

# AVALIAÇÃO DAS ESTERASES SANGUÍNEAS NA DOENÇA DE ALZHEIMER

C. SALDANHA, T. QUINTÃO, C. GARCIA

Int. de Bioquímica, FML, Serviço de Neurologia, Hosp. Stª Maria. Lisboa.

## RESUMO

O presente trabalho pretendeu analisar a relação entre a actividade da acetilcolinesterase (AChE) eritrocitária e a fluidez da respectiva membrana globular traduzida pela polarização de fluorescência da sonda 1,6 - difenil 1,3,5 - hexatrieno; DPH. Para os efeitos, em amostras de sangue de 34 doentes (18 F e 16 M) diagnosticados com a doença de Alzheimer foram determinadas a concentração de hemoglobina, o hematócrito, as actividades colinesterásicas das enzimas plasmática (butirilcolinesterase, BuChE) e eritrocitária (AChE), e a polarização de fluorescência da sonda DPH após inserção na membrana eritrocitária. Os resultados destes parâmetros bioquímicos foram comparados com os obtidos em amostras de sangue de 34 indivíduos voluntários aparentemente saudáveis (com a mesma variação etária 53-82 anos) e não apresentaram diferenças significativas. Não foi observada correlação entre os valores de actividade da AChE e da polarização de fluorescência, nem no grupo controlo nem no grupo de doentes com Alzheimer. Verificou-se correlação negativa ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,001$ ) muito significativa entre a concentração média de hemoglobina globular (razão entre os valores de hemoglobina e hematócrito; CMHG) e a actividade da acetilcolinesterase eritrocitária, no grupo de doentes com Alzheimer. Esta correlação sugere que qualquer variação da viscosidade interna globular (ou de CMHG) possa afectar indirectamente a actividade enzimática da AChE e por consequência contribuir para (i) a falta de interrelação da actividade da enzima com a fluidez lipídica da membrana, e (ii) a ausência de diferença significativa dos valores da AChE entre os dois grupos (controlo e doentes diagnosticados com doença de Alzheimer). Com os resultados obtidos no presente trabalho anulam-se as hipóteses de considerar a actividade enzimática da AChE e/ou a sua interrelação com a fluidez lipídica como possíveis marcadores biológicos da doença de Alzheimer.

## SUMMARY

### Evaluation of blood esterases in Alzheimer's Disease.

The aim of this work was to evaluate a possible correlation between erythrocyte acetylcholinesterase activity (AChE) and membrane fluidity expressed by fluorescence polarization of - 1,6 - diphenil 1,3,5 - hexatriene (DPH). Blood samples of 34 Alzheimer's patients (18 F and 16 M) were obtained and haemoglobin concentration, haematocrit, plasma (butyrylcholinesterase, BuChE) and erythrocyte (AChE) esterase activities and fluorescence polarization after introduction of DPH in erythrocyte membrane have been determined. Results were compared with values obtained from blood samples of 34 apparently healthy volunteers with the same age variation (53-82 years). There was no correlation between AChE activity and fluorescence polarization in the control group nor in the patients' group. There was a significant negative correlation ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,001$ ) between mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHG) and erythrocyte acetylcholinesterase activity in Alzheimer's patients. This correlation suggests that any variation of internal globular viscosity (or MCHG) may indirectly affect AChE enzymatic activity and consequently contribute to the loss of interrelation between AChE activity and membrane lipid fluidity, verified in the present work. A biological marker for Alzheimer's disease diagnosis remains to be discovered.

## INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é uma forma de demência de causa desconhecida, que afecta as pessoas com mais de 50 anos e constitui um dos malefícios da prolongada longevidade.

A investigação orientada para a obtenção de um marcador biológico que facilite o diagnóstico da D.A. tem contribuído para a realização de estudos de avaliação de actividade enzimática da acetilcolinesterase presente no líquido cefalo-raquidiano e sangue.

A acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7 AChE) é uma das enzimas intervenientes no metabolismo da acetilcolina responsável pela hidrólise daquele neurotransmissor.

