

OBSERVAÇÕES HISTOENZIMOLÓGICAS SOBRE O PLEXO DE AUERBACH DO DUODENO NA FASE AGUDA DA MOLÉSTIA DE CHAGAS EXPERIMENTAL EM RATOS

J. A. MELLO DE OLIVEIRA (1)

RESUMO

Foi realizado estudo histoenzimológico do plexo de Auerbach do duodeno em 5 ratos Wistar normais e 3 com infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909, na fase aguda. As observações mostram que há alteração da atividade enzimática do plexo. As atividades enzimáticas mais afetadas são das enzimas do citosol. As enzimas mitocondriais são também comprometidas, embora não constantemente como aquelas.

INTRODUÇÃO

Está demonstrado que na fase crônica da moléstia de Chagas há destruição parcial ou total dos neurônios pós-ganglionares intramurais dos órgãos musculares ociosos¹⁰⁻¹³ e que a resposta destes órgãos ao estímulo farmacológico da acetilcolina ou similares é semelhante àquela dos órgãos desnervados^{7, 17}, obedecendo à lei de CANNON⁵.

KÖBERLE¹¹ mostrou que a destruição ocorre durante a fase aguda da infecção enquanto o parasitismo tecidual é intenso e sugeriu que isto se deve à liberação de produtos do parasita, tóxicos para os neurônios vizinhos, quando se rompem os ninhos de leishmânias. ALCÂNTARA² em trabalho posterior, reforçou essa hipótese.

O mecanismo da destruição neuronal na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, passou a ser estudado por outros pesquisadores utilizando métodos variados. PRATES CAMPOS⁴ relata menor incorporação pelos neurônios de leucina marcada, usando o método histoautorradiográfico e TAFURI¹⁶ observou lesões neuronais ao microscópio eletrônico na fase aguda da infecção experimental. Uma das hipóteses que se pode aventar para ex-

plicar a ação tóxica dos produtos parasitários sobre o sistema nervoso autônomo, é a inibição de enzimas das células deste bloqueando atividades vitais das mesmas. A evolução das técnicas de histoquímica das enzimas²⁶ permite explorar amplamente este aspecto. No presente trabalho são relatadas algumas observações sobre a atividade das enzimas do plexo de Auerbach na fase aguda da moléstia de Chagas experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

A) *Infecção experimental pelo T. cruzi em ratos* — Foram utilizados 30 ratos Wistar, machos de 20 dias de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, divididos em 3 lotes de 10 animais para experimentos consecutivos. Nos 3 experimentos cada animal foi inoculado com 0,1 ml de sangue altamente contaminado pela cepa Y do *T. cruzi* Chagas, 1909, de modo que cada rato recebeu de 100.000 a 150.000 parasitas no inóculo, na proporção de 5000 tripanosomas/grama de peso. A partir do 4.º dia da inoculação foram feitos exames a fresco do sangue dos animais e a parasitemia quantificada pela técnica de

Trabalho realizado no Laboratório de Histoenzimologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Serviço do Prof. F. Köberle) com auxílio financeiro da F.A.P.E.S.P. (Proc. 1017/70) e da O.P.A.S. (FIN 1684-69)

(1) Professor Assistente Doutor

BRENNER³. Os animais receberam identificação individual para permitir o acompanhamento da parasitemia e do quadro clínico de cada um. Quando o estado geral dos animais sofreu queda muito acentuada com sintomas associados de hipoatividade, esplenomegalia, incontinência urinária, paralisia do trem posterior, rinorragia, espasticidade muscular etc., o mais comprometido dentre eles foi sacrificado para o estudo histoenzimológico das células do plexo de Auerbach do duodeno. No total dos experimentos foram escolhidos 3 animais para o estudo enzimático ou seja 1/10 do número de inoculados, os quais foram sacrificados ao 14.^o (CH₁); 15.^o (CH₂); e 21.^o (CH₃) dias após a inoculação. Esta proporção decorreu de que entre o início e o fim do estudo histoenzimológico de cada animal os demais inoculados morreram naturalmente pela infecção ou não a apresentaram com gravidade acentuada. Em ambas as circunstâncias estes animais foram rejeitados para o estudo enzimológico na fase aguda. Foram retiradas

amostras de vísceras para estudo histológico dos animais sacrificados, para avaliar o parasitismo tecidual.

B) *Histoenzimologia do plexo de Auerbach do duodeno* — Foram estudados 8 ratos Wistar machos, incluídos os 3 com infecção experimental pelo *T. cruzi*, Chagas, 1909, conforme exposto no item A e 5 ratos normais de peso e idade eqüivalente aos dos inoculados. Os animais foram sacrificados por secção da medula cervical, o abdome aberto imediatamente e retirado um segmento do duodeno, sempre à mesma distância do anel pilórico. O fragmento para estudo, uma vez retirado, foi mergulhado em N₂ líquido (-196°C) e passado ao criótomo de Harris. Neste foram obtidos cortes de 10 micra de espessura. Para cada reação histoenzimológica houve uma reação controle com tecido incubado em solução sem substrato. Em ambos os grupos de animais foram comparadas as atividades das enzimas das seguintes vias metabólicas da glicose:

