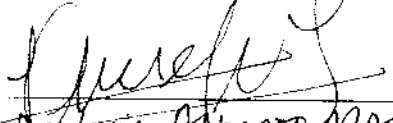


DENISE YVONNE JANOVITZ NORATO

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DE DOUTORADO
DA MÉDICA DENISE Y. J. NORATO, APRE-
SENTADO EM 11 DE DEZEMBRO DE 1987.
CAMPINAS, 11 DE DEZEMBRO DE 1987.


~~PROF. DR. LUIS ALBERTO MAGNA~~

A ANIDRASE CARBÔNICA ERITROCITÁRIA NA SÍNDROME DE DOWN

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Univer-
sidade Estadual de Campinas para obtenção do
Título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Luís Alberto Magna

*****1987*****

N75a

9049/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado nos laboratórios do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. Nos primeiros 2 anos a autora mereceu Bolsa de Mestrado da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Na conclusão do trabalho a autora era Monitora II da Universidade Estadual de Campinas.

IN MEMORIAN

*A Elemér Janovitz, meu pai, exemplo de amor
e coragem na vida e na morte.*

*A Alberto Janovitz, meu irmão, por me ensi-
nar a amar todas as criaturas da natureza.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr.Bernardo Beiguelman pelo exemplo científico e pelo incentivo que me levou à pesquisa e à docência.

Ao Prof.Dr.Walter Pinto Junior, que me acolheu e orientou com carinho no Departamento de Genética Médica.

Ao meu orientador, Prof.Dr.Luís Alberto Magna, antes de tudo um amigo, pela orientação tranquila e compreensiva.

A grande amiga Prof.Dra.Christine Hackel, co-orientadora, pelo apoio, carinho, e pela orientação e cooperação na área de citogenética.

Ao caro amigo, Prof.Dr.Antônio Sérgio Ramalho, pioneiro nesse campo de investigação, pelas opiniões e pela atenção carinhosa com que me ouviu em momentos decisivos deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Genética Médica:Antonio Conceição Costa, Geralda Luzia Alves, Maria Madalena Vasconcelos Rosa pelo carinho e colaboração, em especial a Emílio Sambo Junior, que auxiliou na padronização das técnicas laboratoriais, a Sônia Aparecida Alípio dos Santos pelo material sempre bem lavado, a Josimar Aparecida Alves do Nascimento e a Henry Norberto Cioffi pela cooperação na preparação das lâminas para realização dos cariótipos, a Edi Lúcia Sartorato pela realização e análise dos cariótipos que necessitaram técnicas de bandamento cromossômico assim como pelos desenhos que ilustram a tese, a Inara Ignacchitti de Sena e a Maria Cláudia Furlan pelo trabalho datilográfico das referências bibliográficas.

Aos funcionários das bibliotecas da FCM e do Instituto de Biologia, em especial à Diretora Técnica da Biblioteca do Instituto de Biologia, Sra. Anna Gagliardi, pelo assessoramento durante o levantamento bibliográfico e pela revisão das referências.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp nas pessoas dos Professores Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes e Dra. Eliana Cotta de Faria e dos técnicos Maria Aparecida Selleghin, Laurione Candido de Oliveira e Olinda da Silva pela orientação na realização das dosagens hormonais e das densitometrias.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Análise de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, na pessoa do Prof. Dr. Frederick Carl Strong III, pela orientação e pela permissão para utilização do espectrofotômetro de absorção atômica para a dosagem do zinco.

Aos funcionários e docentes dos demais departamentos da UNICAMP, pela orientação e empréstimo de equipamento laboratorial.

Aos funcionários e docentes do departamento de Genética e Matemática aplicada à Biologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, na pessoa do Prof. Dr. Moacyr Antonio Mestriner pela recepção, orientação e estímulo a realização deste trabalho.

As colegas de pós-graduação, em especial as amigas Andréa Trevas Maciel, Antônia Paula Marques de Faria, Carmen Sílvia Bertuzzo Martins, Denise Pontes Cavalcanti, Elizabeth Maria Costa de Oliveira e Rosa Maria Baldini: sem vocês não teriam sido anos tão bons!

As diretoras e funcionários das Associações de Pais e Amigos dos Excepcionais de Araras e Sumaré pela atenção e cooperação.

Aos pacientes, objetivo primário de nossos esforços, e às famílias pela cooperação na realização deste trabalho.

Agradecimentos especiais

A Wilson, companheiro, amigo, presente nesse caminho com a palavra de estímulo, com a cooperação nas tarefas de criar e educar nossas crianças e com o respeito por meu trabalho.

A minhas filhas Alexandra Beatriz, Renata Luiza e Ana Maria pela compreensão, amor e alegria.

A minha mãe, Yvonne, que me ensinou a amar os livros, e a persistir diante dos obstáculos da vida.

INDICE

I - INTRODUÇÃO	pag
1.1- Histórico.	1
1.2- As isozimas da anidrase carbônica	3
1.3- A reação enzimática, os substratos e os inibidores da anidrase carbônica.	5
1.4- As características cinéticas das isozimas da anidrase carbônica.	6
1.5- Distribuição e função das isozimas da anidrase carbônica	7
1.6- A anidrase carbônica eritrocitária:	
1.6.a- Níveis enzimáticos.	13
1.6.b- Variantes genéticas e deficiência das isozimas da anidrase carbônica eritrocitária.	14
1.6.c- Variação da anidrase carbônica eritrocitária durante o desenvolvimento.	15
1.6.d- Variação da anidrase carbônica eritrocitária no curso de doenças hematológicas, cardiopulmonares, hepáticas e renais.	16
1.6.e- Variação da anidrase carbônica eritrocitária nos distúrbios hormonais.	19
1.6.f- Correlação da anidrase carbônica eritrocitária com os níveis de zinco eritrocitário e plasmático.	20
1.6.g- Variação da anidrase carbônica eritrocitária nas aberrações cromossômicas.	21
1.7- Outras alterações bioquímicas na síndrome de Down.	22
II - OBJETIVOS	24
III - CASUÍSTICA E MÉTODOS	
III.1- Casuística.	25
III.2- Obtenção das amostras de sangue.	25
III.3- Análise cromossômica	26
III.4- Dosagens Bioquímicas.	
III.4.a- Quantificação da hemoglobina.	28
III.4.b- Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária.	28
III.4.c- Quantificação protéica da anidrase carbônica eritrocitária.	33
III.4.d- Dosagem do zinco plasmático.	38
III.4.e- Dosagens de T3 e T4.	39
III.5- Análise estatística.	40
IV - RESULTADOS	
IV.1- Análise cromossômica.	41
IV.2- Dosagens bioquímicas.	41
V - CONCLUSÕES	52
VI - DISCUSSÃO	53
VII - SUMÁRIO	59
VIII- SUMMARY	61
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

I - INTRODUÇÃO

I.1 - HISTÓRICO

Em 1928, Henriques, estudando a dissociação do dióxido de carbono (CO_2), observou que a velocidade da reação *in vitro* era muito inferior à necessária para o transporte fisiológico do CO_2 sob a forma de íons bicarbonato (HCO_3^-), mas que a velocidade da reação aumentava na presença de sangue ou soluções concentradas de hemoglobina. Esse pesquisador propôs, na época, que a hemoglobina formaria um complexo com o CO_2 , a carbohemoglobina (HbCO_2), que seria responsável pelo transporte do CO_2 dos tecidos para os pulmões.

Alguns anos depois, o grupo de Meldrum e Roughton (Brinkman *et al.*, 1932; Meldrum e Roughton, 1932a,b;1933a,b) isolou, purificou e definiu as propriedades de uma proteína, encontrada nos eritrócitos, responsável pelo aumento de velocidade das reações de hidratação do dióxido de carbono e da desidratação do ácido carbônico, sendo finalmente confirmado que o CO_2 também era transportado sob a forma de HCO_3^- . Tendo ação e propriedades de uma enzima, essa proteína foi denominada ANIDRASE CARBÔNICA (CA). Na mesma época Stadie e O'Brien (1933) também isolaram e determinaram as propriedades cinéticas dessa enzima.

Em 1940, Keillin e Mann demonstraram a presença de zinco na enzima purificada, mas 20 anos se passaram para que Lindskog (1960) confirmasse a presença de um átomo de zinco por molécula da enzima e relatasse que a anidrase carbônica era encontrada em diferentes formas, referindo a existência de 2 isozimas nos eritrócitos. Nesse mesmo ano, Lindskog e Malström (1960) demonstraram que a dissociação do zinco da enzima determinava a perda da atividade enzimática.

A universalidade da anidrase carbônica determinou o aparecimento de diferentes linhas de pesquisa por parte de biólogos, bioquímicos e médicos, tendo a enzima sido demonstrada em plantas, animais, e, no homem, em diferentes tecidos, além dos eritrócitos (vide Maren, 1967; Tashian, 1969; Carter, 1972 e Tashian e Carter, 1976).

Em 1983, no congresso sobre a anidrase carbônica da Academia de Ciências de Nova Iorque, organizado por Tashian e Hewett-Emmett, as últimas informações de diferentes pesquisadores foram reunidas, tendo sido esclarecida a ação da anidrase carbônica em diversos passos metabólicos. Nos anos seguintes Lee *et al.* (1985) relataram que a deficiência de uma das isozimas da anidrase carbônica era a responsável por um dos tipos de osteopetrose e Venta (1983) e Edwards *et al.* (1986 a,b), com o concurso de técnicas de hibridização e o emprego de sondas de DNA, determinaram os *loci* dos genes das isozimas que constituem a família da anidrase carbônica.

1.2 - AS ISOZIMAS DA ANIDRASE CARBÔNICA

Até o momento são conhecidas 5 isozimas da anidrase carbônica (EC.2.2.1.1), sendo 3 citoplasmáticas, CA I, CA II e CA III (Lindskog *et al.*, 1984), uma ligada à membrana celular, CA IV (Wistrand, 1984a), e a última, CA_{mit}, encontrada nos mitocôndrios (Storey *et al.*, 1984).

Os genes das isozimas CA I, CA II e CA III localizam-se no braço longo do cromossomo número 8 (Venta *et al.*, 1983; Edwards *et al.*, 1986a,b) e são um conjunto de genes ligados que se originaram por duplicações de um gene ancestral antes da ramificação dos animais amniotos (répteis, pássaros e mamíferos) (Tashian *et al.*, 1983). Ainda não são conhecidos os *loci* dos genes das isozimas CA IV e CA_{mit} (Wistrand, 1984a; Storey *et al.*, 1984).

Semelhantes em sua configuração, as isozimas apresentam peso molecular em torno de 29000 e 1 átomo de zinco por molécula, são hidrossolúveis, e têm atividade entre pH 6 e 10, com atividade máxima em pH 8 (Maren, 1967). Diferem, entretanto, em suas atividades específicas para diferentes substratos, no efeito dos inibidores, no ponto isoelétrico e na termolabilidade (Rickli *et al.*, 1964; Wistrand e Rao, 1968; Sanyal *et al.*, 1983; Tashian *et al.*, 1983).

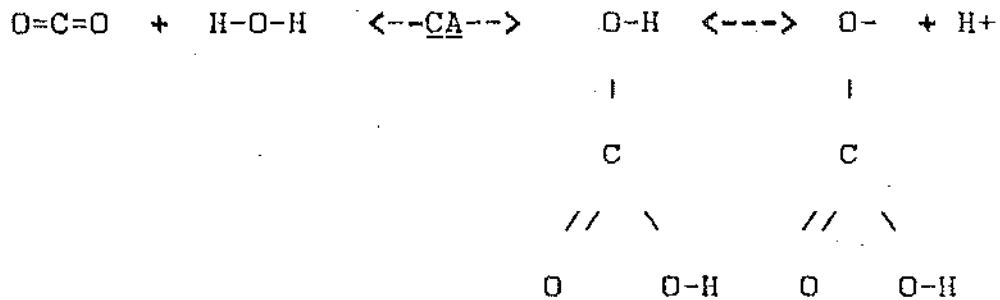
As isozimas citoplasmáticas apresentam 60 a 80 % de homologia nas suas cadeias de aminoácidos sendo as diferenças cinéticas e eletroforéticas entre elas decorrentes de substituições de aminoácidos, das quais as mais importantes, por estarem no sítio ativo da molécula, são as dos resíduos 64 e 200. A isozima CA I apresenta, nessas posições, resíduos de histidina, enquanto que a CA II tem resíduo de treonina ou asparagina na posição 200. A isozima CA III apresenta lisina e treonina nas posições 64 e 200, respectivamente, além de ter 2 resíduos de arginina ou lisina acrescentados nas posições 67 e 91 (Lindskog *et al.*, 1984; Chegwidan *et al.*, 1984).

Caracterizadas como isozimas da anidrase carbônica há poucos anos, a isozima CA IV apresenta composição de aminoácidos e antigenicidade diferente das isozimas citoplasmáticas (Wistrand, 1984a) enquanto que a CA_{m/t} apresenta diferenças estruturais em relação às demais isozimas, o que pode ser concluído devido à sua mobilidade eletroforética diferente e maior dependência às modificações de pH, como o aumento de atividade de cerca de 8 vezes que essa isozima apresenta ao se elevar o pH do meio de 7,0 para 8,0, enquanto as isozimas CA I e CA II mostram um aumento de apenas 2 vezes. (Storey *et al.*, 1984).

Além das isozimas principais, isozimas secundárias de cada uma delas podem ser formadas por modificações na conformação molecular (Headings e Tashian, 1971), por deaminação (Funakoshi e Deutsch, 1969), ou pela combinação desses processos, sendo essas isozimas denominadas pela sigla da isozima principal seguido por algarismos arábicos: CA I-1, CA II-1, CA II-2 etc... (Tashian *et al.*, 1983, 1984). A isozima CA I-1, que representa um estágio do processo de degradação da CA I, era, anteriormente, conhecida como CA A (Osborne e Tashian, 1974).

1.3 - A REAÇÃO ENZIMÁTICA, OS SUBSTRATOS E OS INIBIDORES DA ANIDRASE CARBÔNICA

O substrato natural da anidrase carbônica é o dióxido de carbono, e a enzima catalisa sua hidratação em ácido carbônico, que é ionizado em bicarbonato e hidrogênio (Maren, 1967) :



Numerosos ésteres são utilizados como substratos da CA *in vitro*, tais como o acetato de alfa ou beta-naftila (Tashian e Carter, 1976), o acetato de orto ou para-nitrofenila (Verporte *et al.*, 1967), o acetaldeído (Pocker e Meany, 1960) e a sulfona do ácido 2-hidroxi-5-nitro-alfa-tolueno sulfônico (Sanyal *et al.*, 1983).

O principal inibidor da anidrase carbônica é a acetazolamida, que exerce inibição do tipo não competitiva, além de ser específico para essa enzima (Maren, *et al.*, 1960). A ligação desse inibidor com a molécula enzimática só ocorre fortemente entre pH 6 e 8 (Coleman, 1967). As demais sulfonamidas também agem como inibidores da anidrase carbônica, assim como diversos ânions inorgânicos tais como o cloreto, o iodeto, o sulfeto e o cianeto, entre outros (Maren, 1967; Pocker e Tanaka, 1978; Maren e Couto, 1979).

1.4 - AS CARACTERÍSTICAS CINÉTICAS DAS ISOZIMAS DA ANIDRASE CARBÔNICA

A CA II é a isozima citoplasmática com maior atividade específica em relação ao substrato natural e a maioria dos demais substratos, com exceção do acetato de beta-naftila e do acetato de orto-nitrofenila, em relação aos quais a CA I apresenta maior atividade específica (Verpoorte *et al.*, 1967; Tashian *et al.*, 1972). A CA II também é mais sensível à inibição pela acetazolamida, enquanto que a CA I, embora menos sensível a esse inibidor específico, é bastante inibida pelos ânions inorgânicos, apresentando, mesmo em concentrações fisiológicas de cloreto e bicarbonato, uma redução de cerca de 92% da sua atividade. Esse fato tem sido considerado como indicador de que o papel dessa isozima nos eritrócitos não deve ser a catálise da hidratação do CO_2 (Maren *et al.*, 1976).

Já a CA III, que apresenta a menor atividade específica em relação ao CO_2 e a menor sensibilidade à inibição pela acetazolamida, é tão sensível quanto a CA I em relação à inibição pelos ânions inorgânicos, sendo porém a isozima mais resistente à inibição pelas sulfonamidas benzotiazólicas e tiazólicas (Sanyal, 1984).

A isozima CA IV, ligada à membrana, mostra maior atividade específica que a CA II, mas é igualmente inibida pela acetazolamida (Wistrand, 1984a). A CA_{mit} , embora se assemelhe à CA II por ser pouco sensível à inibição por cloretos sofre maior inibição por sulfetos, diferindo dela também nas demais propriedades cinéticas (Storey *et al.*, 1984).