Foram identificadas várias formas moleculares (solúvel associada à membrana, assimétrica e não extractiva) estando a tetramérica (associada à membrana) diminuída nos neurónios colinérgicos<sup>1</sup> ou no plasma<sup>2</sup> de doentes com aquela doença neurodegenerativa. A forma solúvel não varia quantitativamente na doença de Alzheimer em relação ao normal, talvez porque se encontra nos neurónios internos do cortex cerebral<sup>1</sup>. O polifor-

mismo<sup>3</sup> descrito para a AChE eritrocitária e para a butirilcolinesterase (EC 3.1.1.8, BuChE, esterase sintetizada no fígado e secretada para o plasma<sup>4</sup>) poderá estar na origem da controvérsia gerada a partir dos valores obtidos para as actividades enzimáticas sanguíneas dos indivíduos com a doença de Alzheimer<sup>5,7</sup>.

Tem sido sugerido que a actividade enzimática da AChE eritrocitária está dependente da fluidez lipídica associada ao ordenamento da zona hidrofóbica dos fosfolípidos da membrana<sup>8,9</sup>. Neste trabalho pretende-se avaliar a fluidez lipídica da membrana de glóbulos intactos de indivíduos com a doença de Alzheimer e verificar a possível relação com a actividade enzimática da acetilcolinesterase.

## MATERIAL E MÉTODOS

**População** - Amostras de sangue foram obtidas, após prévio consentimento, de 34 doentes (18 F e 16 M) diagnosticados com a doença de Alzheimer<sup>10</sup> e de um número igual de indivíduos voluntários aparentemente saudáveis com a mesma variação

etária (53-82 anos) e distribuição por sexo. Os doentes apresentavam síndrome demencial progressiva confirmada por exame neuropsicológico; a história, o exame clínico e os exames complementares (TAC cranioencefálico e análises de sangue e urina) não revelaram patologia que pudesse estar na sua origem.

**Parâmetros bioquímicos** – Nas alíquotas de sangue heparinizado (15 UI/ml) determinou-se (i) a concentração de hemoglobina (Hb com um Hemoxímetro, OSM Radiometer), (ii) o valor de hematócrito (Ht) por micro-método com centrifugação a 12,000 durante 5 min. numa centrífuga ALC 4223, (iii) a actividade enzimática da butirilcolinesterase plasmática (BuChE) e da acetilcolinesterase eritrocitária (AChE), segundo o princípio do método de Ellman<sup>11</sup>, e (iv) a fluidez lipídica pela polarização de fluorescência *p* de suspensões de glóbulos intactos (tampão fosfato 155 mM pH 7,4) adaptando a metodologia de Schiliro<sup>12</sup>. As intensidades de luz polarizada emitidas ( $\lambda_{em} = 465$  nm) paralela e perpendicularmente à luz polarizada incidente ( $\lambda_{exc} = 352$  nm) foram determinadas nas suspensões globulares marcadas com DPH 20  $\mu$ M (sonda que se insere preferencialmente na zona hidrofóbica dos fosfolípidos de membrana) e os seus valores subtraídos dos obtidos na ausência da sonda (assegurando deste modo a participação de qualquer elemento fluorescente presente na amostra).

Valores elevados de *p* significam menor capacidade de rotação da sonda (1,6 – difenil 1,3,5 – hexatrieno; DPH) na membrana e, em consequência, maior ordenamento lipídico nesta, isto é, menor fluidez lipídica na zona hidrofóbica dos fosfolípidos de membrana.

Os valores de concentração média de hemoglobina globular (CMHG) são, obtidos do quociente entre os valores da concentração de hemoglobina e do hematócrito. Uma unidade da actividade colinesterásica corresponde a uma micromole de tiocolina formada por minuto nas condições experimentais (5 minutos de incubação a 25° C).

**Análise estatística** – Para a interpretação estatística dos resultados foram utilizados o coeficiente de correlação de Pearson e a análise de regressão linear.

Considera-se que um resultado é significativo quando  $p < 0,05$  (two-tailed).

## RESULTADOS

Os valores de Hb, Ht, CMHG, AChE, BuChE e polarização de fluorescência, avaliados nas amostras de sangue obtidas de doentes com Alzheimer e de indivíduos aparentemente saudáveis, estão apresentados no Quadro 1.

A comparação dos valores dos parâmetros bioquímicos entre o grupo de doentes com Alzheimer e o grupo de controlo não revelou diferença significativa.