a) Glicogenólise:		
Reação do ácido periódico-Schiff ¹⁴		PAS
PAS com prévia digestão pela amilase alfa ²¹		PAS + alfa
PAS com prévia digestão pela amilase beta ²¹		PAS + beta
Fosforilase ativa ⁸		PHYLA a
Fosforilase total ⁸		PHYLA t
b) Glicólise:		
Aldolase da frutose-1,6-fosfato ¹		ALD-A
Desidrogenase láctica ²³		L-D
c) Gliconeogênese:		
Glicose-6-fosfatase ⁶		G6P-A
d) Via das Pentoses:		
Desidrogenase da Glicose-6-fosfato ²²		G6P-D
Desidrogenase do 6-fosfogluconato ²²		6PG-D
Nicotinamida adenina-dinucleotídeo-fosfato tetrazolium		
redutase ¹⁵		NADPH ₂ -TR
Ribose-5-fosfatase ²⁵		R ₅ P-A
e) Ciclo de Krebs:		
Desidrogenase cisaconítica ¹⁸		CA-D
Desidrogenase isocítrica ²⁴		IC-D
Desidrogenase succínica ²⁰		S-D
Desidrogenase málica ²³		M-D
f) Fosforilação Oxidativa:		
Adenosina-trifosfatase a pH 9,4 ¹⁹		ATP-A I

Adenosina-trifosfatase a pH 8,5 ¹⁹	ATP-A II
Adenosina-trifosfatase a pH 7,4 ¹⁹	ATP-A III
Adenosina-trifosfatase a pH 6,3 ¹⁹	ATP-A IV
Nicotinamida adenina dinucleotídeo tetrazolium redutase ¹⁵	NADH ₂ -TR

A intensidade da reação foi avaliada do seguinte modo: Reação intensa (+++), reação forte (++), reação moderada (+), reação fraca (+) e reação negativa (-).

RESULTADOS

A) *Infecção experimental* — A cepa Y do *T. cruzi*, Chagas, 1909, inoculada nos ratos Wistar com 20 dias de idade provocou infecção em todos eles com parasitemia detectada já ao 4.º dia após a inoculação. Exceptuando-se os 3 animais sacrificados para estudo, 22 inoculados faleceram entre o 7.º e o 22.º dia (81,4%). O Gráfico 1 representa um diagrama de dispersão para correlacionar o tempo de sobrevida do animal inoculado em função da parasitemia à época da primeira contagem de parasitas (4.º dia). O coeficiente de correlação linear para esta dispersão é de -0,43, mostrando que previsão do tempo de sobrevida em função da intensidade da primeira onda parasitêmica não pode ser feita com grande probabilidade de acerto.

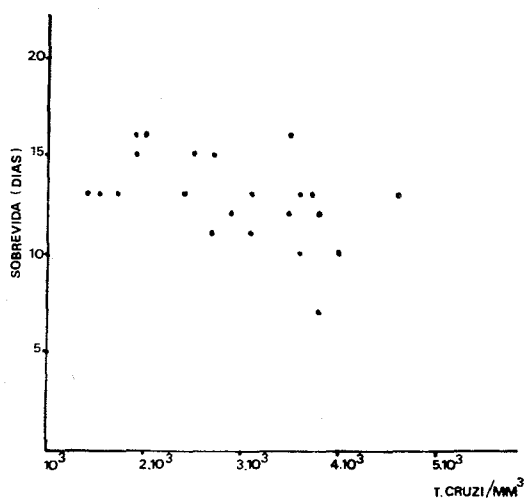


Gráfico 1 — Tempo de sobrevida de ratos inoculados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, em função da parasitemia no 4.º dia após a inoculação.

O exame histopatológico dos ratos sacrificados para estudo revelou parasitismo tecidual nos 3 animais com achados que variaram de um animal a outro, como está relatado abaixo. Vale ressaltar que em todos a reação inflamatória foi insignificante ao nível do plexo.

CH₁ — O parasitismo tecidual foi em geral moderado, mas mais intenso no sistema nervoso central e na musculatura lisa dos órgãos musculares ociosos. Mais intenso naquele que nestes. Das vísceras abdominais, o fígado apresentou alguns ninhos de leishmânia nas células de Kupffer. Rím e baço não tinham parasitas. Em todos os órgãos, havia raros ninhos em fase de rompimento.

CH₂ — O rato CH₂ apresentou o parasitismo mais intenso do grupo. O tropismo mais acentuado da cepa foi para o tecido nervoso e para a musculatura lisa. Foram encontrados parasitas no cérebro, cerebelo e medula, miocárdio, musculatura lisa do tubo digestivo e da parede de artérias. As vísceras abdominais parenquimatosas não apresentaram parasitismo acentuado como aquelas. No fígado houve raras células de Kupffer parasitadas. Em todos os órgãos, grande parte dos ninhos estava em fase de rompimento. Foi este animal que apresentou maior número de pseudocistos rotos.

CH₃ — O parasitismo mais intenso foi encontrado no sistema nervoso central onde além de ninhos de leishmânia íntegros havia vários rotos. Ao momento do exame o parasitismo foi insignificante nas vísceras torácicas e abdominais. No duodeno havia raros ninhos de leishmânia na musculatura lisa.

B) *Histoenzimologia do Plexo de Auerbach*

1 — *Rato Normal* — O método histoquímico revela vias metabólicas ativas e inativas para a utilização da glicose e derivados nas células do plexo mientérico do rato Wistar normal. A avaliação média da atividade das várias enzimas nos 5 ratos normais está representada na Fig. 1.

