

**BC/18635**

**IB/80748**



**UNICAMP**

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE E DA CONCENTRAÇÃO  
DA ANIDRASE CARBÔNICA ERITROCITÁRIA EM  
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO SUGESTIVO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER.

T/UNICAMP

L358<sub>1</sub>



PAULO LATUF FILHO

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo (a) candidato (a)  
*Paulo Latuf Filho*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

18/12/92  
*[Signature]*

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE E DA CONCENTRAÇÃO  
DA ANIDRASE CARBÔNICA ERITROCITÁRIA EM  
PACIENTES COM QUADRO CLÍNICO SUGESTIVO DA  
DOENÇA DE ALZHEIMER.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia  
da Universidade Estadual de Campinas para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: PROF. DR. LUÍS ALBERTO MAGNA

UNIDADE	IB 86
N.º CHEQUE	L3582
V.º	18635
F.º	262/93
Q.º	X
PREÇO	6\$ 100.000,00
DATA	30/01/93
N.º CPJ	

@ 11.000,376 701.

Dedico este trabalho à minha filha Júlia,  
motivo de amor e felicidade.

**Agradecimento especial:**

Ao prof. Dr. BERNARDO BEIGUELMAN, não só pela sua dedicação e colaboração científica, fundamentais para a realização deste, mas, principalmente, por ser um exemplo de figura humana e um Amigo, na essência da palavra.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luís Alberto Magna, pela sua experiência e honestidade científica, que permitiu uma orientação tranquila e segura.

Ao Prof. Dr. Nubor Orlando Facure, pela sua inestimável colaboração e pelo constante incentivo.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto Jr., pela ajuda e conselhos, que não se restringiram somente à minha vida profissional.

Aos docentes do Depto. de Genética Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e, em especial, à Profa. Dra. Denise Y.J. Norato, pela colaboração e compreensão, e à Profa. Dra. Carmem Sílvia B. Martins, pelo constante alto astral que a sua amizade, sempre sincera, proporciona.

Aos colegas do Depto. de Genética Médica, Carlos, Claudinha, Daniel, Inara, Isa, Madalena, Roberto e Toninho, pela colaboração e participação.

Aos colegas de pós-graduação, Edi, Janete, Marilda Gonçalves, Nilma e Rogério pela amizade, mesmo quando à distância.

Aos estagiários (e futuros alunos de mestrado) do Depto. de Genética Médica, Andréa Cristina, Carlos, Eliane Fernandes e Lúcia Helena pelo companheirismo e grande colaboração profissional.

Às estagiárias do CBMEG, Adriana, Marcela e Raquel pela força.

Ao Depto. de Patologia Clínica, em especial à Profa. Nelci Fenalti Hoer, à farmacêutica Claudimeire Apda. Mateus e à bióloga Maria Apda. Selleghin, pela valiosa colaboração e boa vontade demonstrada.

Aos funcionários do Instituto de Biologia, em especial às secretárias Sílvia Helena Crivelenti, Terezinha Vieira de Jesus e às bibliotecárias Norma Aparecida, Zilda Bueno e Maria Lavínia, pela ajuda e paciência dispensadas.

Ao Dr. Edson Rossi diretor clínico do "Lar dos Velhinhos" de Campinas, pela sua grande colaboração.

Aos funcionários do Instituto do Cérebro "Dr. Nubor O. Faccure", em especial à bióloga Carmem e à psicóloga Lorna.

À Profa. Vera pelas ótimas aulas de inglês, que muito me ajudaram.

Aos grandes amigos Jô e Henry, pela contagiante alegria que ameniza os problemas do dia a dia.

À Dona Sônia, fiel confidente e amiga.

As amigas da graduação, Marisa, Marise e Natalícia, pela amizade sincera, desinteressada e duradoura.

Aos meus pais, por jamais terem medido esforços para a minha formação profissional, e pelos bons exemplos dados dentro do nosso lar, que trago hoje como modelo para uma vida digna e distinta.

À minha irmã Toce, presente em todos os momentos, sempre ajudando a superar dificuldades.

Ao Sr. Armando e Dona. Wilma, por quem fui acolhido como um filho, pelo carinho, compreensão e apoio.

À Bernadete, minha esposa e companheira, pela paciência e pela cumplicidade neste trabalho, incluindo-o em nossos momentos.

## ÍNDICE

I	- Introdução.....	01
I.1	- As isozimas da anidrase carbônica: origem, estrutura, atividade enzimática e inibidores.....	02
I.2	- Distribuição tecidual da anidrase carbônica.....	08
I.3	- As isozimas eritrocitárias.....	16
I.4	- A doença de Alzheimer.....	23
II	- Objetivos.....	32
III	- Casuística e Métodos.....	33
	a. Obtenção das amostras de sangue.....	33
	b. Quantificação da hemoglobina.....	35
	c. Determinação da atividade da atividade da anidrase carbônica eritrocitária.....	35
	d. Quantificação protéica da anidrase carbônica eritrocitária.....	36
	d.1 Extração da enzima.....	36
	d.2 Dosagem da concentração de proteína.....	37
	d.3 Eletroforese da anidrase carbônica.....	38
	d.4 Dosagem do zinco plasmático.....	39
IV	- Resultados e discussão.....	40
V	- Resumo.....	48
VI	- Summary.....	50
VII	- Bibliografia.....	52



## I- INTRODUÇÃO

A ANIDRASE CARBÔNICA, AC, (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco na sua conformação e está presente em várias espécies, desde bactérias e algas até vertebrados superiores (Carter, 1972), mostrando grande diversidade de distribuição celular e multiplicidade de funções. O peso molecular da ANIDRASE CARBÔNICA (AC), varia nas diferentes espécies. Na espécie humana é de, aproximadamente, 30.000 daltons, podendo atingir até 180.000 daltons em espécies vegetais. A AC, que é uma das enzimas de mais alta atividade (Carter, 1972), está distribuída em vários tecidos humanos, sendo detectada nas hemácias, cérebro, fígado, testículos, pâncreas, baço, mucosas gástrica e intestinal, útero, saliva, plexo coróide, glândulas supra-renais, musculatura estriada e cardíaca (Davenport, 1946) e placenta (Kurata, 1953 ; Bleyl, 1964)), entre outros.

A mais alta concentração dessa enzima (por volta de 1 a 2g de AC por litro de células segundo Maren, 1967) está presente nos eritrócitos, onde, após a hemoglobina, é a segunda proteína mais abundante (Tashian e Nicholas, 1976).

A AC foi caracterizada, pela primeira vez, em células sanguíneas, em 1933, por dois grupos distintos, um da Universidade de Cambridge, tendo à frente o Dr. Meldrum e Dr. Roughton, e o outro, da Universidade da Filadélfia, com o Dr. Stadie e a Dra. Helen O'Brien. Curiosamente, o trabalho da Universidade de Cambridge tornou-se mais conhecido, talvez por ter um título mais conciso e, com certeza, por ter dado nome à enzima descrita (Dodgson, 1991). Um terceiro grupo, composto por Davenport et al., da Universidade de Oxford, identificou a presença da AC

na mucosa gástrica (Carter, 1972).

## I.1 AS ISOZIMAS da ANIDRASE CARBÔNICA: origem, estrutura, atividade enzimática e inibidores

Foi na década de sessenta, com o aparecimento das técnicas de cromatografia, que as primeiras isozimas da AC foram separadas a partir de eritrócitos. Hoje, passado mais de meio século da descoberta da AC, conhecem-se 7 isozimas geneticamente distintas, mas similares estruturalmente, demonstrando propriedades cinéticas e distribuição tecidual características (Tashian, 1989). Tais isozimas são representadas por algarismos romanos após a abreviatura CA (do inglês Carbonic Anhydrase), havendo, pois, desde a CAI até a CAVII. As CAI, CAII e CAIII são isozimas citoplasmáticas, a CAIV é ligada à membrana celular, a CAV é mitocondrial, a CAVI é uma enzima de secreção presente na saliva e a CAVII, a última descrita, é a isozima presente na glândula salivar (Dodgson, 1991).

