

Este exemplar corresponde
à versão final da Tese
de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas
da UNICAMP pelo médico
Omar Sérgio Caticha Alfonso
Campinas, 24 de agosto de 1990
Ja

OMAR SERGIO CATICHA ALFONSO

Prof. Dra. Denise Y. J. Norato
- Orientadora -

Denise

**ZINCO, ANIDRASE CARBÔNICA ERITROCITÁRIA E PROLACTINA NA
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Mestre em Medicina

Orientador: Prof. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato

1990

Dr. Janovitz

AL28z

13042/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado nos Laboratórios de Genética Médica
e de Endocrinologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Dra. Denise Yvonne Janovitz Norato os meus sinceros agradecimentos pelo incentivo e orientação eficiente e tranquila.

Ao Prof. Dr. Marcos A. Tambascia pelo auxílio, apoio e orientação durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Alberto Magna e ao Prof. Dr. Bernardo Beiguelman, por terem sido meus primeiros grandes mestres e orientadores e pelo constante incentivo ao meu crescimento na carreira científica.

Aos demais professores da disciplina de Endocrinologia e Metabologia da FCM da UNICAMP, Drs. Lúcia M. Assumpção, Maria Tereza M. Baptista, Heraldo Garmes, Denise Zantut e Elizabeth J. Pavin, os meus agradecimentos pela formação em Endocrinologia e pelo incentivo dado ao presente trabalho.

Ao meu colega de residência Dr. Raul Neder Porrelli, pelas frutíferas discussões que geraram as ideias deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Stephenson Caticha-Ellis e ao Prof. Dr. Ariel Caticha pela interpretação matemática de uma parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Gentil Alves Filho pelas discussões, incentivo e livre acesso ao Serviço de Hemodiálise da UNICAMP e do Hospital Santa Rita de Cassia (SP).

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos de Castro, Chefe do Setor de Hemodiálise do Hospital Irmãos Penteados, o meu sincero reconhecimento pela sua cooperação.

Ao Prof. Dr. José A. Gontijo, pelos ensinamentos e acesso

ao seu laboratório no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da UNICAMP.

Aos biólogos Paulo Latuf Filho, Sandra Maria Grandin Pereira e Conceição Aparecida da Silva, pela eficiente cooperação em todas as etapas do trabalho laboratorial.

À Dra. Neuci Fenalti Hoehner e a bióloga Maria Inês de Souza pelo acesso ao Laboratório de Patologia Clínica da FCM da UNICAMP, onde se realizaram as dosagens de zinco e a densitometria das isozimas da anidrase carbônica.

Ao Prof. Dr. Frederick Carl Strong, pelo fornecimento de zinco metálico.

À HOECHST do Brasil, pelo apoio e fornecimento descompromissado de material e drogas.

Aos funcionários do Departamento de Genética Médica, Sonia A. Alípio dos Santos, Antonio Conceição Costa, Henry Norberto Ciolfi, Geralda Luzia Alves, Maria Madalena V. Rosa e a química Edi Lúcia Sartorato pela boa vontade com que realizaram tarefas nem sempre relacionadas ao seu trabalho.

Aos pacientes e pessoas do grupo controle que doaram sangue para a realização deste trabalho.

À minha esposa Aurora, pelo incentivo, carinho e compreensão.

Aos meus pais e irmãos, pelo exemplo de dedicação, perseverança e responsabilidade.

À Aurora, minha querida esposa.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO

I.1- O zinco e sua importância nos sistemas biológicos.....	1
I.2- As alterações hormonais na Insuficiência Renal Crônica.....	6
I.3- Zinco e prolactinemia na Insuficiência Renal Crônica.....	10
I.4- Anidrase Carbônica, Bioquímica e Fisiologia.....	14

II-OBJETIVOS.....20

III-CASUÍSTICA E MÉTODOS.....21

III.1- Casuística.....	21
III.2- A coleta de sangue.....	22
III.3- Dosagens Bioquímicas.....	24
III.3.a-Determinação da concentração de zinco sérico.....	24
III.3.b-Determinação da concentração de zinco intra-leucocitário.....	24
III.3.c-Quantificação da hemoglobina.....	26
III.3.d-Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária.....	26
III.3.e-Quantificação protéica da anidrase carbônica eritrocitária.....	28
III.3.f-Dosagem da prolactina.....	30
III.4.g-Efeito <i>in vitro</i> do zinco na atividade da anidrase carbônica.....	31
III.6- Análise estatística.....	32

IV- RESULTADOS.....33

V- DISCUSSÃO.....56

VI- CONCLUSÕES.....61

VII- RESUMO.....62

VIII-SUMMARY.....64

IX- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....66

I-INTRODUÇÃO

I.1- O zinco e sua importância nos sistemas biológicos

O zinco é um metal de número atômico 30 e de 65,37 unidades de massa atômica, sendo encontrado nos seres vivos principalmente sob a forma de cátion divalente (Sienko & Plane, 1978).

As primeiras indicações do envolvimento do zinco em sistemas biológicos datam de 1869 quando Raulin (cf. Valee, 1978) mostrou que o *Aspergillus niger* não crescia na ausência desse metal. Logo a seguir o zinco foi encontrado em plantas e em tecidos animais, surgindo, no início do século, as primeiras evidências da sua importância para o crescimento normal das plantas superiores (Valee, 1978). Nas décadas seguintes pouco se avançou nesses estudos, sendo as ações tóxicas do zinco conhecidas bem antes do estabelecimento de seu papel nas funções biológicas essenciais. Os estudos da "Febre do fumo metálico", causada pelo excesso de exposição a gases que contêm zinco, levaram Collier & Drinker, em 1926 (cf. Valee, 1978), a padronizarem o primeiro método químico que dosava, de maneira pouco sensível o nível de zinco em materiais biológicos. Nos últimos quarenta anos os problemas analíticos foram paulatinamente resolvidos, causando rápido avanço na área em questão. Métodos que inicialmente utilizavam a ditizona como reagente e que se baseavam na espectrofotometria e fluorimetria foram abandonados dando lugar às técnicas de espectroscopia de

RX e eletroquímicas que, apesar de precisas, são bastante trabalhosas. Hoje tem-se como consagrada a espectrofotometria de absorção atômica, que é um método de dosagem simples, rápido e reproduzível (Smith et al, 1979, Falchuk et al, 1988).

Atualmente a importância do zinco no crescimento, desenvolvimento e reprodução de animais de laboratório, microrganismos e seres humanos é reconhecida. Porém, na maior parte das vezes, os mecanismos envolvidos não são entendidos (Chlebowski, 1978).

Muitas enzimas dependem do zinco como cofator ou o contém na sua estrutura, sendo as mais conhecidas: as peptidases (carboxipeptidases A e B e as carboxipeptidases de ampla especificidade), a fosfatase alcalina, a anidrase carbônica, a desmutase de superóxido, as desidrogenases alcólicas, as aldolases, a transcarbamilase de aspartato, a transcarboxilase e a Polimerase I de DNA (Valee, 1978 - Chlebowski & Coleman, 1978). Uma vez que o zinco é constituinte estrutural dessas enzimas, é importante ressaltar que a concentração de zinco nos diversos tecidos são, em parte, dependentes da necessidade local quanto a uma alta ou baixa atividade das enzimas citadas. Assim, a redistribuição desse metal é mais ou menos homogênea nos indivíduos sadios, assumindo as mais diversas distribuições na vigência de doenças, tais como, insuficiência renal crônica, anemia falciforme, acidoses metabólica e respiratória de causas variadas etc. (Chlebowski & Coleman, 1974). Uma vez que os mamíferos são incapazes de mobilizar rapidamente o zinco de outros compartimentos ou estoques é fácil compreender as dramáticas consequências da deficiência do zinco, o que torna

simples a realização de modelos experimentais, já que baixos níveis séricos de zinco são obtidos com apenas poucos dias de dietas deficientes desse metal (Valee, 1987). Intensas alterações dermatológicas no rato, anormalidades constitucionais no esqueleto da galinha e paraqueratose nos suínos surgem quando esses animais são submetidos a dietas deficientes em zinco, sendo essas alterações mais severas quanto mais jovem for o animal e rapidamente revertidas caso se reestabeleça um aporte dietético com concentração normal de zinco (Chlebowski & Coleman, 1976). No homem uma das consequências mais conhecidas da deficiência de zinco é a acrodermatite enteropática, doença predominantemente observada em crianças com distúrbios da absorção intestinal desse metal, que manifestam intensas alterações dermatológicas e de crescimento. Nessas crianças, assim como nos animais, a terapia com zinco tem resultados extremamente satisfatórios (Abou-Mourad et al., 1979).

É interessante ressaltar que os efeitos deletérios da deficiência de zinco podem ser parcialmente evitados se houver concomitante deficiência de cálcio (Hurley & Tao, 1972 - Masters et al., 1986). Heth et al., (1966), mostraram que o aumento da ingestão de cálcio por si só induz à diminuição na absorção de zinco em ratos, muito embora tais resultados não tenham sido observados no homem (Spencer et al., 1965). Ao nível celular, é comum, o zinco e o cálcio terem efeitos opostos, sendo o primeiro inibidor e o segundo, estimulador da calmodulina, proteína muito importante pelo seu papel nos processos regulatórios celulares (Brewer et al., 1979).

Há necessidade de zinco para o funcionamento normal do

sistema imunológico, consequente ao seu papel nos linfócitos e em outras células imunocompetentes. De fato, a função imunológica depende da capacidade de divisão e diferenciação dessas células e, portanto, da presença de zinco em quantidades suficientes, uma vez que, como foi citado anteriormente, esse metal é constituinte da Polimerase I de DNA, enzima essencial para a divisão celular (Solé & Naspitz, 1988). A carência de zinco em animais leva à intensa atrofia dos órgãos linfóides, além da diminuição da resposta mitogênica específica e não específica, diminuição da produção de anticorpos e da função citotóxica, sendo essas alterações proporcionais à intensidade da carência (Beach et al.,1980 - Fernandes et al.,1979).

Ocorrem alterações no metabolismo do zinco em diversas doenças endócrinas, como no hipertireoidismo, onde são encontradas baixas concentrações de zinco intra-eritrocitário. Tais achados podem ser úteis para diferenciar o hipertireoidismo adquirido antes da gestação daquele que surge transitoriamente nesse período. No primeiro caso, o nível intra-eritrocitários de zinco é baixo, sendo normal no segundo (Lao et al.,1987).

A hipozincemia* também é observada no diabetes mellitus tipo II sendo causada pela hiperzincúria** apresentada por esses pacientes. A perda urinária de zinco é tanto maior quanto maior for o descontrole da doença, o que explica, em parte, os problemas imunológicos associados a essa condição (Kinlaw et al., 1983).

* - "baixos níveis séricos de zinco"

** - "perda urinária excessiva de zinco"

Durante o ciclo menstrual os níveis séricos de zinco tendem a flutuar de maneira cíclica, estando altos durante a menstruação e a fase folicular e declinando nas fases ovulatória e lútea. Já o zinco intra-eritrocitário se mantém constante durante todo ciclo menstrual (Deuster et al.,1987).

1.2- As alterações hormonais na Insuficiência Renal Crônica

A falta de função renal decorrente da lesão do rim persistente e irreversível é denominada insuficiência renal crônica (IRC) e acarreta intensas alterações metabólicas capazes, caso não sejam tomadas medidas que restituam a depuração das substâncias tóxicas do organismo, de levar ao óbito. Essas medidas incluem a diálise peritoneal, a hemodiálise e o transplante renal, onde as substâncias tóxicas são filtradas por uma membrana natural (peritônio) ou artificial (celofane semi-permeável) ou ainda pelo próprio tecido renal transplantado de uma outra pessoa (Brenner & Lazarus, 1984).

O reconhecimento da presença de alterações hormonais na IRC foi possível a partir dos anos 60, quando os regimes de diálise passaram a ser eficazes e a sobrevida dos urêmicos, que antes era de semanas, passou a ser de alguns anos. Assim, notou-se que praticamente todos os pacientes com IRC tinham hipogonadismo e muitos apresentavam ginecomastia (Wheeler et al., 1954 - Schmitt et al., 1968), além de outras alterações hormonais posteriormente identificadas (Handelsman, 1985).

A ginecomastia desses pacientes foi confirmada como sendo uma manifestação do hipogonadismo do urêmico, sendo afastadas outras causas frequentes dessa alteração, tais como o uso de drogas, hepatopatias, desnutrição etc... (Lindsay et al., 1967). Também são comuns na IRC a diminuição da libido e da potência, tanto antes quanto depois da instalação da diálise, observando-se grande melhora desse quadro após o transplante

renal (Larsen et al.,1972).

A fertilidade dos homens, quando em programas de hemodiálise, é de aproximadamente metade da observada na população de mesma idade (Elstein et al.,1969). Também ocorrem alterações substanciais no número e na mobilidade espermática desses pacientes (Canale et al.,1984), sendo que encontra-se, também baixo o nível de testosterona, havendo franca melhora após o transplante (Lin et al.,1975- Hodsworth et al.,1978- Chopp et al.,1978 - Baumgartem, 1977). Essa alteração pode surgir quer por diminuição na taxa de produção, quer por aumento na depuração metabólica desse hormônio (Van Kammen et al.,1978). Uma vez que não há alterações na proteína transportadora de testosterona na IRC, aliado ao fato de que ela não se altera na diálise, a diminuição do nível desse andrógeno não pode ser explicada por esse mecanismo (Van Kammen et al.,1978 - Stewart-Bentley et al.,1974).