1.5 - DISTRIBUIÇÃO E FUNÇÃO DAS ISOZIMAS DA ANIDRASE CARBÔNICA

As isozimas da anidrase carbônica não tem a mesma distribuição nos diferentes tecidos, o que tem sido apontado como indicador de que elas tenham papéis fisiológicos diferentes (Tashian *et al.*, 1984). Assim, enquanto a CA I é predominantemente eritrocitária, a CA II é ubíqua, sendo encontrada tanto nos eritrócitos como no cérebro, pulmões, rins, sistema digestivo e diversas glândulas, além de outros tecidos (Tashian *et al.*, 1984). A CA III, encontrada em pequena quantidade nos eritrócitos, é a principal isozima da anidrase carbônica presente na musculatura esquelética, além de ocorrer também, nos hepatócitos (Funakoshi e Deusch, 1971b; Carter *et al.*, 1979, 1981; Chegwid-den *et al.*, 1984). A isozima CA IV foi identificada na membrana das células renais (Wistrand, 1984a) enquanto que a CA_{mit} foi isolada dos mitocôndrios dos hepatócitos (Storey *et al.*, 1984). A tabela 1 apresenta os diferentes tecidos e órgãos nos quais se confirmou a presença da anidrase carbônica na espécie humana.

Embora a reação catalisada pela anidrase carbônica seja a mesma em todos os tecidos, isto é, a hidratação do dióxido de carbono, ela apresenta diferentes papéis fisiológicos, sendo responsável ora pela retirada e transporte do CO₂, ora pela produção de íons hidrogênio e bicarbonato que participam de trocas iônicas através das membranas plasmáticas ou de reações metabólicas específicas (Maren, 1984).

TABELA 1 - Distribuição das isozimas da anidrase carbônica nos diferentes tecidos na espécie humana.

Orgão	Tecido	Isozima	Ref
CÉREBRO	endotélio capilar	I	48,62
	oligodendrócitos	II	48
ESTÔMAGO	células parietais das glândulas	II	50,114
FÍGADO	(homogeneizado)	III	34,114
GLANDULAS SALIVARES	-----		114
GLANDULAS SUDORÍPARAS	ductos espiralados	I,II	9,50,114
INTESTINO	epitélio luminar	I,II	50
	células colunares do cólon	I	52,114
MÚSCULO	músculo esquelético	III	15
OLHO	endotélio da córnea	I	141
	retina	II	61
	crystalino	II	137,139
	epitélio do processo ciliar	II	51
PANCREAS	epitélio dos ductos	II	49,114
PULMÕES	glândulas traqueobrônquicas	II	114
	endotélio	II	118
RINS	epitélio dos túbulos	II,IV	62,114,140
	medula renal	II	138
SANGUE	eritrócitos	I,II,III	17,121
	plasma	III	40
	plaquetas	II	109

No primeiro caso, temos as anidrases carbônicas localizadas nos eritrócitos e no endotélio capilar de diversos órgãos, onde catalisam a hidratação do CO_2 produzido pelo metabolismo, permitindo seu transporte como íon bicarbonato até os pulmões (Swenson *et al.*, 1984). Essa mesma função é realizada pela anidrase carbônica citoplasmática e extracelular do músculo esquelético, que acelera assim a retirada do CO_2 do tecido muscular para o sangue (Gross *et al.*, 1984), e pela enzima presente no cristalino, que facilita a saída do CO_2 produzido pelo metabolismo (Friedland e Maren, 1984). A enzima encontrada no endotélio pulmonar também tem sido responsabilizada pela formação de bicarbonato para facilitar a difusão do dióxido de carbono através da barreira alvéolo-capilar (Swenson *et al.*, 1984). Entretanto, existem indicações de que essa função não seja importante, e que, na realidade, a enzima participe de outros processos metabólicos ou de transporte não relacionados às trocas gasosas (Bidani e Crandall, 1984).

Nas células de ductos, túbulos e epitélios superficiais especializados no transporte iônico, encontra-se a anidrase carbônica citoplasmática e também a enzima ligada à membrana, ambas catalisando a produção dos íons necessários para as trocas iônicas (Spicer *et al.*, 1984). Assim, no estômago, as células parietais secretam os prótons gerados pela anidrase carbônica, acidificando o conteúdo gástrico enquanto liberam o bicarbonato para o líquido intersticial, alcalinizando-o (Vinik e Helsing, 1984; Spicer *et al.*, 1984). No intestino grosso, a anidrase carbônica do epitélio colunar possivelmente provê íons hidrogênio para troca com o sódio intraluminal (Patton *et al.*, 1982).

Nos rins, a enzima dos túbulos contornados proximais gera íons hidrogênio que são trocados pelos íons sódio da luz tubular, facilitando a reabsorção desse último, enquanto que nos túbulos distais os íons hidrogênio promovem a acidificação da urina, além de mediar a reabsorção dos íons bicarbonato e potássio (Dobyan e Bulger, 1982; Cogan, 1984; Dubose, 1984; Wistrand, 1984a; Spicer *et al.*, 1984; Lonnerholm, 1984).

No pâncreas, a anidrase carbônica está implicada na manutenção do elevado teor de bicarbonato do líquido pancreático (Kumpulainen e Jalovaara, 1981), enquanto nos ductos hepáticos e nas glândulas salivares, embora se presume que ela também esteja relacionada às trocas iônicas, seu papel fisiológico ainda não foi esclarecido (Spicer *et al.*, 1982; Carpentier *et al.*, 1984). Bem conhecida é a função da anidrase carbônica citoplasmática encontrada no corpo ciliar do globo ocular, onde ela é responsável pela produção dos íons bicarbonato necessários para o sistema de transporte de ânions na produção do humor aquoso (Kishida *et al.*, 1984).

No plexo coróide, os íons bicarbonato, resultantes da hidratação do CO_2 , catalisada e espontânea, são responsáveis pela maior parte do fluxo do líquido céfalo-raquidiano (LCR) (Vogh, 1980) em cooperação com a Na^+, K^+ -ATPase, que supre os íons sódio (Masuzawa *et al.*, 1984; Vogh e Marem, 1984). Os inibidores da anidrase carbônica diminuem a produção de LCR, o que indica o seu uso em algumas doenças neurológicas (Vogh, 1980).

No sistema nervoso a anidrase carbônica também é encontrada nos oligodendrócitos, astrócitos e na mielina (Anderson *et al.*, 1984; Cammer, 1984; Kumpulainen e Nyström, 1981). Nessas células a enzima é responsável pela hidratação do CO_2 produzido pela atividade neuronal e pela descarboxilação que ocorre na síntese dos neurotransmissores, suprindo H^+ e HCO_3^- para as trocas iônicas necessárias à polarização da membrana do neurônio. (Sapirstein *et al.*, 1984). Sugere-se também um papel regulador da anidrase carbônica quanto à concentração do cálcio intracelular pelo retículo endoplasmático do sistema nervoso periférico (Riley *et al.*, 1984).

Na mielina, a anidrase carbônica aparentemente facilita a conversão dos intermediários glicolíticos em oxalacetato e citrato, estimulando a sua incorporação nos ácidos graxos, que tem grande importância no processo de mielinização (Sapirstein *et al.*, 1984).

A atividade da anidrase carbônica encontrada na mielina do cérebro humano aumenta com a idade (Lees *et al.*, 1980) e, nos nervos periféricos observam-se altos níveis de anidrase carbônica durante o período de crescimento e mielinização, sugerindo que essa enzima seja necessária para a remoção do CO_2 durante essa fase de metabolismo aumentado, assim como para a remoção de íons e água durante a compactação da bainha de mielina (Cammer, 1979). Nos oligodendrócitos a anidrase carbônica também pode ter papel na compactação do citoplasma antes da formação da mielina (Kimelberg e Ricard, 1984).

A enzima encontrada nos osteoclastos produz os íons hidrogênio que participam da dissolução ácida dos minerais da matriz óssea extracelular, permitindo a sua reabsorção (Gay *et al.*, 1984).

No fígado, além de ser encontrada nos ductos, a anidrase carbônica é também observada nos hepatócitos, onde fornece os íons bicarbonato para os passos iniciais da formação da citrulina, no metabolismo da uréia, assim como para a transformação do piruvato em oxalacetato na síntese dos ácidos graxos (Dodgson *et al.*, 1984).

A importância da anidrase carbônica encontrada na tireóide é decorrente do fornecimento de íons bicarbonato que competem com o iodeto pelas substâncias transportadoras de ânions, participando assim da regulação do transporte do iodo através das membranas celulares tireoideanas, sendo esse processo inibido pelo hormônio estimulante da tireóide (TSH) (Chow *et al.*, 1984; Vogh e Maren, 1984).

No sangue, além de estar presente nos eritrócitos, a anidrase carbônica foi também detectada no plasma (Heath *et al.*, 1984) e nas plaquetas, onde participa da agregação plaquetária dependente de trombina (Siffert *et al.*, 1984).

1.6 - A ANIDRASE CARBÔNICA ERITROCITÁRIA

1.6.a - Níveis enzimáticos

A anidrase carbônica eritrocitária tem sido amplamente estudada nos seus aspectos genéticos, fisiológicos e patológicos, pela facilidade de obtenção do sangue periférico para purificação, qualificação e quantificação da enzima por diferentes técnicas (vide Tashian, 1969; Tashian e Carter, 1976).

Das 3 isozimas eritrocitárias, apenas a CA I e a CA II são rotineiramente avaliadas através de eletroforese e dosagens imunológicas e da atividade enzimática (Fine *et al.*, 1963; Ruiz-Reyes e Ramirez-Zorrilla, 1968; Headings e Tashian, 1970; Noorgard-Pedersen e Mondrup, 1971; Wehinger, 1973; Osborne e Tashian, 1974; Ohno *et al.*, 1982, entre outros). Os níveis referidos dessas isozimas são de cerca de 12 mg/gHb de CA I e 2 mg/gHb de CA II (Tashian e Carter, 1976), ou 4,89mg e 0,60 mg, respectivamente, por mililitro de concentrado de eritrócitos (Mondrup *et al.*, 1980). Apesar da CA II apresentar concentrações até 8 vezes menor do que a CA I, sua atividade específica para o CO₂ é 5 vezes maior, sendo responsável por 90% da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária (Wistrand, 1981).

A CA III, descrita recentemente, representa apenas 1% da anidrase carbônica eritrocitária total, e, sendo sua atividade específica ainda menor do que a da CA I, ela tem pequena participação na atividade eritrocitária total da enzima (Wistrand, 1984a).

A atividade da anidrase carbônica eritrocitária é muito superior à necessária para liberar o CO₂ nos capilares pulmonares, sendo que 2% dessa quantidade são suficientes para essa função no repouso e 4% durante o exercício (Wistrand, 1981). Entretanto, refere-se uma diminuição significativa da quantidade e da atividade específica da isozima CA I eritrocitária, sem modificações da CA II, após a realização de exercício físico (Ohno *et al.*, 1982).

1.6.b - Variantes genéticas e deficiência das isozimas da anidrase carbônica eritrocitária.

Conhecem-se numerosas variantes eletroforéticas das isozimas CA I e CA II, determinadas geneticamente, sendo as frequências em populações da ordem de 1:3000 e 1:6000 respectivamente. Nenhuma dessas variantes relacionou-se a condições patológicas (Tashian e Carter, 1976; Tashian *et al.*, 1980).

Por outro lado, as variantes inativas da CA I, que têm comportamento imunológico e eletroforético indistinguível da enzima original, têm-se relacionado com quadros clínicos específicos, como ocorre com uma variante inativa encontrada em pacientes com acidose tubular renal e surdez. Essa variante difere da mais frequente em apenas um resíduo de aminoácido (Shapira *et al.*, 1974). Outra forma de CA I, também inativa, apresentando menor afinidade na ligação com o zinco, foi observada em uma família com acidose tubular renal primária (Kondo *et al.*, 1978). Uma terceira variante enzimática inativa, descrita em pacientes com aldosteronismo primário, é capaz de recuperar a atividade após proceder-se à adrenalectomia (Kondo *et al.*, 1984).

A associação de quadros clínicos específicos com a deficiência de CA I é ainda discutível, uma vez que tal deficiência, já foi descrita em algumas famílias que não apresentavam nenhuma alteração metabólica ou clínica, não havendo sequer aumento compensatório das demais isozimas da anidrase carbônica (Kendall e Tashian, 1977)...

Já a deficiência de CA II determina um quadro clínico complexo, como se poderia esperar pela ampla distribuição dessa isozima nos diferentes tecidos. Os homozigotos deficientes de CA II apresentam osteopetrose, acidose tubular renal e calcificações dos núcleos da base, podendo até apresentar retardamento mental (Sly *et al.*, 1983), quadro clínico esse conhecido como "doença do cérebro de mármore" (*Marble Brain Disease*) (Ohlson *et al.*, 1980). Nesses pacientes foram observados aumentos, provavelmente compensatórios, dos níveis de CA I e CA III eritrocitárias (Carter *et al.*, 1984). A identificação de heterozigotos para a deficiência de CA II e o diagnóstico pré-natal são possíveis por meio de técnicas que utilizam a inibição diferencial das isozimas (Sundaram *et al.*, 1986).

1.6.c - *Variação da anidrase carbônica eritrocitária durante o desenvolvimento*

A partir da 22ª semana de vida intra-uterina é possível detectar-se atividade e concentrações pequenas da anidrase carbônica eritrocitária que aumentam proporcionalmente à idade gestacional, passando de cerca de 5% do nível do adulto no início do terceiro trimestre, para 20 a 30% desse nível ao término da gestação (Berfenstan, 1952; Wehinger, 1973; Wehinger e Peikert, 1973; Mondrup *et al.*, 1980).

O nível das isozimas aumenta em velocidades diferentes, encontrando-se, no recém nascido a termo, níveis das isozimas correspondentes a 1/16 do nível do adulto para a CA I e 1/10 para a CA II (Mondrup *et al.*, 1980).

A concentração da anidrase carbônica eritrocitária continua aumentando após o nascimento, sendo esse aumento comparável ao que ocorre com a hemoglobina A₂ (Boyer *et al.*, 1983) e correlacionado à curva de crescimento estatural (Moore, 1984). Considera-se que o nível do adulto seja atingido na infância ou na adolescência, existindo divergências a esse respeito (Berfenstan, 1952; Wehinger, 1973; Moore, 1984).

1.6.4- *Variação da anidrase carbônica eritrocitária no curso de doenças hematológicas, cardiopulmonares, hepáticas e renais.*

A quantidade e a atividade da anidrase carbônica encontram-se alteradas nas anemias crônicas, mas não nas anemias agudas decorrentes de hemólise ou hemorragia (Lie-Injo *et al.*, 1970). Observa-se aumento da CA I e da CA II nos eritrócitos de pacientes com anemia megaloblástica (Weatherall e McIntyre, 1967; Ruiz-Reys *et al.*, 1968; Lie-Injo *et al.*, 1970; Dunbar e Tudhope, 1974), e os pacientes tratados adequadamente com vitamina B₁₂ não só normalizam o nível da anidrase carbônica eritrocitária, como chegam a apresentar valor abaixo do normal (Dunbar e Tudhope, 1974). O aumento da CA I é também encontrado em puérperas com alterações megaloblásticas (Ruiz-Reyes, 1969) e em pacientes com eritropoese megaloblástica consequente a terapia anticonvulsivante (Dropeza *et al.*, 1970).

Em outras anemias crônicas os dados de literatura são contraditórios. Assim, na talassemia beta, têm-se relatado atividade normal (Wehinger, 1973) ou aumentada (Lie-Injo *et al.*, 1970) de anidrase carbônica enquanto que na anemia ferropriva, a atividade pode estar diminuída (Wehinger, 1973) ou aumentada (Lie-Injo *et al.*, 1970). Em nosso laboratório observou-se que, na eletroforese de hemoglobina, a faixa correspondente a CA I encontra-se aumentada tanto na anemia ferropriva como na talassemia beta (Ramalho, 1978), sendo utilizada como referência para a avaliação do nível da hemoglobina A₂ através da determinação do índice HbA₂/CA I. Embora a CA I apresente aumento tanto na anemia ferropriva como na talassemia beta, os valores desse índice são significativamente maiores nos pacientes com traço talassêmico, devido ao grande aumento da fração hemoglobínica A₂, ao contrário do que ocorre nos pacientes com anemia ferropriva, nos quais há diminuição da hemoglobina total e frações (Ramalho, 1978).

Já na anemia falciforme há referências de que a isozima CA I da anidrase carbônica eritrocitária encontra-se em nível abaixo do normal, retornando aos valores normais após zincoterapia.

Também encontra-se nível aumentado da anidrase carbônica eritrocitária em alguns pacientes com leucemia (Lie-Injo *et al.*, 1970), embora a diminuição dessa enzima a nível compatível com o observado em recém nascidos, tenha sido encontrada em um paciente com leucemia mielóide crônica juvenil (Wehinger, 1973).