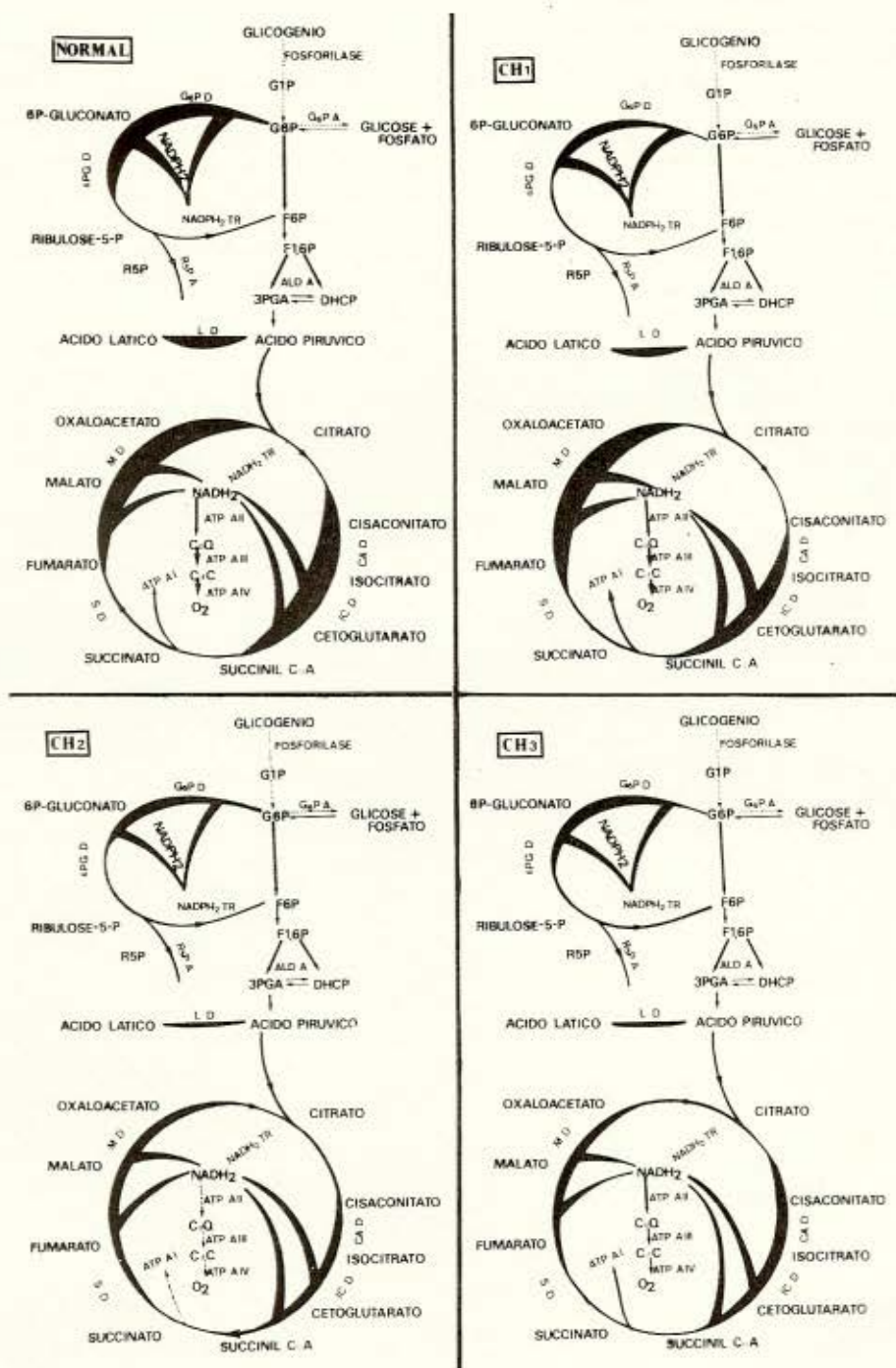


Fig. 1 — Esquemas do perfil metabólico do plexo de Auerbach do duodeno no rato normal e em ratos experimentalmente infectados com *T. cruzi* na fase aguda. (Ver detalhes no texto)