O único parâmetro, que nas amostras de sangue dos doentes com Alzheimer, apresentou tendência para valores mais elevados do que nas amostras dos controlos, foi a AChE. No entanto, não foi observada correlação entre os valores de actividade enzimática da esterase eritrocitária (AChE) e o grau de ordem dos fosfolípidos da membrana dos glóbulos intactos, nem no grupo controlo nem no grupo de doentes com Alzheimer.

Considerando o grupo de doentes com Alzheimer verificou-se correlação negativa significativa ( $r = -0,82$ ,  $p < 0,001$ ) entre a concentração média de hemoglobina globular e a actividade da AChE (Fig. 1).

## DISCUSSÃO

A ausência de diferença significativa entre os valores das actividades enzimáticas da acetilcolinesterase eritrocitária e da butirilcolinesterase plasmática obtidos no grupo com doença de Alzheimer relativamente ao grupo controlo está de acordo com os trabalhos de Markesbery e al.<sup>5</sup>, Atack e al.<sup>6</sup> e Garcia e al.<sup>13</sup>. Todavia, estes resultados contrastam com os referidos por outros grupos<sup>7,14</sup>.

QUADRO 1 – Valores (média  $\pm$  desvio padrão) dos parâmetros bioquímicos determinados em amostras de sangue de indivíduos com doença de Alzheimer (n=34) e de um número igual de indivíduos voluntários aparentemente saudáveis (grupo controlo).

| Parâmetros bioquímicos                            | Grupo de doentes com Alzheimer (n=34) | Grupo controlo (n=34) |
|---|---------------------------------------|-----------------------|
| Hemoglobina (g/dL)                                | 13,6 $\pm$ 1,4                        | 14,2 $\pm$ 2,0        |
| Hematócrito (Ht)                                  | 41,6 $\pm$ 3,2                        | 40,0 $\pm$ 5,0        |
| Concentração média de hemoglobina globular (g/dL) | 32,0 $\pm$ 3,1                        | 33,0 $\pm$ 2,0        |
| Acetilcolinesterase (UI/mgHb)                     | 296,6 $\pm$ 44,9                      | 321 $\pm$ 48          |
| Butirilcolinesterase (UI/L)                       | 1736 $\pm$ 490                        | 1779 $\pm$ 934        |
| Polarização de fluorescência (s.d)                | 0,286 $\pm$ 0,044                     | 0,297 $\pm$ 0,039     |

A discrepância de valores para a actividade de AChE que existe quer em amostras de líquido céfalo-raquidiano<sup>15,16,17</sup> quer de glóbulos vermelhos<sup>5,7,13,14</sup> exclui a AChE como possível marcador da doença de Alzheimer.

Os valores do grau de ordem da zona hidrofóbica (dado pela polarização de fluorescência) dos fosfolípidos da membrana eritrocitária dos doentes não diferiram dos obtidos do grupo de controlo, nem se correlacionaram com os valores da actividade de AChE. A falta de correlação não permite que se considere o par AChE – polarização de fluorescência como indicador da doença de Alzheimer.

No presente trabalho, a um aumento da actividade enzimática da AChE de glóbulos de doentes associa-se menor concentração média de hemoglobina globular (Fig. 1)

$$y = 43,77 + -0,04x \quad r = -0,82$$

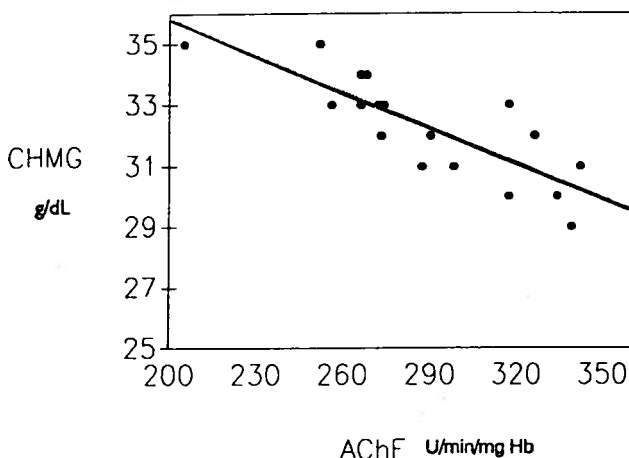


Fig 1 – Correlação negativa entre os valores da concentração média de hemoglobina globular (CMHG) e da actividade da acetilcolinesterase eritrocitária AChE ( $r = -0,82$ ;  $p < 0,001$ ), obtidos em amostras heparinizadas de sangue de indivíduos com doença de Alzheimer.