O sistema das isozimas da AC tem estimulado muitas pesquisas por ser um modelo básico de evolução e expressão de genes derivados de um ancestral comum. De fato, as isozimas da AC já estão presentes em certas algas e bactérias, o que sugere ter a AC aumentado o valor adaptativo dos organismos primitivos, e ter, provavelmente, aparecido antes do surgimento dos eucariontes, há cerca de um bilhão e meio de anos atrás (Tashian, 1989).

Durante a sua história evolutiva, os genes da AC das mais diferentes espécies passaram por etapas de multiplicação, que resultaram

em novos genes, com atuação em processos biológicos tão diversificados como a calcificação, a fotossíntese, a respiração, o equilíbrio ácido-básico, a reabsorção óssea, a formação do humor aquoso e do suco gástrico, a síntese da uréia, da glicose e de lipídios (Tashian, 1989).

Tashian através das seqüências de aminoácidos, construiu a filogenia das isozimas da AC, obtendo a seguinte ordem evolutiva: CAI, CAII, CAIII, CAVII, CAVI e CAIV, e sugeriu que o gene da CAVI, divergiu primeiro do ancestral original (Edwards, 1990).

Esse padrão evolutivo se reflete na distribuição cromossômica dos genes da AC dos mamíferos. Assim, os genes da CAI, CAII e CAIII designados por (CA1), (CA2) e (CA3), estão todos localizados no braço longo do cromossomo 8, na região q13-22 (Davis et al., 1987 e Nakai et al., 1987). O gene da CAVI (CA6) foi mapeado na região distal do braço longo do cromossomo 1 (Sutherland et al., 1989), enquanto que o gene da CAVII (CA7) foi localizado na região q21-23 no cromossomo 16 (Tashian, 1989).

A tabela I, fornece a localização cromossômica, a distribuição e a função das isozimas da AC humana.

Como já se pode ver, a AC desempenha diferentes papéis fisiológicos, muito embora a reação catalisada por ela seja, preferencialmente, a mesma, ou seja, a hidratação do CO<sub>2</sub> e a desidratação do ácido carbônico. Além dessa reação, a AC ainda participa da hidratação de aldeídos (Pocker e Meany, 1965) e hidrólise de alguns ésteres (Tashian et al., 1964).

O substrato natural da AC é o CO<sub>2</sub>, e a reação principal da AC pode ser expressa por:



Tabela I Localização cromossômica, distribuição e função das isozimas da Anidrase Carbônica humana.

( Adaptado de Tashian, 1989 )

Isozimas	Posição e localização cromossômica	Distribuição	Função
CAII	8q22	Epitélio de secreção e absorção. Tecido ósseo e cerebral, olho, fígado, rim, glândulas salivares, pâncreas, estômago, útero e eritrócitos.	Manutenção da homeostase ácido-básica, transferência de íons, acidificação renal, secreção gástrica, produção do suco pancreático, trocas gasosas e formação do humor aquoso.
CAI	8q13 8q22	Eritrócitos, estômago, endotélio vascular, olho, glândulas salivares, células adiposas.	Provavelmente similar à CAII.
CAIII	8q13 8q22	Musculatura esquelética (Tipo1), glândulas salivares, eritrócitos, glândula prostática, pulmão, rim, testículo e glândula mamária.	Facilita a difusão do $CO_2$ e, talvez, a contração muscular. Homeostase ácido-básica.
CAIV	(?)	Pulmão, rim e provavelmente mucosa gastrointestinal, fígado.	Reabsorção de $HCO_3^-$ e transporte de $H^+$ e trocas gasosas.
CAV	(?)	Rim e fígado	Produz $HCO_3^-$ para glicogênese e ciclo da uréia
CAVI	1pt36	Glândulas salivares (células acinares)	Regulação do pH da saliva (?)
CAVII	16q21-23	Glândula salivar (?)	(?)

Na reação in vitro, podemos ter como substratos da AC, os ésteres acetato de alfa-naftila, o acetato de orto- ou para- nitrofenila (Verport et al., 1967), o acetaldeído (Pocker e Meany, 1965) e, ainda, a sultona do ácido 2-hidroxi 5-nitro alfa tolueno sultônico (Sanyal et al. 1983).

As isozimas citoplasmáticas da AC diferem significativamente quanto à eficiência catalítica. Na maioria das vezes, considera-se a isozima CAII como de "alta atividade", a CAI como de "baixa atividade", tendo a CAIII a atividade mais baixa em relação ao substrato natural. Isso é comprovado pela diferença de parâmetros cinéticos onde, em pH 8,8, a atividade da CAII é, aproximadamente, 7 vezes maior do que a da CAI (Tashian et al., 1984).

A designação de alta e baixa atividade nem sempre é apropriada, uma vez que suas atividades específicas podem variar com o substrato utilizado. Por exemplo, a CAII tem atividade maior que a CAI quando o substrato é o p-nitrofenilacetato (Verport et al., 1967), a sultona do ácido 2-hidroxi-5-nitro-alfa-tolueno sultônico (Kaiser e Kwok-Wing, 1969), o acetaldeído (Pocker e Meany, 1965), e o substrato natural, enquanto que a CAI mostra maior atividade que a CAII com o o-nitrofenilacetato (Verport et al., 1967) e o beta naftil-acetato (Tashian, 1972).

As isozimas da AC mostram entre 28 a 59% de homologia nas seqüências de aminoácidos (cadeia simples com aproximadamente 260 aminoácidos), sendo que a CAI e a CAII são as que mostram maior similitude.

As diferenças fundamentais entre elas estão presentes no sítio ativo, com a isozima CAI apresentando três resíduos de histidina nas posições 64, 67 e 200, a CAII His 64, Asn 67 e Thr 200 e a CAIII Lis 64, Arg 67 e Arg 91 (Eriksson e Liljas, 1991), o que sugere ser a histidina

a principal responsável pelas diferenças cinéticas entre essas isozimas (Lindskog et al., 1984), uma vez que esse resíduo é o responsável pela transferência intramolecular de prótons entre o sítio ativo e as moléculas do tampão (Tu et al., 1989).

As outras isozimas (CAIV, CAV e CAVI) apresentam composição de aminoácidos diferente das isozimas citoplasmáticas devido à sua capacidade de se ligar à membrana e se relacionar com a secreção (Edwards, 1991)

Isozimas secundárias de cada uma delas podem ser formadas por modificações na conformação molecular (Headings e Tashian, 1971), por desaminação (Funakoshi e Deutsch, 1969) ou pela combinação desses processos (Bouthier et al., 1973). Tashian e Osborne (1974) mostraram que a isozima secundária CAI-1 pode representar um estágio do processo de degradação da CAI.

A AC acelera a reação de hidratação do  $\text{CO}_2$  em cerca de 250 vezes e alguns passos dessa reação são fundamentais para que esse aumento de velocidade ocorra. Um deles é a ligação do  $\text{CO}_2$  com a molécula de  $\text{Zn}^{2+}$  e o outro é a transferência intramolecular de prótons da molécula de  $\text{Zn}^{2+}$  ligada à água para o grupo transportador de prótons (His 64) (Liang et al., 1988).

Em 1940, Mann e Keilin descobriram que as sulfonamidas atuavam como inibidores da AC e, desde então, foram descritos numerosos fármacos com grande especificidade tecidual (Carter, 1972). Metais como o cobre, a prata, o ouro, o ferro e o cobalto e diversos ânions inorgânicos, como os ânions iodeto, cloreto, cianeto e sulfeto são potentes inibidores da AC (Marén, 1967).

A acetazolamida\* é um inibidor da AC potente e específico, exercendo inibição do tipo não-competitivo (Davis, 1961). Aqui é curioso lembrar que a introdução de inibidores da AC em oftalmologia foi feita pela primeira vez em 1954, com a finalidade de reduzir a formação do humor aquoso e, assim, diminuir a pressão intraocular (Kass, 1989).

