colinesterase

A determinação da atividade colinesterásica

baseou-se no método de Ellman e cols⁴. Os reagentes, com exceção do sulfato de quinidina, foram de procedência Boehringer Mannheim GMBH Diagnostica (Cat. nº 15984). A absorbância foi medida com espectrofotômetro Bausch-Lomb, modelo Spectronic 88.

Método para dosagem de colinesterase em eritrócitos

Em 3 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, contendo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico 0,25 mM, adicionava-se 10 µl de sulfato de quinidina 0,1% e 5 µl de concentrado de hemácias previamente lavadas com solução de cloreto de sódio a 0,85%. Após agitar cuidadosamente, adicionava-se 20 µl de substrato de acetiltiocolina 5 mM, misturava-se com espátula de plástico e media-se a absorbância em 412 nm, a 25°C, em intervalos de 1 minuto. Realizava-se 4 leituras em 4 intervalos consecutivos.

A atividade da enzima foi calculada de acordo com a equação:

$a = \Delta A \times 4,46 \times 10^3$ Umoles/(min. gHb), onde ΔA = variação da absorbância e Hb = hemoglobina. Os resultados foram expressos em UI/g Hb.

Método para dosagem da colinesterase no plasma

Em 3 ml de tampão fosfato 50 mM, pH 7,2, contendo ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico 0,25 mM, adicionava-se 20 µl de plasma. A seguir, adicionava-se 100 µl do substrato de acetiltiocolina 5 mM, misturava-se com espátula e media-se a absorbância em 412 nm, a 25°C, em intervalos de 1 minuto. Realizava-se leituras em 4 intervalos consecutivos.

A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação:

$a = \Delta A \times 11,47 \times 10^3$ umoles/(min. L), onde ΔA = variação da absorbância. Os resultados foram expressos em UI/L.

RESULTADOS

A atividade colinesterásica no plasma e em eritrócitos de indivíduos controle (n = 16) e de chagásicos portadores de megacolo (n = 16) encontra-se na Tabela 1. No paciente J.L.O. não nos foi possível determinar a atividade enzimática nos eritrócitos.

No plasma, a média e o desvio padrão, para o grupo controle e para o grupo de megacolo, foram respectivamente, $2,254 \pm 823$ UI/L e 1.540 ± 318 UI/L ($p < 0,001$). Nos eritrócitos, a

média e o desvio padrão, para o grupo controle e para o grupo portador de megacolo, foram respectivamente, $63,6 \pm 11,0$ UI/g Hb e $53,2 \pm 9,1$ UI/g Hb ($p < 0,005$). As diferenças entre as médias dos grupos controle e chagásico, tanto

no plasma, como em eritrócitos, foram significativas, embora exista sobreposição de valores para ambos os grupos. Esta sobreposição é, entretanto, menor no plasma do que em eritrócitos.

Tabela 1 — Atividade colinesterática no plasma e em eritrócitos de indivíduos controles normais e de indivíduos portadores de megacolo chagásico.

Grupo Controle			Grupo com Megacolo		
Protocolo	Plasma	Eritrócito	Protocolo	Plasma	Eritrócito
	UI/L (*)	UI/g Hb (**)		UI/L	UI/g Hb
W.P.G.P	3.728	57,2	E.P.S	1.927	49,2
J.J.S.	2.179	77,2	A.J.S	1.675	52,5
D.A.J.	1.778	83,4	F.C.	1.136	51,3
G.A.V.	2.065	69,7	G.M.O.	1.709	54,4
J.R.F.	2.248	79,6	A.C.	1.169	49,8
B.A.D.	4.530	66,9	L.R.S.	1.583	55,0
S.J.N.	1.835	56,9	B.S.S.	1.743	45,8
N.G.P.	2.409	67,2	A.D.	1.720	41,8
O.C.N.	2.936	62,7	F.M.B.	1.720	38,2
G.P.O.	2.065	52,1	A.G.C.	1.353	45,8
G.I.	2.466	51,1	E.A.A.	1.526	67,6
N.S.D.	1.755	50,5	J.L.O.	1.606	---
J.A.S.	2.902	57,6	G.M.R.	1.376	60,5
J.M.D.	1.548	69,6	A.P.O.	918	59,1
J.A.N.	2.868	46,5	J.D.P.	2.179	55,3
M.J.F.	3.556	69,4	H.J.S.	1.308	72,4
\bar{x}	2.554	63,6	\bar{x}	1.540	53,2
s	826	11,0	s	318	9,1

(*) UI/L = unidade internacional por litro

(**) UI/g Hb = unidade internacional por grama de hemoglobina

DISCUSSÃO

Boston e cols.² encontraram aumento significativo da atividade colinesterásica tanto no soro como em eritrócitos de pacientes com doença de Hirschsprung, quando comparada a de controles normais. Segundo estes autores, a colinesterase presente localmente no segmento afetado do intestino seria a fonte dos elevados níveis sanguíneos observados na doença de Hirschsprung. Por outro lado, admitem haver uma queda relativa da completa hidrólise catalítica de acetilcolina na porção aganglionar do intestino e, assim sendo, a elevada atividade colinesterásica no soro e nos eritrócitos representaria um

mecanismo compensador para sua degradação sistêmica. De fato, elevados níveis de colinesterase no segmento aganglionar foram reportados por outros pesquisadores^{1 10}.

Alterações quantitativas de acetilcolina foram também detectadas por Ikawa e cols.⁷ em portadores de megacolo congênito. Estes autores encontraram níveis elevados do mediador no segmento aganglionar, quando comparados com os níveis do colo ganglionar. Este é um aspecto interessante com relação ao comportamento de medidores químicos pois, na doença de Hirschsprung os níveis de substância P estão diminuindo na porção aganglionar quando comparados com o segmento ganglionar e, a acetilcolina comporta-se de modo inverso.