O nível de estradiol, tanto nos homens como nas mulheres, tem sido descrito como normal ou baixo (Swerdloff et al.,1970 - Strickler et al.,1974). É importante ressaltar que essa alteração nas mulheres urêmicas pode ser secundária à hiperprolactinemia (Handelsman, 1985), uma vez que a normalização do nível de prolactina, pelo tratamento com bromocriptina, melhora o nível de estradiol (Wass et al.,1978).

Embora o nível das gonadotrofinas não se altere após a diálise peritoneal ou hemodiálise (Guevara et al.,1969), o nível sérico de LH costuma estar elevado na IRC (Hodsworth et al., 1978). Já o nível de FSH pode ser normal, havendo também elevações ocasionais (Swerdloff et al.,1970 - Morley et al.,

1978). Após o uso do hormônio estimulador das gonadotrofinas (GnRH), pode ocorrer um aumento exacerbado do LH com demora em retornar ao nível basal, sendo que, em menor proporção, achados similares podem ocorrer com relação ao FSH. Essas respostas anômalas não são corrigidas com os esquemas de diálise, porém o são quando o paciente é transplantado com sucesso (Le Roith et al., 1980 - Schernthaner et al., 1979). Importantes alterações menstruais ocorrem nas mulheres urêmicas, sendo que a amenorréia surge frequentemente quando a filtração glomerular cai abaixo de 4 ml/minuto (Shaldon, 1966).

A subunidade α das glicoproteínas também está com nível aumentado na IRC, sem alteração nas suas propriedades cromatográficas (Hagen et al., 1976). Essas alterações refletem a hipersecreção hipofisária causada pelas influências ainda não compreendidas da uremia na função gonadotrófica dessa glândula (Blackman et al., 1982).

A função tiroideana é, na maioria das vezes, normal. Nem sempre, porém é fácil diagnosticar clinicamente o hipotireoidismo, uma vez que essa doença tem sintomas em comum com a IRC, tais como, fraqueza, cansaço, ressecamento da pele e dificuldade para realização de tarefas intelectuais (Handelsman, 1985). Quando surgem alterações tiroideanas, essas se apresentam como um hipotireoidismo secundário (Cowden et al., 1981). A produção de T_3 , T_4 e T_3 reverso costumam ser normais na IRC, muito embora a conversão periférica de T_4 em T_3 esteja diminuída (Wartofsky e Burman, 1982).

O nível de GH costuma estar elevado na IRC, mantendo-se inalterado durante o esquema de diálise. Já o transplante renal

reverte essa anormalidade cuja origem é decorrente da deficiência no mecanismo regulatório da secreção de GH pelos somatotrofos (Feldman, 1974).

1.3- Zinco e prolactinemia na Insuficiência Renal Crônica

O nível sérico da prolactina está frequentemente aumentado na IRC (Cowden et al.,1978- Chirito et al.,1972 - Nagel et al., 1973). Em busca da etiologia de tal disfunção, diversos autores se preocuparam em avaliar, de maneira clássica, o controle da secreção de prolactina. Assim, houve a preocupação de afastar a ingestão de drogas sabidamente causadoras de hiperprolactinemia, uma vez que elas são frequentemente utilizadas por pacientes com IRC (antihipertensivos, antidepressivos, antieméticos e tranquilizantes). Isso foi confirmado por diversos autores ao afastarem dos estudos os pacientes que utilizassem tais medicações (Chirito et al.,1972 -Nagel et al., 1973). É interessante ressaltar que as drogas com efeitos colaterais anti-dopaminérgicos agravam a hiperprolactinemia do paciente urêmico, porém a prevalência dessa alteração não é maior do que nos pacientes com IRC não usuários dessas medicações (Cowden et al.,1978- Gomez et al.,1980). Também estudou-se a prevalência dessa condição patológica em doenças renais não urêmicas, tais como a síndrome nefrótica, mostrando-se que a hiperprolactinemia somente surge quando ocorre queda significativa da filtração glomerular (Cowden et al.,1978 - Ijaiya et al., 1980).

Uma vez que o nível de prolactina não muda agudamente após as sessões de diálise (Hagen et al.,1976), e que também a extração renal da prolactina representa apenas uma pequena fração (<5%), pode-se supor que a hiperprolactinemia dos urêmicos não seja causada por alterações na depuração plasmática

dessa substância (Cowden et al.,1978). A realização de estudos dinâmicos da secreção de prolactina, mostrou respostas deficientes ao estímulo pelo TRH, metoclopramida (Cowden et al.,1981), clorpromazina (Ramirez et al.,1977), arginina e hipoglicemia induzida por insulina (Schmitz et al.,1983). De maneira similar foi demonstrada a reduzida inibição causada pelos agonistas dopaminérgicos, L-dopa (Ramirez et al.,1977), bromocriptina (Cowden et al.,1981) e dopamina (Sievertsen et al., 1980). No entanto, a automaticidade do lactotrofo é revertida após o transplante renal (Lin et al., 1979).

Inicialmente imaginava-se que a etiologia de tal alteração fosse similar à das outras disfunções endócrinas da uremia, isto é, alterações metabólicas que de alguma maneira levariam ao controle anômalo da hipófise (Handelsman, 1985). Obviamente tais alterações metabólicas são importantes na determinação da hiperprolactinemia da IRC, porém outros fatores inesperados passaram a ser implicados de maneira decisiva para explicar tal disfunção.

Em 1973, La Bella et al., estudando a influência da adição de íons metálicos encontrados em extratos hipotalâmicos sobre as secreções hormonais de culturas de células de hipófises de ratos, descobriram que o cobre, o zinco e o níquel tinham efeitos importantes na liberação dos hormônios hipofisários. Assim, o cobre era capaz de estimular o hormônio estimulador da tireóide (TSH), o adrenocorticotrófico (ACTH), o luteinizante (LH), o de crescimento (GH) e a prolactina, sendo o zinco e o níquel estimuladores do TSH, ACTH, LH e GH, porém inibidores da prolactina. Deve-se ressaltar que, as concentrações de zinco

utilizadas eram suprafisiológicas.

Dez anos após as primeiras evidências da influência do zinco na secreção da prolactina, dois grupos de autores demonstraram que, em culturas de hipófise de ratos o zinco, em concentrações fisiológicas (da ordem de 10 a 15 uM), inibia a secreção e a síntese da prolactina (Login et. al.1983 & Judd et al, 1984), sendo que em concentrações suprafisiológicas (100 uM) também causara a liberação de LH (Login et al.,1983).

Em 1989 Koppelman et al. estudaram o efeito da administração aguda de zinco em humanos, mostrando que esse íon era incapaz de alterar o nível da prolactina em mulheres normais e hiperprolactinêmicas. Já Brandão Neto et al. (1989) conseguiram mostrar que zinco administrado via oral reduz o nível da prolactina, em indivíduos normais de ambos sexos, diferindo, portanto, seus achados daqueles publicados por Koppelman et al.(1989). Segundo Travaglini et al.(1989), não há redução da prolactina nos pacientes com IRC, após 6 meses de terapia com zinco. Entretanto, Mahajan et al.(1985), observaram que 18 a 24 meses de terapia com zinco podiam levar a efeitos benéficos com relação a redução do nível de prolactina. Além disso, esses autores mostraram a presença de forte correlação negativa entre o nível sérico de zinco e da prolactina, quando incluíam, no mesmo grupo, os pacientes tratados com zinco e os com placebo. Esses mesmos autores, em 1982, haviam demonstrado elevação no nível de testosterona em pacientes com IRC, após a terapia com zinco.

Com relação ao metabolismo do zinco na IRC, pode-se afirmar que existe deficiência na absorção intestinal desse metal

(Antoniou et al.,1981, Foot & Hinks, 1988), o que, associado a fatores não totalmente esclarecidos, leva a uma baixa zincemia (Antoniou et al.,1977 e Mahajan et al.,1982). O nível de zinco intra-leucocitário tem sido utilizado como método para avaliar o *status* corporal de zinco, uma vez que o zinco sérico nem sempre reflete a quantidade total desse metal no organismo (Solé & Naspitz,1988 - Hinks et al.,1982). Através dessa técnica demonstrou-se que os pacientes com IRC têm deficiência global de zinco (Foot & Hinks,1987). Também há referências de que as concentrações de zinco são baixas ou normais em vários órgãos de pacientes que faleceram de IRC (Mahajan et al.,1979), muito embora, o compartimento intra-eritrocitário apresente nível aumentado desse metal. (Sandstead, 1980). Também demonstrou-se que pacientes urêmicos não apresentam maiores perdas urinárias ou fecais de zinco (Handelsman, 1985 - Mahajan et al.,1979), o que associado ao alto nível intra-eritrocitário de zinco encontrado nos pacientes com IRC, permite supor que ocorra uma redistribuição compartimental desse metal. As modificações relatadas por alguns autores no nível eritrocitário da anidrase carbônica, enzima que contém um átomo de zinco por molécula, poderiam estar relacionadas ao aumento intra-eritrocitário de zinco.

I.4- Anidrase Carbônica. Bioquímica e Fisiologia.

O grupo de Meldrum e Roughton (1933) isolou, purificou e definiu as propriedades da anidrase carbônica (CA) encontrada nos eritrócitos e outros tecidos e responsável pelo aumento da velocidade das reações de hidratação do CO_2 e desidratação do ácido carbônico (H_2CO_3). Essa enzima é, no aspecto quantitativo, a segunda proteína encontrada nos eritrócitos.

Em 1940, Keillin e Mann demonstraram a presença de zinco na anidrase carbônica e em 1949 Valee et al. mostraram a correlação existente entre a atividade da CA e a concentração intra-eritrocitária de zinco, sendo que tal achado foi baseado na dosagem da atividade da enzima em várias doenças que apresentavam diferentes concentrações de zinco no interior das hemácias. Em 1960 Lindskog e Malstrom (1960) demonstraram que a dissociação do zinco da enzima determinava a perda da atividade enzimática.

Até o momento são conhecidas cinco isozimas da CA (EC.2.2.1.1), sendo três citoplasmáticas, CA I, CA II e CA III (Lindskog et al., 1984), uma ligada à membrana celular, CA IV (Wistrand, 1984), e a última, CA mit, encontrada nos mitocôndrios (Storey et al., 1984). Semelhantes em sua configuração, as isozimas apresentam peso molecular em torno de 29000 e um átomo de zinco por molécula, são hidrossolúveis, e têm atividade entre pH 6 e 10, com ação máxima em pH 8 (Maren, 1967). Além das isozimas principais, isozimas secundárias de cada uma delas podem ser formadas por modificações na conformação molecular (Headings & Tashian, 1971), por

desaminação (Funakoshi & Deutsch, 1969), ou pela combinação desses processos, sendo essas isozimas denominadas pela sigla da isozima principal seguida por algarismos arábicos: CA I-1, CA II-1, CA II-2 etc...(Tashian et al.,1984). A isozima CA I-1, que representa um estágio do processo de degradação da CA I, era , anteriormente, conhecida como CA A (Osborne & Tashian, 1974).

As isozimas da anidrase carbônica não têm a mesma distribuição nos diferentes tecidos, o que sugere que elas tenham papéis fisiológicos diferentes. Assim, enquanto a CA I é predominantemente eritrocitária, a CA II é ubíqua, sendo encontrada tanto nas hemácias como no cérebro, pulmões, rins, sistema digestivo e diversas glândulas (Tashian et al.,1984). A CA III é encontrada em pequena quantidade nos eritrócitos, porém é a principal isozima da CA encontrada na musculatura esquelética, além de estar presente também, nos hepatócitos (Funakoshi & Deutsch, 1971- Carter et al.,1979 -Chegwidden et al.,1984). A isozima CA IV foi identificada na membrana das células renais (Wistrand, 1984) enquanto que a CA mit foi isolada dos mitocôndrios dos hepatócitos (Storey et al.,1984).

Embora a reação catalisada pela anidrase carbônica seja a mesma em todos os tecidos, isto é, a hidratação do CO_2 , ela apresenta diferentes papéis fisiológicos, sendo responsável ora pela retirada e transporte do CO_2 , ora pela produção de íons hidrogênio e HCO_3^- , que participam de trocas iônicas através das membranas plasmáticas, ou de reações metabólicas específicas (Maren,1984). No primeiro caso, temos as anidrases carbônicas localizadas no eritrócito e no endotélio capilar de diversos órgãos, onde catalisam a hidratação do CO_2 produzido pelo

metabolismo celular, permitindo o seu transporte como íon HCO_3^- 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 (Gros et al.,1984), e pela enzima presente no cristalino, que facilita a saída do CO_2 produzido (Friedland & Maren, 1984). A enzima encontrada no endotélio pulmonar também tem sido responsabilizada pela formação de HCO_3^- para facilitar a difusão do CO_2 através da barreira alvéolo-capilar (Swenson et al.,1984).

Nas células dos 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 HCO_3^- para o líquido intersticial, alcalinizando-o (Vinik & Helsinger, 1984 e Spicer et al.,1984). No intestino grosso, a anidrase carbônica do epitélio colunar possivelmente provê íons hidrogênio para a 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 de urina, além de mediar a reabsorção dos íons HCO_3^- e potássio. (Dobyan & Bulger,1982; Dubose, 1984; Wistrand, 1984; Spicer et al.,1984 - Lonnerholm,1984).

No pâncreas, a anidrase carbônica está implicada na manutenção do elevado teor de HCO_3^- do líquido pancreático (Kumpulainen & Jalovaara, 1981), enquanto nos ductos hepáticos e nas glândulas salivares, embora se presuma que ela também esteja relacionada às trocas iônicas, seu papel fisiológico ainda não foi esclarecido (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 HCO_3^- necessários para o sistema de transporte de ânions na produção do humor aquoso (Kishida et al., 1984).