As isozimas citoplasmáticas mostram diferentes comportamentos com relação à ação dos inibidores. Assim, por exemplo, a CAII é mais sensível à inibição pela acetazolamida que a CAI (Maren et al., 1976) que, por sua vez, é mais sensível à inibição por ânions inorgânicos, tendo sido demonstrada a redução de aproximadamente 92% da atividade da CAI em concentrações fisiológicas de cloreto e bicarbonato (Maren, et al.). Isso indicou, pois, que a CAI possui outro papel fisiológico em eritrócitos, que não o da hidratação do  $\text{CO}_2$ . Em recente trabalho publicado por Dodgson et al. (1988), porém, a CAI demonstrou fraca inibição pelo  $\text{Cl}^-$  a  $37^\circ\text{C}$  e, ainda, em eritrócitos de pacientes deficientes de CAII, a atividade foi 50% do normal, o que sugere ter a CAI, uma ação efetiva nos eritrócitos (Dodgson, 1991). A isozima CAIII, por sua vez, demonstra simillaridade à CAI quanto à inibição por ânions inorgânicos, muito embora, seja menos sensível à inibição pela acetazolamida que a CAI (Sanyal, 1983).

\* Diamóx, laboratórios Merck Sharp-Dohme ,  
utilizado clinicamente para a redução da pressão intra-ocular.

## I.2 DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL da ANIDRASE CARBÔNICA

A distribuição das isozimas da AC não é a mesma nos diferentes tecidos, o que mostra terem elas função particular em cada um deles (Tashian et al., 1984). De qualquer modo, existem técnicas de imuno-histoquímica e de inibição diferencial que permitem determinar a presença da AC em diferentes tecidos humanos, condição essencial para se avaliar a potencialidade de defeitos produzidos pela deficiência da AC.

Após a descoberta da presença da AC em eritrócitos, detectou-se essa enzima na mucosa gástrica (Davenport, 1946), sabendo-se atualmente, que ela é encontrada em todo o trato gastrointestinal, desde as glândulas salivares até o cólon, onde desempenha diversos papéis fisiológicos (transporte, regulação de pH intracelular e absorção) (Swenson, 1991).

No estômago ela participa de forma ativa no mecanismo de secreção ácida, estando presente em altas concentrações nas células oxínticas e também nas células epiteliais de superfície, sendo a CAII a isozima principal (Swenson, 1991), realizando a neutralização intracelular e a hidratação do dióxido de carbono, formando o ácido carbônico (Davenport et al., 1978). Devido a isso, muitos inibidores da AC são utilizados no tratamento de úlcera gástrica, mas os resultados ainda são contraditórios (Swenson, 1991).

Além das enzimas implicadas nos processos de digestão de proteínas, gorduras e carboidratos, a secreção pancreática exhibe elevada concentração de bicarbonato de sódio, que neutraliza o ácido clorídrico oriundo do estômago que chega ao duodeno. A AC, principalmente a CAII, participa do mecanismo de secreção do bicarbonato de sódio nas células



dos dutos intercalares (Davenport et al., 1978). A isozima CAIV também está presente nas membranas (Carter et al., 1990), encontrando-se a CAI em quantidade menor do que a CAII (Swenson, 1991).

No intestino existem diferenças marcantes com relação ao conteúdo de AC. Assim, no jejuno, a quantidade de AC é baixíssima, localizando-se essa enzima principalmente na membrana basolateral das células das criptas (Swenson, 1991), onde a concentração de CAII é duas vezes maior que a da CAI (Lonnerholm et al., 1985). Mesmo com grande quantidade de ácido carbônico sendo reabsorvida e os íons  $H^+$  sendo secretados no jejuno, o papel da AC ainda permanece obscuro (Turnenberg et al., 1970; Swenson, 1991).

Do mesmo modo que no jejuno, a quantidade de AC presente no íleo é relativamente pequena, estando a concentração de CAI e CAII na proporção 1,45:1 (Lonerholm et al., 1985). Esse órgão possui uma considerável capacidade de alcalinizar o quimo intestinal. Desse modo, a secreção de  $HCO_3^-$  aparenta estar ligada à absorção de NaCl e à manutenção de pH favorável à microflora normal do intestino baixo, mas, aqui também, o papel exato da AC permanece controverso, já que os dados relacionados com a reabsorção de NaCl são consistentes, mas os que se relacionam com a alcalinização luminal não o são (Swenson, 1991).

No cólon estão presentes as isozimas CAI, CAII e CAIII, além da CAIV, descrita recentemente (Carter et al., 1990). O cólon distal possui menos atividade de AC que o cólon proximal e o ceco. A enzima está concentrada no epitélio de superfície e na porção superior, onde sua função está relacionada com a reabsorção do NaCl (Swenson, 1991).

No fígado a AC participa do metabolismo intermediário da uréia, da glicose e dos ácidos graxos, fornecendo íons bicarbonato em

determinadas etapas desses processos (Dodgson et al., 1984), estando presente nos hepatócitos. Foram detectadas as isozimas CAII e CAIII (Jeffrey et al., 1985) assim como a CAV (mitocondrial) (Swenson, 1991) e a CAIV (Carter et al., 1990), sendo a maioria da sua atividade citoplasmática (Garcia-Marin et al., 1988).

A atividade da AC no rim foi descrita pela primeira vez em 1941 por Davenport e Widdelmi e, hoje, sabe-se que as isozimas CAII, CAIV e CAV estão distribuídas desigualmente ao longo do nefrônio (Dodgson, 1991).

O rim, entre outras funções, regula a concentração plasmática de bicarbonato e mantém a composição química dos líquidos corporais, colaborando, assim, para a manutenção da homeostase ácido-básica (Harper et al., 1985).

A principal função da AC é a catálise da reação entre  $H_2O$  e  $CO_2$ , produzindo o ácido carbônico e secretando  $H^+$  (Harper et al., 1985). Nos túbulos proximais o  $H^+$  secretado para o lúmen tubular em intercâmbio com o  $Na^+$ , reage com o  $HCO_3^+$  filtrado para formar o  $H_2CO_3$ . Este, na presença da AC (localizada na borda em escova intraluminal do túbulo proximal) dissocia-se normalmente em  $CO_2$  e  $H_2O$ . Assim, ela intermedia a reabsorção do  $NaHCO_3$  filtrado (Harper et al., 1985). Esses passos metabólicos são realizados pelas isozimas CAII e CAIV. Essas isozimas demonstram similaridade cinética quanto ao número de transformação para o  $CO_2$  e atividade específica para o p-nitrofenilacetato. Além disso mostram suscetibilidade à inibição por sulfonamidas e resistência à inibição por cloretos. Elas diferem, entretanto, na composição de aminoácidos e no peso molecular, assim como, no comportamento cromatográfico e eletroforético (Wistrand e Kmüüttille, 1989). Estudos recentes aventam a hipótese de a

CAV estar envolvida na síntese da glicose nas células dos túbulos contorcidos proximais (Dodgson, 1991).

A acetazolamida bloqueia a reabsorção de  $\text{HCO}_3^-$  no túbulo proximal e a sua regeneração no túbulo distal. Embora em situações agudas ela seja um diurético eficiente, seu efeito parece depender de concentrações adequadas de bicarbonato no plasma (Harper et al., 1985). Os outros diuréticos têm, também, fraca atividade como inibidores da AC, embora, não seja esse o mecanismo básico de sua capacidade para induzir a diurese (Harper et al., 1985).

Desde 1952 sabe-se da existência da AC no pulmão, sendo detectadas as isozimas CAI e CAII, distribuídas no parênquima, células do epitélio e do endotélio (Nioka e Forster II, 1991). A isozima CAIV foi, recentemente, isolada de membranas do tecido pulmonar e apresentou grande similaridade com a CAIV encontrada nos rins (Zhu e Sly, 1990). O papel da AC nos pulmões ainda não está bem esclarecido, mas supõe-se que ela esteja envolvida no transporte de  $\text{CO}_2$  (Nioka e Forster II, 1991), provavelmente facilitando a difusão do  $\text{CO}_2$  e mantendo o equilíbrio do pH extracelular (Bidani e Grandall, 1988).