Nas policitemias também há aumento da anidrase carbônica eritrocitária, sendo o mais importante o que ocorre na policitemia vera, na qual observam-se aumentos de 40% da CA I e 60% da CA II, enquanto nas policitemias secundárias às cardiopatias cianóticas encontra-se aumento apenas da CA I (Funakoshi e Deustch, 1971a).

O aumento da CA I também é observado em pacientes com enfisema pulmonar que apresentam elevação da pCO_2 (Funakoshi e Deustch, 1971a) e em alguns casos de doenças pulmonares com obstruções severas (Lie-Injo *et al.*, 1970). Já em crianças portadoras de cardiopatias cianóticas e naquelas com insuficiência pulmonar não foram encontradas alterações da anidrase carbônica eritrocitária (Wehinger, 1973).

Com relação a hepatopátias, há referências somente de que, em pacientes com cirrose hepática, ocorre aumento da isozima CA I (Lie-Injo *et al.*, 1970).

Na insuficiência renal crônica também observa-se aumento da CA I, fato que não tem sido considerado como mecanismo compensatório, uma vez que esse aumento não está relacionado nem à duração e nem à gravidade dos distúrbios ácido-básicos ou da uremia (Drukker *et al.*, 1972). Esse aumento, entretanto, apresenta correlação negativa com o *clearance* de creatinina e sempre ocorre nos pacientes que apresentam reserva alcalina menor do que 20 mEq/l (Mondrup e Anker, 1974). Desse modo, a acidose também pode ser considerada como estímulo para o aumento da CA I, o que é reforçado pelo fato de fetos submetidos a acidose no final da gestação apresentarem um aumento do nível dessa isozima (Moynihan, 1980).

1.6.e -Variação da anidrase carbônica eritrocitária nos distúrbios hormonais.

Intensamente estudadas têm sido as relações da anidrase carbônica eritrocitária com os hormônios tireoidianos, observando-se nível enzimático diminuído no hipertireoidismo e elevado no hipotireoidismo. Em ambos os casos há normalização após a correção do distúrbio hormonal (Weatherall e McIntyre, 1967; Anker e Mondrup, 1974; Lie-Injo *et al.*, 1967, 1970; Magid, 1970; Noorgard-Pedersen e Lindholm, 1972).

Em pacientes com tireotoxicose a isoforma CA I da anidrase carbônica eritrocitária apresenta nível de 37% do normal enquanto a CA II, de 80% (Funakoshi e Deutsch, 1971a) podendo haver aumento da concentração da hemoglobina fetal (Lie-Injo *et al.*, 1967; Noorgard-Pedersen e Lindholm, 1972). A correlação negativa observada entre o nível de tiroxina plasmática e a concentração da anidrase carbônica eritrocitária (Noorgard-Pedersen e Lindholm, 1972; Anker e Mondrup, 1974) é devida ao efeito inibidor desse hormônio na síntese da enzima nas células precursoras da série eritrocítica (Magid, 1970a). Embora no hipertireoidismo haja diminuição tanto da CA I quanto da CA II, as duas isoformas não respondem igualmente às modificações do nível hormonal (Headings e Tashian, 1970), pois a tiroxina inibe preferencialmente a síntese da CA I (Taniguchi *et al.*, 1978).

A observação de que ocorre aumento da CA II em gestantes (Noorgard-Pedersen e Lindholm, 1972) e da CA I e CA II no momento do parto sugere que os hormônios sexuais também possam determinar modificações quantitativas dessas isoformas (Funakoshi e Deutsch, 1971a). Entretanto, não se observam alterações da anidrase carbônica em mulheres que utilizam anticoncepcionais hormonais (Noorgard-Pedersen e Lindholm, 1972).

1.6.f - *Correlação da anidrase carbônica eritrocitária com os níveis de zinco eritrocitário e plasmático.*

A concentração de zinco eritrocitário, cerca de 1300 μ g% no adulto e 500 μ g% no recém nascido, é proporcional a atividade da anidrase carbônica eritrocitária (Berfenstan, 1952) e acompanha as variações dessa enzima tanto nas situações fisiológicas quanto nas patológicas (Vallee *et al.*, 1949).

A concentração normal do zinco plasmático varia no adulto de 0,5 a 1,5 μ g/ml (Talbot e Ross, 1960; Prasad *et al.*, 1975), podendo ocorrer alterações na presença de algumas doenças, como é o caso da anemia falciforme, onde a diminuição do zinco eritrocitário, plasmático e capilar decorrente da perda urinária desse metal, acompanha a diminuição de anidrase carbônica eritrocitária, havendo retorno ao nível enzimático normal após zincoterapia (Prasad *et al.*, 1975). Situação inversa ocorre nos pacientes com insuficiência renal, onde há aumento da CA I e diminuição do zinco plasmático, provavelmente pela utilização do mesmo para a síntese da enzima (Mondrup e Anker, 1974; Drukker *et al.*, 1972). Na anemia perniciosa, onde também se observa aumento da CA I, tanto o zinco eritrocitário como o plasmático encontram-se elevados (Dunbar e Tudhope, 1974), ocorrendo o mesmo nas policitemias (Talbot e Ross, 1960).

1.6.g -*Variação da anidrase carbônica eritrocitária nas aberrações cromossômicas.*

As primeiras avaliações dos níveis da anidrase carbônica eritrocitária em indivíduos portadores de aberrações cromossômicas foram realizadas em pacientes com síndrome de Patau (trissomia do cromossomo 13) (Gerald *et al.*, 1964; Lee *et al.*, 1965; Walzer *et al.*, 1966; Weatherall e McIntyre, 1967). Neles observou-se diminuição do nível da isozima CA I, acompanhado de diminuição da concentração da Hb A₂ e aumento da concentração da Hb F, tendo-se sugerido que tais alterações seriam decorrentes de um retardamento na maturação desses pacientes (Lee *et al.*, 1965).

Já nos pacientes com síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) constatou-se que ocorria aumento da quantidade de CA I (Wehinger, 1973; Ramalho, 1978). Apesar de numerosos estudos bioquímicos terem sido realizados em pacientes com essa síndrome, o aumento de anidrase carbônica eritrocitária nos mesmos permaneceu sem maiores estudos durante cerca de uma década. Em 1984, Ohno *et al.* com o concurso de técnicas imunológicas confirmaram o aumento do nível da isozima CA I nesses pacientes. Esses autores não consideraram esse aumento como decorrente do efeito de dose gênica e sugeriram que novos estudos sobre a fisiopatologia da síndrome de Down eram necessários.

1.7 - OUTRAS ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS NA SÍNDROME DE DOWN

Antes de se conhecerem os aumentos da anidrase carbônica na síndrome de Down, outras variáveis bioquímicas haviam sido pesquisadas nessa síndrome, tendo-se descrito concentrações plasmáticas normais de cálcio, fósforo, ácido úrico e zinco, diminuição da atividade da serotonina no sangue total e aumento de diversas enzimas como a transferase da galactose-1-fosfatouridil, as fosfatases leucocitárias alcalina e ácida, a 5-nucleotidase leucocitária, a desidrogenase do 6-fosfato de glicose eritrocitária, a NADPH-redutase de metemoglobina, a hexoquinase e a fosfohexoquinase (Rosner *et al.*, 1965; Pantelakis *et al.*, 1970). Nesses pacientes, os aumentos observados nas concentrações das enzimas hexoquinase, G-6-PD e NADPH-redutase de metemoglobina, embora significativos, não correspondem ao aumento de 50% esperado caso resultassem do efeito de dose gênica, como ocorre em relação à transferase eritrocitária e à fosfatase alcalina leucocitária (Rosner *et al.*, 1965). Também a enzima fosfohexoquinase apresenta aumento que poderia ser atribuído ao efeito de dose gênica (Pantelakis *et al.*, 1970).

Uma outra enzima que se encontra elevada na síndrome de Down é a dismutase de superóxido-1 (SOD-1) cujo gene está localizado no cromossomo 21 (Sinet *et al.*, 1974, Ohno *et al.*, 1984). Já os aumentos da catalase (Ohno *et al.*, 1984) e da peroxidase de glutatíão (Sinet *et al.*, 1975, Ohno *et al.*, 1984) não podem ser explicados por efeito de dose gênica, mas como resposta ao aumento de peroxidases resultantes do aumento da conversão dos radicais superóxido consequentes ao excesso de SOD-1 (Sinet *et al.*, 1982).

Quanto às hemoglobinas, a hemoglobina fetal tende a apresentar valores menores ao nascimento, diminuindo mais rapidamente nos primeiros meses, enquanto que a hemoglobina A₂ aumenta mais rapidamente nesse período. Isso é considerado uma situação inversa à que ocorre na trissomia do cromossomo 13, isto é, tem-se uma ontogênese acelerada, em relação às hemoglobinas, na trissomia do cromossomo 21 (Wilson *et al.*, 1968).

Referem-se alterações hormonais nos pacientes com síndrome de Down, como o aumento de FSH, LH e prolactina e a resposta alterada à insulina (Pintor *et al.*, 1981). Os hormônios tireóidicos tem sido pesquisados nesses pacientes pela semelhança do quadro clínico com o de pacientes com hipotireoidismo, tendo-se encontrado uma maior frequência de hipotireoidismo, ou hipotireoidismo subclínico (Murdoch *et al.*, 1977; Aldenhoff *et al.*, 1981; Pueschel & Pezzullo, 1985; Loudon *et al.*, 1985; Cutler *et al.*, 1986).

II- OBJETIVOS

Considerando que os níveis da anidrase carbônica eritrocitária foram avaliados até o momento em pequeno número de pacientes com síndrome de Down (Wehinger, 1973; Ohno *et al.*, 1984), e que nesses pacientes não foram estudados os fatores que podem modificá-los, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar as alterações que foram observadas por Wehinger (1973) e Ohno *et al.* (1984), investigando em pacientes com síndrome de Down a concentração protéica da anidrase carbônica eritrocitária e de cada isozima, bem como a atividade enzimática total, verificando, simultaneamente, os níveis de zinco plasmático, de tiroxina (T₄), de triiodotironina (T₃) e de hemoglobina.

III. CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1 - Casuística

A casuística estudada consistiu de 32 pacientes portadores de síndrome de Down, todos com idade superior a 5 anos e provenientes do serviço de Genética Clínica do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP e das escolas da Associação dos Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) das cidades de Sumaré, SP, e Araras, SP.

Os 41 indivíduos do grupo controle, por sua vez, foram um irmão e/ou um genitor de cada paciente estudado, levando-se em consideração que esses indivíduos têm em comum com os pacientes, em média, a metade da constelação gênica, além de compartilharem do mesmo ambiente.

III.2 - Obtenção das amostras de sangue

Após repouso de uma hora, procedeu-se à coleta de sangue, por punção venosa, utilizando a heparina sódica na razão de 0,01 a 0,02ml/ml de sangue como anticoagulante. Utilizou-se somente seringa e agulha descartáveis para esse procedimento.

O volume de sangue coletado, em cada caso, foi de cerca de 5 ml, separando-se uma alíquota de 0,5 ml para realização do estudo do cariótipo, quando necessário, e uma de 0,5ml para a dosagem da hemoglobina total.

Os restantes 4 ml foram centrifugados a 1800rpm, durante 10 minutos, sendo o plasma assim obtido estocado a -20°C para posterior dosagens de zinco, T3 e T4. O concentrado de hemácias, por outro lado, foi lavado 3 vezes em solução salina a 0,9%, separando-se após a última centrifugação, também de 1800rpm durante 10 minutos, uma alíquota de 1 ml que foi estocada a -20°C , para posterior extração da fração protéica correspondente à anidrase carbônica.

Ao restante do concentrado de hemácias adicionaram-se 3 volumes de água destilada para hemólise, seguindo-se a separação do estroma pela adição de igual volume de clorofórmio, agitação vigorosa da mistura e centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante destinado à determinação da atividade da anidrase carbônica foi então diluído na razão 1/10 (v/v) em água destilada, obtendo-se um hemolisado na diluição 1/40 (v/v). Todos os procedimentos que se seguiram à coleta, incluindo o transporte ao laboratório, foram realizados à temperatura de 4°C .

III.3 - Análise cromossômica

As culturas de linfócitos foram feitas de acordo com a técnica modificada de Moorhead *et al* (1960) descrita a seguir.

Da alíquota de sangue venoso heparinizado separou-se 0,3 ml (15 gotas) que foram adicionados a um frasco contendo 5 ml de meio de cultura HAM F-10 com 20% de soro fetal bovino e 0,1 ml de fito-hemaglutinina, incubando-se o frasco em estufa a 37°C durante 72 horas. Cerca de 30 minutos antes da interrupção da cultura adicionou-se 0,1 ml de colquicina à 0,04 mM.

Ao retirar os frascos da estufa, eles foram agitados e em seguida centrifugados a 900rpm durante 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante. Realizou-se o tratamento hipotônico progressivo pela técnica de Pinto Jr.[#] acrescentando-se a cada tubo 1 ml de uma solução de KCl a 0,075 M por 5 vezes, com intervalos de 10 minutos. Interrompeu-se a hipotonia pela adição de 0,5 ml de fixador (solução de metanol e ácido acético 3/1 (v/v)), e centrifugou-se o material durante 5 minutos a 900 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Após ressuspender-se o material em 4 ml de fixador, procedeu-se a nova centrifugação a 900 rpm durante 5 minutos. Esse procedimento foi então repetido por mais 3 vezes, e após a última centrifugação, o material obtido foi utilizado para a preparação das lâminas, coradas pela imersão em uma solução a 6% de Giemsa em tampão Sorensen a 0,05 M, pH 6.8 durante 10 minutos. Nos casos em que se detectaram translocações e mosaicismos, as preparações obtidas foram posteriormente submetidas a técnicas de produção de bandas G (Sanchez *et al.*, 1973) e bandas Q (Caspersson *et al.*, 1970).

Nos pacientes com síndrome de Down analisaram-se inicialmente, 11 metáfases e, naqueles em que foi detectado mosaicismo, aumentou-se a análise para 50 metáfases. Da paciente na qual não se detectaram células trissômicas em linfócitos de sangue periférico (L.B.A), obteve-se material de biópsia de pele para cultura de fibroblastos. Já nos indivíduos que constituíram o grupo controle, analisaram-se 32 metáfases de cada um deles, o que permitiu afastar os mosaicismos de até 5% com probabilidade de 80,6%, e de 10% com probabilidade de 96,6% (Belguelman, 1982)

[#]comunicação pessoal.

III.4 - Dosagens bioquímicas

III.4.a- Quantificação da hemoglobina

A quantificação da hemoglobina total e da hemoglobina presente no hemolisado utilizado para a dosagem da atividade da anidrase carbônica eritrocitária foi feita pela determinação da absorbância do hemolisado diluído 1000 vezes em água destilada em 546 nm. Para o cálculo da concentração da hemoglobina utilizou-se o coeficiente de extinção molar da hemoglobina, nesse comprimento de onda, que é de 13,8.

III.4.b- Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária

Realizou-se a determinação da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária segundo modificação da técnica descrita por Tashian (1969), usando-se o acetato de alfa-naftila como substrato da enzima.

Em dois tubos pipetou-se 0,05 ml do hemolisado diluído 1/40 (v/v) em água destilada, ao qual acrescentou-se 1ml de acetato de alfa-naftila a 1,7mM em tampão fosfato 0,02M, pH 7,0, contendo dioxana a 2%. A um dos tubos adicionou-se, antes do substrato, 1ml de acetazolamida a 8mM em uma solução diluída de NaOH, seguindo-se incubação em banho-maria durante 20 minutos a 37°C. No outro tubo a acetazolamida foi adicionada após o período de incubação. Ao final acrescentou-se, a ambos os tubos, 0,5ml de 5-cloro-o-toluidina (*Fast Red-TSALT*) a 2 mg/ml em uma solução de laurilsulfato de sódio a 1,2%.