No plexo coróide, os íons HCO_3^- , resultantes da hidratação do CO_2 , são responsáveis pela maior parte do fluxo do líquido céfalo-raquidiano (Vogh, 1980) em cooperação com a Na^+/K^+ ATPase, que supre os íons sódio (Masuzawa et al., 1984 - Vogh & Marem, 1984). Os inibidores da anidrase carbônica diminuem a produção de liquor, o que indica o seu uso em algumas doenças neurológicas (Vogh, 1980).

A CA 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 também existe nos hepatócitos, onde fornece os íons HCO_3^- 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 na tiróide é decorrente do fornecimento de íons HCO_3^- que competem com o iodeto pelas

substâncias transportadoras de ânions, participando assim da regulação do transporte de iodo através das membranas celulares tiroideanas, sendo esse processo inibido pelo hormônio estimulador da tireóide (TSH) (Chow et al.,1984).

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

Ocorrem alterações da anidrase carbônica eritrocitária em diversas doenças, entre elas na Insuficiência Renal Crônica (IRC). Nessa doença foi observado aumento da concentração da CA I, fato que não tem sido considerado como mecanismo compensatório, uma vez que esse aumento não está relacionado nem com a duração e nem com a gravidade dos distúrbios ácido-básicos ou da uremia (Drukker et al.,1972). Esse aumento, entretanto, apresenta associação negativa com a depuração da creatinina e sempre ocorre nos pacientes que apresentam reserva alcalina menor que 20 mEq/l (Mondrup & Anker, 1974). Desse modo, a acidose também pode ser considerada como um estímulo para o aumento da CA I, o que é reforçado pelo fato de que fetos submetidos a acidose no final da gestação apresentam um aumento do nível dessa isozima (Moynihan, 1980).

Também são referidas modificações da CA eritrocitária nas doenças hormonais. Assim, essa enzima está diminuída no hipertireoidismo e aumentada no hipotireoidismo, havendo normalização após a correção do distúrbio hormonal e estando o nível da isozima CA I inversamente relacionado ao de tiroxina (Weatherall & Mctyre,1967- Anker & Mondrup,1974- Lie-Injo et

al., 1967- Magid, 1970- Noorgard-Pedersen & Lindholm, 1972).

O aumento da CA II em gestantes sugere que os hormônios sexuais também podem determinar modificações dessas isozimas (Funakoshi & Deutsch, 1971). Sabe-se que o nível eritrocitário de CA I correlaciona-se com o nível sérico de progesterona, o que os leva a variar conjuntamente durante o ciclo menstrual. (Paciorek & Spencer, 1980). Por outro lado, não se observam alterações no nível da CA em mulheres que utilizam anticoncepcionais orais (Noorgard-Pedersen & Lindholm, 1972).

II- OBJETIVOS

Considerando que nos pacientes com IRC submetidos a hemodiálise observa-se um aumento do nível de prolactina, diminuição do nível sérico e aumento do nível intra-eritrocitário de zinco, além de elevação na concentração eritrocitária da anidrase carbônica, o estudo simultâneo desses fatores poderá levar à melhor compreensão da inter-dependência entre eles. Com esse objetivo propusemo-nos a:

- 1- Avaliar o nível sérico de zinco e de prolactina, a atividade e a concentração da anidrase carbônica eritrocitária e das suas isozimas em um grupo de pacientes com IRC submetidos a um esquema de hemodiálise.
- 2- Verificar a relação entre a concentração e a atividade da anidrase carbônica eritrocitária com o nível sérico de prolactina e do zinco.
- 3- Avaliar o *status* corporal de zinco através da dosagem do zinco intra-leucocitário nos pacientes com IRC em esquema de hemodiálise.
- 4- Estudar o efeito *in vitro* da adição de zinco sobre a atividade da anidrase carbônica eritrocitária de indivíduos hígidos.

III-CASUÍSTICA E MÉTODOS

III.1- Casuística

Foram estudados 34 pacientes (18 homens e 16 mulheres) com IRC de etiologia não determinada e submetidos à hemodiálise há pelo menos um ano, sendo que 25 deles eram atendidos no Hospital Irmãos Penteado de Campinas (SP) e os 9 restantes no Serviço de Nefrologia do Hospital Santa Rita de Cássia em São Paulo. Tomou-se o cuidado de excluir pacientes que utilizavam drogas sabidamente causadoras de hiperprolactinemia (α -metildopa, metoclopramida, etc). A idade média e o desvio padrão em pacientes do sexo masculino foi de 49.78 e 13.24 e de 42.14 e 14.22 anos nos do sexo feminino.

O grupo controle foi constituído de 40 indivíduos normais (21 homens e 19 mulheres), que não utilizavam qualquer medicação e não apresentavam alteração ao exame físico. Em todos investigou-se história de galactorreia e as mulheres apresentavam ciclos menstruais regulares. Desses, 30 indivíduos eram doadores voluntários do banco de sangue do HC UNICAMP, sendo os 10 restantes médicos desse mesmo hospital. A idade média e o desvio padrão nos indivíduos controles do sexo masculino foi de 41.28 e 11.06 e de 42.94 e 10.12 anos nos do sexo feminino.

Os pacientes com IRC e os controles estudados foram analisados separadamente em dois grupos. Assim, em uma primeira etapa avaliou-se na amostra I, constituída de 16 pacientes, 9

homens e 7 mulheres, 14 caucasóides e 2 de origem negróide, os níveis de prolactina, zinco sérico, hemoglobina, atividade total e concentração da anidrase carbônica eritrocitária e de suas isozimas CA I, CA I.1 e CA II. O mesmo foi realizado em 22 indivíduos normais, 12 homens e 10 mulheres, 20 caucasóides e 2 negróides. Já na amostra II, estudada em uma segunda etapa, 18 pacientes, 9 homens e 9 mulheres, 15 caucasóides e 3 de origem negróide, dosaram-se os níveis de prolactina e de zinco intra-leucocitário, sendo o grupo controle constituído de 18 pessoas, 9 homens e 9 mulheres, 16 caucasóides e 2 negróides.

Amostras de sangue de um terceiro grupo (Amostra III), constituído de 5 homens caucasóides normais com idade média de 30.03 e desvio padrão de 5.35 anos, foram utilizadas para a realização da avaliação, *in vitro*, do efeito da concentração do zinco na atividade total da anidrase carbônica eritrocitária.

III.2- A coleta de sangue

Utilizando-se somente material plástico e descartável colheram-se aproximadamente 20 ml de sangue de cada indivíduo, usando-se como anticoagulante a heparina sódica na razão de 0,01 a 0,02 ml/ml de sangue. Nos pacientes com IRC a coleta foi realizada antes de ser iniciada a sessão de hemodiálise e, nos indivíduos normais, de 2 a 4 horas após o despertar matinal.

Dos indivíduos da Amostra I, inicialmente foram separados 0,5 ml de sangue total para a dosagem da hemoglobina. Os restantes 19,5 ml foram centrifugados a 1800 rpm, durante 10

minutos, sendo o plasma assim obtido estocado a -20°C em 2 frascos livres de zinco, para posterior dosagem do zinco sérico e da prolactina. O concentrado de hemácias por outro lado, foi lavado 3 vezes com solução salina a 0,9%, separando-se após a última centrifugação, também a 1800 rpm durante 10 minutos, uma alíquota para a determinação da atividade da CA sendo o restante estocado a -20°C , para posterior extração da fração protéica correspondente à CA.

Dos indivíduos da Amostra II, 2 ml de sangue foram centrifugados a 1800 rpm e o plasma obtido estocado a -20°C para posterior dosagem da prolactina. O restante do sangue (18 ml) foi utilizado para a separação e contagem dos leucócitos, sendo o concentrado espesso de leucócitos, congelado a -20°C para posterior dosagem do zinco intra-leucocitário.

Na Amostra III, foram colhidas alíquotas de 8 ml de sangue, sendo estas centrifugadas a 1800 rpm e o concentrado de hemácias lavado 3 vezes com solução salina a 0,9%. Esse material foi utilizado para a realização da avaliação do efeito da concentração do zinco na atividade total da CA.

III.3- Dosagens Bioquímicas

III.3.a- Determinação da concentração de zinco sérico

O zinco sérico foi dosado de acordo com a técnica de Falchuk et al.(1988) com discretas modificações, conforme descrito a seguir. Para evitar contaminação pelo zinco, todo material de vidro utilizado nessa determinação foi previamente lavado com ácido nítrico. Realizou-se a desproteinização de 1 ml de plasma pela adição de igual volume de ácido tricloroacético a 10%. Após agitação e centrifugação a 3000 rpm, durante 20 minutos, 1 ml do sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio, onde foi adicionada água desionizada até se obter um volume final de 5 ml de solução, que foi utilizada para a leitura da absorbância em espectrofotômetro de absorção atômica. A concentração de zinco, em cada amostra, expressa em ug/dl de plasma, foi calculada pela comparação da absorbância da amostra com aquela fornecida por uma curva padrão.

III.b- Determinação da concentração de zinco intra-leucocitário

A dosagem do zinco intra-leucocitário foi feita de acordo com a técnica de Hinks et al. (1982) com discretas modificações. A 15 ml de sangue total colocados em provetas graduadas foi adicionada igual quantidade de uma solução de dextran 150 a 10% em solução salina a 0,9 %. Realizou-se a inversão cuidadosa dos tubos para a mistura homogênea do dextran

com o sangue. Após repouso durante 1 hora para sedimentação da serie vermelha, do sobrenadante obtido, correspondente a um líquido turvo e rico em leucócitos, foram retirados 0,1 ml que foram adicionados a 1.9 ml de uma solução de Turk (Ácido acético glacial 4 % com 4 gotas de azul de metileno 1% /100 ml) . Prosseguiu-se com a contagem leucocitária em câmara de Newbauer. Após ser medido o volume, o restante do sobrenadante, foi aspirado com pipeta Pasteur, e colocado em outro tubo de ensaio de polietileno que foi centrifugado a 5000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi desprezado, sendo medido o volume do concentrado de leucócitos que se depositou no fundo do tubo. Esse material foi desproteinizado, através da adição de igual volume de ácido tricloroacético a 10%, sendo novamente submetido a centrifugação a 3000 rpm a temperatura ambiente durante 15 minutos. O sobrenadante límpido obtido serviu para a dosagem do zinco, seguindo a técnica já descrita anteriormente.

A concentração de zinco intra leucocitário foi expressa em pmol por 10^6 leucócitos, sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Zn (pmol por } 10^6 \text{ cel)} = \frac{\text{[Zn] no concentrado digerido de leucócitos (pmol/ml)}}{\text{Volume da suspensão inicial rica em leucócitos (ml)}} \times \frac{\text{Volume do concentrado de leucócitos (ml)}}{\text{Número de leucócitos na suspensão inicial rica em leucócitos (leucócitos/ml)}} \times 10^6$$

III.3.c- 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, que nesse comprimento de onda, é de 13,8.

III.3.d- Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária

Realizou-se a determinação da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária segundo técnica descrita por Norato (1987) que é uma adaptação da técnica originalmente descrita por Tashian (1969), onde se utiliza o acetato de α -naftila como substrato da enzima.

A 1 ml 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). Em dois tubos pipetou-se 0,05 ml do hemolisado diluído 1/40 (v/v)

em água destilada, ao qual acrescentou-se 1 ml de acetato de α -naftila a 1,7 mM em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, contendo dioxana a 2%. A um dos tubos adicionou-se, antes do substrato, 1 ml de acetazolamida a 8 mM 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, 0,5 ml de 5-cloro-o-toluidina (*Fast Red-TR salt*) 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 555 nm, contra tubos brancos contendo água destilada em lugar da enzima e seguindo os mesmos procedimentos acima, isto é, um tubo branco recebeu 1 ml de acetazolamida no início da incubação enquanto o 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 α -naftila (Mestriner, 1970).

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 de incubação a 37 °C. Considerou-se 1 unidade (U) de atividade como 1 μmol de acetato de α -naftol produzido por minuto por ml de hemolisado. A atividade específica foi calculada em relação à quantidade de hemoglobina presente no hemolisado, e expressa em U/mg Hb.

III.3.e- Quantificação protéica da anidrase carbônica eritrocitária

Para a obtenção de uma solução de anidrase carbônica eritrocitária parcialmente purificada utilizou-se a técnica da extração pelo etanol-clorofórmio (Meldrum & Roughton, 1933-Rickli et al., 1964 - Tashian & Carter, 1976). A adaptação descrita a seguir foi realizada por Norato (1987) e foi a que apresentou melhor reprodutibilidade em nosso laboratório.

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, 0,5 ml de etanol a 95 % e 0,62 ml 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 5000 rpm. Filtrou-se o sobrenadante e este serviu para a realização da eletroforese da anidrase carbônica e a dosagem do conteúdo protéico desse material.

A dosagem da proteína presente na solução de anidrase carbônica foi feita pelo método da reação do biureto (Layne, 1957), com pequenas modificações, como descrito a seguir. Acrescentou-se 0,05 ml da solução de anidrase carbônica parcialmente purificada a 2 ml da solução de biureto. Após repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a

absorbância da solução em 546 nm. 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 uma solução de albumina bovina. Com os dados da concentração de proteína da solução e o volume total obtido na purificação de 0,5 ml de concentrado de hemácias, calculou-se a concentração total da anidrase carbônica (CA tot) por ml de concentrado de hemácias, pela fórmula:

$$[CA] = 2 \text{ [mg de proteína/ml da solução]} \times [\text{volume da solução (ml)}]$$

mg/ml de hemácias

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 obtém-se, a partir da origem, 3 bandas, a saber CA II, CA I e CA I-1 sendo a segunda banda a mais concentrada (Ruiz-Reyes & Ramirez-Zorrilla, 1968- Tashian & Carter, 1976). Ao término da eletroforese realizou-se a coloração das fitas mantendo-as imersas em uma solução de Ponceau 0,5 % em TCA 5 % durante 1 minuto. A seguir realizou-se a descoloração do fundo pela imersão das fitas, sucessivamente, em 3 cubas contendo solução descorante (ácido acético a 5%) durante 1 hora nas primeiras 2 cubas e de 36 a 72 horas na última.