O papel da AC no olho está, diretamente, relacionado com a produção do humor aquoso, fornecendo o substrato ( $\text{HCO}_3^-$ ) para o transporte de ânions (Kishida et al., 1984).

No tecido ósseo, a AC está associada à reabsorção óssea e ao crescimento ósseo endocondral, onde parece ter importante função na calcificação da cartilagem (Vaananem e Parvinem, 1991). Estudos com imunohistoquímica mostram que os condrócitos são a matriz celular da AC na placa de crescimento (Väänänem et al., 1984). Recentemente, confirmou-se a localização extracelular da AC na placa de crescimento (Marie e Hott,

1987) e, com base nesses dados, concluiu-se que, nesse tipo de célula, a isozima presente é a CAII, a qual, provavelmente, facilitaria o transporte de  $\text{CO}_2$  e poderia, também, explicar o alto pH do fluido extracelular da cartilagem, o que favorece a precipitação do fosfato de cálcio (Vaananem, 1991).

A presença de AC nos osteoclastos, sugere ser essa enzima responsável pelo suprimento de prótons transportados pela membrana (Cao e Gay, 1985). Tal hipótese é apoiada nas observações feitas sobre a interação do hormônio paratireoideo (PTH) e a homeostase de  $\text{Ca}^{2+}$  (inibidores da AC em cobaias nefrectomizadas diminuem a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático) (Waite, 1972). Postula-se, também, o envolvimento da AC (CAII) no mecanismo de secreção ácida dos osteoclastos, uma vez que o PTH aumenta a atividade enzimática (Silverton et al., 1988) e a secreção ácida (Hunter et al., 1988) e inibidores da AC inibem ambas atividades (Silverton, 1991).

No tecido muscular a presença da AC está relacionada com a manutenção do equilíbrio iônico e com a homeostase ácido-básica (Carter, 1991). A isozima em concentração mais elevada é a CAIII, presente no citoplasma e na musculatura esquelética, que tem como função facilitar o transporte, para o sangue, de  $\text{CO}_2$  produzido nas células musculares. Esse processo engloba dois mecanismos distintos, a difusão do  $\text{CO}_2$  intracelular e a catálise do transporte de  $\text{CO}_2$  extracelular (Geers e Gros, 1991). As isozimas CAII e a CAIV estão presentes no sarcolema e no retículo sarcoplasmático desse tecido (Geers e Gros, 1991).

Recentemente detectou-se a presença da AC em várias células das glândulas salivares e na saliva (Fernley, 1991). Além das isozimas CAI e CAII na glândula parótida e na submandibular detectou-se, também,

a presença da isozima secretora CAVI a qual, acredita-se, está relacionada com a regulação do pH salivar (Parkilla et al., 1990).

A isozima CAVI, em comparação com as isozimas citoplasmáticas, possui alto peso molecular e pouca sensibilidade à inibição por sulfonamidas (Fernley, 1991).

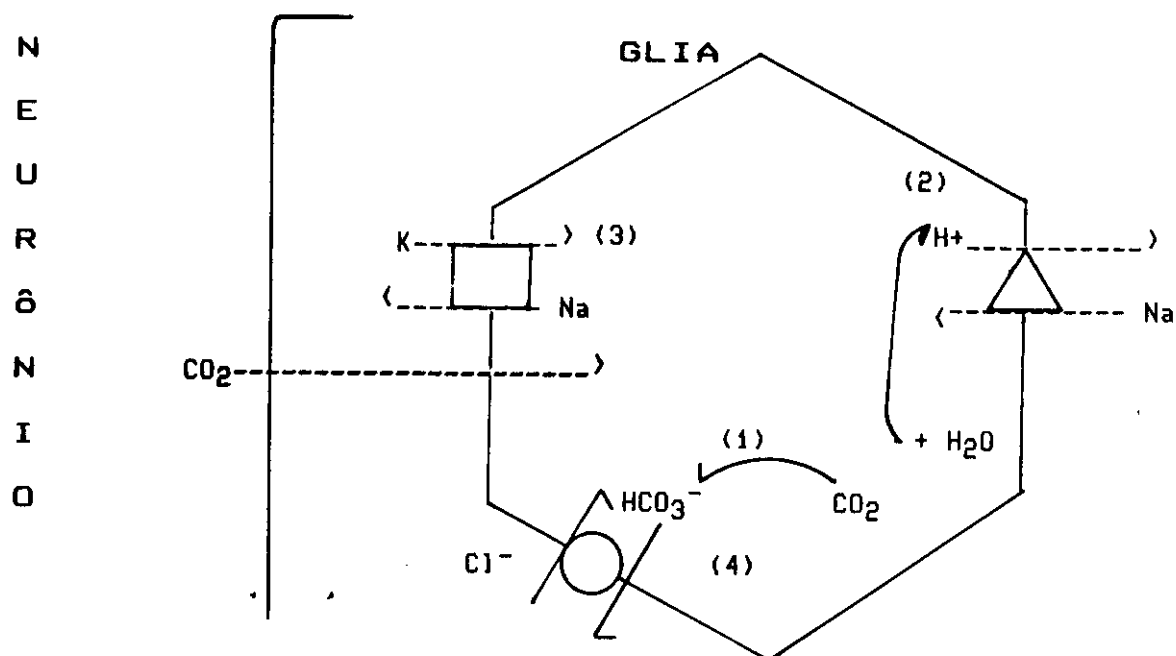
A última isozima descrita, a CAVII é, também, uma isozima secretora e se expressa nas glândulas salivares (Tashian, 1989).

A presença da AC no tecido cerebral foi detectada pela primeira vez por Van Goor (1948) (cf. Nógradi e Mihály, 1990). Utilizando métodos bioquímicos e histoquímicos, Giacobini et al. (1962)

demonstraram a presença e a atividade dessa enzima nas células gliais. No epitélio do plexo coróide a AC está presente em concentração elevada, possuindo um importante papel na secreção do líquido céfalo-raquidiano (LCR) (Masuzawa et al., 1984). A distribuição celular das isozimas da AC no sistema nervoso central (SNC) está restrita, principalmente, às células gliais, com concentração mais elevada nos oligodendrócitos, nos quais é observada no citoplasma, mielina e, aparentemente, nas mitocôndrias (Anderson, et al., 1984 ; Camer, 1984). Muito embora se reconheça a importância dos astrócitos no transporte de íons e fluidos no SNC, a questão da existência de atividade enzimática nessas células permanece obscura, uma vez que, nesse tipo celular, foram detectados apenas baixíssimos níveis de AC (Neubauer, 1991).

Considera-se que os neurônios sejam, também, deficientes de AC, apesar de a lista de exceções a essa consideração ser crescente, pois essa enzima já foi detectada em subpopulações de neurônios da retina e do sistema nervoso periférico e central (Neubauer, 1991).

O papel da AC no tecido cerebral está relacionado com a manutenção do equilíbrio ácido-básico intra e extra-celular, e, também, do fluido cerebrospinal (Guillaume *et al.*, 1991) ao catalisar a hidratação do  $\text{CO}_2$  durante a atividade neuronal, gerando o bicarbonato necessário para as reações biossintéticas (Coulson e Herbert, 1984; Maren 1984) e à atividade neuronal (Woodbury *et al.*, 1984). O esquema I, proposto por Sapirstein *et al.* (1984), representa a hipótese da distribuição iônica no tecido cerebral e a manutenção do equilíbrio ácido-básico, realizado pelos oligodendrócitos.



Esquema I Esquema hipotético da redistribuição de íons pelas células gliais.

