

ACETILCOLINA HIDROLASA (EC 3.1.1.7) Y BUTIRILCOLINA
HIDROLASA (EC 3.1.1.8) EN *MONIEZIA EXPANSA* (CESTODE)
Y *FASCIOLA HEPATICA* (TREMATODE)

LÓPEZ LÓPEZ, M. C.; HERMOSO, R.; MONTEOLIVA, M.

Sección de Fisiología y Bioquímica
Instituto «López-Neyra» de Parasitología, C. S. I. C.
Granada

(Recibido el 1-9-1980)

SUMMARY

It has been determined the cholinesterase activity in *Moniezia expansa* and *Fasciola hepatica* by the pH-Stat technique, a highly sensible, precise and reproducible quantitative method.

We must point out the presence of specific cholinesterase (acetylcholine hydrolase EC 3.1.1.7) in both parasites, high levels of enzymatic activity in *Moniezia* being observed against the acetylcholine substrate (1,685 μm of hydrolized substrate/minute/g of sample), being somewhat smaller (0,750 μm of hydrolized substrate/minute/g of sample) in *Fasciola*.

Key Words: Cholinesterases, pH-Stat, *Moniezia expansa*, *Fasciola hepatica*.

RESUMEN

Se ha determinado la actividad colinesterasa en *Moniezia expansa* y *Fasciola hepatica* mediante la técnica pH-Stat, método cuantitativo altamente sensible, preciso y reproducible.

Debemos destacar la presencia en los dos parásitos de colinesterasa específica (acetilcolina hidrolasa EC 3.1.1.7), observándose altos niveles de actividad enzimática en *Moniezia* frente al sustrato acetilcolina (1,685 μm de sustrato hidrolizados/minuto/g de muestra), siendo en *Fasciola* algo menores (0,750 μm de sustrato hidrolizados/minuto/g de muestra).

Palabras clave: Colinesterasas, pH-Stat, *Moniezia expansa*, *Fasciola hepatica*.

INTRODUCCION

Las colinesterasas son un grupo de enzimas ampliamente distribuidas en el reino animal, cuya función fisiológica ha sido extensamente estudiada en vertebrados.

Así como se sabe la existencia de este enzima en parásitos, se desconoce en la mayoría de los casos el papel que desempeña en ellos. Esto es debido a que la mayor parte de las veces el enzima se ha detectado solamente por técnicas histoquímicas.

Las colinesterasas específicas (acetilcolinesterasas) y las inespecíficas (seudocolinesterasas), han sido descritas en numerosos trabajos en Trematodes (LEWERT y HOPKINS, 1965; KRALJ y LIU, 1967; RAMISZ y SZANKOWSKA, 1970; BRUCNER y VOGEL, 1974; y otros) y Cestodes (LEE y col., 1963; ARME, 1966; SHIELD, 1969, y otros).

El papel exacto de las diferentes colinesterasas es especulativo, pero es posible que las colinesterasas no específicas regulen la transmisión nerviosa intraneural, mientras que las específicas regulan la transmisión en la sinapsis hidrolizando el sustrato natural acetilcolina, conocido neurotransmisor químico del sistema nervioso (HUTCHISON y PROBERT, 1972).

Consideramos que el enzima colinesterasa puede desempeñar un papel importante a la hora de combatir el parasitismo, adoleciéndose de una falta de conocimientos precisos de este enzima en parásitos.

MATERIAL Y METODOS

Las muestras biológicas utilizadas como fuente enzimática han sido: *Moniezia expansa* (Cestode) y *Fasciola hepatica* (Trematode), procedentes del Matadero Municipal de la localidad y transportados al laboratorio en termos con solución salina al 0,9 por 100, a la temperatura de 37° C. Estas muestras son ensayadas inmediatamente o congeladas a — 20° C, realizando la medida de la actividad en un plazo máximo de 15 días.

Preparamos homogeneizados totales de los parásitos con solución salina al 0,9 por 100, a la proporción 1/4. Para ello utilizamos primero un homogeneizador mecánico tipo UMS con sistema de refrigeración simultánea y a continuación el Potter. Posteriormente se someten a ultrasonido. Las muestras antes de

ser analizadas se dializan en solución salina al 0,9 por 100, a la proporción de 1/100, durante 24 horas, con agitación continua y en cámara regulada a 4° C. La membrana utilizada es de tipo Wisking.

La determinación de la actividad enzimática ha sido hecha mediante la técnica pH-Stat (NABB y col., 1967) con las siguientes condiciones: Electrodo combinado GK 2320C; temperatura 37° C; punto final pH = 8,01; sosa 0,001 N (factor determinado diariamente); volumen de muestra 0,5 ml; solución salina 4,5 ml; pH de la muestra ajustado a 8,03 con sosa 0,1 N; 0,2 ml de sustrato (cloruro de acetilcolina $4,2 \times 10^{-3}$ M ó ioduro de butirilcolina $4,2 \times 10^{-3}$ M).

Para cada una de las muestras hemos realizado tres ensayos en blanco y tres medidas de actividad enzimática.