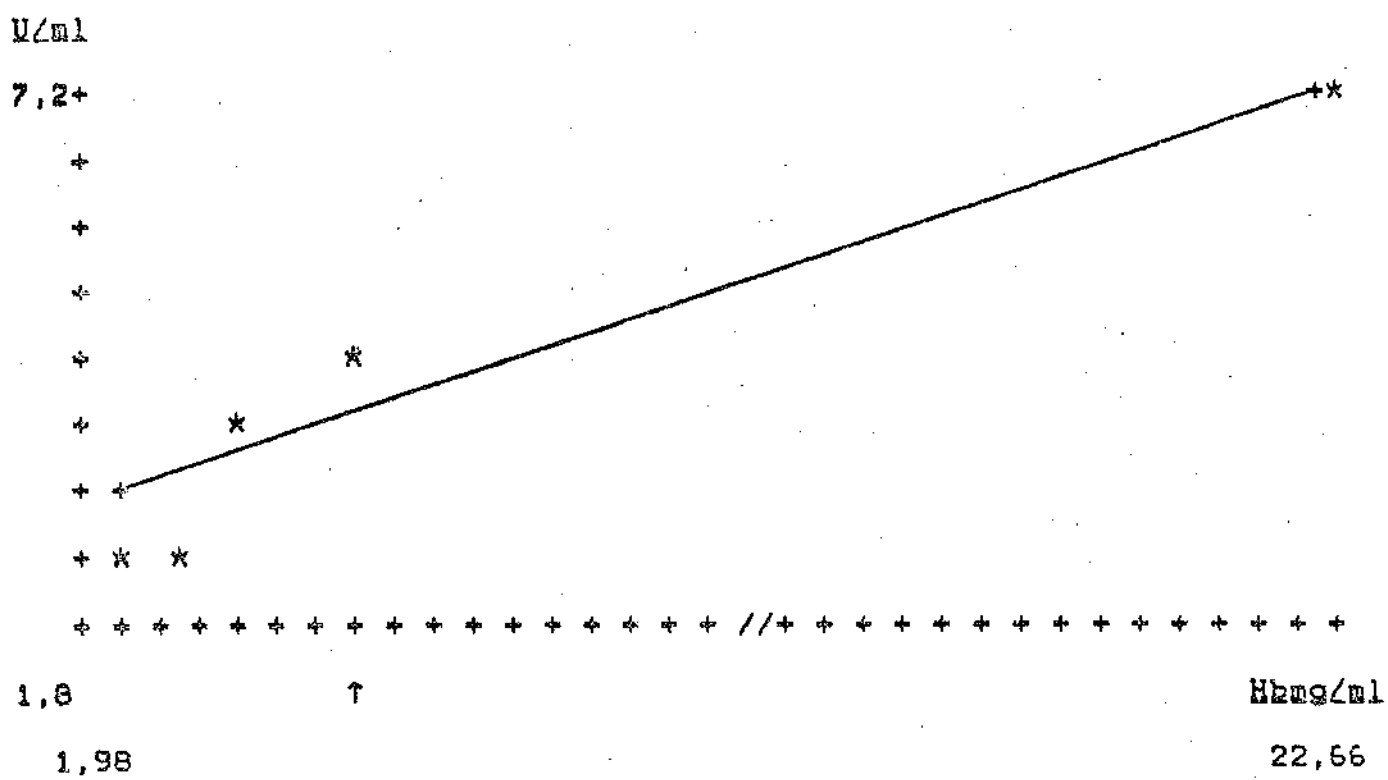
Após aguardar 15 minutos para o completo desenvolvimento da cor mediu-se a absorbância em 555nm, contra tubos branco contendo água destilada em lugar da enzima e seguindo os mesmos procedimentos acima, isto é, um tubo branco recebeu 1ml de acetazolamida no início da incubação enquanto que ao outro acrescentou-se esse inibidor após 20 minutos de incubação a 37°C. Durante o ensaio manteve-se o pH da mistura de reação entre 7,0 e 7,2, pois valores de pH superiores a esses determinam hidrólise espontânea e significativa do acetato de alfa-naftila (Mestriner, 1970). Todas as determinações foram realizadas em duplicata.

A atividade da anidrase carbônica eritrocitária corresponde à diferença $\Delta A = (A_{555} \text{ Tubo 2} - A_{555} \text{ Tubo 1})$ sendo o tubo 1 aquele que recebeu acetazolamida no início da incubação e o tubo 2 o que recebeu esse inibidor após transcorridos os 20 minutos da incubação a 37°C. Considerou-se 1 unidade (U) de atividade como 1 μmol de acetato de alfa-naftol produzido por minuto por ml de hemolisado. A atividade específica foi calculada em relação à quantidade de hemoglobina (mg/ml) presente no hemolisado, e expressa em $\frac{U}{\text{mg Hb}}$. Nas condições citadas acima, a atividade enzimática (U/ml) é função linear da concentração do hemolisado, avaliada pela concentração de hemoglobina (mgHb/ml), como mostrado na tabela 2 e na figura 1. Como consequência, adotou-se a diluição do hemolisado a 1/40 para as determinações da atividade da anidrase carbônica eritrocitária, pois essa diluição fornece valores de absorbância adequados. Testou-se a reprodutibilidade da técnica pela determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária em 10 alíquotas de 0,05 ml do hemolisado diluído a 1/40 em água destilada (v/v) de um indivíduo adulto masculino normal, obtendo-se o coeficiente de variação menor que 10%, como mostra a tabela 3.

 TABELA-2 - Atividade da anidrase carbônica eritrocitária (U/ml)
 ----- em concentrações crescentes de hemolisado. -----

<u>diluição</u>	<u>Hmg/ml</u>	<u>A-1</u>	<u>A-2</u>	<u>diferença</u>	<u>U/ml</u>
1/100	1,98	0,030	0,048	0,018	1,80
1/ 80	2,78	0,045	0,065	0,020	2,00
1/ 60	3,36	0,094	0,126	0,032	3,20
1/ 40	5,46	0,136	0,177	0,041	4,10
1/ 10	22,66	0,548	0,620	0,072	7,20

 A-1 e A-2 são as absorbâncias dos tubos que receberam acetazolamida
 ----- no início e após 20 minutos de incubação a 37°C respectivamente



INTERCESSÃO = 1,922 INCLINAÇÃO = 0,24 r = 0,9545

Figura 1: Correlação entre atividade enzimática da anidrase carbônica eritrocitária total e as concentrações de hemoglobina em 5 diluições do hemolisado (r = 0,95). A seta indica a concentração de hemoglobina adotada para a determinação da atividade enzimática.

TABELA-2-Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária em 10 alíquotas de 0,05 ml do hemolisado diluído em água destilada 1/40 (v/v) de um indivíduo masculino adulto normal.

	A-1	A-2	ΔA
1	0,092	0,113	0,021
2	0,086	0,107	0,021
3	0,089	0,108	0,019
4	0,091	0,112	0,021
5	0,091	0,114	0,023
6	0,085	0,106	0,021
7	0,088	0,110	0,022
8	0,081	0,105	0,024
9	0,082	0,107	0,025
10	0,085	0,110	0,025
MÉDIA	0,087	0,109	0,022
DESVIO PADRÃO	0,0038	0,0031	0,002
COEFICIENTE DE VARIAÇÃO	4,40%	2,82%	8,96%

A-1 e A-2 são as absorvâncias dos tubos que receberam acetazolamida no início e após 20 minutos de incubação a 37°C respectivamente

III.4.c. Quantificação Protéica da anidrase carbônica eritrocitária

Extração da enzima- Para a obtenção de uma solução de anidrase carbônica eritrocitária parcialmente purificada utilizou-se a técnica da extração pelo etanol-clorofórmio (Meldrum e Roughton, 1933b; Nyman, 1961; Rickley *et al*, 1964 e Tashian e Carter, 1976). A adaptação descrita a seguir foi a que apresentou melhor reprodutibilidade em nosso laboratório, com coeficiente de variação menor que 5%, como mostra a tabela 4.

Hemolisou-se 0,5 ml do concentrado de hemácias lavadas com 3 volumes de água destilada gelada (4°C), ficando a mistura em repouso durante 30 minutos à 4°C. A seguir, mantendo-se o hemolisado em banho de gelo, acrescentou-se, gota a gota, simultaneamente e sob agitação constante, 0,5ml de etanol a 95% e 0,62ml de clorofórmio, ambos à temperatura de 0°C, mantendo-se a agitação durante mais 15 minutos. A pasta espessa obtida permaneceu em repouso, em banho de gelo, durante outros 15 minutos, seguindo-se a centrifugação do material em centrífuga refrigerada a 4°C, durante 30 minutos, a 6000 rpm. Filtrou-se o sobrenadante e procedeu-se a nova centrifugação do mesmo após a adição de 0,1 ml de clorofórmio gelado. O sobrenadante obtido prestou-se à realização da eletroforese da anidrase carbônica e à dosagem da proteína.

Dosagem da concentração de proteína-A dosagem de proteína da solução de anidrase carbônica foi feita pelo método da reação do biureto (Layne, 1957), com pequenas modificações, como descrito a seguir.

TABELA 4 = Dosagem protéica pelo método do biureto, de 8 soluções de anidrase carbônica obtidas de extrações simultâneas, em alíquotas de uma amostra de sangue venoso de um indivíduo normal do sexo feminino.

Tubo	mg/ml	
1	0,930	
2	1,040	Média=0,941 DP. = 0,046
3	0,930	
4	0,930	Coefficiente de variação = 4,87%
5	0,970	
6	0,910	
7	0,930	
8	0,890	

Acrescentou-se 0,5ml da solução de anidrase carbônica parcialmente purificada a 2ml de solução de biureto. Após repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorbância da solução em 546nm. O cálculo da concentração de proteína, em cada amostra, foi realizado pela comparação dos valores de absorbância obtidos com aqueles de uma curva padrão preparada com solução de albumina bovina. Com os dados da concentração de proteína da solução e o volume total obtido na purificação de 0,5ml de concentrado de hemácias, calculou-se a concentração de anidrase carbônica por ml de concentrado de hemácias pela fórmula:

$$\text{mg/ml hemácias} = \frac{[2[\text{mg/ml da solução}] \times [\text{volume da solução (ml)}]]}{[\text{vol. do concentrado de hemácias (ml)}]}$$

Eletroforese de anidrase carbônica- A eletroforese para determinação das proporções das isozimas da anidrase carbônica eritrocitária foi realizada em fitas de acetato de celulose, em tampão tris-glicina pH 8.6, sob 180 volts, durante 1 hora. Nessas condições obtêm-se, a partir da origem, 3 bandas, a saber CA II, CA I e CA I-1 sendo a 2ª banda a mais concentrada (Ruiz-Reyes e Ramirez-Zorrilla, 1968; Tashian e Carter, 1976). Ao término da eletroforese realizou-se a coloração das fitas mantendo-as imersas em uma solução de amido negro (0,5g de amido negro em 45ml de metanol, 10ml de ácido acético e 100ml de água bidestilada) durante 3 minutos. A seguir, realizou-se a descoloração do fundo pela imersão das fitas, sucessivamente, em 3 cubas contendo solução descorante (45ml de metanol, 10ml de ácido acético e 100ml de água bidestilada) durante 1 hora nas primeiras 2 cubas e de 16 a 20 horas na última.

Após a fixação procedeu-se à diafanização das fitas de acetato de celulose pela sua desidratação em metanol durante 30 segundos seguida pela imersão em uma solução constituída de 17 ml de metanol, 2,8 ml de ácido acético e 0,2 de glicerol durante 1 minuto. As fitas foram então montadas em lâminas e incubadas durante 30 segundos em estufa a 60°C. A densitometria das fitas diafanizadas, em 578nm, fornece um gráfico que apresenta 3 picos correspondentes às isozimas CA-II, CA-I e CA-I(1), como ilustra a Fig.2. Por métodos de integração das curvas obtidas pôde-se calcular os percentuais de cada isozima. Assim, conhecendo-se a concentração de proteína presente na solução utilizada para eletroforese, foi possível estimar a concentração de cada isozima, sendo os resultados dados em miligrama de proteína por mililitro de concentrado de hemácias (mg/ml).

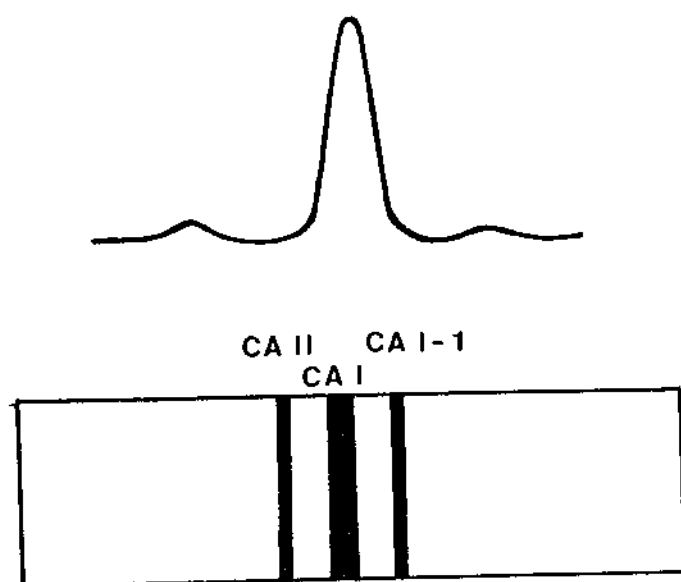


Figura 2 - Esquema de eletroforese de anidrase carbônica eritrocitária e respectivo perfil densitométrico.

III.4.d - Dosagem do zinco plasmático

O zinco plasmático foi dosado de acordo com o método proposto pela Unicam para a dosagem no espectrofotômetro de absorção atômica modelo Unicam SP 90 (*Zinc in blood serum, Unicam atomic absorption method ZN2, Pye Unicam method sheets, UNICAM SP90 Atomic Absorption Spectrophotometer*). Realizou-se a desproteinização de 1ml de plasma pela adição de igual volume de ácido tricloroacético a 10%. Após agitação e centrifugação a 3000 rpm, durante 20 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos graduados, anotando-se o volume e adicionando-se, ao mesmo, água desionizada até se obter um volume final de 10ml de solução, que foi utilizada para a leitura da absorbância. A concentração de zinco, em cada amostra, expressa em $\mu\text{g/ml}$ de plasma, foi calculada pela comparação da absorbância da amostra com aquela fornecida por uma curva padrão. Para evitar contaminação pelo zinco, todo o material de vidro utilizado nessa determinação foi previamente lavado com ácido nítrico.

III.4.e - Dosagens de T₃ e T₄.

As dosagens dos hormônios tireóidicos T₃ e T₄ foram realizadas por radioimunoensaio, utilizando-se o "Kit" Trilab-RIE T₃/T₄, conforme a rotina do laboratório do Departamento de Patologia Clínica da FCM da UNICAMP, sendo os resultados expressos em µg/dl para o T₄ e ng/dl para o T₃.

Dosagem de T₃: a 0,1 ml de sêro adicionou-se 0,1ml de anticorpo anti-T₃ e 0,2ml de T₃-¹²⁵I, agitando-se no "Vortex". Após incubação a 37°C durante 60 minutos acrescentou-se 1ml do segundo anticorpo e manteve-se em repouso a temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida à centrifugação a 3000 a 4000 rpm durante 20 minutos decantou-se o sobrenadante por inversão e realizou-se a contagem em contador gama por 1 minuto. Obteve-se a concentração de T₃ através do cálculo do percentual de ligação realizado pela comparação da média das leituras das duplicatas após ser descontado o tubo branco com uma curva padrão obtida por 5 padrões que acompanham o "Kit."

Dosagem de T₄: a 0,01 ml de sêro adicionou-se 0,1ml de anticorpo anti-T₄ e 0,1ml de T₄-¹²⁵I, agitando-se no "Vortex". Após incubação a 37°C durante 60 minutos acrescentou-se 1ml do segundo anticorpo e manteve-se em repouso a temperatura ambiente durante 10 minutos. Em seguida à centrifugação a 3000 a 4000 rpm durante 20 minutos decantou-se o sobrenadante por inversão e realizou-se a contagem em contador gama por 1 minuto. Obteve-se a concentração de T₄ através do cálculo do percentual de ligação realizado pela comparação da média das leituras das duplicatas após ser descontado o tubo branco com uma curva padrão obtida por 5 padrões que acompanham o "Kit."

III.5 - Análise estatística

A comparação das médias das variáveis quantitativas obtidas no grupo de pacientes com trissomia livre do cromossomo 21 e no grupo controle, após verificação de que as mesmas tinham distribuição normal, foi realizada pelo teste t de Student, enquanto que a investigação de associação entre as variáveis, em cada grupo, foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de correlação simples. Em ambos os casos, adotou-se o nível de 5% para a aceitação da significância.

IV. RESULTADOS

IV.1 - ANÁLISE CROMOSSÔMICA

Dos 32 pacientes com síndrome de Down, 29 eram portadores de trissomia livre universal, 2 apresentavam mosaicismos (L.B.A com 100% das metáfases em linfócitos normais e 90% das metáfases em fibroblastos trissômicos do cromossomo 21 e R.J.Q.G. com 2% das metáfases em linfócitos com a trissomia do cromossomo 21) e uma paciente (M.C.C) apresentava translocação Dq21q não herdada.

Dos 41 indivíduos do grupo controle, o exame do cariótipo foi possível de ser realizado em 38 deles. Dentro desse grupo detectou-se mosaicismos cromossômicos baixos em 6 genitoras dos propósitos, sendo 5 delas com 2% de mosaicismos de trissomias do grupo C (J.R.R; M.S.F; M.D.C; M.H.R.C. e C.C.M.) e uma (J.R.N) com 2% de mosaicismos da trissomia do cromossomo 21.