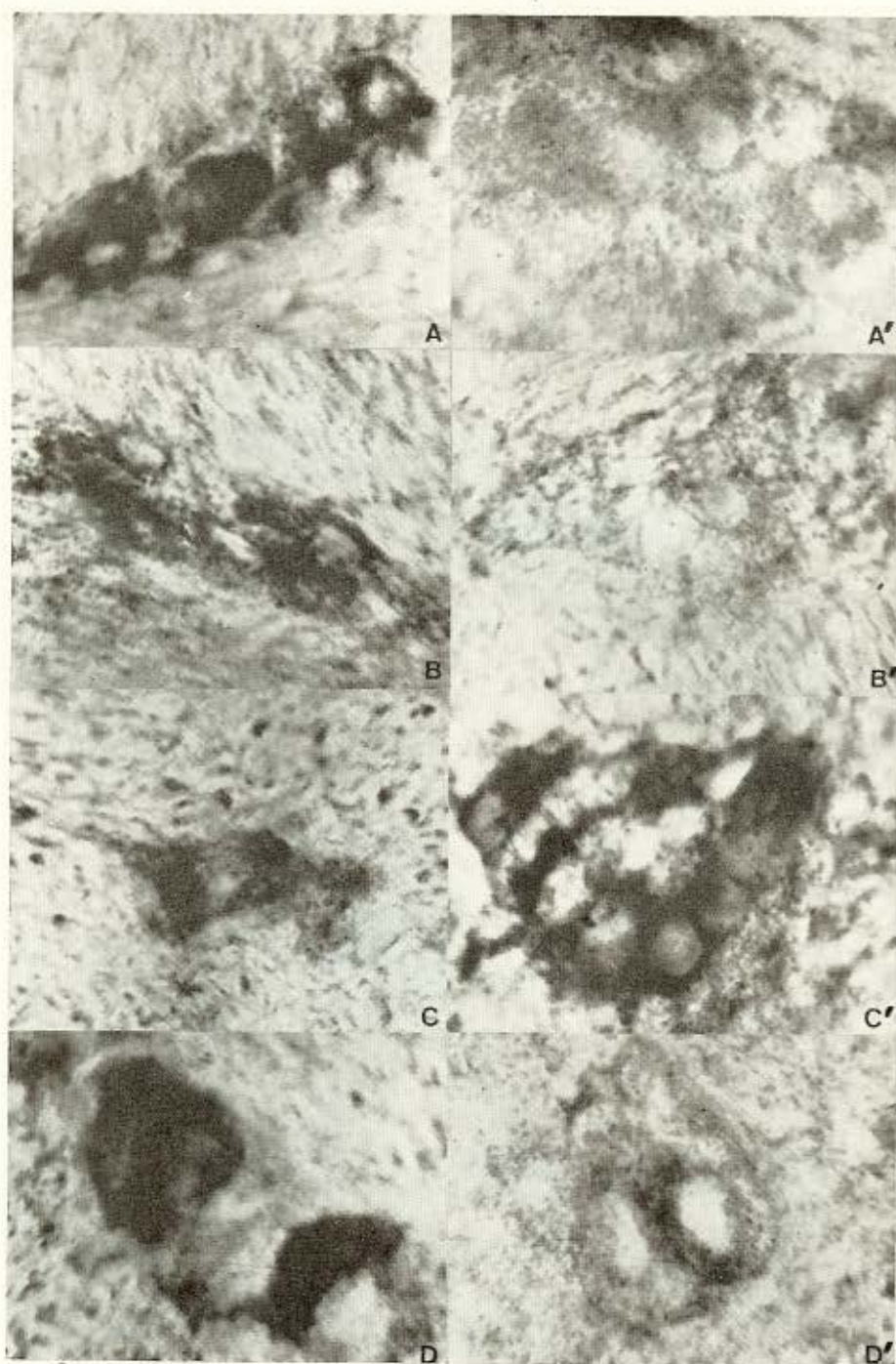


Fig. 2 — Atividades enzimáticas da G6P-D (A), 6PG-D (B), NADP₂-TR (C) e L-D (D) do plexo de Auerbach do rato normal comparadas às respectivas atividades (A', B', C' e D') na fase aguda da moléstia de Chagas experimental.