Após a fixação procedeu-se a 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 glacial e 0,2 ml de glicerol durante 1 minuto. As fitas foram então incubadas durante 30 segundos em estufa a 60 °C. A densitometria das fitas diafanizadas, fornece um gráfico que apresenta 3 picos correspondentes as isozimas CA II, CA I e CA I-1. Por métodos de integração das curvas obtidas pode-se calcular os percentuais de cada isozima. Assim, conhecendo-se a concentração de proteína presente na solução utilizada para a eletroforese, foi possível estimar a concentração de cada isozima, sendo os resultados expressos em mg de proteína por ml de concentrado de hemácias (mg/ml), como CA I total (CA I + CA I-1), CA I e CA II.

III-3.f- A dosagem da prolactina

A dosagem de prolactina foi realizada pela técnica de radioimunoensaio, utilizando o "Kit" Coat-a-Count da DPC, conforme rotina do laboratório de Endocrinologia da FCM da UNICAMP.

Aos tubos plásticos revestidos de anticorpo anti-prolactina, adicionou-se 0,02 ml de plasma, sendo logo após encubados com 1 ml de prolactina tamponada e marcada com I^{125} (I^{125} -PrL). A separação da fração livre da ligada foi realizada por aspiração. A medida da radioatividade foi realizada em um contador gamma e os valores encontrados comparados com as leituras obtidas por uma curva padrão, expressas em ng/ml.

Todas as amostras, de cada grupo, foram dosadas em um mesmo ensaio e em duplicata, sendo a variação intra-ensaio no primeiro

grupo de 6,7 % e a concentração mínima detectável de 0,9 ng/ml. Já no segundo grupo a variação intra-ensaio foi de 7,2 % e a concentração mínima detectável de 0,98 ng/ml. A variação interensaio encontrada foi de 8,1 % . Os valores da amostra controle não foram significativamente diferentes de controles padronizados anteriormente no laboratório.

III.3.g- Efeito *in vitro* do zinco na atividade da anidrase carbônica

Para o estudo do efeito da concentração de zinco na atividade da anidrase carbônica, foram adicionados à água destilada, para preparação do hemolisado 1/40, quantidades variadas de zinco, de maneira que esse tivesse concentrações de 0; 0,1; 0,5; 2,5; 12,5 e 62,5 μ M de zinco. A concentração "real" de zinco em cada tubo permaneceu desconhecida, uma vez que a quantidade de zinco presente fisiologicamente nas amostras não foi levada em conta, sendo a atividade obtida na "concentração 0 de zinco no hemolisado", equivalente a atividade da enzima nas concentrações fisiológicas desse metal, já presentes na amostra em questão.

Uma vez preparados os hemolisados 1/40 com diversas concentrações de zinco estes foram incubados por uma hora a temperatura ambiente. Procedeu-se a dosagem da atividade da anidrase carbônica eritrocitária conforme técnica descrita anteriormente.

As concentrações de zinco escolhidas para este experimento foram baseadas em uma série de ensaios que utilizaram as mais variadas concentrações desse metal. Os resultados observados com

a utilização de concentrações maiores mostraram a ocorrência de franca inibição da atividade da enzima. Isso provavelmente se deve ao baixíssimo pH da solução de zinco que é preparada usando como solvente o ácido clorídrico, e portanto levando a intensa queda do pH quando se atingem concentrações de zinco próximas a 1 mM. Nas concentrações em que foi realizado o experimento o pH foi constante mantendo-se em 7,3 mesmo nos tubos com as maiores concentrações de zinco.

Para provar que as concentrações de zinco ~~utilizadas~~ não induzem a hidrólise espontânea do acetato de α -naftil, foi medida a absorbância de controles que continham água destilada no lugar do hemolisado 1/40 com as concentrações citadas de zinco, prosseguindo-se com os mesmos passos descritos para determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária. Não se observou nenhum efeito do zinco na hidrólise do acetato de α -naftil, ou seja as leituras obtidas com concentrações variadas de zinco, não foram diferentes dos tubos brancos, que medem a hidrólise espontânea do acetato de α naftil.

III.4- Análise estatística

A comparação das variáveis quantitativas obtidas nos pacientes com IRC e no grupo controle foi realizada utilizando-se a análise não paramétrica de Mann-Whitney. Para a investigação da associação entre as variáveis utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Em todos os casos adotou-se o nível de significância de 5%. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa de computador *Microstat, Ecosoft. Inc., 1984*.

IV- RESULTADOS

A discriminação dos valores das variáveis estudadas na Amostra I no grupo de pacientes com IRC e no grupo controle se encontram respectivamente nas tabelas 1 e 2, estando as médias e os desvios padrão apresentados na tabela 3.

A comparação das variáveis entre os sexos em cada grupo, realizada pelo teste de Mann-Whitney, mostrou não haver diferença significativa em nenhuma das variáveis nos pacientes com IRC (tabela 4). Já no grupo controle, as mulheres apresentam maiores níveis de concentração da CA eritrocitária total, CA I total e CA I, não havendo diferença significativa na concentração da CA II. Também a prolactina nas mulheres normais foi significativamente mais elevada do que nos homens, enquanto os níveis de hemoglobina foram menores. A idade e o zinco sérico não apresentaram diferença significativa quanto ao sexo nesse grupo (tabela 5).

Nas variáveis em que houve diferença significativa quanto ao sexo a comparação entre os grupos foi feita separadamente, sendo nas demais o estudo feito em conjunto, o que pode ser visto na tabela 6, onde todas as variáveis foram comparadas, pelo teste de Mann-Whitney, entre pacientes com IRC e indivíduos normais. Não houve diferença significativa quanto a idade nos dois grupos. Os pacientes com IRC de ambos os sexos apresentaram níveis significativamente menores da concentração de hemoglobina, anidrase carbônica eritrocitária total e das suas isozimas CA I e CA II, assim como do zinco sérico. A concentração da CA I total (CA I + CA I-1) somente se encontra

significativamente diminuída nas pacientes com IRC do sexo feminino, enquanto nos homens a diferença não foi significante. Os níveis de prolactina e a atividade total da anidrase carbônica eritrocitária estão significativamente aumentados nos pacientes com IRC.

O cálculo do coeficiente de correlação de Spearman, foi realizado no grupo de indivíduos normais separadamente por sexo, sendo as variáveis dos pacientes urêmicos, que não apresentaram diferenças entre os sexos, avaliadas em conjunto. As correlações esperadas entre as concentrações das isozimas e entre essas e a concentração total da CA foram observadas em ambos grupos, com excessão da CA II que se correlacionou positivamente com a CA I total e a CA I somente no grupo de pacientes com IRC (tabelas 7, 8 e 9). Nos pacientes com IRC a idade correlacionou-se positivamente com os níveis de CA II, enquanto a atividade total da CA eritrocitária e os níveis de zinco sérico, e este último com a prolactina sérica estiveram correlacionados negativamente (tabela 7). O gráfico I mostra a reta de regressão linear aplicada aos dados de zinco sérico e prolactina nos pacientes com IRC. Nos indivíduos do grupo controle do sexo feminino, observaram-se correlações positivas entre o zinco sérico e a concentração total da CA I e entre a prolactina e a CA II (tabela 9). No entanto, nos indivíduos normais do sexo masculino, somente se observaram as associações entre as isozimas entre si e entre essas e a concentração total da CA (tabela 8). Nenhuma variável apresentou correlação com os níveis de hemoglobina.

As tabelas 10 e 11 mostram a discriminação das variáveis

estudadas nos pacientes com IRC e controles da Amostra II, e na tabela 12 as respectivas médias e desvios padrão. Nas tabelas 13 e 14 pode-se observar que nenhuma das variáveis diferiu quanto ao sexo tanto nos pacientes quanto nos indivíduos normais, o que permitiu a análise agrupada para a comparação entre esses grupos. Não se encontraram diferenças quanto a idade entre esses grupos, porém nos pacientes com IRC, os níveis de zinco intra-leucocitário estiveram significativamente diminuídos, estando, também significativamente, aumentados os níveis de prolactina (tabela 15).

O cálculo da correlação de Spearman em pacientes com IRC da Amostra II se encontra na tabela 16, e para indivíduos normais, na tabela 17. Nos pacientes houve correlação negativa entre os níveis de zinco intra-leucocitário e os de prolactina, sendo que nenhuma correlação significativa foi observada nos indivíduos normais. A reta de regressão para os dados do zinco intra-leucocitário e prolactina nesse grupo de pacientes se encontra no Gráfico II.

Na tabela 18, encontram-se os resultados da atividade da anidrase carbônica em cinco indivíduos normais da Amostra III, cujos hemolisados diluídos 1/40, foram expostos a diferentes concentrações de zinco. Como se pode observar no gráfico III, todos os indivíduos tiveram comportamento similar, ocorrendo aumento da atividade dessa enzima a medida que a concentração adicionada de zinco aumenta, sendo que a partir de determinado momento a adição desse metal, leva a inibição da atividade da anidrase carbônica eritrocitária. Nesse gráfico, representou-se na abcissa o logaritmo decimal da concentração adicionada de

zinco (uM), sendo a ordenada utilizada para a atividade da anidrase carbônica em U/mg Hb . Verificou-se que as curvas do gráfico 3 podem ser descritas de forma adequada por expressões matemáticas do tipo:

$$f(x) = a + \frac{b (x - c)^2}{1 + d |(x - c)^3|}$$

Onde:

$$x = x_0 + z$$

x_0 = quantidade individual de zinco

z = quantidade adicionada de zinco ao hemolisado 1/40

a, b, c e d são constantes da função f(x).

Calculando as curvas f(x) com um computador, pode-se mostrar que as diferenças nas curvas do gráfico III podem ser atribuídas apenas às pequenas variações de x_0 (incluído no valor de x), mantendo constantes os outros parâmetros. Isso explica que as variações nas concentrações fisiológicas de zinco de cada amostra podem ser responsáveis pelas diferenças encontradas da concentração de zinco em que surge o pico de atividade da anidrase carbônica eritrocitária.

TABELA 1- Dosagens dos níveis de hemoglobina, anidrase carbônica eritrocitária, zinco e prolactina séricos em pacientes com IRC da Amostra I

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Hb (g%)	Prolactina (ng/ml)	CAtot	CAI (mg/ml)	CAII (mg/ml)	CAItot	Ativ. CAtot (U/mgHb)	Zinco (ug/dl)
1- JRM	37	M	8,90	200,00	6,27	3,89	0,23	6,04	7,28	56,05
2- JH	62	M	8,90	30,53	2,74	1,20	0,58	2,16	9,70	86,27
3- CSN	35	M	7,00	26,73	2,00	0,92	0,20	1,80	7,32	77,10
4- MPA	45	M	8,80	31,17	2,39	1,42	0,54	1,85	8,08	79,77
5- RS	68	M	7,00	14,13	2,56	1,15	0,35	2,21	3,11	91,33
6- MAM	41	M	10,60	91,92	0,72	0,37	0,13	0,59	5,62	58,34
7- EDC	61	M	11,30	48,57	1,10	0,42	0,07	1,03	4,69	64,47
8- JCS	37	M	8,70	17,64	1,42	1,09	0,12	1,30	5,15	79,37
9- LV	62	M	9,60	86,26	4,63	2,20	0,26	4,37	9,47	53,01
10-ALC	30	F	6,40	41,70	1,76	0,69	0,20	1,56	7,10	83,18
11-MFM	41	F	10,70	200,00	3,2	1,52	0,73	2,47	7,14	54,58
12-MOB	65	F	14,70	90,15	4,26	2,07	0,81	3,45	6,25	63,00
13-LRA	32	F	10,60	17,08	1,95	0,91	0,18	1,77	4,20	86,58
14-MLF	55	F	9,90	30,82	2,85	1,30	0,32	2,53	4,39	88,63
15-MCP	26	F	7,60	18,79	2,78	1,74	0,09	2,69	6,23	83,79
16-MP	46	F	10,10	18,98	3,99	2,21	0,34	3,65	3,87	84,93

TABELA 2- Dosagens dos níveis de hemoglobina, anidrase carbônica eritrocitária, zinco e prolactina séricos em pessoas normais da Amostra I

Amostra	Idade (anos)	Sexo	Hb (g%)	Prolactina (ng/ml)	CAtot	CAI (mg/ml)	CAII	CAItot	Ativ CAtot (U/mgHb)	Zinco (ug/dl)
1 -HG	29	M	15,10	17,80	1,97	1,02	0,24	1,73	0,11	148,68
2 -RP	26	M	16,30	6,10	3,80	1,96	1,19	2,61	0,20	198,20
3 -OCA	27	M	15,65	12,75	2,50	0,89	0,54	1,96	0,17	116,17
4 -MT	41	M	16,04	6,27	3,20	1,63	0,32	2,88	0,74	128,18
5 -JJS	56	M	15,00	10,98	3,90	1,80	1,59	2,31	0,37	106,12
6 -BS	60	M	14,34	8,81	4,25	1,78	1,42	2,83	0,34	99,14
7 -MJ	30	M	12,40	10,87	3,00	1,47	0,51	2,49	0,22	148,44
8 -FM	59	M	16,70	11,38	5,01	2,36	0,87	4,14	0,17	189,38
9 -MS	57	M	13,68	13,51	4,30	2,39	1,00	3,30	0,89	138,19
10-CAS	49	M	14,80	8,64	4,30	2,66	0,21	4,09	1,01	146,28
11-RCP	47	M	15,31	10,26	2,23	1,34	0,27	1,96	0,77	138,90
12-ZAB	32	M	12,01	9,34	7,00	4,50	1,27	5,73	0,98	146,10
13-LA	41	F	12,63	8,64	4,29	2,42	0,34	3,95	0,22	136,00
14-DZ	29	F	9,80	11,40	4,70	2,02	0,43	4,27	0,12	189,17
15-TB	40	F	15,73	15,21	3,50	1,72	1,02	2,48	1,12	98,16
16-HHM	40	F	12,13	18,20	6,74	3,48	1,03	5,71	0,66	159,20
17-AA	54	F	13,14	14,36	6,20	4,28	0,52	5,68	0,58	166,36
18-MBS	57	F	14,20	13,22	6,06	3,29	0,81	5,25	0,44	108,90
19-JCS	36	F	14,30	18,26	4,90	2,36	1,03	3,87	0,32	92,98
20-MX	34	F	13,40	16,28	5,80	3,16	0,93	4,87	0,26	156,06
21-GCS	58	F	15,01	17,80	5,01	2,21	1,34	3,67	0,22	126,98
22-TMA	59	F	12,12	14,36	4,50	3,29	0,81	3,69	0,48	112,13

TABELA 3- Médias e desvios padrão das variáveis estudadas
nos pacientes com IRC e normais da Amostra I.