IV.2 - DOSAGENS BIOQUÍMICAS

A discriminação dos valores das variáveis estudadas nos pacientes com síndrome de Down com trissomia livre encontram-se nas tabelas 5 e 6, enquanto que as tabelas 7 e 8 relacionam tais valores observados nos indivíduos do grupo controle sem mosaicismos cromossômicos detectados. As tabelas 9 e 10 relacionam, respectivamente, os valores observados nos pacientes com síndrome de Down devido a translocação Dq21q (1 paciente) e mosaicismos da trissomia do cromossomo 21 (2 pacientes), e nas 6 genitoras portadoras de aneuploidia em mosaico (5 delas com trissomias de cromossomos do grupo C e 1 com trissomia do cromossomo 21). Os dados relacionados nas tabelas 9 e 10 não foram incluídos na análise estatística.

TABELA 5-Dosagens de anidrase carbônica eritrocitária em pacientes com síndrome de Down devido à trissomia livre do cromossomo 21.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	CA total (mg/ml)	CAII (mg/ml)	CAI (mg/ml)	CA total (mg/ml)	Atividade (U/mgHb)	
1-	AAP	6	M	3,54	0,26	3,17	3,28	1,00
2-	CRM	6	M	2,16	0,52	1,60	1,64	0,64
3-	AMJ	6	M	1,95	0,08	1,71	1,87	0,32
4-	RPP	6	M	2,18	0,22	1,79	1,96	0,42
5-	LPR	6	M	3,03	0,13	2,84	2,90	0,32
6-	PMD	6	M	2,60	0,61	1,94	1,99	0,28
7-	EA	7	M	2,52	0,33	1,87	2,00	0,46
8-	ASJ	7	M	4,05	0,68	2,75	3,37	1,30
9-	MAAM	7	M	1,54	0,57	0,97	0,97	1,31
10-	MC	9	M	2,08	0,29	1,79	1,79	0,19
11-	DMS	9	M	1,43	0,10	1,21	1,33	0,85
12-	LRR	10	M	2,26	0,23	1,96	2,03	0,47
13-	ACG	12	M	3,43	0,35	2,87	3,08	0,86
14-	ECF	15	M	3,42	0,24	3,11	3,18	1,37
15-	JED	23	M	3,40	0,22	2,91	3,18	1,54
16-	JBC	28	M	2,47	0,26	1,94	2,21	0,33
17-	SSM	6	F	3,06	0,54	2,33	2,52	0,17
18-	RCC	6	F	2,46	0,22	2,14	2,24	0,58
19-	CRNP	6	F	2,27	0,35	1,71	1,92	0,44
20-	CI	8	F	2,72	0,47	2,19	2,25	0,71
21-	HMC	10	F	1,97	0,10	1,77	1,87	0,60
22-	SPS	10	F	2,90	0,28	2,37	2,62	0,34
23-	ACB	11	F	2,20	0,12	1,77	2,08	0,22
24-	LC	17	F	3,20	0,24	2,66	2,96	0,99
25-	MLG	18	F	2,45	0,60	1,85	1,85	0,48
26-	HAL	20	F	3,82	0,65	2,69	3,17	0,69
27-	IMP	21	F	2,58	0,35	1,94	2,23	1,76
28-	SHF	21	F	2,42	0,31	1,97	2,11	0,14
29-	MJN	22	F	2,39	0,67	1,72	1,72	0,51

TABELA 5-Dosagens de hemoglobina, zinco plasmático, T3 e T4 em pacientes com síndrome de Down devido à trissomia livre do cromossomo 21.

Paciente	Hb(g%)	zinco(μ g/ml)	t3 (ng/dl)	t4 (μ g/dl)
2- CRM	14,32		165,00	9,00
3- AMJ	12,83	1,42	150,00	7,40
4- RPP	14,62		120,00	9,80
5- LPR	12,53	0,99	62,00	8,00
6- PHD	11,04	1,13	70,00	8,00
7- EA	13,09	1,87	78,00	6,80
8- ASJ		2,60		
9-MAAM	12,78		180,00	9,40
10- MC	14,83	1,28	150,00	5,20
11- DMS	9,36	0,69	64,00	6,70
12- LRR	12,88	1,42	110,00	6,60
14- ECF		2,16		
15- JED		1,42		
16- JBC	13,65		90,00	8,40
17- SSM	11,76		160,00	10,00
18- RCC	13,70		100,00	8,40
19-CRNP	11,86		125,00	6,80
20- C1	14,93	1,72	110,00	7,80
21- HMC	13,91		125,00	6,40
22- SPS	15,54		125,00	9,80
23- ACB	13,81			
25- MLG	12,88	1,28	88,00	9,20
26- HAL	13,96	1,72	90,00	7,50
27- IMP		0,54		
28- SHF	14,01	0,84	120,00	8,80
29- MJN	11,25	0,99	100,00	7,80

TABELA Z - Dosagens de anidrase carbônica eritrocitária em indivíduos do grupo controle

Controle	Idade (anos)	sexo	CA total (mg/ml)	CAII (mg/ml)	CAI (mg/ml)	CAI total (mg/ml)	Atividade (U/mgHb)
1 - JED	9	M	0,90	0,21	0,65	0,69	0,36
2 - ASM	10	M	2,98	0,40	2,40	2,58	0,32
3 - CNI	10	M	1,26	0,15	0,98	1,11	0,54
4 - CSM	11	M	2,74	0,66	1,86	2,08	0,17
5 - JDC	11	M	1,27	0,42	0,85	0,85	0,35
6 - MAQG	20	M	2,36	0,19	2,17	2,17	0,52
7 - BJBA	33	M	1,45	0,29	1,10	1,16	1,02
8 - JVM	41	M	1,34	0,36	0,90	0,98	0,81
9 - FC	5	F	1,34	0,13	1,15	1,21	0,98
10- EAP	7	F					0,31
11- CRM	8	F	1,80	0,34	1,43	1,46	0,64
12- MPR	18	F	2,85	0,43	2,00	2,43	0,53
13- AB	19	F	1,51	0,41	1,03	1,20	0,46
14- BSD	30	F	2,42	0,82	1,52	1,59	0,75
15- FRFI	31	F	1,59	0,23	1,23	1,36	1,57
16- VLPS	33	F	2,08	0,21	1,66	1,87	0,36
17- HACC	38	F	1,41	0,35	0,96	1,06	0,66
18- IGP	41	F	1,87	0,33	1,44	1,44	0,55
19- AGF	42	F	2,36	0,30	1,98	2,06	0,10
20- TRS	42	F	1,57	0,13	1,28	1,44	1,43
21- ASF	43	F	3,38	0,20	3,11	3,18	1,63
22- LSA	43	F	2,48	0,70	1,78	1,78	0,44
23- MARNC	44	F	2,34	0,41	1,65	1,93	0,95
24- AMS	45	F	2,34	0,39	1,79	1,95	1,59
25- OAP	47	F	2,95	0,25	2,48	2,60	0,77
26- IHC	49	F	3,52	0,54	2,45	2,98	1,62
27- NGCG	51	F	3,24	0,16	2,75	3,08	0,60
28- MMS	54	F	1,42	0,18	1,18	1,24	0,72
29- ICC	55	F	3,06	0,36	2,50	2,70	1,31
30- HMB	56	F	1,28	0,20	1,08	1,08	0,60
31- MSD	57	F	2,83	0,14	2,40	2,69	1,36
32- GL	61	F	2,36	0,23	2,05	2,13	0,34
33- CC	62	F	1,74	0,27	1,19	1,47	0,24
34- LP	64	F	2,24	0,08	2,02	2,16	1,45
35- AFT	69	F	2,45	0,44	1,90	2,01	0,30

TABELA 8 - Dosagens de hemoglobina, zinco plasmático, T3 e T4 em indivíduos do grupo controle.

Controle	Hb(g%)	zinco(ug/ml)	t3(ng/dl)	t4(ug/dl)
1- JED	12,17		100,00	6,80
2- ASM	12,94		125,00	8,00
3- CNI	13,40	1,28	145,00	7,80
4- CSM	13,19	0,84	150,00	7,00
5- JDC	14,32	1,57	150,00	7,80
6- MAQG	16,57	2,16	60,00	6,00
7- BJBA	12,27		100,00	8,20
8- JVM	12,26	1,13		
9- FC	15,77	0,54	195,00	6,80
11- CRM	13,81		210,00	9,60
12- NPR	12,78		88,00	7,00
13- AB	10,75		160,00	11,00
14- BSD	14,21		78,00	6,40
15- FRFI	11,30			
16- VLPS	12,89		110,00	6,80
17- MACC	12,53	2,16	120,00	7,80
18- IGP	11,25		120,00	6,00
19- AGF	13,60		90,00	10,50
20- TRS	9,61	1,13	145,00	15,00
21- ASF		2,76		
22- LSA	14,73		75,00	5,00
23- MARMC	10,74	2,46	78,00	6,10
26- IMC		2,31		
27- NGCG		2,01		
28- MMS	10,18	2,01		
29- ICC		1,87		
30- MNB	16,00			
31- MSD		1,72		
32- GL	15,39	2,31		
33- CC	13,60	1,87		
34- LP		1,42		
35- AFT	12,27	2,31		

TABELA_9 - Dosagens de anidrase carbônica eritrocitária em pacientes com síndrome de Down devido a translocação ou mosaïcismo, envolvendo o cromossomo 21.

Paciente	Idade (anos)	Carit6tipo	Hb (g%)	CATotol (mg/ml)	CAII (mg/ml)	CAI (mg/ml)	CAITot (mg/ml)	Atividade (U/mgHb)
1- HCC	20	46,XX,t (Dq21q)		1,53	0,06	1,34	1,47	1,24
2- RJQG	22	46,XY/47,XY,+21	16,26	2,10	0,34	1,76	1,76	0,41
3- LBA	16	46,XX/47,XX,+21	12,58	3,30	0,75	2,45	2,56	0,60

TABELA_10 - Dosagens de anidrase carbônica eritrocitária em genitoras apresentando mosaïcismo cromossômico diverso baixo em cultura de linfócitos.

Paciente	Idade (anos)	Carit6tipo	Hb (g%)	CATotol (mg/ml)	CAII (mg/ml)	CAI (mg/ml)	CAITot (mg/ml)	Atividade (U/mgHb)
1- JRR	40	46,XX/47,XX,+9	14,35	2,67	0,28	2,36	2,39	0,62
2- MSF	46	46,XX/47,XX,+C	12,83	1,36	0,09	1,15	1,28	0,34
3- MDC	58	46,XX/47,XX,+12	13,40	1,86	0,19	1,55	1,67	0,56
4- JRN	63	46,XX/47,XX,+21	14,32	2,08	0,59	1,49	1,49	0,58
5- MMRC	54	46,XX/47,XXX	15,24	2,07	0,53	1,54	1,54	0,55
6- CCM	29	46,XX/47,XX,+C	11,25	2,97	0,22	2,59	2,75	0,28

Na tabela 11 apresentam-se as médias e os desvios padrão obtidos nos 29 pacientes com síndrome de Down (Grupo DOWN) e nos 34 indivíduos do grupo controle (Grupo CONT) para a anidrase carbônica eritrocitária, a hemoglobina, o zinco sérico, e T₃ e T₄. Essas três últimas variáveis mediram-se em menor número de pacientes em decorrência da insuficiência de material, em alguns casos, ou à ocorrência de hemólise, em outros. Todas as variáveis relacionadas na tabela 11 apresentaram distribuição normal, tanto no grupo de pacientes como no grupo controle e, com exceção das variáveis CA I, zinco plasmático e T₃ no grupo de indivíduos controles, nenhuma delas apresentou correlação com a idade, o que permitiu a comparação entre as médias dos 2 grupos, sem se considerar a idade, o mesmo ocorrendo em relação ao sexo, uma vez que não houve diferenças significativas entre as médias das variáveis dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle, segundo o sexo. Desse modo, foi possível considerar cada grupo na sua totalidade para a comparação das outras variáveis. No grupo controle as variáveis CA I e zinco plasmático apresentaram correlação positiva com a idade ($r=0,344$ e $r=0,540$, respectivamente) enquanto a variável T₃ apresentou correlação negativa ($r= - 0,55$). Essas variáveis foram previamente ajustadas para a idade média do grupo de pacientes com síndrome de Down.

Essa tabela também apresenta, nas duas últimas colunas, os valores de t calculados para a diferença entre as médias dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle. Como se pode observar, a quantidade total de anidrase carbônica (CA total, mg/ml), no grupo de pacientes com síndrome de Down, é significativamente maior do que no grupo controle, sendo essa diferença decorrente do aumento significativo da isozima CA I, tanto quando se considera a CA I total (soma de

CA I e CA I-1) como quando se considera apenas a CA I, pois o nível da isozima CA II (CA II mg/ml) foi semelhante em ambos os grupos.

A atividade específica total da anidrase carbônica eritrocitária, por outro lado, também pode ser considerada semelhante em ambos os grupos.

O nível de zinco plasmático, após correção dos valores do grupo controle para a idade média dos pacientes com síndrome de Down não apresentou diferença significativa entre os grupos. Observou-se entretanto correlação dos níveis plasmáticos de zinco com o nível da isozima CA I tanto no grupo controle ($r=0,51$) como no grupo de pacientes com síndrome de Down ($r=0,57$).

Já o nível de T₃, após correção dos valores do grupo controle para a idade média dos pacientes com síndrome de Down, encontra-se significativamente diminuído no grupo de pacientes com síndrome de Down, não apresentando entretanto correlação com as demais variáveis).

Para as variáveis hemoglobina e T₄ não se detectou nenhuma diferença apreciável entre os pacientes e o grupo controle.

Os níveis de hemoglobina e dos hormônios tireóidíacos dos pacientes e dos indivíduos do grupo controle apresentaram valores dentro do intervalo de normalidade da população, com 95% de probabilidade.

Tabela_11 - Comparação entre as médias das variáveis quantitativas no grupo de pacientes com trissomia livre do cromossomo 21 (Grupo DOWN) com as do grupo de indivíduos controle (Grupo CONT).

VARIÁVEL	GRUPO	N	MÉDIA	Desvio Padrão	t	P																																																																																																	
CA mg/ml	= DOWN	29	2,64	0,65	2,007	<0,01																																																																																																	
	= CONT.	34	2,14	0,71			CAI mg/ml	= DOWN	29	0,35	0,19	0,525	0,50 < P < 0,60	= CONT.	34	0,32	0,17	CAI mg/ml	= DOWN	29	2,12	0,55	3,047	<0,01	= CONT	34	1,67	0,62	= CONT.*	34	1,43	0,58	CAITet mg/ml	= DOWN	29	2,29	0,62	2,8477	<0,01	= CONT.	34	1,82	0,68	U/mgHb	= DOWN	29	0,67	0,44	0,770	0,40 < P < 0,50	= CONT.	35	0,75	0,47	Hb g%	= DOWN	22	13,16	1,46	0,293	0,70 < P < 0,80	= CONT.	26	13,02	1,80	Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80	= CONT.	19	1,78	0,60	= CONT.*	19	1,33	0,50	T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75	2,549	<0,02	= CONT.	19	121,00	41,07	= CONT.*	19	141,53	34,31	T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90	= CONT.
CAI mg/ml	= DOWN	29	0,35	0,19	0,525	0,50 < P < 0,60																																																																																																	
	= CONT.	34	0,32	0,17			CAI mg/ml	= DOWN	29	2,12	0,55	3,047	<0,01	= CONT	34	1,67	0,62		= CONT.*	34	1,43	0,58			CAITet mg/ml	= DOWN	29	2,29	0,62	2,8477	<0,01	= CONT.	34	1,82	0,68	U/mgHb	= DOWN	29	0,67	0,44	0,770	0,40 < P < 0,50	= CONT.	35	0,75	0,47	Hb g%	= DOWN	22	13,16	1,46	0,293	0,70 < P < 0,80	= CONT.	26	13,02	1,80	Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80	= CONT.		19	1,78	0,60	= CONT.*			19	1,33	0,50	T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75		2,549	<0,02	= CONT.	19			121,00	41,07	= CONT.*	19	141,53	34,31	T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90	= CONT.	19	7,87
CAI mg/ml	= DOWN	29	2,12	0,55	3,047	<0,01																																																																																																	
	= CONT	34	1,67	0,62																																																																																																			
	= CONT.*	34	1,43	0,58																																																																																																			
CAITet mg/ml	= DOWN	29	2,29	0,62	2,8477	<0,01																																																																																																	
	= CONT.	34	1,82	0,68			U/mgHb	= DOWN	29	0,67	0,44	0,770	0,40 < P < 0,50	= CONT.	35	0,75	0,47	Hb g%	= DOWN	22	13,16	1,46	0,293	0,70 < P < 0,80	= CONT.	26	13,02	1,80	Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80	= CONT.	19	1,78	0,60	= CONT.*	19	1,33	0,50	T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75	2,549	<0,02	= CONT.	19	121,00	41,07	= CONT.*	19	141,53	34,31	T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90	= CONT.	19	7,87	2,31																																		
U/mgHb	= DOWN	29	0,67	0,44	0,770	0,40 < P < 0,50																																																																																																	
	= CONT.	35	0,75	0,47			Hb g%	= DOWN	22	13,16	1,46	0,293	0,70 < P < 0,80	= CONT.	26	13,02	1,80	Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80	= CONT.	19	1,78	0,60		= CONT.*	19	1,33	0,50			T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75	2,549	<0,02	= CONT.		19	121,00	41,07	= CONT.*			19	141,53	34,31	T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90	= CONT.	19	7,87	2,31																																							
Hb g%	= DOWN	22	13,16	1,46	0,293	0,70 < P < 0,80																																																																																																	
	= CONT.	26	13,02	1,80			Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80	= CONT.	19	1,78	0,60		= CONT.*	19	1,33	0,50			T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75	2,549	<0,02	= CONT.	19	121,00	41,07		= CONT.*	19	141,53	34,31			T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90	= CONT.	19	7,87	2,31																																																		
Zincug/ml	= DOWN	16	1,38	0,54	0,285	0,70 < P < 0,80																																																																																																	
	= CONT.	19	1,78	0,60																																																																																																			
	= CONT.*	19	1,33	0,50																																																																																																			
T3ng/dl	= DOWN	21	113,43	33,75	2,549	<0,02																																																																																																	
	= CONT.	19	121,00	41,07																																																																																																			
	= CONT.*	19	141,53	34,31																																																																																																			
T4ug/dl	= DOWN	21	7,99	1,29	0,2	0,80 < P < 0,90																																																																																																	
	= CONT.	19	7,87	2,31																																																																																																			

* valores ajustados para a idade média dos pacientes com síndrome de Down.