La actividad queda definida por los micromoles de sustrato hidrolizados/minuto/gramo de muestra.

$$\text{Actividad} = \frac{A \cdot B \cdot N \cdot 1.000 \cdot f}{C \cdot D}$$

A.—Número de unidades registradas durante el período de titulación.

B.—ml de titulador liberados por la jeringa, por unidad de registro.

N.—Normalidad del titulador (sosa 0,001 N).

F.—Factor de la sosa utilizada.

C.—Tiempo de titulación en minutos.

D.—Volumen de muestra utilizada.

RESULTADOS

Concentración óptima de sustrato. Gráficas 1, 2.

Actividad enzimática frente a los sustratos acetilcolina y butirilcolina. Tablas I, II. Gráficas 3, 4, 5, 6.

TABLA I

ACTIVIDAD COLINESTERASA EN HOMOGENEIZADOS TOTALES
(ULTRASONIDO) FRENTE AL SUSTRATO ACETILCOLINA, EXPRESADA
EN μ MOLES H. SUST./M/G DE MUESTRA

	N.º de ensayos	SUSTRATO ACETILCOLINA	
		$\bar{X}$	SD
<i>Moniezia expansa</i>	10	1,685	0,0545
<i>Fasciola hepatica</i>	6	0,750	0,0199

TABLA II

ACTIVIDAD COLINESTERASA EN HOMOGENEIZADOS TOTALES
(ULTRASONIDO) FRENTE AL SUSTRATO BUTIRILCOLINA, EXPRESADA
EN μ MOLES H. SUST./M/G DE MUESTRA

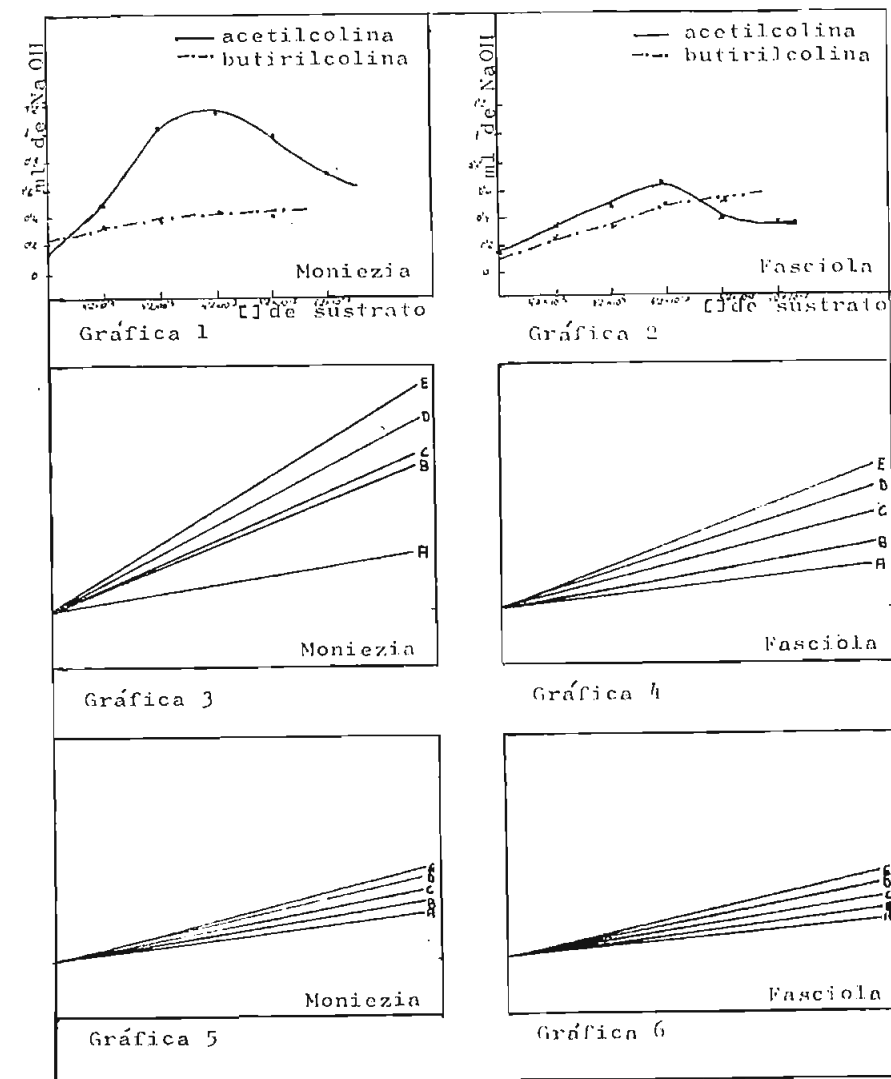
	N.º de ensayos	SUSTRATO BUTIRILCOLINA	
		$\bar{X}$	SD
<i>Moniezia expansa</i>	10	0,161	0,0055
<i>Fasciola hepatica</i>	6	0,291	0,0110

DISCUSION

El método pH-Stat para la determinación de la actividad colinesterasa ha sido utilizado por numerosos autores (STAVINOHÁ y col., 1969; HOLMSTEDT, 1971; VIJAY y WILLARD, 1975, y otros) concluyendo que es un método altamente sensible, preciso y reproducible. Presenta las siguientes ventajas: las concentraciones de sustrato y enzima pueden ser ajustadas y mantenidas a niveles en los cuales la actividad enzimática es óptima; utilización de sustrato natural; registro gráfico simultáneo; pH constante en el punto óptimo seleccionado sin necesidad de tampón. Todo ello, unido a la no interferencia de la turbidez de los homogeneizados y detectar bajos niveles de actividad enzimática hace que el pH-Stat sea una técnica muy adecuada para la determinación de la actividad colinesterasa en parásitos.