	IRC				Controles			
	Homens média	dp	Mulheres média	dp	Homens média	dp	Mulheres média	dp
Idade	49,78	13,24	42,14	14,22	42,75	13,47	44,80	11,12
Hb	8,97	1,42	10,00	2,64	14,77	1,46	13,24	1,70
CA tot.	2,64	1,77	2,97	0,94	3,78	1,37	5,17	1,00
CA 1	1,40	1,07	1,49	0,57	1,98	0,95	2,82	0,79
CA II	0,27	0,18	0,38	0,28	0,78	0,49	0,82	0,31
CA 1 tot.	2,37	1,74	2,59	0,78	3,00	1,15	4,34	1,02
Atividade CA tot.	6,71	2,23	5,60	1,41	0,49	0,35	0,44	0,29
Zinco	71,74	14,03	77,81	13,34	141,98	29,43	134,59	32,21
Pr1	60,77	59,30	59,65	66,98	10,56	3,21	14,77	3,11

TABELA 4- Comparação entre as variáveis de homens e mulheres com IRC
da Amostra I. Teste de Mann-Whitney

	Homens	Mulheres	p
	soma dos dados ordenados	soma dos dados ordenados	
Idade	86,5	49,5	0,14
Hb	67,5	68,5	0,17
CA tot	67	69	0,16
CA I	69	67	0,21
CA II	70,5	65,5	0,26
CA I tot	67	69	0,16
Atividade CA tot	89	47	0,09
Zinco	67	69	0,16
Pr1	78,5	57,5	0,42

TABELA 5- Comparação entre as variáveis de homens e mulheres normais da Amostra I. Teste de Mann-Whitney.

	Homens soma dos dados ordenados	Mulheres soma dos dados ordenados	P
Idade	132	121	0,35
Hb	169	84	0,02 *
CA tot	100,5	152,5	0,007 *
CA I	103,5	149,5	0,01 *
CA II	132	121	0,35
CA I tot	103	150	0,01 *
Atividade CA tot	138	115	0,50
Zinco	147	106	0,27
Pr1	97	156	0,003 *

* Significativo

TABELA 6- Comparações entre as variáveis dos pacientes com IRC com as dos indivíduos normais da Amostra I.

Teste de Mann-Whitney.

		IRC soma dos dados ordenados	Normais soma dos dados ordenados	p
Idade		340,5	400,5	0,200
Hb	Homens	45	186	$6,2 \cdot 10^{-5} *$
	Mulheres	40	113	0,01 *
CA tot.	Homens	75	156	0,04 *
	Mulheres	50	103	0,001 *
CA I	Homens	74	157	0,03 *
	Mulheres	33,5	119,5	0,002 *
CA II		188,5	525,5	$1,3 \cdot 10^{-4} *$
CA I tot	Homens	76	155	0,051
	Mulheres	32	121	0,001 *
Atividade CA tot		488	253	$9,7 \cdot 10^{-8} *$
Zinco		136	605	$9,7 \cdot 10^{-8} *$
Pr1	Homens	151	80	$1,1 \cdot 10^{-4} *$
	Mulheres	95	58	$8,9 \cdot 10^{-4} *$

* Significativo

TABELA 7- Resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas nos pacientes com IRC da Amostra I

	Idade	Hb	Ativ.CA	CAtot	CA II	CA Itot	CA I	Zinco
Idade	1,00							
Hb	0,35	1,00						
Ativ.CA	-0,04	-0,17	1,00					
CA tot	0,30	0,15	0,25	1,00				
CA II	0,57*	0,17	0,28	0,59*	1,00			
CA I tot	0,26	0,07	0,17	0,98*	0,50*	1,00		
CA I	0,21	0,09	0,24	0,94*	0,51*	0,95*	1,00	
Zinco	0,02	-0,34	-0,52*	-0,20	0,02	-0,11	-0,20	1,00
Pr1	0,12	0,46	0,48	0,28	0,22	0,18	0,20	-0,80*

* $p < 0.05$

$r_{sc} = 0.50$

$n = 16$

TABELA 8- Resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas nos homens normais da Amostra I

	Idade	Hb	Ativ CA	CA tot	CA II	CA I tot	CA I	Zinco
Idade	1,00							
Hb	0,04	1,00						
Ativ CA	0,36	-0,42	1,00					
CA tot	0,34	-0,38	0,38	1,00				
CA II	0,23	-0,22	-0,03	0,48	1,00			
CA I tot	0,26	-0,35	0,46	0,94*	0,23	1,00		
CA I	0,26	-0,45	0,55	0,93*	0,36	0,91*	1,00	
Zinco	-0,34	0,22	-0,30	0,16	-0,25	0,26	0,21	1,00
Pr1	-0,07	-0,07	-0,41	-0,21	-0,17	-0,35	-0,26	-0,01

* $p < 0.05$

$r_{sc} = 0.60$

$n = 12$

TABELA 9- Resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas nas mulheres normais da Amostra I

	Idade	Hb	Ativ.CA	CA tot	CA II	CA I tot	CA I	Zinco
Idade	1,00							
Hb	0,16	1,00						
Ativ.CA	0,25	0,43	1,00					
CA tot	0,14	-0,35	-0,13	1,00				
CA II	0,14	0,60	0,29	0,15	1,00			
CA I tot	-0,11	-0,55	-0,24	0,85*	-0,30	1,00		
CA I	0,36	-0,55	0,10	0,73*	-0,22	0,77*	1,00	
Zinco	-0,35	-0,33	-0,63	0,51	-0,37	0,71*	0,39	1,00
Pr1	0,01	0,35	0,35	0,37	0,85*	-0,04	0,002	-0,13

* $p < 0.05$

$r_{sc} = 0.65$

$n = 10$

TABELA 10-Dosagens da prolactina e zinco intra-leucocitário em pacientes com IRC da Amostra II

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Zinco intra-leucocitário (pmol/ 10^6 células)	Prolactina (ng/ml)
1- JMN	22	M	80,90	42,77
2- GSN	38	M	73,60	43,20
3- MD	39	M	90,30	3,00
4- LAL	41	M	60,40	210,00
5- ALA	44	M	101,08	4,00
6- MBS	48	M	80,43	25,32
7- JSN	34	M	98,14	13,00
8- AA	33	M	90,13	27,21
9- RZ	45	M	88,14	32,65
10-PMN	32	F	86,37	29,66
11-JAL	22	F	108,14	8,03
12-MJG	54	F	66,07	59,55
13-CJ	41	F	81,09	26,34
14-CB	44	F	96,07	11,51
15-AMC	50	F	98,09	10,70
16-ESD	46	F	106,98	9,78
17-MCS	49	F	60,28	48,95
18-GSC	33	F	56,36	126,07

TABELA 11-Dosagens da prolactina e zinco intra-leucocitário em pessoas normais da Amostra II

Número	Idade (anos)	Sexo	Zinco intra-leucocitário (pmol/ 10^6 células)	Prolactina (ng/ml)
1- OSC	27	M	130,13	6,37
2- MAC	34	M	145,45	13,06
3- JJC	35	M	160,14	2,50
4- KMS	48	M	127,20	2,40
5- LAS	43	M	115,10	4,00
6- GRS	39	M	110,15	2,50
7- VGD	37	M	128,00	11,71
8- CXS	49	M	145,90	2,30
9- JGF	42	M	150,31	3,00
10-MAZ	27	F	121,03	3,00
11-ALX	26	F	124,04	3,20
12-AMC	49	F	106,03	7,84
13-MCS	47	F	105,07	6,00
14-CFD	41	F	117,09	10,34
15-AC	44	F	126,40	9,71
16-MCX	52	F	160,90	18,32
17-VH	43	F	171,10	3,60
18-CF	39	F	148,06	2,70

TABELA 12- Médias e desvios padrão das variáveis estudadas nos pacientes com IRC e nos normais da Amostra II.

	IRC				Controles			
	Homens		Mulheres		Homens		Mulheres	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Idade	38,22	7,83	41,22	10,32	39,33	7,01	41,00	8,56
Zinco intra- leuc.	84,79	12,58	84,38	19,73	134,70	16,73	133,00	23,05
Pr1	44,57	63,79	36,73	38,19	5,31	4,22	6,77	4,99

TABELA 13-Comparação entre as variáveis de homens e mulheres com IRC da Amostra II. Teste de Mann-Whitney.

	Homens soma dos dados ordenados	Mulheres soma dos dados ordenados	P
Idade	76	95	0,20
Zinco intra-leucocitário	85	86	0,48
Prolactina	85	86	0,48

TABELA 14-Comparação entre as variáveis de homens e mulheres normais da Amostra II. Teste de Mann-Whitney.

	Homens soma dos dados ordenados	Mulheres soma dos dados ordenados	P
Idade	78	93	0,25
Zinco intra-leucocitário	93	78	0,25
Prolactina	71,5	99,5	0,10

TABELA 15- Comparação das variáveis dos pacientes com IRC com as dos indivíduos normais da Amostra II. Teste de Mann-Whitney

	IRC soma dos dados ordenados	Controles soma dos dados ordenados	p
Idade	330	336	0,46
Zinco intra-leucocitário	175	491	$2,80 \cdot 10^{-7} *$
Pr1	457,5	208,5	$4,10 \cdot 10^{-5} *$

* Significativo

TABELA 16- Resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas nos pacientes com IRC da Amostra II.

	Idade	Zinco intra-leucocitário	Prolactina
Idade	1,00		
Zinco intra-leucocitário	-0,09	1,00	
Prolactina	-0,01	-0,80*	1,00

* $p < 0,05$ $r_{sc} = 0,47$ $n = 18$

TABELA 17- Resultados da análise de correlação de Spearman entre as variáveis estudadas nos indivíduos normais da Amostra II

	Idade	Zinco intra-leucocitário	Prolactina
Idade	1,00		
Zinco intra-leucocitário	-0,05	1,00	
Prolactina	0,03	-0,03	1,00

$r_{sc} = 0,47$ $n = 18$

TABELA 18 - Efeito *in vitro* do zinco na atividade da anidrase carbônica eritrocitária em indivíduos normais da Amostra III

Atividade Anidrase Carbônica U/mg Hb						
[Zn]	0 μ M	0.1 μ M	0.5 μ M	2.5 μ M	12.5 μ M	62.5 μ M
Amostra						
1	1,46	2,97	4,35	7,65	6,91	2,12
2	1,09	2,76	3,78	6,38	3,81	1,20
3	0,76	1,19	5,98	1,85	1,06	0,81
4	1,74	2,07	1,97	6,38	4,89	2,18
5	1,05	1,44	2,12	2,79	5,29	2,18

Gráfico I- Reta de regressão aplicada às variáveis zinco sérico e prolactina em pacientes com IRC da Amostra I.

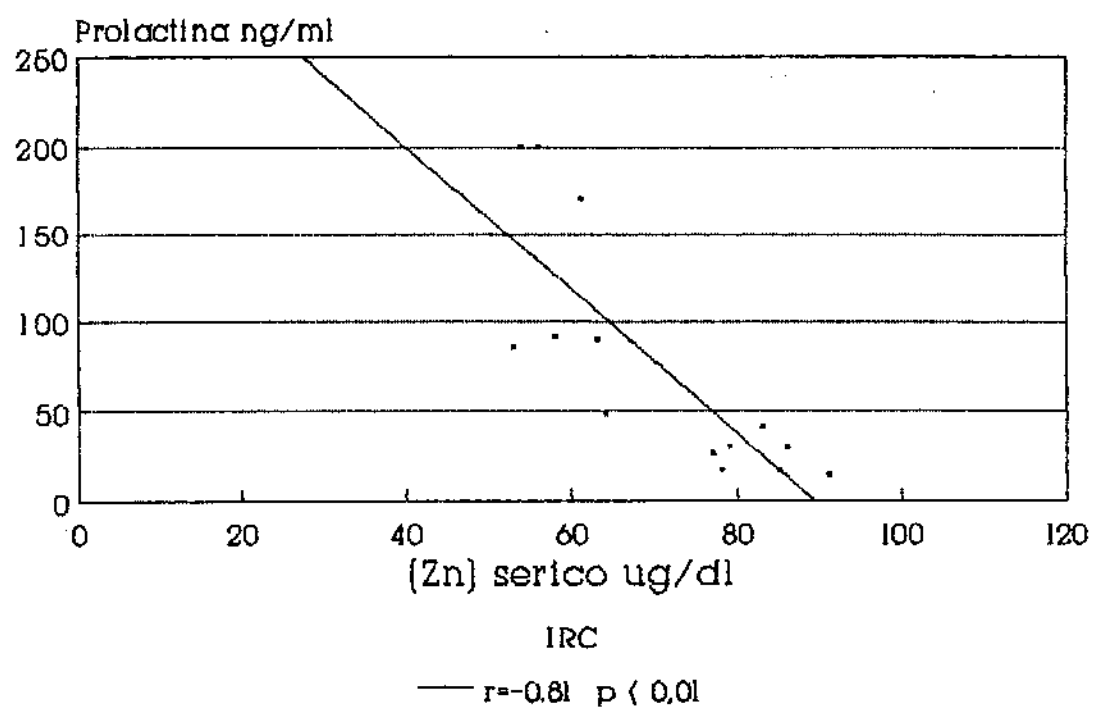


Gráfico II- Reta de regressão aplicada as variáveis zinco intra-leucocitário e prolactina em pacientes com IRC da Amostra II.