A atividade específica total da anidrase carbônica eritrocitária do grupo formado por genitoras que apresentaram células aneuplóides em linfócitos, em comparação com um grupo controle formado por genitoras da mesma idade e com cariótipo normal (controles nº 14, 17, 23, 28, 31, 34), está significativamente diminuída nas primóias ($t=3,263$, $P<0,05$). Essa diferença também é observada quando se compara esse grupo de genitoras com o grupo controle ($t'=2,698$, $P<0,05$). A atividade específica total da anidrase carbônica eritrocitária no grupo de genitoras com aneuploidias não apresenta diferença significativa entretanto com a atividade específica do grupo de pacientes com síndrome de Down.

Tomando-se os valores individuais, a média e o desvio padrão da variável CA I, pôde-se traçar as curvas normais da distribuição dessa isozima nos grupos controle e de pacientes com síndrome de Down, de acordo com a função:

$$f(x) = \frac{1}{2s\sqrt{\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\bar{x})^2}{2s^2}}$$

onde \bar{x} e s são, respectivamente, a média e o desvio padrão, x é o valor da variável e e é a base dos logaritmos naturais.

Por outro lado, de acordo com Magna (1984), em se chamando de $f_1(x)$ a função da distribuição do grupo controle e $f_2(x)$ a do grupo de pacientes com síndrome de Down, pode-se determinar o ponto de intersecção entre as 2 distribuições tornando $f_1(x) = f_2(x)$, situação em que o valor da variável correspondente ao ponto de intersecção é obtido pela resolução da equação:

$$(s_1^2 - s_2^2)x^2 + 2(s_2^2\bar{x}_1 - s_1^2\bar{x}_2)x + s_1^2\bar{x}_2^2 - s_2^2\bar{x}_1^2 - 2s_1s_2 \ln\left(\frac{N_2s_1}{N_1s_2}\right) = 0$$

A equação acima, por ser quadrática fornecerá 2 raízes caso as distribuições tenham interpenetração. Nesse caso tem interesse a raiz cujo valor se situa entre as médias das distribuições.

De acordo com o exposto acima as distribuições do nível da CA I dos grupos controle e de pacientes com síndrome de Down apresentam intersecção no ponto $x=1,83$, estando 30% ($Z=0,53$) dos valores para os pacientes com síndrome de Down abaixo desse valor, enquanto 25% ($Z=0,69$) dos valores do grupo controle estão acima de 1,83, como se observa na figura 3.

Embora os 2 grupos representem populações significativamente diferentes quanto à média da variável CA I, a grande sobreposição das duas distribuições dessa variável impede que a mesma seja utilizada como teste para diagnóstico diferencial, entretanto, com base no cálculo de Z e levando em conta a média e desvio padrão das distribuições da CA I obtidos, pode-se calcular as possibilidades de pacientes com mosaicismos se enquadrarem em cada grupo.

Assim teríamos que dos pacientes apresentados na tabela 9, M.C.C (com translocação Dq21q) e R.J.Q.G (apresentando 2% de células trissômicas em linfócitos e poucos sinais clínicos de síndrome de Down) podem ser incluídos com 2,7 e 1,06 vezes maior probabilidade, respectivamente, no grupo controle. Já a paciente L.B.A (com quadro clínico de síndrome de Down mas que apresentou células trissômicas apenas na cultura de linfócitos) pode ser enquadrada com 3,93 vezes maior probabilidade no grupo de pacientes com síndrome de Down.

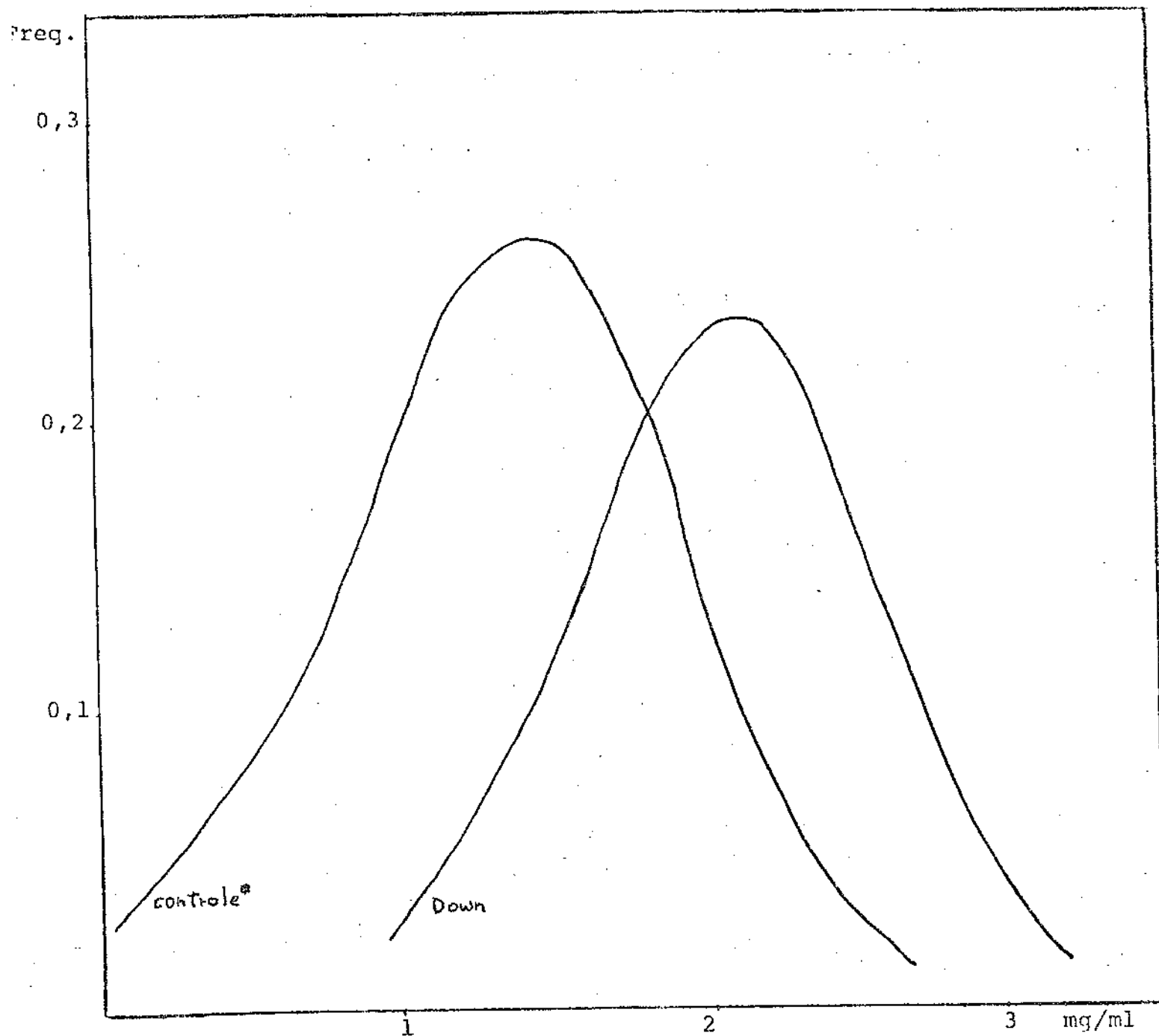


Figure 3 - Distribuição da isozima CA I em mg/ml nos grupos de pacientes com síndrome de Down e de indivíduos controle. Intersecção: $x=1,83$

* valores dos indivíduos do grupo controle ajustados para a média de idade dos pacientes com síndrome de Down.

V- CONCLUSões

- 1- Pacientes com síndrome de Down apresentam aumento da isozima CA I da anidrase carbônica eritrocitária, sem alteração significativa da isozima CA II.
- 2- O aumento da quantidade da isozima CA I nos pacientes com síndrome de Down não é acompanhado por um aumento significativo da atividade total da enzima, uma vez que ela tem pequena participação na atividade total da anidrase carbônica eritrocitária.
- 3- Pacientes com síndrome de Down não apresentam alteração da concentração do zinco plasmático.
- 4- Nos pacientes com síndrome de Down não se observou alteração do nível de tiroxina, entretanto, a triiodotironina encontra-se diminuída em relação aos controles.
- 5- Nos indivíduos sem aberração cromossômica a isozima CA I e o zinco plasmático apresentam correlação positiva com a idade, enquanto que a triiodotironina apresenta correlação negativa.
- 6- A isozima CA I da anidrase carbônica eritrocitária apresenta correlação positiva com os níveis de zinco plasmático tanto no grupo de indivíduos controles como no grupo de pacientes com síndrome de Down.

VI - DISCUSSÃO

Nos pacientes com síndrome de Down observou-se a frequência esperada de mosaicismos e translocação, em torno de 6% e 3% respectivamente. Já nos indivíduos controles não se encontraram alterações cromossômicas em irmãos, irmãs e genitores de pacientes com síndrome de Down, mas seis genitoras entre as 29 (20,7%) apresentaram mosaicismos cromossômicos baixos, com menos de 2% de células trissômicas, sendo cinco para cromossomos do grupo C e uma para cromossomos do grupo G. Segundo Sousa (1985), ocorre mosaicismos cromossômicos baixos em mães de pacientes com síndrome de Down, tendo essa autora encontrado trissomias do grupo G em quatro das 20 genitoras estudadas (20%) ao analisar 100 metáfases de cada genitora. A ocorrência de outras aneuploidias, na presente amostra, poderia ser explicada pelo fato de que três das cinco genitoras com mosaicismos baixos de trissomia do grupo C serem idosas, fato que sugere serem essas aneuploidias decorrentes do efeito da idade nas células somáticas (Bond e Chandley, 1983).

Os pacientes com síndrome de Down apresentam nível significativamente mais alto da isozima CA I da anidrase carbônica eritrocitária quando comparados com os indivíduos do grupo controle, sem que ocorra um concomitante aumento da isozima CA II. Esses achados confirmam as observações de Wehinger (1973) e Ohno *et al* (1984). Além disso, a CA I é correlacionada com a idade nos indivíduos sem aberração cromossômica e com o nível de zinco plasmático em ambos os grupos.

A atividade total da anidrase carbônica eritrocitária ao contrário do postulado por Wehinger (1973), não se mostrou elevada entre os pacientes com síndrome de Down. Essa divergência pode ser decorrente da idade dos pacientes estudados por Wehinger (1973), todos com menos de 12 anos (sendo quatro dos seis pacientes com menos de três anos), idade na qual essa enzima ainda não atingiu o nível do adulto.

Por outro lado, como a isozima CA I tem pequena atividade específica no eritrócito (Wistrand, 1981), além de ser inibida por concentrações fisiológicas de cloreto (Maren *et al.*, 1976), um aumento discreto da concentração dessa isozima pode não ser suficiente para refletir no aumento da atividade enzimática total no adulto.

A ontogênese acelerada poderia ser uma das hipóteses para explicar o aumento da concentração da anidrase carbônica eritrocitária observada nos pacientes com síndrome de Down. É plausível supor que os dados de Wehinger (1973) refletem o aumento precoce dos níveis e da atividade da anidrase carbônica entre os pacientes com síndrome de Down. Esse aumento, que normalmente ocorre, pode estar acelerado nesses pacientes, uma vez que eles mostram uma velocidade maior na ontogênese de variáveis hematológicas, como é o caso da diminuição mais rápida do nível de hemoglobina fetal e o aumento precoce do nível da hemoglobina A₂ (Wilson *et al.*, 1968), assim ^{como} apresentam sinais de envelhecimento precoce (Sinet, 1982).

Uma segunda hipótese para explicar o aumento da CA I poderia ser a de que os pacientes com síndrome de Down apresentariam diminuição do nível de tiroxina (T₄), ocorrendo, conseqüentemente, um aumento da CA I por uma menor inibição da síntese da isozima pela tiroxina.

A eventual diminuição do nível dos hormônios tireoídianos referida em pacientes com síndrome de Down (Murdoch *et al.*, 1977; Aldenhoff *et al.*, 1979; Loudon *et al.*, 1985; Pueschel e Pezzullo, 1985; Cutler *et al.*, 1986) restringiu-se neste trabalho á triiodotironina (T₃), não havendo correlação do nível desse hormônio e da tiroxina (T₄) com as isozimas da anidrase carbônica eritrocitária ou mesmo com a atividade enzimática total, o que inviabiliza essa hipótese.

Como os genes para as isozimas da anidrase carbônica eritrocitária estão no cromossomo 8 (Venta, 1983; Edwards *et al.*, 1986a,b) o aumento da síntese dessa isozima não é decorrente de efeito de dose gênica. Entretanto, o fato de se observar, nos pacientes com síndrome de Down, aumento de outras enzimas, cujos genes também não se localizam no cromossomo 21, pode sugerir que, nesses pacientes, haja um aumento da síntese de numerosas enzimas, o que poderia ser devido ao efeito de dose gênica de genes reguladores. Esses genes, por sua vez, estariam, então, localizados no cromossomo 21. Essa hipótese poderia explicar o aumento da isozima CA I encontrado, embora, nesse caso, faltem evidências reais até o presente momento.

Considerando que a concentração da isozima CA I encontra-se aumentada em doenças nas quais ocorrem alterações metabólicas, em especial do equilíbrio ácido-básico e da oxigenação (Lie-Injo *et al.*, 1970; Funakoshi e Deustch, 1971a; Drukker *et al.*, 1972; Moynihan, 1980), e supondo que essa isozima tenha uma função importante na homeostase, visto ser a isozima da anidrase carbônica que geralmente se altera nesses distúrbios, o aumento do seu nível em indivíduos geneticamente desequilibrados e, portanto, com distúrbios metabólicos vários, seria a consequência natural.

A favor dessa hipótese pode-se considerar a distribuição tecidual dessa isozima, que além de ser encontrada nos eritrócitos está presente no endotélio capilar de órgãos que necessitam da manutenção do equilíbrio ácido-básico dentro de intervalo de variação muito pequeno, além de uma rápida resposta a fatores de desequilíbrio do mesmo, por serem tecidos que não apresentam capacidade de regeneração, como o tecido nervoso e a córnea. Além desses locais, observa-se a anidrase carbônica CA I nas células do cólon, glândulas sudoríparas, plexo coróide e outros tecidos cuja função é a de secreção de líquidos alcalinos, com elevada velocidade de produção de HCO_3^- , que é produzido pela hidratação do CO_2 mediada pela anidrase carbônica (Maren, 1984). Essa hipótese, além de elucidar o aumento da CA I nos indivíduos com aberrações cromossômicas, poderia justificar a permanência dessa isozima de baixa atividade no processo evolutivo.

Lembrando que nos pacientes com síndrome de Down ocorre aumento de 50% da enzima dismutase de superóxido-1 (SOD-1), por efeito de dose gênica, tem-se que, de acordo com a hipótese acima, o aumento da CA I poderia ser secundário às alterações do metabolismo dos radicais superóxido (O_2^-), isso porque o aumento da SOD-1 nos pacientes com a síndrome de Down determina uma maior velocidade de transformação desses radicais em peróxido de hidrogênio, que por sua vez é destruído pelas enzimas catalase e peroxidase de glutatião, também elas elevadas, nesses pacientes, como resposta ao efeito primário do aumento da SOD-1 (Sinet, 1982). De fato, para ocorrer a redução do superóxido são utilizados íons hidrogênio intracelulares, os quais são produtos da reação catalisada pela anidrase carbônica. Esse poderia ser o estímulo para o aumento da síntese da isozima CA I.

O aumento da concentração de CA I, observado nos eritrócitos de pacientes com síndrome de Down seria, então, um reflexo do aumento da síntese dessa isozima que ocorreria como um mecanismo compensador para manutenção da homeostase.