A sequência de eventos inclui: (1) a hidratação de  $\text{CO}_2$  (produzido pela atividade neuronal) pela AC, produzindo íons hidrogênio e íons bicarbonato. (2) Os íons  $\text{H}^+$  são trocados pelos íons  $\text{Na}^+$ . (3) Bomba  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase trocando  $\text{Na}^+$  por  $\text{K}^+$ , permitindo o efluxo iônico, polarizando a membrana. (4) Troca de íons bicarbonato pelo cloro extracelular, que determina a sua diminuição, impedindo a entrada no neurônio.

Visto que a AC está preponderantemente concentrada nos oligodendrócitos, os quais mostram estreita correlação com a formação da mielina, relaciona-se o rápido aumento pós-natal de astrócitos e oligodendrócitos com a participação da AC no processo de desenvolvimento cerebral (Ling, 1973). Aliás, em algumas doenças desmielinizantes, como, por exemplo, na adrenoleucodistrofia e na leucodistrofia de células globóides de Krabbe, a atividade da AC está diminuída (Lees et al., 1980).

Acredita-se, também, que a AC é um marcador específico dos oligodendrócitos (Ghandour et al., 1979). De fato, as células gliais estão ausentes no período pós-natal imediato e, coincidentemente, a atividade da AC nessa época é extremamente baixa, o que ocasiona um acúmulo de  $\text{CO}_2$  nas células neuronais. Essa alta taxa de  $\text{CO}_2$  é condição que favorece o rápido crescimento de sinapses e processos neuronais, além de ser, também, fundamental para a mielinização e a formação de precursores de agentes transmissores, como o oxalacetato e o alfa-cetoglutarato (Woodbury et al., 1984).

Com o decorrer do desenvolvimento cerebral e o crescimento das células gliais, a AC presente nessas células diminui a concentração de  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  das células neuronais. Ao mesmo tempo, essas concentrações aumentam de maneira significativa nas células gliais (Woodbury et al., 1984).

A acetazolamida mostrou propriedade anticonvulsivante em alguns animais de laboratório e em anima nobile (Woodbury, 1980). Essa propriedade decorre da atividade da AC já que a acetazolamida, diminui a concentração de  $\text{CO}_2$  e  $\text{HCO}_3^-$  nas células gliais, e é claro, o pH celular, o oposto ocorrendo nas células neuronais.

O  $\text{CO}_2$  acumulado é suficiente para bloquear as crises convulsivas, sendo, pois, um ótimo mecanismo protetor (Woodbury et al., 1984).

### I.3 ISOZIMAS ERITROCITÁRIAS

Desde o trabalho pioneiro de Roughton e Meldrum (1933) as isozimas eritrocitárias constituem o grupo mais amplamente estudado e caracterizado dentro da família das isozimas da AC.

As concentrações das isozimas CAI, CAII e CAIII em eritrócitos humanos obedecem a proporção, 86:13:1, respectivamente (Carter et al., 1984 ; Dodgson et al., 1988), com níveis de 12,7 ( $\pm 0,30$ ) ug/mgHb para a CAI e 1,94 ( $\pm 0,30$ ) ug/mgHb para a CAII (Tashian e Carter, 1976). A CAI contribui com, aproximadamente, 10% da atividade total, a CAII com 90% e a CAIII com 1% (Carter et al., 1984 ; Wistrand, 1981).

O aparecimento das isozimas eritrocitárias ocorre por volta da 23ª semana de gestação e o seu nível aumenta proporcionalmente à idade gestacional, chegando, ao nascimento, com concentração de CAI e de CAII correspondendo a, respectivamente, 1/16 e 1/10 dos níveis encontrados nos adultos normais. Isso sugere uma diferença significativa entre a velocidade de aparecimento das isozimas (Mondrup et al., 1980). O nível do adulto normal parece ser atingido durante, ou logo após a infância (Moore, 1984).

As isozimas mostram uma grande variação qualitativa e quantitativa, causada por fatores genéticos ou não. As variantes da isozima CAI são raras e não possuem significado clínico, com exceção da variante Israel CAI, descrita por Shapira et al. (1974). Tal variante, que foi associada à acidose tubular renal, em comparação à enzima normal possui



atividade específica muito reduzida para o  $\text{CO}_2$  e para o p-nitrofenilacetato. Estruturalmente, elas demonstram possuir uma diferença significativa, sendo a variante mutante deficiente do resíduo tirosina da cadeia de aminoácidos (Tashian e Carter, 1976).

A osteopetrose com acidose tubular renal e calcificação cerebral foi descrita pela primeira vez por Sly *et al.* em 1972. Em 1983, esses mesmos autores, pesquisando a AC em eritrócitos de indivíduos portadores dessa anomalia, detectaram a ausência da isozima CAII. Os pais desses pacientes, que eram fenotipicamente normais, possuíam, em seus eritrócitos, cerca de 50% da quantidade de CAII encontrada em indivíduos sadios (Sly, 1983). Atualmente, tal anomalia também é designada por síndrome Guibaud-Vanisel, doença do cérebro de mármore ou síndrome da deficiência da CAII (McKusic, 1986).

Essas observações, somadas ao fato de as sulfonamidas produzirem acidose tubular renal e bloquearem a ação do PTH, sugeriram ser a deficiência da AC o defeito primário nessa alteração metabólica, que demonstra padrão de herança autossômico recessivo.

As manifestações clínicas dessa síndrome são variáveis, mas é comum o achado radiológico semelhante a outras formas de osteopetrose, tais como, densidade óssea aumentada, arquitetura trabecular obliterada e faixas transversas nas metáfises (Sly, 1991 ; Lester, 1977). A fragilidade óssea é, então, uma consequência dessa anomalia. A atrofia ótica e complicações no aparelho auditivo, são, também, características comuns dessa síndrome, mas a anemia, que é um achado comum em outras formas de osteopetroses, é raramente presente nesses pacientes (Sly, 1991)

A acidose tubular renal em indivíduos com a deficiência da CAII é, geralmente, uma combinação da acidose tubular proximal e distal (Cochat et al., 1987). A calcificação cerebral, assim como o retardamento mental em indivíduos com deficiência da CAII, ainda permanecem obscuros, pois o retardamento mental parece estar relacionado com o aumento dos níveis de calcificação cerebral, mas o oposto nem sempre é verdadeiro (Tashian et al., 1984). De fato, alguns indivíduos deficientes de CAII apresentavam inteligência pouco abaixo da normalidade, mas exibiam densas e progressivas calcificações basais (Whyte et al., 1988). O retardamento mental está presente em 90% dos pacientes descritos, muitos dos quais não recebem educação em escolas regulares, embora o retardamento seja, na maioria das vezes, classificado como moderado (Sly, 1991).

A maioria dos pacientes descritos apresenta baixa estatura e, alguns deles, baixo peso. Provavelmente esse retardamento do crescimento seja resultado de uma acidose metabólica crônica (Sly, 1991). Outras características clínicas podem ser observadas como, por exemplo, a desproporção crânio-facial, micrognatia e, ainda, nariz estreito e proeminente.

A patogenia dessa síndrome ainda permanece controversa, já que a ausência dessa isozima foi detectada em eritrócitos dos indivíduos portadores sem que, no entanto, fosse observada ausência da CAII diretamente nos osteoclastos e nas células dos túbulos renais desses indivíduos (Sly, 1991) onde, provavelmente, haveria atividade residual, já que a CAII é a isozima solúvel, presente em maior concentração (Wistrand et al., 1975) e tais células continuariam, portanto, sintetizando a proteína. Essa diferença de atividade residual poderia explicar a heterogenei-

dade clínica dessa síndrome (Sly, 1991). A concentração de CAI e CAIII estão aumentadas nesses indivíduos (Tashian et al., 1984).

Mais da metade dos casos estudados foram observados em famílias de beduínos do Kuwait, Arábia Saudita e África do Norte, locais onde os casamentos consangüíneos são mais frequentes (Sly, 1991). O diagnóstico pré-natal desse erro inato do metabolismo e o aconselhamento genético são possíveis utilizando-se técnicas de inibição enzimática diferencial, que possibilitam a detecção de heterozigotos (Sundaram et al., 1986).