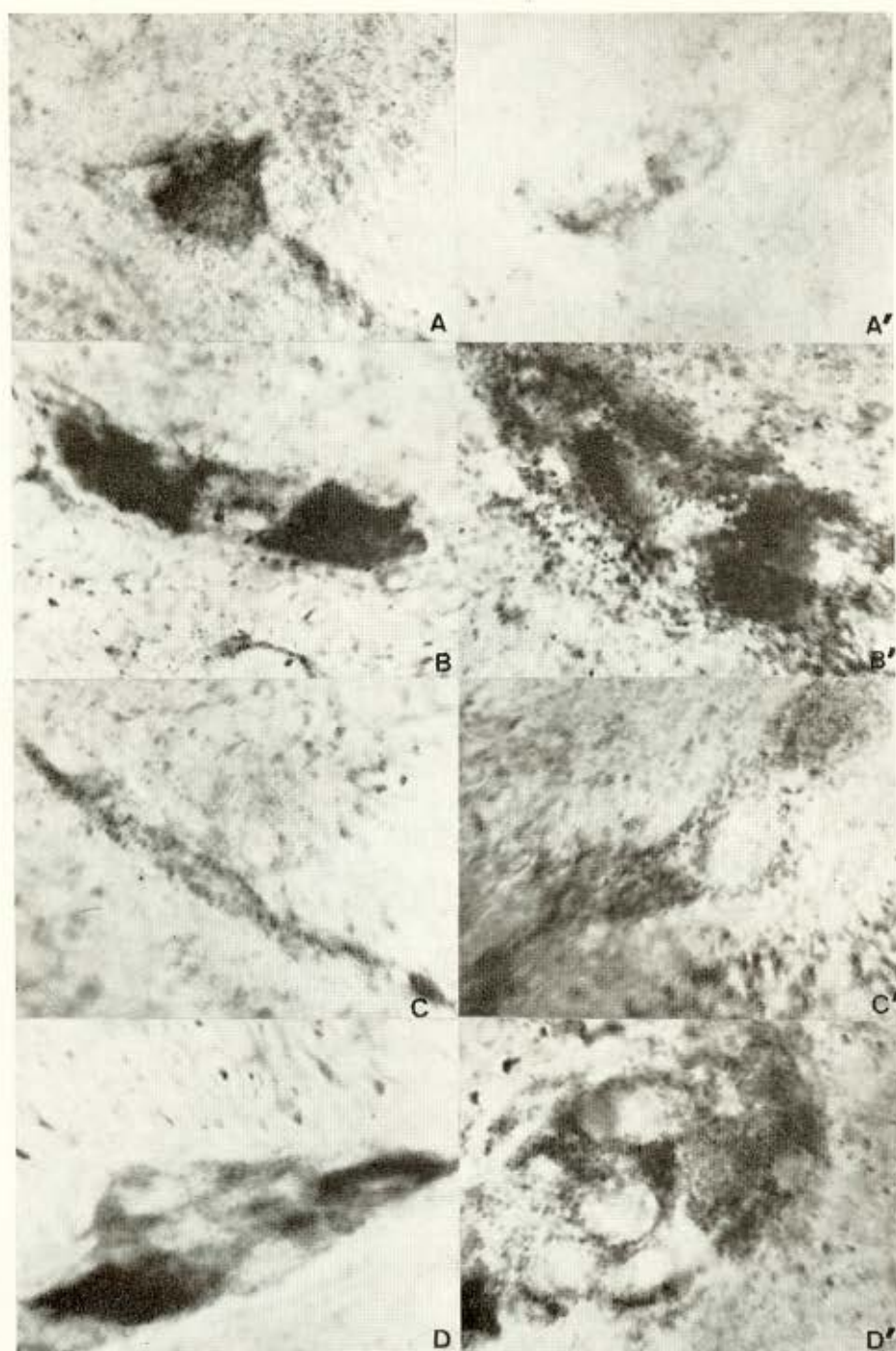


Fig. 3 — *Ciclo de Krebs*: Atividades enzimáticas da CA-D (A), IC-D (B), S-D (C) e M-D (D) no plexo mientérico do rato normal, em comparação com as mesmas atividades (A', B', C' e D') no rato infetado experimentalmente com o *Trypanosoma cruzi* (fase aguda)