Com relação ao nível plasmático do zinco tem-se que segundo Rosner (1965) o nível desse metal, em 12 pacientes com síndrome de Down foi normal. Na presente amostra também não foram observadas alterações significativas da concentração plasmática de zinco nesses pacientes, entretanto observou-se correlação positiva do nível plasmático desse metal com os níveis da isozima CA I tanto no grupo de indivíduos controles como no grupo de pacientes. Já a correlação positiva do zinco plasmático com a idade nos indivíduos controles merece um estudo posterior. O fato de não se obter correlações da CA I, do zinco e da triiodotironina com a idade nos pacientes com síndrome de Down pode ser decorrente do pequeno intervalo de variação da idade na amostra de pacientes.

Permanece sem explicação o aumento da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária observado nas seis genitoras com mosaicismos baixos de trissomias diversas. Como cinco dessas mulheres são idosas (idade de 40 a 63 anos), o efeito da idade sobre o aumento da atividade da anidrase carbônica eritrocitária, assim como o achado de que há correlação entre a concentração da isozima CA I e a idade em indivíduos sem aberrações cromossômicas merecem uma investigação detalhada.

VII. SUMARIO

O presente trabalho consiste da avaliação dos níveis eritrocitários das isozimas da anidrase carbônica assim como da atividade total dessa enzima nos eritrócitos de 32 pacientes com síndrome de Down sendo 29 devido à trissomia livre do cromossomo 21, um devido a uma translocação D/G e dois apresentando mosaicismos da trissomia do cromossomo 21. Também foram avaliadas as concentrações de zinco plasmático e dos hormônios tireoidianos, além da hemoglobina, com o objetivo de caracterizar as relações dessas variáveis com a concentração e a atividade da anidrase carbônica. O grupo controle constituiu de 42 indivíduos normais, genitores e/ou irmãos dos propósitos.

Realizou-se a avaliação das concentrações das isozimas da anidrase carbônica através de eletroforese em fita de acetato de celulose de uma solução da enzima parcialmente purificada, seguida por densitometria. Dosou-se a atividade total da anidrase carbônica eritrocitária no hemolisado utilizando-se uma técnica colorimétrica baseada na inibição da enzima pela acetazolamida e utilizando-se o acetato de alfa-naftila como substrato. As dosagens de zinco plasmático foram realizadas em espectrofotômetro de absorção atômica, e os hormônios tireoidianos foram medidos por radioimunoensaio.

Os pacientes com síndrome de Down apresentam nível significativamente mais alto da isozima CA I da anidrase carbônica eritrocitária em relação aos indivíduos do grupo controle, sem um concomitante aumento da isozima CA II. A atividade total da anidrase carbônica eritrocitária, por outro lado, não se mostrou elevada.

Nos indivíduos do grupo controle observou-se correlação positiva do nível da isozima CA I e do zinco plasmático com a idade, enquanto a triiodotironina apresentou correlação negativa com a idade. Tanto no grupo controle como no de pacientes a isozima CA I apresentou correlação positiva com o nível de zinco plasmático.

Os pacientes com síndrome de Down não apresentam alteração da concentração do nível de zinco plasmático ou de tiroxina mas foi observada diminuição da concentração da triiodotironina. Não houve correlação do nível desses hormônios tireóidíanos com as isozimas da anidrase carbônica ou mesmo com a atividade enzimática total.

Os resultados obtidos levaram à formulação das seguintes hipóteses para explicar o aumento do nível da isozima CA I eritrocitária nos pacientes com síndrome de Down:

1. Ontogênese acelerada;
2. Aumento da síntese da isozima CA I decorrente do efeito de dose de genes reguladores que se localizariam no cromossomo 21;
3. Resposta ao desequilíbrio metabólico consequente à aberração cromossômica.

VIII- SUMMARY

The erythrocytic carbonic anhydrase concentration and activity was determined in 32 patients with Down's syndrome (chromosome 21 trisomy) and 42 normal controls, siblings or parents of the patients. In each case the level of erythrocytic carbonic anhydrase and of its isozymes were determined by cellulose acetate membrane electrophoresis of a hemoglobin free solution, obtained by ethanol-chloroform extraction, followed by densitometry. The carbonic anhydrase activity was measured in the hemolysate by a colorimetric method based on the inhibition of the enzyme by acetazolamide, using alfa-naphthyl acetate as substrate. Plasma zinc was determined by atomic absorption spectrophotometry and thyroid hormones by radioimmunoassay.

Patients with Down's syndrome, when compared to the control group, showed a significantly higher level of CA I isozyme, but no rise in CA II, while carbonic anhydrase activity and plasma zinc were similar in both groups. As for the thyroid hormones, T_3 was significantly lower in the patients with Down's syndrome, while thyroxine was similar to the control group. CA I isozyme and plasma zinc showed positive correlation to age and T_3 a negative correlation to age in the control group. CA I isozyme level showed positive correlation to plasma zinc in both groups.

These findings led to the following hypothesis to explain the higher level of CA I found in Down's patients.

1. Advanced ontogenesis;
2. Enhanced synthesis of CA I isozyme due to dose effect of regulatory genes localized in chromosome 21;
3. An answer to the metabolic imbalance due to the chromosome aberration.

IX- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALDENHOFF, P.; HELGE, H.; WALDENMAIER, C. & ZABRANSKY, S. Thyroid function in 122 Down's syndrome patients. *Hum. Genet., supplement* 2:231, 1981.
2. ANDERSON, R.E.; ENGSTROM, F.L. & WOODBURY, D.M. Carbonic anhydrase in the cerebrum and cerebellum of normal and audiogenic seizure mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 502-4, 1984.
3. ANKER, N. & MONDRUP, M. Carbonic anhydrase isozyme B in erythrocytes of subjects with thyroid disorders. *Clin. Chim. Acta*, 54: 277- 82, 1974.
4. BEIGUELMAN, B., ed. Cromosomopatias autossômicas. In _____ *Citogenética Humana. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1982, 179-215.*
5. BERFENSTAM, R. Studies on carbonic anhydrase activity in children: 1. Enzyme activity in the blood of infants and children of different ages, particularly in premature infants. *Acta Paediatr.*, 41: 32-52, 1952.
6. BIDANI, A. & CRANDALL, E.D. Kinetic parameters and activity of pulmonary vascular carbonic anhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 565-7, 1984.
7. BOND, D.J. & CHANDLEY, A.C. eds. The origins and causes of aneuploidy in man. The age effect. In _____ *Aneuploidy. Oxford Monographs on Medical Genetics, Oxford University Press, Oxford, II: 55-76, 1983.*
8. BOYER, S.H.; SIEGEL, S. & NOYES, A.N. Developmental changes in human erythrocyte carbonic anhydrase levels: coordinate expression with adult hemoglobin. *Dev. Biol.*, 97:250-3, 1983.
9. BRIGGMAN, J. V.; TASHIAN, R.E. & SPICER, S.S. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase I and II in eccrine sweat glands from control subjects and patients with cystic fibrosis. *Am. J. Pathol.*, 112:250-7, 1983. *appud TASHIAN et al., 1984 op cit.*
10. BRINKMAN, R.; MARGARIA, R.; NELDRUM, N.U. & ROUGHTON, F.J.W. Some properties of carbonic anhydrase, the CO₂ enzyme present in blood. *J. Physiol.*, 75: 15P-6P, 1932.
11. CAMMER, W. Carbonic anhydrase activity in mielin from sciatic nerves of adult and young rats: quantitation and inhibitor sensitivity. *J. Neurochem.*, 32:651-4, 1979.
12. _____ Carbonic anhydrase in oligodendrocytes and myelin in the central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:494-7, 1984.
13. CARPENTIER, P.; FOURNIE, J. & CHETAIL, M. Biochemical demonstration of carbonic anhydrase in the rat parotid secretion granules. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:216-8, 1984.
14. CARTER, M.J. Carbonic anhydrase: isoenzymes, properties, distribution and functional significance. *Biol. Rev.*, 47:465-513, 1972.
15. CARTER, N.D.; JEFFERY, S.; SHIHS, A.; EDWARDS, Y.; TIPLER, T. & HOPKINSON, D.A. Characterization of human carbonic anhydrase III from skeletal muscle. *Biochem. Genet.*, 17:837-54, 1979.
16. CARTER, N.D.; HEWETT-EMMETT, D.; JEFFERY, S. & TASHIAN, R.E. Testosterone-induced sulfonamide-resistant carbonic anhydrase of rat liver is indistinguishable from skeletal muscle CA III. *FEBS Lett.*, 129:114-8, 1981.

17. CARTER, N.D.; HEATH, R. WELTY, R.J.; HEWETT-EMMETT, D.; JEFFERY, S.; SHIELDS, A. & TASHIAN, R.E. Red cells genetically deficient in carbonic anhydrase II have elevated levels of a carbonic anhydrase indistinguishable from muscle CA III. *Ann.N.Y.Acad. Sci.*, 429:284-6, 1984.
18. CASPERSON, T.; ZECH, L.; JOHANSSON, C. & MODEST, R.J. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosome*, 30:215-28, 1970.
19. CHEGWIDDEN, W.R.; HEWETT-EMMETT, D. & TASHIAN, R.E. Active site studies on muscle carbonic anhydrase III. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:179-82, 1984.
20. CHOW, S.Y.; KEMP, J.W. & WOODBURY, D.M. Role of carbonic anhydrase in tyroidal iodide transport. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:604-6, 1984.
21. COLEMAN, J.E. Mechanism of action of carbonic anhydrase. Substrate, sulfonamide and anion binding. *J. Biol. Chem.*, 242:5212-9, 1967. *appud* MAREN, 1967 *op cit.*
22. CUTLER, A. T.; BENEZRA-OBEITER, R. & BRINK, S.J. Thyroid function in young children with Down's syndrome. *Am. J. dis. Child.* 140(5): 479-83, 1986.
23. DOBYAN, D.C. & BULGER, R.E. Renal carbonic anhydrase. *Am. J. Physiol.*, 248:311-24, 1982.
24. DODGSON, S.J.; FORSTER II, R.E. & STOREY, B.T. The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429: 516-24, 1984.
25. DRUKKER, A.; CZACZKES, J.W.; BEN-YOSEPH, Y. & SHAPIRA, E. - Carbonic anhydrase B concentration of erythrocytes in chronic renal failure. *Israel J. Med. Sci.*, 8(4):508-10, 1972.
26. DUBOSE Jr., T.D. Carbonic anhydrase-dependent bicarbonate transport in the kidney. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:528-37, 1984.
27. DUNBAR, A.P. & TUDHOPE, G.R. Red-cell carbonic anhydrase isozymes in megaloblastic anaemia. *Scand. J. Haematol.*, 12:173-8, 1974.
28. EDWARDS, Y.H.; LLOYD, J.; PARKAR, M. & POVEY, S. The gene for human muscle carbonic anhydrase (CA III) is assigned to chromosome 8. *Ann. hum. Genet.* 50:41-7, 1986.
29. EDWARDS, Y.H.; BARLOW, J.H.; KONIALIS, C.P.; POVEY, S. & BUTTERWORTH, P.H.W. Assignment of the gene determining human carbonic anhydrase, CA I, to chromosome 8. *Ann. hum. Genet.*, 50:123-9, 1986.
30. FINE, J.M. & BOFFA, G.A. Immunological and starch-gel electrophoresis studies of the carbonic anhydrases XI, X2 and Y isolated from human erythrocyte haemolysates. *Nature*, 200:371-2, 1963.
31. FRIEDLAND, B.R. & MAREN, T.H. The role of carbonic anhydrase in lens ion transport and metabolism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:582-6, 1984.
32. FUNAKOSHI, S. & DEUTSCH, H.F. Human carbonic anhydrases. II- Some physicochemical properties of native isozymes and of similar isozymes generated in vitro. *J. Biol. Chem.*, 244:3438, 1969.
33. ----- Human carbonic anhydrases. V- Levels in erythrocytes in various states. *J. Lab. clin. Med.*, 77:39-45, 1971a.
34. ----- Human carbonic anhydrases. VI- Levels in isozymes in old and young erythrocytes and in various tissues. *J. Biol. Chem.*, 246:1088-92, 1971b.

35. GAY, C.V.; SCHRAER, H.; ANDERSON, R.E. & CAO, H. Current studies on the location and function of carbonic anhydrase in osteoclasts. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:473-8, 1984.
36. GERALD, P.S.; WALZER, S. & DIAMOND L.K. Location of the genetic elements controlling the hematologic changes in the D₅ trisomy. *Blood*, 24:836-7, 1964.
37. GROS, G.; GEERS, C.; DERMETZEL, R. ; SIFFERT, W.; GARTNER, A. & LEIBSTEIN, A. Extracellular, extravascular carbonic anhydrase in skeletal muscle. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:412-414, 1984.
38. HEADINGS, V.E. & TASHIAN, R.E. Differential inhibition of red cell carbonic anhydrase isozymes in hyperthyroidism. *Nature*, 228:1197-99, 1970.
39. ----- Isozymes of carbonic anhydrase I from primate red blood cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 236:353-9, 1971.
40. HEATH, R.; CARTER, N.; JEFFERY, S.; EDWARDS, R.; WATTS, D.; WATTS R. & RODECK, C. Fetal plasma carbonic anhydrase III and creatine kinase in Duchenne dystrophy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:620-2, 1984.
41. HENRIQUES, O.M. Die Bindungsweise des Kohlendioxyds im Blute. *Biochem.Z.* 200:1-24, 1928.
42. KEILIN, D. & MANN, T. Carbonic anhydrases. Purification and nature of the enzyme. *Biochem.J.*, 34:1163-76, 1940.
43. KENDALL, A.G. & TASHIAN, R.E. Erythrocyte carbonic anhydrase I: Inherited deficiency in humans. *Science*, 197:471-2, 1977.
44. KIMELBERG, H.K. & RICARD, C. Carbonic anhydrase and 2'3'cyclic nucleotide 3'phosphohydrolase activity in perfused rat brain and rat brain primary cultures. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:498-501, 1984.
45. KISHIDA, K.; OCHI, N.; EMI, K.; IIZUKA, S. & TSUBOI, S. Effects of carbonic anhydrase inhibitors on electrical phenomenon of the ciliary body of the rabbit eye. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:580-1, 1984.
46. KONDO, T.; TANIGUCHI, N.; MATSUDA, I & MURAO, M. Inactive form of erythrocyte carbonic anhydrase B in patients with primary renal tubular acidosis. *J.Clin.Invest*, 62:610-7, 1978.
47. KONDO, T.; TANIGUCHI, N.; HIRANO, T. & KAWAKAMI, Y. Inactive form of carbonic anhydrase I in erythrocytes from primary aldosteronism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429: 302-5, 1984.
48. KUMPULAINEN, T. & NYSTRON, S.H.M. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase C in human brain. *Brain Res.*, 220: 220-5, 1981.
49. KUMPULAINEN, T. & JALOVAARA, P. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes in the human pancreas. *Gastroenterology*, 80:796-9, 1981. *appud TASHIAN et al.*, 1984 *op cit.*
50. KUMPULAINEN, T. Human carbonic anhydrase isozyme C. *Histochemistry*, 72:425-31, 1981. *appud TASHIAN et al.*, 1984 *op cit.*
51. ----- Immunohistochemical demonstration of carbonic anhydrase isozyme C in the epithelium of the human ciliary process. *Histochemistry*, 77: 281-4, 1983. *appud TASHIAN et al.*, 1984 *op cit.*
52. KUMPULAINEN, T. Immunohistochemical localization of human carbonic anhydrase isoenzymes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 429:359-68, 1984.
53. LAYNE, E. - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.*, 3:450-1, 1957.