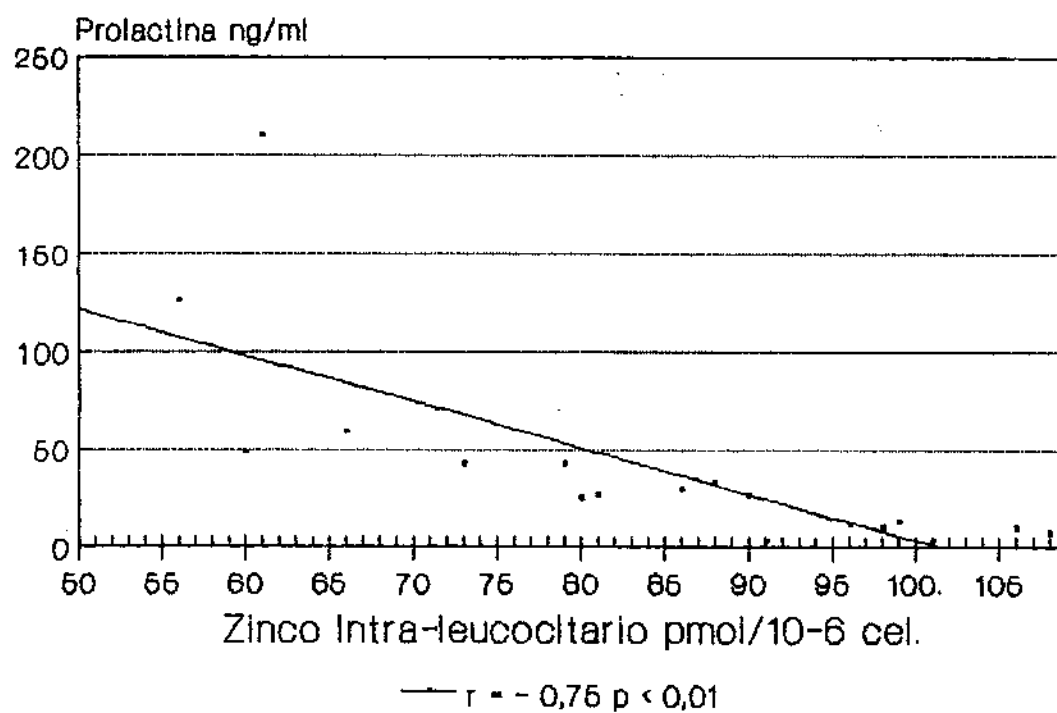
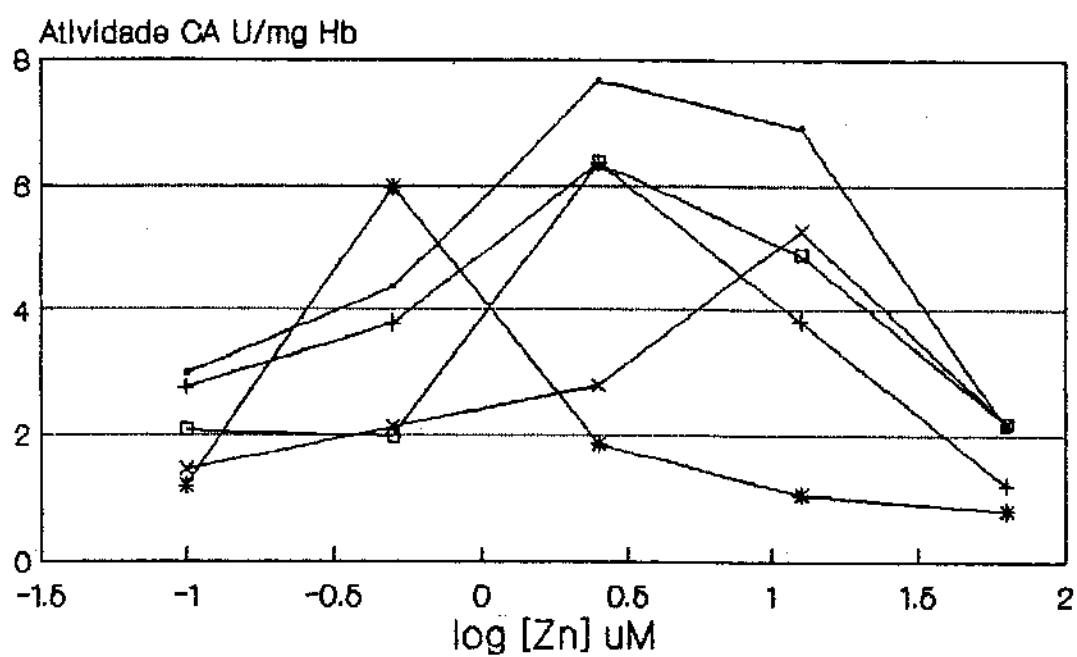


Gráfico III-Efeito *in vitro* do zinco na atividade da anidrase carbônica eritrocitária de indivíduos normais da Amostra III.



V- DISCUSSÃO

A dosagem concomitante de zinco, prolactina, atividade e concentração da anidrase carbônica eritrocitária em pacientes com IRC, não consta da literatura corrente. Da mesma maneira, não foi estudada a importância do *status* corporal de zinco na determinação da hiperprolactinemia do paciente urêmico.

O estudo realizado, visou buscar novos dados para a compreensão da influência já descrita por Mahajan et al., 1985, dos níveis de zinco na prolactinemia dos pacientes em IRC. A determinação da atividade e concentração da anidrase carbônica eritrocitária foram tomadas como modelo para avaliar a redistribuição intra-eritrocitária do zinco, como proposto por Valee et al., 1949, enquanto os níveis intra-leucocitários de zinco foram estudados para estabelecer, nesses pacientes, o *status* corporal de zinco (Solé & Naspitz, 1988 - Hinks et al., 1982).

Com relação ao intenso aumento da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária encontrada nos nossos pacientes com IRC (cerca de 15 vezes maior do que nos indivíduos normais), podemos ressaltar que não foi possível encontrar resultado similar na literatura, uma vez que os trabalhos que se preocuparam em estudar essa variável em pacientes urêmicos, detiveram-se somente na avaliação da concentração protéica das isozimas da anidrase carbônica. Assim, Drukker et al., 1972 e Mondrup & Anker, 1974, utilizando a técnica da imunodifusão radial descreveram aumento da concentração da isozima CA I. Já

em nossa casuística esse aumento não foi observado, sendo, ao contrário, encontrados menores valores das concentrações das isozimas da anidrase carbônica nos pacientes urêmicos quando comparados aos normais, com exceção da CA I total, em indivíduos do sexo masculino, onde essa diminuição não foi estatisticamente significativa .

Como, observamos em nossa casuística, que homens tem menores concentrações de CA I total do que mulheres normais (tabela 8), é possível explicar a discordância entre os nossos achados com os de Mondrup & Anker, 1974, uma vez que o grupo controle desses autores era constituído somente por indivíduos do sexo masculino, o que levaria a falsa suposição de um aumento da concentração dessa isozima no grupo de pacientes com IRC, que era constituído por indivíduos de ambos os sexos.

Todas as outras variáveis estudadas mostraram resultados compatíveis com os da literatura. Assim, os níveis de hemoglobina dos pacientes com IRC foram significativamente menores quando comparados aos indivíduos normais, como, entre outros, referiram Brenner & Lazarus, 1985. O mesmo ocorreu com os níveis de zinco sérico e intra-leucocitário que apresentaram valores menores ao serem comparados com os controles normais, sendo isso já referido por Antoniou et al., 1977, Mahajan et al., 1982 e Foot & Hinks, 1987. Também a prolactina, em nossa amostra, mostrou diferença importante entre pacientes com IRC e normais, uma vez que essa esteve aumentada no primeiro grupo, fato também já descrito por Cowden et al., 1978- Chirito et al., 1978 e Nagel et al., 1973.

Apenas nos pacientes com IRC, observou-se associação entre

a CA II e a CA total. Para o fato dessa correlação não ter sido observada nos indivíduos normais não encontramos uma explicação evidente. Também surgiu uma associação negativa entre a atividade total da anidrase carbônica e o zinco sérico, não observada no grupo controle, o que pode ser explicado pela redistribuição eritrocitária desse metal como veremos adiante.

Os níveis de zinco sérico se correlacionaram negativamente com os de prolactina nos pacientes com IRC o que já havia sido descrito por Mahajan em 1985. Entretanto, esse autor juntou em um mesmo grupo pacientes urêmicos tratados com zinco ou placebo, enquanto em nossa casuística, essa associação foi observada em pacientes que nunca fizeram uso da terapia com esse metal.

Tanto a atividade total da anidrase carbônica como a concentração desta e das suas principais isozimas eritrocitárias não se correlacionaram com os níveis de prolactina nos pacientes em IRC, o que sugere que essa enzima não tem importância na determinação da hiperprolactinemia da uremia.

Os dados de Schaefer et al.,1988, afirmam que a hiperprolactinemia tende a melhorar após a normalização da anemia através da terapia com eritropoetina, porém em nossos dados não se notaram influências dos níveis de hemoglobina na prolactinemia, o que pode ter ocorrido pela pequena flutuação encontrada com relação a essa variável.

Importante ressaltar a correlação encontrada nos pacientes com IRC entre os níveis de zinco intra-leucocitário e os de prolactina, o que demonstra a influência do *status* corporal de zinco na etiopatogenia da hiperprolactinemia desse grupo de pacientes. Esse achado nos leva a supor que o fator importante

no desenvolvimento dessa alteração é a depleção corpórea de zinco. Os níveis de zinco sérico, de maneira grosseira, também representam o *status* corporal de zinco, e também estiveram, em nossa amostra, correlacionados aos de prolactina.

Correlação que permanece até o momento sem explicação e é ímpar na literatura, é a associação entre a CA II e a prolactina nas mulheres normais. Há referências de que a CA II aumenta em gestantes (Funakoshi & Deustch, 1971), entretanto essa isozima não sofre alterações com o uso de anticoncepcionais orais que contém estrogênios e progestágenos, o que nos levaria a supor que tal aumento possa ser decorrente do aumento da prolactina durante o período gestacional (Molitch, 1985). Obviamente, para testar essas suposições serão necessários estudos onde sejam conhecidas a fase do período menstrual de cada mulher, observando-se como variam os níveis de CA II com relação aos de prolactina, o mesmo podendo ser avaliado durante a gestação.

A correlação entre a isozima CA I e o zinco sérico encontrada entre mulheres normais já foi descrita por Norato, 1987 em um grupo composto por indivíduos de ambos os sexos.

A redistribuição do zinco para o compartimento intra-eritrocitário, como citado anteriormente, não deve estar relacionada com a hiperprolactinemia dos urêmicos, porém tal fato deve ser importante para a determinação da alta atividade total da anidrase carbônica eritrocitária encontrada nesses indivíduos. Isso foi sugerido pelo experimento *in vitro*, onde o acréscimo de zinco, dentro de determinadas concentrações, resultou em aumento da atividade total dessa enzima. É interessante ressaltar, que o pico de atividade da enzima, nesse

experimento, ocorreu em concentrações de zinco similares àquelas encontradas no interior das hemácias de pacientes com IRC (Sandstead, 1980). Nos pacientes com IRC observamos ainda, que essa atividade da enzima esta inversamente correlacionada aos níveis de zinco sérico, o que reforça a hipótese de que a redistribuição desse metal é a responsável pelas alterações encontradas na atividade total da anidrase carbônica eritrocitária.

O estudo, em pacientes com IRC, do comportamento da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária após contato com diferentes concentrações de zinco, a avaliação da relação das concentrações intra-eritrocitárias de zinco e a atividade dessa enzima e o estudo da cinética enzimática da reação estudada *in vitro*, poderão trazer informações que complementem este estudo.