Os nossos estudos mostram uma diminuição significativa da atividade colínerásica, tanto no plasma (pseudocolínerase) como em eritrócitos (acetilcolínerase) de portadores de megacolo chagásico, comparados com controles normais.

Tafuri¹⁵, através de microscopia eletrônica, verificou que tanto os neurônios como as células de Schwann estavam comprometidos no megacolo de origem chagásica. Os nossos dados mostram um paralelismo entre as alterações histológicas e a atividade colínerásica pois, tanto a acetilcolínerase de origem neuronal, como a pseudocolínerase originária das células de Schwann, estão diminuídas.

A hipótese que Boston e cols.² levantaram para explicar o aumento sistêmico da atividade colínerásica, não nos convence totalmente. Acreditamos que o aumento da atividade pseudocolínerásica seja, em parte, devido à hiper-

plasia das células de Schwann que ocorre no segmento aganglionar do megacolo congênito. Quanto ao aumento da atividade acetilcolínerásica nos eritrócitos, cabe-nos detalhar um pouco mais. É sabido que a acetilcolínerase localiza-se na superfície externa da membrana da hemácia⁵. É provável, portanto, que sua fonte também sejam os neurônios e que a membrana da hemácia possua receptores para essa enzima. Isto é admissível, uma vez que lipídios contendo colina localizam-se na camada mais externa da membrana do eritrócito¹⁷.

Os nossos estudos, comparados aos de Boston e cols.², permitem estabelecer, a nível molecular (atividade colínerásica), diferenças entre megacolo chagásico e megacolo congênito, a exemplo do que já havíamos demonstrado para a substância P^{6, 16}.

SUMMARY

Cholinesterase activity was measured in the plasma and erythrocytes from 32 individuals. The 16 patients, in whom the diagnosis of Chagasic megacolon confirmed, had a significantly lower concentration of the enzyme both in plasma (1.540 ± 318 YI/L) and erythrocytes (53.2 ± 9.1 UI/g Hb) when compared with the 16 controls in whom, the plasma and erythrocyte cholinesterase levels were, respectively, 2.554 ± 823 and 63.6 ± 11 UI/g Hb. The results show a correlation between the systemic cholinesterase activity and the histopathological findings.

(Key-words: Acetylcholinesterase, Pseudocholinesterase, Megacolon, Chagas' Disease)

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Boston VE, Dale G, Riley KWA. Diagnosis of Hirschsprung's disease by quantitative biochemical assay of acetylcholinesterase in rectal tissue. *Lancet* 2:951-953, 1975
2. Boston VE, Cywes S, Davies MRQ. Serum and erythrocyte acetylcholinesterase activity in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery* 13:407-410, 1978
3. Ehrenpreis T, Pernow B. On the occurrence of substance P in the rectosigmoid in Hirschsprung's disease. *Acta Physiologica Scandinavica* 27:380-388, 1952
4. Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95, 1961
5. Hers F, Kaplan E. A Review: Human erythrocyte acetylcholinesterase. *Pediatric Research* 7:204-214, 1973
6. Hial V, Diniz CR, Pittella JEH, Tafuri WL. Quantitative study of P substance in the megasophagus and megacolon of human *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 76:175-179, 1973

7. Ikawa H, Yokoyama J, Morikawa Y, Hayashi A, Katsumata K. A quantitative study of acetylcholine in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery* 15:48-52, 1980
8. Köberle F. Die Chagaskrankheit: eine Erkrankung der Neurovegetativen Peripherie. *Wiener Klinische Wochenschrift* 68:333-339, 1956
9. Köberle F. Die Chagaskrankheit. Ihre Pathogenese und ihre Bedeutung als Volksseuche. *Zeitschrift Für Tropenmedizin und Parasitologie* 10:236-266, 1959
10. Meier-Ruge W, Lutterbeck PM, Herzog B, Morger R, Moser R, Schärli A. Acetylcholinesterase activity in suction biopsies of the rectum in the diagnosis of Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery* 7:11-17, 1972
11. Tafuri WL. Microscopia eletrônica do miocárdio na fase aguda da tripanossomíase cruzi experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 11:151-164, 1969
12. Tafuri WL. Microscopia eletrônica do colo do camundongo na fase aguda da tripanossomíase cruzi experimental. *Revista da Associação Médica de Minas Gerais* 20:209-220, 1969
13. Tafuri WL, Maria TA. Sobre o comportamento do componente vesicular neurosecretor no megacôlono da tripanossomíase cruzi humana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 12:298-309, 1970
14. Tafuri WL, Maria TA, Lopes ER. Lesões do plexo mientérico do esôfago, do jejuno e do colo de chagásicos crônicos. Estudos ao microscópio eletrônico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 13:76-91, 1971
15. Tafuri WL. Alterações ultra-estruturais dos componentes muscular, intersticial e nervoso do coração e intestinos, na doença de Chagas experimental e humana. Tese para Professor Titular, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1974
16. Tafuri WL, Maria TA, Pittella JEH, Bogliolo L, Hial V, Diniz CR. An electron microscopy study of the Auerbach's plexus and determination of substance P of the colon in Hirschsprung's disease. *Virchows Archives. (A) Pathology, Anatomy and Histology* 362:41-50, 1974
17. White A, Handler P, Smith EL, Hill RL, Lehman LR. Principles of biochemistry. McGraw-Hill, Kogakusha Tokyo, p 992, 1978