54. LEE, C.S.N.; BOYER, S.H.; BOWEN, P.; BORGAONKAR, D.S.; ROSENBLUM, H. & LIBORO, C. Retarded maturation in D1 trisomy. *Clin. Res.*, **13**:265, 1965.
55. LEES, M.B.; SAPIRSTEIN, V.S.; REISS, D.S. & KOLODNY, E.H. Carbonic anhydrase and 2,3'cyclic nucleotide 3-phosphohidrolase activity in normal human brain and in demyelinating diseases. *Neurology*, **30**:719-25, 1980.
56. LIE-INJO, L.E.; HOLLANDER, L. & FUDENBERG, H.H. Carbonic anhydrase and fetal hemoglobin in thyrotoxicosis. *Blood*, **30**:442-8, 1967.
57. LIE-INJO, L.E.; LOPEZ, C.G. & HART, P.L.V. Erythrocyte carbonic anhydrase activity in health and disease. *Clin. Chem. Acta*, **29**:541-50, 1970.
58. LINDSKOG, S. Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochem. biophys. Acta*, **39**:218, 1960.
59. LINDSKOG, S. & MALMSTROM, B.G. Reversible dissociation of zinc in bovine carbonic anhydrase. *Biochem. biophys. Res. Commun*, **2**:213-7, 1960.
60. LINDSKOG, S.; ENGBERG, P.; FORSMAN, C.; IBRAHIM, S.A.; JONSON, B-H.; SIMONSSON, I. & TIBELI, L. Kinetics and mechanism of carbonic anhydrase isoenzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **429**:61-75, 1984.
61. LINSER, P. & MOSCONA, A.A. Variable CA II compartmentalization in vertebrate retina. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **429**:430-46, 1984.
62. LONNERHOLM, G. Histochemical localization of carbonic anhydrase in mammalian tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **429**:369-81, 1984.
63. LOUDON, M. M.; DAY, R.E. & DUKE, E.M.C. Thyroid disfunction in Down's syndrome. *Arch. dis. Child.*, **60**:1149-51, 1985.
64. MAGID, E. Determination of erythrocyte carbonic anhydrase B and C: an aid in the diagnosis of thyroid disorders? *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **26**:257-62, 1970a.
65. MAGNA, L.A. A NADH-Redutase de metemoglobina e metemoglobinemia em hansenianos sob tratamento sulfônico. Campinas, 1984, Tese (doutoramento), UNICAMP, Instituto de Biologia.
66. MAREN, T.H.; PARCELL, A.L. & MALIK, M.N. A kinetic analysis of carbonic anhydrase inhibition. *J. Pharmacol. expt. Ther.*, **130**:389-400, 1960.
67. MAREN, T.H. Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, **47**(4):595, 1967.
68. MAREN, T.H.; RAYBURN, C.S. & LIDDELL, N.E. Inhibition by anions of human red cell carbonic anhydrase B; physiological and biochemical implications. *Science*, **191**:469-72, 1976.
69. MAREN, T.H. & COUTO, E.O. The nature of anion inhibition of human red cell carbonic anhydrases. *Archs. Biochem. Biophys*, **192**:501-10, 1979.
70. MAREN, T.H. The general physiology of reactions catalyzed by carbonic anhydrase and their inhibition by sulfonamides. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **429**:568-79, 1984.
71. MASUZAWA, T.; HASEGAWA, T.; NAKAHARA, N.; IIDA, K.; SATO, F. Localization of carbonic anhydrase in the rat choroid plexus epithelial cell. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **429**:405-7, 1984.
72. MELDRUM, N.U. & ROUGHTON, F.J.W. The CO₂ catalyst present in blood. *J. Physiol. Lond.*, **75**:3P-4P, 1932a.
73. ----- Discussion on recent advances in the study of enzymes and their action. *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **B**, **111**:296-7, 1932b.

74. ----- Carbonic anhydrase and the state of carbon dioxide in blood. *Nature*, 131:874-5, 1933a.
75. ----- Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol. Lond.*, 80:113-42, 1933b.
76. MESTRINER, M.A. Polimorfismo protéico em sistemas haplodiplóides (*Apis mellifera*, Linné, 1758) - Ribeirão Preto, 1970, Tese (Doutoramento). USP, Faculdade de Medicina.
77. MONDRUP, M. & ANKER, N. Carbonic anhydrase isoenzyme B in the erythrocytes of uremic subjects. *Clin. Chim. Acta*, 51:141-6, 1974.
78. MONDRUP, M.; ANKER, N. & CHRISTENSEN, F. Carbonic anhydrase isoenzyme determination. An aid to the diagnosis of "small-for-date" infants. *Clin. Chim. Acta*, 100:107-12, 1980.
79. MOORE, H.J. Quantitative variation of erythrocyte carbonic anhydrase levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:277-9, 1984.
80. MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMANN, W.J.; BATTIPS, D.M. & HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultivated from peripheral blood. *Exp. Cell Res.*, 20: 613-6, 1960.
81. MOYNIHAN, J.B. Isoenzymes of erythrocytic carbonic anhydrase in acidemic newborn infants. *Biochem. Soc. Trans.*, 8:86-7, 1980.
82. MURDOCH, J.C.; RATCLIFFE, W.A.; McCARTY, D.G.; RODGER, J.C. & RATCLIFFE, J.G. Thyroid function in adults with Down's syndrome. *J. Clin. Endocr. Metab.*, 44:453-8, 1977.
83. NORGAARD-PEDERSEN, B. & MONDRUP, M. Quantitative estimation of human carbonic anhydrases B and C by electrophoresis in antibody containing agarose. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27:169-74, 1971.
84. NORGAARD-PEDERSEN, B. & LINDHOLM, J. Quantitation of red cell carbonic anhydrase B and C and hemoglobin F in thyroid disorders. *Acta med. scand.*, 192:227-30, 1972.
85. OHLSSON, A.; STARK, G. & SAKATI, N. Marble Brain Disease: Recessive osteopetrosis, renal tubular acidosis and cerebral calcification in three Saudi Arabian Families. *Dev. med. Child. Neurol.*, 22:72-96, 1980.
86. OHNO, H.; TANIGUCHI, N.; KONDO, T.; TAKAKUWA, E.; TERAYAMA, K. & KAWARABAYASHI, T. Effect of physical exercise on the specific activity of carbonic anhydrase isozyme in human erythrocytes. *Experientia*, 38:830-1, 1982.
87. OHNO, H.; IIZUCA, S.; KONDO, T.; YAMAMURA, K.; SEKIYA, C. & TANIGUCHI, N. The levels of superoxide dismutase, catalase and carbonic anhydrase in erythrocytes of patients with Down's syndrome. *Klin. Wschr.*, 62:287-8, 1984.
88. DROPEZA, S.I.; RUÍZ-REYES, G.; LORÍA, A.; RAMÍREZ-ZORRILLA, J.; LOPEZ, M.M. & GARCIA, D.G. Variations des iso-enzymes d'anhydrase carbonique érythrocytaire dans l'érythropoiese mégalo-blastique consécutive a la thérapie anticonvulsive. *Rev. Europ. études Clin. Biol.*, 15:765-70, 1970.
89. OSBORNE, W.R.A. & TASHIAN, R.E. Thermal inactivation studies of normal and variant human erythrocyte carbonic anhydrases using a sulphonamide binding assay. *Biochem. J.*, 141-58:219, 1974.
90. PANTELAKIS, S.N.; KARAKLIS, A.G.; ALEXIOU, D.; VARDAS, E. & VALAES, T. Red cell enzymes in trisomy 21. *Am. J. Hum. Genet.*, 22:184-93, 1970.
91. PATTON, C.J.; JENKINS, M.Q.; BRIGGMAN, J.V. & SPICER, S.S. Effect of amiloride on potential difference across rectal mucosa in cystic fibrosis patients. *Pediat. Res.*, 16:1035-36, 1982.

92. PINTOR, C.; GARAU, A. & PUGGIONI, R. Endocrine profile in Down's syndrome. *Hum. Genet., supplement* 2:251, 1981.
93. POCKER, Y. & MEANY, J.E. The catalytic versatility of carbonic anhydrase from erythrocytes. The enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde. *J. Am. Chem. Soc.* 87:1809, 1965.
94. POCKER, Y. & TANAKA, N. Inhibition of carbonic anhydrase by anions in the carbon dioxide-bicarbonate system. *Science*, 199:907-9, 1978.
95. PRASAD, A.S.; SCHOOMAKER, E.B.; ORTEGA, J.; BREWER, G.J.; OBERLEAS, D. & DELSHLEGEL, F.J. Zinc deficiency in sickle cell disease. *Clin. Chem.*, 21:582-7, 1975.
96. PUESCHEL, S.M. & PEZZULLO, J.C. Thyroid dysfunction in Down syndrome. *Am. J. Dis. Child.*, 139:636-9, 1985.
97. RAMALHO, A.S. Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil. Campinas, 1978. Tese (livre docência), UNICAMP, Faculdade de Ciências Médicas.
98. RICKLI, E.E.; GHANZANFAR, S.A.S.; GIBBONS, B.H. & EDSALL, J.T. Carbonic anhydrases from human erythrocytes - preparation and properties of two enzymes. *J. Biol. Chem.*, 239(4):1065-78, 1964.
99. RILEY, D.A.; ELLIS, S.; LANG, D.H.; BAIN, J.L.W. Examination of carbonic anhydrase activities in the peripheral nervous systems of humans, rhesus monkeys, cats and rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 408-11, 1984.
100. ROSNER, F.; ONG, B.H.; PAINE, R.S. & MAHANAND, B.A. Biochemical differentiation of trisomic Down's syndrome (Mongolism) from that due to translocation. *New Eng. J. Med.*, 273:1356-61, 1965.
101. RUIZ-REYES, G. & RAMÍREZ-ZORRILLA, M.J. Rapid measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes by means of cellulose acetate membrane electrophoresis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 50:677-82, 1968.
102. RUIZ-REYES, G.; OROPEZA, S.I.; RAMÍREZ-ZORRILLA, M.J. & CASTRO, R. Utilidad clínica de las variaciones de isoenzimas de anhidrase carbónica eritrocítica en la detección de la eritropoyesis megaloblástica. *Revta. Invest. Clin.*, 20:463-79, 1968.
103. RUIZ-REYES, G. Eritropoyesis megaloblástica y anhidrasas carbónicas eritrocíticas. *Soc. med. Mex.*, 99:345-52, 1969.
104. SANCHEZ, O.; ESCOBAR, J.I. & YUNIS, J.J. A simple G banding technique. *Lancet*, II:269, 1973.
105. SANYAL, G.; FERRERO, J.L. & MAREN, T.H. Kinetics and inhibition of carbonic anhydrase catalyzed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitro-alfa-toluenesulfonic acid sultone. Comparison with reactions of other substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 744: 171-9, 1983.
106. SANYAL, G. Comparative carbon dioxide hydration kinetics and inhibition of carbonic anhydrase isozymes in vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:165-78, 1984.
107. SAPIRSTEIN, V.S.; STROCCHI, P.; GILBERT, J.M. Properties and function of brain carbonic anhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 81-93, 1984.
108. SHAPIRA, E.; BEN-YOSEPH, Y.; EYAL, F.G. & RUSSELL, A. Enzymatically inactive red cell carbonic anhydrase B in a family with renal tubular acidosis. *J. Clin. Invest.*, 53:59-63, 1974.
109. SIFFERT, W.; FOX, G.; GROS, G. Carbonic anhydrase in human platelets: Effects of carbonic anhydrase inhibition on platelet aggregation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:207-9, 1984.

110. SINET, P.M.; ALLARD, D.; LEJEUNE, J. & JÉROME, H. Augmentation d'activité de la superoxyde dismutase érythrocytaire dans la trissomie pour le chromosome 21. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 278: 3267-70, 1974. *appud* SINET, 82 *op cit*
111. SINET, P.M.; MICHELSON, A.M.; BAZIN, A. LEJEUNE, J. & JÉROME, H. Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trysomy 21 subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 910-5, 1975 *appud* SINET, 82 *op cit*
112. SINET, P.M. Metabolism of oxygen derivatives in Down's syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 376: 83-94, 1982.
113. SLY, W.S.; HEWETT-EMMETT, D.; WHYTE, M.P.; YA-SHIU, L.Y. & TASHIAN, R.E. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autosomal recessive syndrome of osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Proc. natl. acad. Sci. U.S.A.* 80: 2752-56, 1983.
114. SOUSA, M.F.A. *Monoclonismo cromossômico do grupo G em pais de crianças com trissomia livre do 21.* Ribeirão Preto, 1985. Tese (Mestrado), USP, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
115. SPICER, S.S.; SENS, M.A.; HENNIGAR, R.A. & STOWARD, P.J. Implications of the immunohistochemical localization of the carbonic anhydrases isozymes for their function in normal and pathological cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 382-97, 1984.
116. STADIE, W.C. & O'BRIEN, H. The catalyses of the hydratation of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by an enzyme isolated from red blood cells. *J. Biol. Chem.*, 103: 521-9, 1933.
117. STOREY, B.T.; DODGSON, S.J. & FORSTER II, R.F. Mitochondrial carbonic anhydrase: the purified enzyme. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 210-1, 1984.
118. SUNDARAM, V.; RUMBOLO, P.; STROSCIUGLIO, P. & SLY, W.S. Carbonic anhydrase II deficiency: diagnosis and carrier detection using differential enzyme inhibition and inactivation. *Am. J. Hum. Genet.*, 38: 125-36, 1986.
119. SWENSON, E.R. The respiratory aspects of carbonic anhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429: 547-60, 1984.
120. TALBOT, T.R., Jr & ROSS, J.F. The zinc content of plasma and erythrocytes of patients with pernicious anemia, sickle cell anemia, polycythemia vera, leukemia and neoplastic disease. *Lab. Invest.*, 9: 174-84, 1960.
121. TANIGUCHI, N.; ISHIKAWA, N & KONDO, T. Inhibitory effect of thyroxine on carbonic anhydrase B isozyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 85: 952-8, 1978.
122. TASHIAN, R.E. The esterases and carbonic anhydrases of human erythrocytes. In: YUNIS, J.J., ed., *Biochemical Methods in Red Cell Genetics*, New York, Academic Press, 1969, p. 307-36.
123. TASHIAN, R.E. & CARTER, N.D. Biochemical genetics of carbonic anhydrase. *Adv. Hum. Genet.*, 8: 1-56, 1976.
124. TASHIAN, R.E.; KENDALL, A.G. & CARTER, N.D. Inherited variants of human red cell carbonic anhydrase. *Hemoglobin*, 4: 635-51, 1980.
125. TASHIAN, R.E.; HEWETT-EMMETT, D. & GOODMAN, M. On the evolution and genetics of carbonic anhydrases I, II and III. *Curr. top. Biol. Med. Res., Isozymes*, 7: 79-100, 1983.

126. TASHIAN, R.E.; HEWETT-EMMETT, D.; DODGSON, S.J.; FORSTER II, R.E. & SLY, W.S. The value of inherited deficiencies of human carbonic anhydrase isozymes in understanding their cellular roles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:262-75, 1984.
127. VALLEE, B.L.; LEWIS, H.D.; ALTSCHULE, M.D. & GIBSON II, J.G. The relationship between carbonic anhydrase activity and zinc content of erythrocytes in normal, anemic and other pathologic conditions. *Blood*, 4:467-78, 1949.
128. VENTA, P.J.; SHOWS, T.B.; CURTIS, P.J. & TASHIAN, R.E. Polymorphic gene for human carbonic anhydrase II: A molecular disease marker located on chromosome 8. *Proc. Natn. acad. Sci. U.S.A.*, 80:4437-40, 1983.
129. VERPOORTE, J.A.; MEHTA, S. & EDSALL, J.T. Esterase activities of human carbonic anhydrase B and C. *J. Biol. Chem.* 242:4221-9, 1967.
130. VINIK, A.I. & HELDSINGER, A.A. Cytochemical quantification of physiologic regulation of oxyntic cell carbonic anhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:592-6, 1984.
131. VOGH, B.P. The relation of choroid plexus carbonic anhydrase activity to cerebrospinal fluid formation: study of three inhibitors in cat with extrapolation to man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219:321-31, 1980.
132. VOGH, B.P. & MAREN, T.H. Importance of carbonic anhydrase in the production of cerebrospinal fluid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:607-8, 1984.
133. WALZER, S.; GERALD, P.S.; BREAU, G.; O'NEILL, D. & DIAMOND, L.K. Hematologic changes in the D-1 trisomy syndrome. *Pediatrics*, 39:419-29, 1966.
134. WEATHERALL, D.J. & McINTYRE, P.A. Developmental and acquired variations in erythrocyte carbonic anhydrase isozymes. *Br. J. Haemat.*, 13:603-14, 1967.
135. WEHINGER, H. Untersuchungen über die Erythrocyten Carboanhydrasen bei pathologischen Zuständen im Kindersalter. *Z. Kinderheilk.*, 114:163-74, 1973.
136. WEHINGER, H. & PEIKERT, B. Erythrozyten Carboanhydrasen als Maturitätsindex im Vergleich zu den parametern der Hamoglobinogenese. *Helv. paediat. Acta*, 28:117-26, 1973.
137. WILSON, M.G.; SCHROEDER, W.A. & GRAVES, D.A. Postnatal changes of hemoglobin F and A₂ in infants with Down's Syndrome (G trisomy). *Pediatrics*, 42:349-53, 1968.
138. WISTRAND, P.J. & RAO, S.N. Immunologic and kinetic properties of carbonic anhydrases from various tissues. *Biochim. biophys. Acta*, 154:130-44, 1968.
139. WISTRAND, P.J. Human renal cytoplasmic carbonic anhydrase. Tissue levels and kinetic properties under near physiological conditions. *Acta Physiol. Scand.*, 109:239-48, 1980.
140. _____ The importance of carbonic anhydrase B and C for the unloading of CO₂ of the human erythrocyte. *Acta physiol. scand.*, 113:417-26, 1981.
141. _____ Properties of membrane-bound carbonic anhydrase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:195-206, 1984a.
142. _____ The use of carbonic anhydrase inhibitors in ophthalmology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:609-19, 1984.