CONCLUSÕES

- 1- Os pacientes com IRC estudados, quando comparados a controles normais, apresentam altos níveis de prolactina e da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária, embora apresentem baixas concentrações proteicas totais dessa enzima e das suas principais isozimas. Esses pacientes também apresentam diminuição dos níveis de zinco sérico e intra-leucocitário.
- 2- A atividade total da anidrase carbônica eritrocitária se correlaciona negativamente com os níveis de zinco sérico na IRC.
- 3- A atividade e concentração totais da anidrase carbônica eritrocitária ou das suas principais isozimas não se correlacionam com os níveis de prolactina nos pacientes com IRC ou nos indivíduos normais, com exceção da CA II que, em nossa amostra, se correlacionou positivamente com a prolactina em mulheres normais.
- 4- Os níveis de zinco sérico e intra-leucocitário se correlacionam negativamente com os da prolactina na IRC, o que mostra a importância do status corporal de zinco na determinação da hiperprolactinemia da uremia.
- 5- Acrescimento de zinco *in vitro* em 5 amostras de sangue de indivíduos normais levaram a um aumento na atividade da anidrase carbônica eritrocitária, inibindo essa atividade a partir de determinada concentração.
- 6- O aumento da atividade da anidrase carbônica eritrocitária nos pacientes com IRC deve ser decorrente da redistribuição de zinco para o compartimento intra-eritrocitário.

RESUMO

Os níveis séricos de prolactina e zinco, a concentração de hemoglobina e a atividade e concentração total da anidrase carbônica eritrocitária e suas isozimas, foram avaliados em 16 pacientes com IRC em esquema de hemodiálise, sendo comparados com 22 indivíduos normais. Em outros 18 pacientes hemodializados e 18 pessoas normais foram estudados os níveis de zinco intra-leucocitário e de prolactina. Um estudo *in vitro* avaliou os efeitos do zinco na atividade da anidrase carbônica em 5 indivíduos normais.

Os pacientes com IRC apresentaram altos níveis de prolactina e da atividade total da anidrase carbônica eritrocitária, estando baixas a concentração total dessa enzima, das suas principais isozimas, o zinco sérico e intra-leucocitário, assim como os níveis de hemoglobina.

A atividade total e a concentração da anidrase carbônica eritrocitária e das suas isozimas não se correlacionaram com os níveis de prolactina em nenhum dos dois grupos, com exceção dos níveis de CA II que se correlacionaram à prolactina nas mulheres normais. Já a atividade total dessa enzima apresentou correlação negativa com os níveis de zinco sérico nos pacientes com IRC. Também o zinco sérico e o intra-leucocitário se correlacionaram negativa e significativamente com os níveis de prolactina nesses pacientes, o que não ocorreu nos indivíduos normais.

O experimento *in vitro* mostrou que concentrações crescentes de zinco acrescentados em hemolisados de indivíduos normais são capazes de aumentar a atividade da anidrase carbônica

eritrocitária, ocorrendo inibição da enzima quando se atingem concentrações mais elevadas desse metal.

Os nossos resultados, sugerem que a redistribuição do zinco para o compartimento intra-eritrocitário leva a um aumento da atividade da anidrase carbônica, não se relacionando a etiologia da hiperprolactinemia da IRC. Entretanto o zinco intra-leucocitário, que representa o *status* corporal de zinco, esta correlacionado negativamente à prolactina, sugerindo que a depleção corpórea de zinco deve ser importante fator na hiperprolactinemia do urêmico.

SUMMARY

The prolactin, zinc and hemoglobin levels, activity and total concentration of carbonic anhydrase and its isoenzymes were evaluated in 16 chronic renal failure (CRF) patients on hemodialysis, and in 22 normal subjects. In another 18 uremic patients and 18 normal persons we studied the leukocyte zinc content and the prolactin levels. In addition, we performed an *in vitro* study in order to evaluate the zinc influence on the activity of the erythrocyte carbonic anhydrase in 5 normal subjects.

Patients with CRF showed high levels of prolactin and carbonic anhydrase activity, while the total concentration of this enzyme, its isoenzymes, serum and leukocyte zinc contents, and hemoglobin levels were low.

The activity and concentration of the carbonic anhydrase and its isoenzymes did not have any influence on the prolactin levels in either group, with the exception of the isoenzyme CA II that correlated with the prolactin levels in normal woman. We also found a negative correlation between the activity of the carbonic anhydrase and the zinc levels among CRF patients. Serum and leukocyte zinc correlated negatively and significantly with the prolactin levels, which was not observed in the normal subjects.

The *in vitro* experiment shows that increasing the concentration of zinc in the hemolysate of normal subjects increases the carbonic anhydrase activity up to a maximum; further increases show the opposite effect.

This results suggest that the zinc redistribution to the erythrocytes leads to an increase in the ~~carbonic anhydrase~~ activity, but it is unlikely that this is the cause of the chronic renal failure hyperprolactinemia. However, the leukocyte zinc, that is a measure of the zinc body status, is negatively correlated with the prolactin level. This suggests that zinc body depletion might be the etiology of the uremic hyperprolactinemic state.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABOU-MOURAD, N.N., FARAH, F.S., STEEL, D.- Dermopathic Changes in Hypozincemia. *Arch Dermatol*, 115 : 956-958, 1979.
- 2- ANKER, N. & MONDRUP, M.- Carbonic anhydrase in the cerebrum and cerebellum of normal and audiogenic seizure mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 502-4, 1984.
- 3- ANTONIOU, L.D., SUDHAKAR, T., SHALHOUB, R.J., SMITH, J.C.- Reversal of uraemic impotence by zinc. *Lancet*, 2: 898, 1977.
- 4- ANTONIOU, L.D., SHALHOUB, R.J., ELIOT, S.- Zinc tolerance tests in chronic uraemia. *Clin. Nephrol*, 16: 181, 1981.
- 5- BAUMGARTEN, S.R., LINDSAY, G.K., WISE, G.J.- Fertility problems in the renal transplant patient. *J. Urol*. 118: 991-5, 1977.
- 6- BEACH, R.S., GERSHWIN, M.E., HURLEY, L.S.- Growth and development in post natally zinc deprived mice. *J. Nutr.*, 110: 201-11, 1980.
- 7- BLACKMAN, M.R., BRIEFEL, G.R., TSITOURAS, P.D., HARMAN, S.M.- Excess *in vitro* secretion of the free alpha subunit of the glycoprotein hormones by pituitary cells from chronically uremic rats. *Endocrinology* 110: 1964-6, 1982.
- 8- BRANDÃO-NETO, J., MENDONÇA, B.B., SHUHAMA, T., MARCHINI, J.S., MADUREIRA, G., PIMENTA, W.P., TORNERO, M.T.T.- Zinc: An inhibitor of prolactin secretion in humans. *Horm. Metabol. Res.* 21: 203-6, 1989.
- 9- BRENNER, B.M., LAZARUS, J.M.- Chronic Renal Failure, in:

Harrisson Medicina Interna 10^o Ed. Vol 2, Cap. 291,
Guanabara Koogan, 1796-803, 1984.

10-BREWER, G.J., ASTERJ.C., KNUTSEN, C.A., KRUCKEBRG, W.C.-
Zinc Inhibition of Calmodulin: A Proposed Molecular
Mechanism of Zinc Action on Cellular Functions. *Am. J.*
Hematol. 7:53-60, 1979.

11-CANALE D., BARSANTINI S., MINERVINE R., FIORENTINO L., BARSOTTI
G., MENCHINI-FABRIS G.F.- Human chorionic gonadotropin treatment
of male sexual inadequacy in patients affected by chronic
renal failure. *J. Androl.* 5: 120-6, 1984.

12-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.

13-CARTER N.D., JEFFERY S., SHIEHS A., EDWARDS Y., TIPLER T.,
HOPKINSON D.A.- Characterization of human carbonic anhydrase
III from skeletal muscle. *Biochem. Genet.*, 17: 837-54, 1979.

14-CHEGWIDDEN W.R., HEWETT-EMMET D., TASHIAN R.E.- Active site
studies on muscle carbonic anhydrase III. *Ann. N. Y. Acad.*
Sci., 429: 179-82, 1984.

15-CHIRITO E., GONDA A., FRIESEN H.- Prolactin in renal failure.
Clin. Res. 20: 423-7, 1972.

16-CHLEBOWSKI J.F., COLEMAN J.E.- Enzymes containing zinc. *J.*
Biol. Chem. 249: 7192-8, 1976.

17-CHLEBOWSKI J.F., COLEMAN J.E.- Zinc and its role in
enzymes. Ed. Chlebowski J. F., Chap 1, New York
Academic Press, 1-139, 1978.

18-CHOPP R.T., MENDEZ R.- Sexual function and hormonal
abnormalities in uremic men on chronic dialysis and after

- renal transplantation. *Fertil. Steril.* 29: 661-9, 1978.
- 19-CHOW S.Y., KEMP J.W., WOODBURY D.M.- Role of carbonic anhydrase in thyroidal iodide transport. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 604-6, 1984.
- 20-COWDEN E.A., RATCLIFFE J.G., DOBBIE J.W., KENNEDY A.C.- Hyperprolactinemia in renal disease. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 9: 241-6, 1978.
- 21-COWDEN E.A., RATCLIFFE J.G., RATCLIFFE W.A., KENNEDY A.C.- Hypothalamic-pituitary function in uremia. *Acta. Endocrinol.* 98: 488-92, 1981.
- 22-DEUSTER P.A., DOLEV E., BERNIER L.L., TROSTMANN U.H.- Magnesium and zinc status during the menstrual cycle. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 157: 964-8, 1987.
- 23-DOBYAN D.C., BULGER R.E.- Renal Carbonic Anhydrase. *Am. J. Physiol.*, 243: 311-24, 1982.
- 24-DODGSON S.J., FORSTER 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.* 6 (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-ELSTEIN M., SMITH E.K.M., CURTIS J.R.- Reproductive potential of patients treated by maintenance haemodialysis. *Br. Med. J.*, 2: 734-37, 1969.
- 28-FALCHUK K.H., HILT K.L., VALEE B.L.- Determination of zinc in

- biological samples by atomic absorption spectrometry. *Methods in Enzymol.* 158: 422-35, 1988.
- 29-FELDMAN H.A., SINGER I.- Endocrinology and Metabolism in uremia and dialysis: a clinical review. *Medicine (Baltimore)* 54: 345-59, 1974.
- 30-FERNANDES G., NAIR M., ONOE K., TANAKA T., FLOYD R., GOOD R.A.- Impairment of cell mediated immunity by dietary zinc deficiency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 457-68, 1979.
- 31-FOOT J.W., HINKS L.J.- Reduced leukocyte zinc and albumin-bound zinc in blood of haemodialysis patients. *Ann. Clin. Biochem.* 24: 198-202, 1987.
- 32-FOOT J.W., HINKS L.J.- Zinc absorption in haemodialysis patients. *Ann. Clin. Biochem.* 25: 398-402, 1988.
- 33-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.
- 34-FUNAKOSHI S., DEUTSCH H.F.- Human carbonic anhydrase II. Some physicochemical properties of native isozymes and of similar isozymes generated in vitro. *J. Biol. Chem.*, 244: 3438-45, 1969.
- 35-FUNAKOSHI S., DEUTSCH H.F.- Human carbonic anhydrases. Levels in erythrocytes in various states. *J. Lab. Clin. Med.*, 77: 39-45, 1971.
- 36-FUNAKOSHI S., DEUTSCH H.F.- Human carbonic anhydrases. Levels of isozymes in old and young erythrocytes and in various tissues. *J. Biol. Chem.* 246: 1088-92, 1971.
- 37-GAY C.V., SCHRAERH., 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.
- 38-GOMEZ F., de la CUEVA R., WAUTERS J., LEMARCHAND-BERAUD T.-
 Endocrine abnormalities in patients undergoing long term
 hemodialysis. *Am. J. Med.*, 68: 522-28, 1980.
- 39-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: 412-4, 1984.
- 40-GUEVARA A., VIDT D., HALBERG M.C., ZORN E.M., DEBMAN C.,
 WIELAND R.G.- Serum gonadotrophin and testosterone levels in
 uremic males undergoing intermittent dialysis. *Metabolism*
 18: 1062-66, 1969.
- 41-HAGEN C., OLGAARD A., MC NEILLY A.S., FISCHER R.- Prolactin and
 the pituitary-gonadal axis in male uraemic patients on
 regular dialysis. *Acta Endocrinol.* 82: 29-35, 1976.
- 42-HANDELSMAN D.J.- Hypothalamic-Pituitary Gonadal Dysfunction in
 Renal Failure, Dialysis and Renal Transplantation. *Endocrine*
Reviews 6 (2): 151-82, 1985.
- 43-HEADINGS V.E., TASHIAN R.E.- Isozymes of carbonic anhydrase I
 from primate red blood cells. *Biochem. Biophys. Acta*,
 236: 353-9, 1971.
- 44-HENRIQUES O.M.- Die Bindungsweise des Kohlendioxyds im Blute.
Biochem. Z., 200: 1-24, 1928.
- 45-HETH D.A., BECKER W.M., HOEKSTRA W.G.- Effect of calcium
 phosphorus and zinc-65 absorption and turnover in rats fed
 semipurified diets. *J. Nutr.*, 88: 331-7, 1966.
- 46-HINKS L.J., COLMSEE M., DELVES H.T.- Determination of Zinc and
 Cooper in Isolated Leucocytes. *Analyst.*, 107: 815-23, 1982.