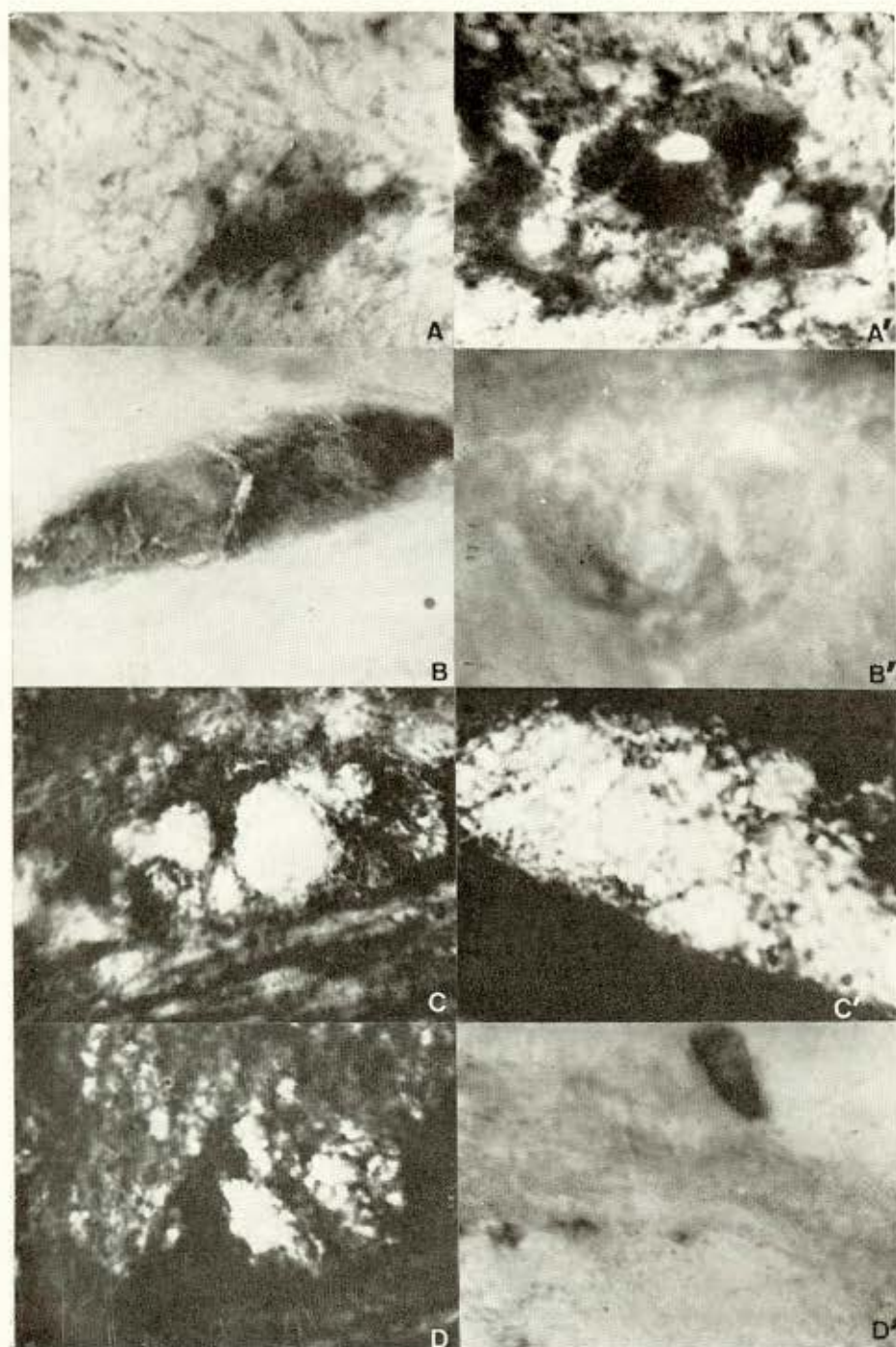


Fig. 4 — *Fosforilação oxidativa*: Atividades enzimáticas no plexo de Auerbach do rato normal compreendendo as reações para $\text{NADH}_2\text{-TR}$ (A), ATP-A I (B), ATP-A III (C) e ATP-A IV (D) comparadas às respectivas reações (A', B', C' e D') no animal infetado.

As reações para detectar a presença de glicogênio (PAS; PAS + alfa; PAS + beta) e a atividade glicogenolítica do tecido (PHYLA a e t) são negativas. Observa-se presença de material PAS positivo na substância fundamental do plexo mas não no citoplasma neuronal e a reação não desaparece pela prévia digestão pelas amilases. Outra via metabólica histoquimicamente inativa é a gliconeogênese avaliada pela reação da G₆P-A que também é negativa. A glicólise é ativa. A ALD-A é uma enzima cuja reação está presente mas com fraca (+) intensidade na maior parte das células. A desidrogenase láctica tem reação que varia de moderada (++) a intensa (++++) nos neurônios do plexo.

As reações correspondentes ao desvio das pentoses mostram que a via é bastante ativa no plexo mientérico. A G₆P-D tem reação intensa (++++) , a 6PG-D reação forte (+++) e a tetrazolium-redutase NADPH₂-TR reação intensa (++++) . A ribose-5-fosfatase (R₅P-A) tem reação fraca (+). O ciclo do ácido cítrico também é ativo nas células dos gânglios intramurais, mas não tanto quanto a via das pentoses. As reações para as desidrogenases do ciclo variam de moderadas (++) a fortes (+++), excetuando a enzima S-D cuja atividade sempre é fraca (+). Em um rato observamos atividade intensa (++++) para a enzima M-D. A atividade da fosforilação oxidativa avaliada pela atividade das fosfatases do ATP e pela redutase do NADH₂-TR também está presente. Destas enzimas a atividade da redutase é intensa (++++) enquanto as ATP-A têm atividade moderada (++) ou fraca (+). Este é em linhas gerais o perfil da atividade enzimática, no plexo dos ratos normais.

2 — *Ratos Chagásicos* — Nos animais chagásicos permanecem inativas as enzimas da glicogenólise e da gliconeogênese. Contudo, nas demais vias há variações acentuadas de um animal para outro. Os resultados individuais estão esquematizados na Fig. 1 ao lado do esquema da atividade enzimática do animal normal. Nos 3 animais houve depressão da atividade enzimática do desvio das pentoses. O maior comprometimento nesta via ocorreu nas atividades das desi-

drogenases da glicose-6-fosfato e do 6-fosfogluconato cujas reações passaram de intensa (++++) a moderada (++) nos três animais (Fig. 2). A redutase do NADPH₂ sofreu alteração semelhante, mas não constante, da atividade e a reação permaneceu intensa (++++) em CH₁, forte (+++), em CH₂ e moderada (++) em CH₃. A atividade da R₅P-A, também tributária desta via, negativou-se nos animais chagásicos, mas a interpretação do resultado torna-se difícil em virtude da fraca reação também observada nos ratos normais.

A atividade da desidrogenase láctica foi mais deprimida em CH₂ e CH₃ cuja reação foi fraca (+). No animal CH₁ a reação foi moderada, mantendo-se nos limites inferiores da intensidade observada nos animais normais.

As modificações ocorridas no ciclo de Krebs e na fosforilação oxidativa (Figs 3/4) também variam de animal para animal. As atividades enzimáticas permaneceram praticamente normais no rato CH₁. Nos animais CH₂ e CH₃ houve depressão. Em CH₂ foram afetadas todas as enzimas do ciclo do ácido cítrico. As reações foram positivas mas de fraca intensidade (+) para CA-D, IC-D, S-D e M-D. A redutase de NADH₂ manteve reação forte (+++), mas nas demais reações da cadeia da fosforilação oxidativa houve negatização das fosfatases do APT. O animal CH₃ foi menos afetado que CH₂ mas houve nítida redução nas intensidades das reações do ciclo de Krebs cujas reações variaram de fracas (+) a moderadas (++) . A cadeia de transferência de elétrons e produção de ATP manteve sua atividade neste animal. Nos 3 ratos chagásicos as alterações metabólicas não dependeram da presença de processo inflamatório na vizinhança.

COMENTARIOS

São pouco freqüentes as referências sobre a atividade das enzimas envolvidas na produção de energia pelas células dos gânglios intramurais do tubo digestivo. Em geral são observações feitas de passagem quando do relato de trabalhos sobre técnicas que envolveram o tubo digestivo como órgão teste. HESS & col.⁹ referem atividade intensa para

G₆P-D, NADPH₂-TR, NADH₂-TR que concordam com as nossas observações sobre o rato normal. Encontraram também variações de atividade nas enzimas do ciclo de Krebs de um mesmo animal referindo reação mais intensa para IC-D que para M-D.