En principio determinamos la actividad enzimática en los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los homogeneizados

(Gráficas 3, 4, 5, 6; C). Posteriormente analizamos los precipitados. Comprobamos (Gráficas 3, 4, 5, 6; B) tanto en *Moniezia* como en *Fasciola* que una gran parte de la actividad enzimática queda en



Gráficas 1-2.—Concentración óptima de sustrato.

Gráficas 3-4.—Actividad colinesterasa frente al sustrato acetilcolina.

Gráficas 5-6.—Actividad colinesterasa frente al sustrato butirilcolina.

A) Ensayo en blanco; B) Precipitado; C) Sobrenadante; D) Homogeneizado total; E) Homogeneizado total (Ultrasonido).

la fracción de precipitado. A continuación observamos que la medida de la actividad enzimática en los homogeneizados totales (Gráficas 3, 4, 5, 6; D) presenta un aumento considerable, por ello utilizamos en ambos parásitos el homogeneizado total.

Nos pareció interesante ver la influencia que la aplicación del ultrasonido podía tener sobre la medida de la actividad, pudiéndose comprobar (Gráficas 3, 4, 5, 6; E) un aumento claro de ésta.

Una concentración óptima del sustrato cloruro de acetilcolina de $4,2 \times 10^{-3}$ M (Gráficas 1, 2) y la muy baja hidrólisis de yoduro de butirilcolina (Tabla I), nos hablan claramente de la presencia en estos dos parásitos de una colinesterasa específica, acetilcolina hidrolasa EC 3.1.1.7 (NACHMANSOHN y WILSON, 1951).

Esta diferencia clara de actividad enzimática frente a los dos sustratos (Tablas I, II) es más acusada en *Moniezia*, parásito que presenta un alto nivel de acetilcolinesterasa, estando todo ello de acuerdo con la función que el sistema nervioso tiene en la continuidad de este parásito en el hospedador, donde el neurotransmisor acetilcolina juega un papel fundamental (REES, 1966).

REFERENCIAS

- ARME, J. M. (1966): Citado por: VON BRAND T. (1973), pág. 228.
- BRUCKNER, D. A., and VOGEL, M. (1974): Citado por: VON BRAND T. (1979), pág. 296.
- CHENG, C. T. (1978): *General Parasitology*, Academic Press, Inc., New York. 2.^a ed. (*Parasitología General*, 1.^a ed. en castellano, Ed. A. G., págs. 482-484).
- HOLMSTEDT, B. (1971): Distribution and Determination of Cholinesterases in Mammals. *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, 44: 99-107.
- HUTCHISON, G. W., and PROBERT, A. J. (1972): *Ascaris suum*. kinetic properties, times specificity and ultrastructural location of Cholinesterases. *Experimental Parasitology*, 32: 109-116.
- KRALJ, N., and LIU, S. K. (1967): Citado por: VON BRAND, T. (1973), pág. 228.
- LEE, E., and col. (1963): Citado por: HUTCHISON, G. W., and PROBERT, A. J. (1972), pág. 228.
- LEWERT, R. M., and HOPKINS C. A. (1965): Citado por: VON BRAND, T. (1973), pág. 228.
- NABB, D. P., and col. (1967): Determination of cholinesterase by an automated pH-Stat method. *Archives of Environmental Health*, 15: 147-154.
- NACHMANSOHN, D., and WILSON, I. B. (1951): Acetylcholinesterase. *Advances in Enzymology*, 12: 259.

- RAMISZ, A., and SZANKOWSKA, Z. (1970): Citado por: VON BRAND, T. (1973), pág. 228.
- REES, G. (1966): Citado por: CHENG, C. T. (1978), pág. 483.
- SHIELD, J. M. (1969): Citado por: VON BRAND, T. (1973), pág. 228.
- STAVINOH, W., and col. (1969): An study the measurement of cholinesterase by constant pH-titration the effect of hemolysians and comparison with the electrometric technique. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 14: 469.
- VIJAY, K., and WILLARD, B. (1975): Acetylcholinesterase from *Bungarus fasciatus* venom I. Substrate specificity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 51: 2c, 249-253.
- VON BRAND, T. (1973): *Biochemistry of Parasites*. Academic Press. New York and London, págs. 228-229.
- VON BRAND, T. (1979): *Biochemistry and Physiology of Endoparasites*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, págs. 296-306.