- 47-HODSWORTH S.R., KRESTER D.M., ATKINS R.C.- A comparison of hemodialysis and transplantation in reversing the uremic disturbance of male reproductive function. *Clin. Nephrol.*, 10: 146-51, 1978.
- 48-HURLEY L.S., TAO S.H.- Alleviation of teratogenic effects of zinc deficiency in rats. *Am. J. Physiol.*, 222: 322-5, 1972.
- 49-IJAIYA K., ROTH B., SCHWENK A.- Serum prolactin levels in renal insufficiency in children. *Acta. Paediatr. Scand.*, 69: 299-307, 1980.
- 50-JUDD A.M., MACLEOD R.M., LOGIN I.S.- Zinc acutely, selectively and reversibly inhibits pituitary prolactin secretion. *Brain Research*, 294: 190-2, 1984.
- 51-KEILIN D., MANN T.- Carbonic Anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.*, 34: 1163-76, 1940.
- 52-KINLAW W.B., LEVINE A.S., MORLEY J.E., SILVIS S.E., MCLAIN C.J.-Abnormal Zinc Metabolism in Type II Diabetes Mellitus. *Am. J. Med.*, 75: 273-7, 1983.
- 53-KISHIDA K., OCHI N., EMI K., TIZUKA 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.
- 54-KOPPELMAN M.C.S., GREENWOOD V., SOHN J., DEUSTER P.- Zinc does not acutely suppress prolactin in normal or hyperprolactinemic woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68: 215-8, 1989.
- 55-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.*

- 56-LA BELLA F., DULAR R., VIVIAN S., QUEEN G.- Pituitary hormone realising or inhibiting activity of metal ions present in hypothalamic extracts. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 52(3): 786- 91, 1973.
- 57-LAO T.T.H., CHIN R.K.H., SWAMINATHAN R., PANESAR N.S., COCKRAM C.S.- Erythrocyte zinc in differential diagnosis of hyperthyroidism in pregnancy: a preliminary report. *Br. Med. J.*, 294: 1064-5, 1987.
- 58-LARSEN N.A.- Sexual problems on RDT and after renal transplantation. *Proc. Eur. Dial. Transplant Assoc.* 9: 271-5, 1972.
- 59-LAYNE E.- Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth. Enzymol.*, 3: 450-1,1957.
- 60-LE ROITH D., DANOVITZ G., TRESTIAN S., SPITZ I.M.- Dissociation of pituitary glycoprotein response to realising hormones in chronic renal failure. *Acta Endocrinol.*, 93: 277-82,1980.
- 61-LIE-INJO L.E., HOLLANDER L., FUDENBERG H.H.- Carbonic anhydrase and fetal hemoglobin in thyrotoxicosis. *Blood*, 30: 442-8, 1967.
- 62-LINDSAY R.M., BRIGGS J.D., LUKE R.G., BOYLE I.T., KENNEDY A.C.- Gynaecomastia in chronic renal failure. *Br. Med. J.*, 4: 779-81, 1967.
- 63-LINDSKOG S.- Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochem. Biophys. Acta*, 39: 218-21, 1960.
- 64-LINDSKOG S., MELMSTROM B.G.. Reversible dissociation of zinc in bovine carbonic anhydrase. *Biochem. Biophys. Res. Com.*,2:

213-7, 1960.

- 65-LINDSKOG S., ENGBERG P., FORSMAN C., IBRAHIM S.A., JOHNSON B.H., SIMONSSON I., TIBELI L.- Kinetics and mechanism of carbonic anhydrase isoenzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 61-75, 1984.
- 66-LIN V.S., FANG V.S.- Gonadal dysfunction in uremic men. A study of the hypothalamo-pituitary-testicular axis before and after renal transplantation. *Am. J. Med.*, 58: 655-60, 1975.
- 67-LIN V.S., KATHPALIA S.C., FROHMAN L.A.- Hyperprolactinemia and impaired pituitary response to suppression and stimulation in chronic renal failure: Reversal after transplantation. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 48: 101-7, 1979.
- 68-LOGIN I.S., THORNER M.O., MAC LEOD R.M.- Zinc may have a physiological role in regulating pituitary prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 37: 317-20, 1983.
- 69-LONNERHOLM G.- Histochemical localization of carbonic anhydrase in mammalian tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 369-81, 1984.
- 70-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, 1970.
- 71-MAHAJAN S.K., PRASAD A.S., RABBANI P., BRIGGS W.A., MC DONALD F.D.-Zinc metabolism in uremia. *J. Lab. Clin. Med.*, 94: 693-8, 1979.
- 72-MAHAJAN S.K., ABASSI A.A., PRASAD A.S., RABBANI P., BRIGGS W.A., MC DONALD F.D.-Effect of oral zinc therapy on gonadal function in hemodialysis patients. *Ann. Int. Med.*, 97: 357-61, 1982.

- 73-MAHAJAN S.K., PRASAD A.S., RABBANI P., BRIGGS W.A., MC DONALD F.D.-Zinc deficiency: a reversible complication of uremia. *Am. J. Clin. Nutr.*, 36: 1177-83, 1982.
- 74-MAHAJAN S.K., HAMBURGER R.J., FLAMENBAUM W., PRASAD A.S., MC DONALD F.D.- Effect of zinc supplementation on hyperprolactinaemia in uraemic men. *Lancet*, Oct. 5: 750-1, 1985.
- 75-MAREN T.H.-Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition. *Physiol. Rev.*, 47 (4): 595-9, 1967.
- 76-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.
- 77-MASTERS D.G., KEEN C.L., LONNERDAL B., HURLEY L.S.- Release of zinc from maternal tissues during zinc deficiency or simultaneous zinc and calcium deficiency in the pregnant rat. *J. Nutr.* 116: 2148-54, 1986.
- 78-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.
- 79-MELDRUM N.U., ROUGHTON F.J.W.- The CO₂ catalyst present in blood. *J. Physiol. Lond.*, 75: 3-4, 1932.
- 80-MELDRUM N.U., ROUGHTON F.J.W.- Carbonic anhydrase and the state of carbon dioxide in blood. *Nature*, 131: 874-5, 1933.
- 81-MESTRINER M.A.- Polimorfismo protéico em sistemas haplodiplóides (*Apis mellifera*, Linné, 1758)- Ribeirão Preto, 1970, Tese Doutorado, Faculdade de Medicina USP.
- 82-MOLITCH M.E.- Pregnancy and hyperprolactinemic woman. *N. Eng. J. Med.*, 312: 1364-8, 1985.

- 83-MONDRUP M., ANKER N.- Carbonic anhydrase isoenzyme B in the erythrocytes of the uremic subjects. *Clin. Chem. Acta.*, 51: 141-6, 1974.
- 84-MORLEY J.E., DISTILLER L.A., UNTERHALTER S., MYERS J.B., RABIN R., KATZ M.- Effect of renal transplantation on pituitary gonadal function. *Metabolism.*, 27: 781-5, 1978.
- 85-MOYNIHAN J.B.- Isoenzymes of erythrocytic carbonic anhydrase in acidemic newborn infants. *Biochem. Soc. Trans.*, 8: 86-7, 1980.
- 86-NAGEL T.C., FREINKEL B., BELL R.H., FRIESEN H., WILBER J.F., METZGER B.E.- Gynecomastia, prolactin, and other peptide hormones in patients undergoing chronic hemodialysis. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 36: 428-35, 1973.
- 87-NORATO D.Y.J.- A anidrase carbônica eritrocitária na Síndrome de Down. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, 1987.
- 88-NOORGARD-PEDERSEN B., LINDHOLM J.- Quantification of red cell carbonic anhydrase B and C and hemoglobin F in thyroid disorders. *Acta. Med. Scand.*, 192: 227-30, 1972.
- 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.*, 219: 141-56, 1974.
- 90-PACIOREK J., SPENCER N.- An association between plasma progesterone and erythrocyte carbonic anhydrase I concentration in woman. *Clin. Sci.*, 58: 161-4, 1980.
- 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. *Pediatr. Res.*, 16: 1035-6, 1982.

92-RAMIREZ G., O NEILL W.M., BLOOMER H.A., JUBIZ W.- Abnormalities in the regulation of prolactin in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 658-61, 1977.

93-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.

94-RUIZ-REYES G., RAMIREZ-ZORRILLA M. J.- Rapid measurement of erythrocyte carbonic anhydrase isozymes by means of cellulose acetate membrane electrophoresis. *Am. J. Clin. Patol.*, 50: 677-82, 1968.

95-SANDSTEAD H.H.- Trace elements in uremia and hemodialysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33: 1501-8, 1980.

96-SCHAEFER R.M., KOKOT F., KURNER B., ZECH M., HEIDLAND A.- Normalization of elevated prolactin levels in hemodialysis patients on erythropoietin. *Nephron*, 50: 400-1, 1988.

97-SCHERNTHANER G., STUMVOLL H.K., LUDWIG H., SPONA J.- Prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, C-peptide, glucose tolerance and pituitary gonadal axis in patients with compensated renal failure. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, 16: 703- 28, 1979.

98-SCHMITT G.W., SHEHADEH I., SAWIN C.T.- Transient gynecomastia in chronic renal failure during chronic intermittent hemodialysis. *Ann. Int. Med.*, 69: 73-81, 1968.

99-SCHMITZ O., MOLLER J.- Impaired prolactin response to arginine infusion and insulin hypoglycemia in chronic renal failure.

Acta. Endocrinol., 102: 486-9, 1983.

100-SHALDON S.- Hemodialysis in chronic renal failure. *Postgrad. Med. J. (Suppl)*, 42: 671-85, 1966.

101-SIENKO M.J., PLANE R.A.- Elementos da família do Zinco- em *Química, Cap 22, 6ª Ed.*, 465-469, 1978.

102-SIEVERTSEN G.D., LIM V.S., NAKAWATASE C., FROHMAN L.A.- Metabolic clearance and secretion rates of human prolactin in normal subjects and in patients with chronic renal failure. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 50: 846- 54, 1980.

103-SIFFERT W., FOX G., GROS G.- Carbonic anhydrase in human platelets: Effects of carbonic anhydrase inhibition on platelet aggregation. *Ann. N. Acad. Sci.*, 429: 207-9, 1984.

104-SMITH JR. J.C., BUITRIMOVITZ G.P., PURDY W.C.- Direct measurement of zinc in plasma by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chem.*, 25(8): 1487-91, 1979.

105-SOLÉ D., NASPITZ C.K.- O zinco e o sistema imunológico. *Rev. Paul. Med.*, 106 (4): 225-9, 1988.

106-SPENCER H., VANKINSCOTT V., LEWIN I., SAMACHSON J. - Zinc metabolism during low and high calcium intake in man. *J. Nutr.*, 86: 169-77, 1965.

107-SPICER S.S., SENS M.A., HENNIGAR R.A., STOWARD P.J.- Implications of the imuno-histochemical localization of the carbonic anhydrases isozymes for their function in normal and pathological cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429:382-97, 1984.

108-STEWART-BENTLEY M., GANS D., HORTON R.- Regulation of gonadal function in uremia. *Metabolism*, 23: 1065-9, 1974.

109-STOREY B.T., DODGSON S.J., FORSTER R.F.- Mitochondrial

- carbonic anhydrase: The purified enzyme. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 210-1, 1984.
- 110-STRICKLER R.C., WOOLEVER C.A., JOHNSON M., GOLDSTEIN M., DE VEBER G.- Serum gonadotrophin patterns in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 5: 185-9, 1974.
- 111-SWENSON E.R.- The respiratory aspects of carbonic anhydrase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 547-60, 1984.
- 112-SWERDLOFF R.S., KANTOR G., KORENMAN S.G.- Gonadotrophin disassociation in uremic ginecomastia: high plasma LH, low FSH and normal estradiol. *Clin. Res.*, 18: 172-78, 1970.
- 113-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, p 307-36, 1968.
- 114-TASHIAN R.E., CARTER N.D.- Biochemical genetics of carbonic anhydrase. *Adv. Hum. Genet.*, 8: 1-56, 1976.
- 115-TASHIAN R.E., HEWETT-EMETT D., DODGSON S.J., FORSTER R.E., SLY W.S.- The value of inherited deficiencies of human carbonic anhydrase isoenzymes in understanding their cellular roles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 262-75, 1984.
- 116-TRAVAGLINI P., MORIONDO P., TOGNI E., VENEGONI P., BOCHICCHIO D., CONTI A., AMBROSO G., PONTICELLI C., MOCCHEGIANI E., FABRIS N., FAGLIA G.- Effect of oral zinc administration on prolactin and thymulin circulating levels in patients with chronic renal failure. *J. Clin Endoc. Metab.*, 68: 186-90, 1989.
- 117-VALEE B.L., LEWIS H.D., ALTSCHULE M.D., GIBSON 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.
- 118-VALEE B.L.- Zinc Biochemistry and Physiology and their Derangements. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 303: 11-56, 1978.
- 119-VALEE B.L.- Mobilization of tissue zinc for growth and reproduction. *Nutrition Reviews*, 45(11): 346-8, 1987.
- 120-VAN KAMMEN E., THIJSEN J.H.H., SCHWARZF.- Sex hormones in male patients with chronic renal failure. The production of testosterone and androstenedione. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 8: 7-15, 1978.
- 121-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.
- 122-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.*, 213: 321-31, 1980.
- 123-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.
- 124-WASS V.J., WASS J.A.H., REES L., EDWARDS C.R.W., OGG C.S.- Sex hormone changes underlying menstrual disturbances on haemodialysis. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, 15: 178-81, 1978.
- 125-WARTOFSKY L., BURMAN K.D.- Alterations in thyroid function in patients with systemic illness: the euthyroid sick syndrome. *Endocrine Reviews*, 3: 164-79, 1982.
- 126-WEATHERALL D.J., MC INTYRE P.A.- Developmental and acquired

variations in erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes. *Br. J. Haematol.*, 13: 603-14, 1967.

127-WHEELER C.E., CAWLEY E.P., GRAY H.T., CURTIS A.C.-
Ginecomastia: a review and analysis of 160 cases. *Ann. Intern. Med.*, 40: 985-95, 1954.

128-WISTRAND P.J.- Properties of membrane-bound carbonic anhydrase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 429: 195-206, 1984.

As normas utilizadas para a citação bibliográfica foram as preconizadas pela Organização Internacional de Normatização (ISO) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT/NB 66/78).