As técnicas de biologia molecular também já podem ser empregadas, pois existe a descrição de um polimorfismo do sítio de clivagem da enzima de restrição TaqI na região 5', próxima ao gene da CAII (CA2) (Lee et al., 1985).

Em algumas doenças hematológicas também foram notadas alterações significativas dos níveis das isozimas eritrocitárias da AC, como, por exemplo, na anemia megaloblástica na qual ocorre aumento das isozimas, principalmente da CAI (Weatherall e McIntyre, 1967 ; Ruiz-Reyes, 1968). O tratamento básico da anemia megaloblástica consiste da administração de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> (Janini, 1978) que, por sua vez, fazem com que os níveis da AC eritrocitária diminuam lenta e progressivamente, até a normalidade, que coincide com a normalização dos valores de hemoglobina (Weatherall e McIntyre, 1967). Isso sugere a utilidade da dosagem dos níveis de AC no diagnóstico retrospectivo da eritropoese megaloblástica. As alterações megaloblásticas estão presentes em muitas situações, como, por exemplo, na gravidez (Janini, 1978), no puerpério, na desnutrição (Ruiz-Reyes, 1969) e na terapia anticonvulsivante (Oropenza, 1970). Na leucemia mielóide crônica juvenil os níveis de AC são com-

patíveis com os níveis observados em recém-nascidos. Também na anemia ferropriva encontram-se níveis diminuídos dessa enzima (Wehinger, 1973).

Na persistência hereditária da hemoglobina fetal associada com a beta-talassemia os níveis da AC eritrocitária permanecem inalterados (Conley et al., 1963). Em outras situações em que o nível da hemoglobina fetal está aumentado, no entanto, há uma diminuição no nível da AC eritrocitária (Lie-Injo e Tarail, 1966).

No traço talassêmico beta são descritos níveis normais (Wehinger, 1973) ou aumentados dessa enzima nos eritrócitos (Lie-Injo et al., 1970). Ramalho (1978) detectou níveis elevados de CAI eritrocitária tanto na talassemia beta quanto na anemia ferropriva, utilizando esse achado para a realização do diagnóstico diferencial entre essas duas entidades patológicas pela investigação da razão  $HbA_2/CAI$ , que está aumentada nos talassêmicos.

É conhecida, também, a correlação entre o nível de zinco eritrocitário e plasmático e a atividade da AC. Por isso, em algumas situações anômalas nas quais os níveis de zinco estão reduzidos, como, por exemplo, na anemia falciforme, encontramos, também, uma diminuição da AC eritrocitária (Tashian e Carter, 1976). Níveis alterados de CAI e ou CAII eritrocitárias estão presentes em outras numerosas enfermidades (Tabela II).

Em algumas aberrações cromossômicas, como, por exemplo, na síndrome da trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down) e na trissomia do cromossomo 13 (síndrome de Patau) os níveis da AC eritrocitária encontram-se alterados. Na síndrome da trissomia do cromossomo 13 observou-se a diminuição do nível da CAI e, também, da  $HbA_2$ , acompanhado de um aumento da  $HbF$  (Gerald et al., 1964). Esse achado conduziu à hipótese

de que a diminuição da AC estivesse associada a um atraso da maturação ( Lee et al., 1965 ; Walzer et al., 1966).

Já na síndrome de Down constatou-se um aumento da quantidade da isozima CAI (Wehinger, 1973 ; Ramalho, 1978 ; Ohno, 1984 ; Norato, 1987). Várias outras alterações bioquímicas são observadas na síndrome de Down, entre as quais, um aumento significativo do nível da dismutase-1 de superóxido (SOD-1) (Ohno, 1984). Esse aumento pode ser explicado como um efeito de dose gênica, uma vez que, o gene da SOD-1 está localizado no cromossomo 21 (Sinet, 1974 ; Ohno, 1984). Isso não explicaria, no entanto, o aumento da AC eritrocitária, uma vez que os genes dessas isozimas estão localizados no cromossomo 8 (Davis et al., 1987 ; Nakai et al., 1987).

Esse aumento da CAI eritrocitária detectado em pacientes com síndrome de Down pode ser devido à maior velocidade na ontogênese de variáveis hematológicas, pois esses pacientes apresentam uma rápida diminuição do nível de HbF e um aumento precoce de A<sub>2</sub>. Esses pacientes apresentam envelhecimento precoce e muitos sinais biológicos presentes nessa síndrome são coincidentes com aqueles característicos da doença de Alzheimer, como por exemplo, a degeneração granulovacuolar de neurônios, placas senis, enovelados neurofibrilares, calcificações cerebrais, além da alteração no metabolismo do peróxido (Sinet, 1982).

Tendo em vista essas similaridades passava a ser de crucial importância a investigação dos níveis de AC em pacientes com a doença de Alzheimer.

Tabela II Algumas doenças associadas a alterações dos níveis da anidrase carbônica eritrocitária (Adaptado de Tashian e Carter, 1976)

DOENÇAS	ISOZIMAS	
	CAI	CAII
Anemia falciforme	diminuída	diminuída
Anemia ferropriva	diminuída	?
Enfisema pulmonar	diminuída	diminuída
Hipertireoidismo	diminuída	diminuída
Hipotireoidismo	aumentada	aumentada
Leucemia mielóide crônica	diminuída	?
	aumentada	aumentada
Policitemia secundária	em alguns casos	em alguns casos
Policitemia vera	geralmente aumentada	geralmente aumentada
Síndrome da angústia respiratória	diminuída	diminuída
Síndrome de Down	aumentada	?

#### I.4 A DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer é um dos processos degenerativos mais freqüentes do cérebro e foi relatada pela primeira vez por Alois Alzheimer, que descreveu, em 1907, as principais alterações anátomo-patológicas encontradas nessa enfermidade.

Sabe-se, atualmente, que a doença de Alzheimer é um sério problema de saúde pública, pois estima-se que ela atinja 1% da população geral e 5-20% da fração com mais de 65 anos (Jones, 1990), sendo apontada nos EUA como a quinta causa das mortes ali ocorridas (Markesbery, 1989). Essa doença se caracteriza, principalmente, pela presença de perda da memória progressiva e irreversível, diminuição das capacidades cognitiva, intelectual, motora e sensitiva. Dentre os achados anátomo-patológicos, o mais comum e típico da doença é a presença de placas senis e dos enovelados neurofibrilares (Rowland, 1986).

Clinicamente, podem-se distinguir duas formas da Doença de Alzheimer. Uma delas se caracteriza pelo aparecimento antes dos 65 anos (doença de Alzheimer ou demência pré-senil) e a outra, pela manifestação após os 65 anos (demência senil ou demência senil tipo Alzheimer). Certos autores consideram que 70 anos seria a idade limite divisória (Perry, 1986). A maioria, porém, considera as duas formas como uma só entidade, pois não se encontram diferenças significativas entre elas nas análises clínicas, anátomo-patológicas, ultra-microscópicas e bioquímicas (Rowland, 1986). Entretanto, no concernente à intensidade das manifestações clínicas, pode-se dizer que elas diferem, já que a forma precoce é mais grave que a tardia, levando-se em conta, o grau de perda

das capacidades cognitivas na evolução da doença (Bavles, 1991 ; Jones, 1990 ; Roth, 1986).

Observa-se, inicialmente, um certo grau de embotamento intelectual, o raciocínio se torna mais lento, a memória apresenta falhas, principalmente de fatos recentes. A agitação, a irrequietude, os distúrbios do ciclo sono-vigília são manifestações freqüentes. A afasia é um sintoma inicial freqüente. Alterações do humor são freqüentes, sendo que a depressão é encontrada em 25% dos casos, além da ocorrência do desenvolvimento de idéias paranóicas e delírios (Richardson e Adams, 1984 ; Rowland, 1986). Durante a evolução da doença, nota-se o aparecimento de apraxia, com a marcha lenta e arrastada, e agnosia.