Esta correlação negativa ( $r = -0,82$   $p < 0,001$ ) sugere que o aumento da viscosidade intraeritrocitária induz a criação de forças que, ao contrariarem as forças electrostáticas de expansão do citoesqueleto<sup>18</sup>, se repercutam à superfície globular, contri-

buindo para menor actividade enzimática da AChE e para a alteração da possível correlação desta com a fluidez da membrana (indicada pela polarização de fluorescência).

A densidade eritrocitária (CMHG) pode comportar-se com um parâmetro fisiopatológico, associado à expressão fenotípica de várias hemoglobinopatias<sup>19,20</sup>, apresentando valores diferentes com o sexo e a raça<sup>21</sup>.

A interdependência dos valores de CMHG com a concentração iónica (Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>) intraglobular consoante o sexo e a raça<sup>21</sup> poderá indicar um estado de desequilíbrio iónico eventualmente presente na doença de Alzheimer, que influenciaria a actividade da AChE. Sabe-se que o comportamento cinético da AChE na forma pura é modificado na presença de concentrações várias de cátions monovalentes<sup>22</sup>. Assim, não é de excluir que este efeito também se verifique relativamente à actividade da AChE na doença de Alzheimer. Poder-se-á sugerir que a correlação negativa entre valores da CMHG e a actividade da AChE eritrocitária na doença de Alzheimer resulte (i) da influência da concentração de iões extracelulares na actividade enzimática e/ou (ii) da reacção das forças intracelulares de interacção hemoglobina/proteínas de membrana com repercussões à superfície da membrana globular.

Da análise dos resultados do presente trabalho conclui-se que (i) nem a actividade da AChE nem a relação AChE/fluidez lipídica possam ser considerados como marcadores biológicos da doença de Alzheimer, e que (ii) a correlação negativa estabelecida entre CMHG e AChE venha a constituir um índice da evolução da doença de Alzheimer.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o precioso apoio dactilográfico às Sr<sup>as</sup> D. Emília Alves e Sr<sup>a</sup> D. Ana Cristina de Sá e a colaboração técnica da Sr<sup>a</sup> D. Teresa Santos

#### BIBLIOGRAFIA

1. YOUNKIN, S.G.; GOODRIDGE, B.; KATZ, J.; LOCKETT, G.; NAFZIGER, D.; USIAK, M.F.; YOUNKIN, L.H. Molecular Forms of Acetylcholinesterase in Alzheimer Disease. *Fed. Proc.* 1986; 45:2982-2988.
2. YAMAMOTO, Y.; NAKANO, S.; KAWASHIMA, S.; NAKAMURA, S.; URAKAMI, K.; KATO, T.; MASAKUNI, K. Plasma and Serum G4 Isoenzyme of Acetylcholinesterase in Patients with Alzheimer-type Dementia and Vascular Dementia. *Ann. Clin. Biochem.* 1990; 27: 321-326.
3. CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. - Comparison of Butyrylcholinesterase and Acetylcholinesterase. *Biochem J.* 1989; 260: 625-634.
4. RAO, V.R.; GNAMAMUTHU, C.; BALASUBRAMANIAN, A.S. - Human Cerebrospinal Fluid Acetylcholinesterase. Evidence for Identity Between the Serum and Cerebrospinal Fluid Butyrylcholinesterase. *Clin. Chim. Acta* 1989; 183: 135-146.
5. MARKESBERY, W.R.; LEUNG, P.K.; BUTTERFIELD, D.A. Spin

Label and Biochemical Studies of Erythrocyte Membranes in Alzheimer's Disease. *J. Neurol. Sci.* 1980; 45: 323-330.