Nossas observações concordam com as desses Autores quanto ao fato de que os neurônios pós-ganglionares do tubo digestivo têm atividades enzimáticas evidentes, ligadas ao desvio das pentoses e ao ciclo de Krebs. O nosso material demonstra além disso que o plexo não acumula glicogênio como reserva de energia e não resintetiza a glicose a partir da glicose-6-fosfato. A glicose fosforilada é totalmente processada no sentido do ciclo das pentoses ou da glicose. Estes dados mostram que o plexo necessita ali, da oferta contínua de glicose em condições satisfatórias. A demonstração de enzimas ligadas à glicólise, ao ciclo de Krebs e à fosforilação oxidativa é facilmente compreensível tendo em vista a energia necessária para o exercício da atividade reguladora do mesmo sobre os efetores da parede intestinal. A atividade do ciclo das pentoses fica menos clara, embora aí como alhures, deva estar ligada principalmente à produção de NADPH₂ e ao metabolismo dos nucleotídeos. As observações aqui relatadas mostram que estas vias metabólicas fundamentais para a vitalidade celular estão sujeitas a alterações durante a fase aguda da moléstia de Chagas experimental.

Desde as primeiras evidências anatômicas sobre a patogenia neuro-vegetativa das alterações observadas na moléstia de Chagas, KÖBERLE¹¹ salientou que a destruição neuronal ocorre na fase aguda. O momento crucial da destruição, segundo ele, dá-se durante a exposição das células nervosas aos produtos tóxicos liberados do ninho de leishmânias após o rompimento do pseudocisto, aos quais denominou genericamente como "neurotoxina". A natureza desses produtos e o seu mecanismo de ação ainda permanecem obscuros. As pesquisas relatadas procuraram mostrar as alterações ultra-estruturais nos plexos intramurais¹⁶ ou os seus efeitos⁴ durante a fase aguda da infecção para explicar o mecanismo da ação nociva. Seguindo a mesma linha de raciocínio partimos da hipótese que eventuais alterações neuro-

nais poderiam depender de distúrbios nos mecanismos enzimáticos celulares. Estes devem ser mais facilmente demonstráveis num período da infecção em que a concentração dos produtos parasitários se eleva no organismo e mais intensamente nas vizinhanças dos pontos de ruptura de pseudocistos. Todavia, não há condições para definir com precisão este momento. Poder-se-ia suspeitar que a intensidade da parasitemia detectada nos primeiros dias após inoculação permita avaliar prospectivamente a evolução da doença. Se tomamos o tempo de sobrevida como índice da gravidade da infecção vê-se que é fraca a correlação entre o parasitismo inicial e a sobrevida. No presente trabalho a oportunidade de sacrificar o animal chagásico foi empiricamente avaliada em função do quadro clínico do animal. O exame histológico mostra que os animais, ainda assim, não estavam na mesma fase com relação à ruptura dos pseudocistos parasitários. Embora nos três houvesse ninhos em rompimento, o animal CH₂ foi o que mostrou maior comprometimento. Do ponto de vista histoquímico foi também ele o animal mais comprometido. Não obstante as variações de animal para animal, ficou patente que a constelação enzimática celular está sujeita a profundas alterações, as quais são independentes da presença de processo inflamatório vizinho. As alterações mais constantes, afetando os 3 animais, envolvem a desidrogenase láctica e as desidrogenases da glicose-6-fosfato e do 6-fosfo-gluconato, que são enzimas localizadas no citosol. O comprometimento das enzimas mitocondriais do ciclo do ácido cítrico e da fosforilação oxidativa foi nítido em CH₂ e CH₃, mas a preservação das mesmas em CH₁ mostra que a sua ocorrência é inconsistente.

TAFURI¹⁶ mostrou claramente lesões mitocondriais tanto dos neurônios como das células satélites no plexo de Auerbach, durante a infecção experimental pelo tripanosoma. Na sua documentação observam-se mitocôndrios tumefeitos com desintegração das membranas e das cristas o que concorda perfeitamente com as lesões que referimos em CH₂ (15.º dia da infecção) e em CH₃ (21.º dia da infecção). Ele não refere modificações nos lisossomos.

As nossas observações mostram que as enzimas do citosol são as mais constantemente expostas à ação deletéria dos produtos tóxicos emanados do pseudocisto roto embora as enzimas das organelas também possam se comprometer. O mecanismo da ação nociva permanece obscuro. A amplitude dos distúrbios bioquímicos permite suspeitar que eles decorram de modificações secundárias do meio interno celular após lesões de membrana. Contudo a inibição específica de enzimas reguladoras não pode ser excluída e serão necessárias outras observações que permitam ratificar estes achados e explorar os produtos parasitários capazes de determiná-las.

SUMMARY

Enzyme histochemistry of the duodenal Auerbach plexus, in the acute phase of experimental Chagas Disease in rats.

Enzyme histochemistry has been performed to study the Auerbach' plexus in 5 normal rats and 3 rats inoculated with the "Y" strain of *Trypanosoma cruzi*, during the acute phase of the infection. The research was directed to enzymatic activity related to glycogenolysis, glycolysi, hexosemonophosphate shunt, Krebs' cycle and oxidative phosphorylation. It has been demonstrated that in acute phase of experimental Chagas Disease there is a reduction of activity of those enzymes in the cytosol of the cells of the Auerbach' plexus. Enzymatic activity in the mitochondria can also be affected. A mechanism to explain this cellular damage is suggested.