Nos estágios terminais, a vida se torna puramente vegetativa, com as atividades intelectuais abolidas. A alimentação se torna limitada trazendo, como consequência, o emagrecimento acentuado e acelerado. Ocorre, também, a perda de controle sobre os esfíncteres; dessa forma, em completo estado de invalidez, a morte acaba ocorrendo por uma intercorrência (Jones, 1990 ; Richardson e Adams, 1984 ; Rowland, 1986).

A evolução, como já visto anteriormente, é progressiva e em alguns casos o quadro permanece estacionário durante um período que pode chegar a dois anos, no qual as funções cognitivas se mantêm inalteradas, mas a evolução da doença prossegue, em seguida. Essa doença dura, geralmente, de 4 a 10 anos, sendo que o período de evolução pode variar entre os limites extremos de 1 a 20 anos (Rowland, 1986). O grau de atrofia cerebral é variável. À necrópsia, o peso do cérebro varia entre 850 e 1,250g (Rowland, 1986).

Muitos achados histopatológicos são descritos na doença de Alzheimer, dentre os quais podem ser nomeados a disrupção axonal, os



enovelados neurofibrilares extracelulares, a angiopatia amilóide (depósito de proteína amilóide nas paredes e artérias meníngeas e intracorticais) (Glennner, 1989), as degenerações vacuolares e os corpúsculos de Hirano (inclusões eosinofílicas, com distribuição restrita às células do hipocampo, afetando, aproximadamente, 10% dos neurônios piramidais) (Kay, 1986 ; Morris, 1991 ; Yamaguchi et al., 1991).

O exame microscópico revela, também, a diminuição tanto dos neurônios como do neurópilo da córtex, existindo, também, a desmielinização secundária da substância branca subcortical (Rowland, 1986).

Os achados macroscópicos típicos da doença de Alzheimer, mas não exclusivos, são ampla atrofia cerebral com alargamento dos sulcos e estreitamento dos giros cerebrais. Ao nível microscópico nota-se o aparecimento de placas senis, os enovelados neurofibrilares e os fios neuropílicos (Braak et al., 1986 ; Braak e Braak, 1988 ; Perry, 1986).

As placas senis são formadas por terminações de axônios degenerados, desmielinizados, que se impregnam com prata. Esses axônios mostram volume aumentado e estão dispostos em torno de um núcleo central, formado por proteína amilóide com depósito de silicato de alumínio (Hyman et al., 1989 ; Jones, 1990 ; McGeer et al., 1990 ; Okamoto et al., 1983 ; Morris et al., ; Tabaton et al., 1989). Geralmente são encontrados em todo o córtex cerebral e na região do hipocampo. Foi comprovada a relação direta entre o número de placas por campo microscópico e o grau de comprometimento mental (Rowland, 1986).

Os enovelados neurofibrilares resultam do acúmulo de filamentos helicoidais originados de degenerações axoniais (que incluem, ainda, lisossomos e mitocôndrios degenerados), no interior de neurônios (Rowland, 1986). A composição desses novelos ainda é muito discutida, embora

se saiba da existência de um acúmulo de proteínas que se impregnam pela prata, insolúveis, mesmo quando em solução ácida, e resistentes à digestão por enzimas proteolíticas. Ao microscópio esses enovelados mostram aspecto de chama de vela (Wischik e Crowter, 1986). Os novelos de neurofibrilas aparecem primeiro no hipocampo (principalmente no subículo e CA1) podendo, posteriormente, serem encontrados em todo o córtex cerebral (Rowland, 1986).

Os fios neuropílicos, geralmente, são dendritos de neurônios que possuem enovelados neurofibrilares interiormente, muito embora, haja raros casos de localização axonal (Yamaguchi et al., 1990 ; Braak e Braak, 1988). A distribuição destes, se dá no neurópilo de todo o córtex e com maior concentração na camada V.

A perda de peso é generalizada no cérebro, mas algumas áreas são afetadas de maneira mais intensa, como por exemplo, o lobo frontal e temporal, o núcleo caudado, o putâmem, o hipocampo e a amígdala (Hyman et al., 1989).

São relativamente poucas as alterações encontradas ao exame bioquímico dos tecidos cerebrais em pacientes falecidos com a doença de Alzheimer, quando comparados com indivíduos normais de idades correspondentes. A anomalia mais frequente e mais exaustivamente estudada, é a diminuição de acetilcolina, causada por uma deficiência da atividade da acetiltransferase de colina que varia de 40 a 90% e em torno de 48% para a acetilcolinesterase, que são, respectivamente, enzimas de síntese e degradação (Jones, 1990 ; Katzman, 1986).

Esse fato parece sugerir a destruição seletiva de neurônios colinérgicos (onde essas enzimas estão presentes), em especial, da via de projeção colinérgica procedente dos núcleos profundos localizados no

septo, nas mediações de faixa diagonal de Broca que demanda o hipocampo, assim como no núcleo basal de Meynert, o qual se dirige ao córtex cerebral. A especificidade desta destruição de neurônios parece ser confirmada, principalmente, pelo grau de deficiência cognitiva ser, aproximadamente, proporcional à diminuição da acetiltransferase de colina (Rowland, 1986).

De todas as alterações, quer sejam elas anátomo-patológicas, quer sejam bioquímicas, tem-se uma correlação exata dos acontecimentos. De fato, como já é sabido, o hipocampo possui papel central na função da memória, principalmente, da memória recente. Sendo essa uma das regiões mais afetadas, não é surpresa a perda da memória em pacientes acometidos por esta moléstia. A amígdala também está intensamente lesada nesses pacientes. Tendo essa região função fundamental na regulação do comportamento emocional está, pois, explicada a ocorrência de distúrbios do humor e do temperamento emotivo desses pacientes. Finalmente, sabe-se que as características clínicas observadas são condizentes com a anatomia patológica da doença (Jones, 1990).

O diagnóstico da doença baseia-se na instalação de demência progressiva, desacompanhada de alterações motoras, pelo menos na fase inicial, assim como na exclusão de outras doenças capazes de provocar demência (Rowland, 1986), como, por exemplo, a doença de Pick, hidrocefalia de baixa pressão, traumatismo, demência por múltiplos infartos, doença de Parkinson com demência, coreia de Huntington, doença de Creutzfeld-Jakob, além de outras, que, por fatores diversos, também podem conduzir a quadros demenciais (hipotireoidismo, encefalites, tumor cerebral, depressão endógena, doença de Cushing, intoxicação e deficiências nutricionais) (McGeer, 1986 ; Richardson e Adams, 1984).

Para o diagnóstico diferencial é de grande valia a utilização de testes laboratoriais como o hemograma, velocidade de hemossedimentação, teste sorológico para sífilis, testes endocrinológicos, eletroencefalograma e pesquisa do líquido céfalo-raquidiano. Atualmente, os métodos de imagem, como por exemplo, a tomografia computadorizada, são fundamentais para aumentar a probabilidade de correção do diagnóstico (McGeer, 1986; Hyman et al., 1989; Jones, 1990; Rowland, 1986), uma vez que ele é de exclusão. O diagnóstico definitivo, só será obtido com a biópsia do cérebro, o que é feito post mortem (Besson et al., 1983; Khachaturian, 1985; Katzman, 1986; Glenner, 1988; Hyman et al. 1987 e Jones, 1990)

A etiologia da doença de Alzheimer permanece indefinida até hoje, e muitas teorias são levantadas com bases nas observações das alterações metabólicas presentes nessa doença que afeta os seres humanos de maneira sistêmica, não sendo, portanto, um tipo de envelhecimento precoce (Kay, 1986).