6. ATTACK, J.R.; PERRY, R.H.; WILSON, I.D.; BOBER, M.J.; BLESSED, G.; TOMLINSON, B.E. Blood Acetyl and Butyrylcholinesterase in Senile Dementia of Alzheimer Type. *J. Neural Sci.* 1985; 70: 1-12.
7. CHIPPERFIELD B.; NEWMAN P.M.; MOYES I.C.A. Decreased Erythrocyte Cholinesterase Activity in Dementia. *Lancet* 1981; 2: 199.
8. DOMENECH C.; DOMENECK E.E.M.; FARIAS R.N. - Pesticide Action and Membrane Fluidity Allosteric Behavior of Rat Erythrocyte Membrane-Bound Acetylcholinesterase in the Presence of Organophosphorus Compounds. *FEBS Lett* 1977; 74: 243-246.
9. FRENKEL, E.Y.; ROELOFSEN, B.; BRODBECK, V.; VAN DEENEN, L.M.; OTT, P.; Lipid Protein Interactions in Human Erythrocyte-Membrane Acetylcholinesterase Modulation of Enzyme Activity by Lipids. *Eur. J. Biochem.* 1980; 109: 377-382.
10. MCKHANN G.; DRACHMAN D.; FOLSTEIN M.; KATZMAN R.; PRICE D.; STODLAN E.M. - Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group Under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-944.
11. ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE R.M. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochem. Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
12. SCHILIRO G.; AVITABILE M.; LIVOLTI, S.; BARCELLONE, M.L.; SPISNI, A.; GEREMIA, T.; MASOTTI, L.; VARRELA, A.; MOLLICE, F. Fluorescence Studies on Erythrocyte Membrane From Normal and Thalassemic Subjects. *IRCS Med. Science* 1981; 9: 549.
13. GARCIA, C.; CUNHA-MONTEIRO, A.L.; BEAUMONT, H.; CARDOSOL; MOREIRA, C.; SALDANHA, C.; MARTINSE SILVA, J. - Haemorheological Factors in Brain Failure. *Rev. Port. Hemorheol.* 1 (Supp. 1)1987; 85-91.
14. SMITH, R.C.; HO, B.T. HSU, L.; RI.; VROULIS, G.; CLANGHORN J.; SCHOOLAR J. - Cholinesterase Enzymes in The Blood of Patients with Alzheimer's Disease. *Life. Sci* 1982;30: 543-546.
15. DAVIES P. Neurotransmitter-related Enzymes in Senile Dementia of the Alzheimer Type. *Brain Research* 1979, 171: 319-327.
16. SOININEN, H.; HALONEM, T.; RIEKKINEN Acetylcholinesterase Activities in Cerebrospinal Fluid of Patients With Senile Dementia of Alzheimer Type. *Acta Neurol. Scand* 1981; 64: 217-224.
17. GARCIA C.; MAGALHÃES A.; COELHO M.H. SALDANHA PROENÇA C. Proteínas, Metabólitos das Aminas Cerebrais e Acetilcolinaesterase no Líquido Cefalo-raquidiano de Doentes com Doença de Alzheimer. Primeira Reunião Conjunta da Sociedade Espanhola de Neurologia e da Sociedade Portuguesa de Neurologia. Sintra. 1984.
18. SCHMID-SCHONBEIN H.; HEIDTMANN H.; GREBE R. Spectrin. Red Cell Shape and Deformability Membrane Curvature in Genetic Spectrin Deficiency. *Blut* 1986, 52: 131-147.
19. HOFRICHTER J.; ROSS P.D.; EATON W.A. Kinetics and Mechanisms of Deoxyhemoglobin S. Gelation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1974; 71:4864 4872.
20. FABRY M.E.; KAUL D.K.; RAVENTOS-SUAREZ C., CHANG H.: NAGEL R.L. Cells Have an Abnormally High Intracellular Hemoglobin Concentration: Pathophysiological Consequences. *J. Clin. Invest.* 1982; 70: 1315-1319.
21. BLUMENFELD N.; FABRY M.E.; THYSEN B.; NAGEL R.L. Red Cell Density is Sex and Race Dependence in the Adult. *J. Lab. Clin. Med.* 1988; 112: 333-338.
22. SALDANHA C. Acetilcolinaesterase - Contribuição para o Estudo da Enzima Eritrocitária do Homem. Tese de Doutoramento. Lisboa 1985.