AGRADECIMENTOS

O Autor agradece a colaboração técnica da Srta. Maria de Lourdes Netto (Histo-enzimologia) e do Sr. Hélio Romualdo Rocha (Patologia Experimental).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABE, T. & SHIMIZU, N. — Histochemical method for demonstrating aldolase. *Histochemie* 4:209-212, 1964.
2. ALCANTARA, F. G. — Sistema neuro-vegetativo do coração na Moléstia de Chagas experimental. *Rev. Goiana Med.* 7:111-126, 1961.
3. BRENNER, Z. — Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 4:389-396, 1962.
4. CAMPOS, J. C. P. — Radioautographic study of the protein synthesis in the Purkinje cells at the acute phase of the experimental trypanosomiasis cruzi in rats. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:25-33, 1969.
5. CANNON, W. B. — A law of denervation. *Amer. J. Med. Sc.* 198:737, 1939.
6. CHIQUOINE, A. D. — The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and in the kidney of the mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 1:429-435, 1953.
7. GODOY, R. A. — Hipersensibilidade da musculatura brônquica à metacolina na forma crônica da moléstia de Chagas. *Rev. Goiana Med.* 10:91-120, 1964.
8. GUHA, S. & WEGMANN, R. — Une nouvelle méthode de mise en évidence de la phosphorylase. *Ann. Histochim.* 4:103-115, 1959.
9. HESS, R.; SCARPELLI, D. G. & PEARSE, A. G. E. — The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide Linked Dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:753-760, 1958.
10. KÖBERLE, F. & NADOR, E. — Etiologia e patogenia do megaeosfago no Brasil. *Rev. Paul. Med.* 47:643-661, 1955.
11. KÖBERLE, F. — Uber das Neurotoxin des *Trypanosoma cruzi*. *Zentralbl. Pathol.* 95:468-475, 1956.
12. KÖBERLE, F. — Patogenia da moléstia de Chagas. Estudo dos órgãos musculares ocos. *Rev. Goiana Med.* 3:155-180, 1957.
13. KÖBERLE, F. & ALCANTARA, F. G. — Mecanismo da destruição neuronal do sistema nervoso na moléstia de Chagas. *Hospital (Rio)* 57:1057-1062, 1960.
14. Mc MANUS, J. F. A. — Histological demonstration of mucin after period acid. *Nature (London)* 158:202, 1946.
15. SACARPELLI, D. G.; HESS, R. & PEARSE, A. G. E. — The cytochemical localization of oxidative enzymes. I. Diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4:747-752, 1958.
16. TAFURI, W. L. — Lesões do sistema nervoso autônomo do coração e do cólon do camundongo na fase aguda da doença de Chagas experimental. Estudo ao microscópio óptico e ao eletrônico. *Rev. Ass. Med. Minas Gerais* 49:3-39, 1968.

MELLO de OLIVEIRA, J. A. — Observações histoenzimológicas sobre o plexo de Auerbach do duodeno na fase aguda da moléstia de Chagas experimental em ratos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:261-271, 1973.

17. VIEIRA, C. B. — Hiperexcitabilidade de glândulas salivares hipertróficas à pilocarpina na forma crônica da moléstia de Chagas. *Rev. Ass. Med. Brasil.* 10:7-12, 1964.
18. YAMADA, Y.; ABE, T. & SHIMIZU, N. — Histochemical technique for demonstrating cisaconitase. *Arch. Histol. Japon* 23:165-171, 1962.
19. WEGMANN, R. & BANKOWSKY, Z. — Différenciation histochimique de 4 groups d'adenosine triphosphatase selon Slater. *Ann. Histochem.* 5:121-141, 1960.
20. WEGMANN, R. & TORDET-CORIDROT, C. — Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase by specific inhibition and activation. *J. Histochem. Cytochem.* 8:348-349, 1960.
21. WEGMANN, R. & VERNE, J. — Étude histochimique des enzymes intervenant dans le métabolisme des polyssaccharides. *Ann. Histochem.* 5:121-141, 1960.
22. WEGMANN, R. & GERZELLI, G. — La glucose-6-phosphate dehydrogenase et ses relations avec des substrats voisins du glucose-6-phosphate. Rôle de l'hexokinase. *Ann. Histochem.* 6:111-124, 1961.
23. WEGMANN, R. & SOTELLO, C. — Aspects cytoenzymologiques du métabolisme des glucides de la cellule de Purkinje. *Ann. Histochem.* 7/4:65-81, 1962.
24. WEGMANN, R. & KHOSROVCHAH, H. — Interêt de l'étude histoenzymologique sur tissu vivant des cycles métaboliques au cours de la stéroïdogénèse surrenalienne chez la ratte. *Ann. End.* 25:346-354, 1964.
25. WEGMANN, R. — Ribose-5'-phosphatase. In *Techniques Histoenzymologiques*. Institut d'Histochemie Médicale. Paris, Faculté de Médecine, 1966, pp. 19-20.
26. WEGMANN, R. — Quelques aspects de l'enzymologie cellulaire: Les enzymes appliquées à la Biologie et à la Médecine. *Mises a Jour* 5:315-368, 1970.

Recebido para publicação em 14/2/1972.