A presença de silicato de alumínio nos envelados neurofibrilares e nas placas senis chamou a atenção para a importância do alumínio na doença de Alzheimer (Candy et al., 1986). A hipótese de ser esse metal um causador da doença encontrou apoio no fato de os depósitos de alumínio se concentrarem principalmente no centro das placas senis. Porém, quando se faz uma analogia entre a encefalopatia por diálise, doença cuja etiologia é o depósito de alumínio no sistema nervoso central, e a doença de Alzheimer, nota-se que os sintomas dessas duas doenças são muito diferentes, não havendo na encefalopatia por diálise, as lesões características da doença de Alzheimer (Alfrey et al., 1976; Crapper et al., 1989; Scholtz, 1987). Isso causou uma certa dúvida sobre o envol-

vimento do alumínio como agente etiológico da doença de Alzheimer. Os dados que relacionaram a incidência dessa doença em cidades com diferentes concentrações de alumínio na água também foram contraditórios (Corrigan et al., 1989 ; Curran e Hindmarch, 1989 ; Rifat et al., 1990).

Há, trabalhos mencionando uma relação entre traumatismo cerebral e a doença de Alzheimer, pois foi encontrada uma incidência até quatro vezes maior da doença em indivíduos que haviam sofrido traumatismo craniano (Graves et al., 1990).

A hipótese colinérgica, já citada anteriormente, não encontra bases sólidas. Por não haver tratamento com utilização de precursores da acetilcolina, nem com inibidores da acetilcolinesterase, imagina-se ser o déficit colinérgico secundário à morte celular (Perry, 1986 ; Nitri-  
ni, 1991).

A hipótese de que a doença de Alzheimer seria consequência de alterações provocadas por radicais livres é bastante substancial, já que o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, trazem grandes danos às células, aumentando inclusive o número de trocas entre cromátides irmãs, e, ainda, contribuindo para o aumento de doenças mieloproliferativas (Hajimohammadreza e Brammer, 1990 ; Hallwell, 1989 ; Percy et al., 1990 ; Zemlan et al., 1989)

A perda da homeostase celular do cálcio, alterações do pH e desorganização do citoesqueleto são ocorrências presentes na doença de Alzheimer. Isso deve ocorrer por uma perda das capacidades mitocondriais, uma vez que essas organelas têm papel relevante na organização do citoesqueleto, muito provavelmente, por regulação do pH e da concentração citoplasmática de cálcio. Pode-se pensar, então, ser essa alteração fundamental na patogenia da doença de Alzheimer (Freitas, 1992).

É conhecida a forma familiar da doença de Alzheimer, que possui etiologia e padrão de herança autossômico dominante, representando 35% dos casos (Kay, 1986), sendo os restantes creditados a uma etiologia multifatorial (Fitch et al., 1988 ; Kay, 1987 ; Kumar et al., 1991 ; Martin et al., 1991 ; Selkoe, 1987 ; Tanzi et al., 1989).

A associação da síndrome de Down com a doença de Alzheimer vem sendo discutida há muitos anos, não só pela coincidência de algumas características nas duas doenças mas, também, por se saber que há uma prevalência de 37,5% da doença de Alzheimer entre os pacientes com síndrome de Down e idades entre 30 e 40 anos (Allsop et al., 1986 ; Wisniewski et al., 1985). Além das características citadas anteriormente, pode-se mencionar, também, a deficiência colinérgica e serotoninérgica (Mann et al., 1980 ; Reynolds e Godrige, 1985 ; Yates et al., 1986 ; Yates et al., 1980), a tendência a doenças mieloproliferativas, o aumento do número de trocas entre cromátides irmãs e a probabilidade aumentada de filhos com aneuploidias, como características pertinentes às duas moléstias (Kay, 1986)

Essa relação se estreita ainda mais, com a análise dos dados de um trabalho publicado por Wisniewsky et al. (1985), a respeito de 100 necrópsias do cérebro de pacientes com síndrome de Down com o encontro de 15% de pacientes com lesões características da doença de Alzheimer entre os mortos com 11 a 20 anos de idade. Entre os falecidos com idades entre 21 e 30 anos, as lesões ocorreram em 27,5%. Finalmente, em pacientes com mais de 30 anos, essas lesões estavam presentes em 100% deles.

Não há evidências, ainda, sobre a localização do gene envolvido na doença de Alzheimer tipo familiar no cromossomo 21 (Goate et al., 1989 ; Martin, 1989 ; Schellenberg et al., 1988 ; George-Hyslop St et al., 1987). No entanto, há indícios de que o gene que sintetiza uma proteína precursora da beta-proteína, presente nas placas senis, está localizado no cromossomo 21, o que também explicaria somente parte da doença. Ele não explica, evidentemente, as alterações metabólicas observadas na síndrome de Down e na doença de Alzheimer.

## II- OBJETIVOS

A revisão da literatura nas páginas anteriores deixou claro que o nível de AC eritrocitária se encontra alterado em muitas enfermidades, estando aumentado no caso específico da síndrome de Down (Wehinger, 1973 ; Ramalho, 1978 ; Norato, 1987). Visto que a síndrome de Down aparenta estreita relação com a doença de Alzheimer (Sinet, 1982 ; Allsop et al., 1986 ; Wisniewski et al., 1985 ; Kay, 1986) julgamos ser imprescindível investigar a atividade e a concentração da AC eritrocitária em pacientes cujo quadro clínico era altamente sugestivo dessa última doença, a fim de pôr à prova a hipótese de que a síndrome de Down e a doença de Alzheimer encontram padrão similar quanto à AC eritrocitária.



### III- CASUÍSTICA e MÉTODOS

#### III.1 Casuística

A casuística estudada consistiu de 10 pacientes (6 mulheres e 4 homens) portadores de quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer, com idades variando entre 56 e 78 anos, sendo que 4 (2 homens e 2 mulheres) foram atendidos e diagnosticados no ambulatório do Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Os outros 6 pacientes, procederam do ambulatório do Instituto do Cérebro "Dr. Nubor Orlando Facure".

O grupo controle, foi composto por 10 voluntários sadios, com idade variando entre 56 a 75 anos, sendo 6 mulheres e 4 homens, provenientes do "Lar dos Velhinhos de Campinas".

#### III.2 Metodologia

##### a. Obtenção das amostras de sangue

Procedeu-se a coleta de sangue com seringas e agulhas descartáveis, por punção venosa, utilizando-se heparina sódica (Liquemine, Roche) como anticoagulante, na razão de 0,01 a 0,02 ml/ml de sangue.

No caso dos pacientes diagnosticados no ambulatório do Departamento de Neurologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP a coleta de sangue foi feita nos domicílios desses pacientes.

O volume de sangue coletado, em cada caso, foi de cerca de 10 ml, separando-se uma alíquota de 1,0 ml para a dosagem da hemoglobina total. O restante foi centrifugado a 1.800 r.p.m., durante 10 min., sendo obtido desta forma o plasma, que foi estocado a  $-20^{\circ}$  C para posterior dosagem de zinco plasmático.

O concentrado de hemácias foi lavado 3 vezes consecutivas em solução salina a 0,9% , separando-se, após a última centrifugação (1.800 r.p.m./10 min), 2 alíquotas de 1,0 ml cada, que foram estocadas a  $-20^{\circ}$  C, para posterior extração da fração protéica correspondente à anidrase carbônica. Ao restante do concentrado de hemácias adicionaram-se 3 volumes de água destilada para hemólise, seguindo-se a separação do estroma pela adição de igual volume de clorofórmio, agitação vigorosa da mistura e centrifugação a 6.000 r.p.m. durante 10 min.

O sobrenadante destinado à determinação da atividade da anidrase carbônica foi, então, diluído na razão 1/10 (v/v) em água destilada, obtendo-se, portanto, um hemolisado na diluição 1/40 (v/v).

Todos os procedimentos que se seguiram à coleta, foram realizados à temperatura de  $4^{\circ}$  C, incluindo o transporte.

## b. 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 realizada pela determinação da absorvância em 546 nm do hemolisado diluído 500 vezes em água destilada.

Para o cálculo da concentração da hemoglobina, utilizou-se o coeficiente de extinção milimolar da hemoglobina que, nesse comprimento de onda, é de 13,8.

## c. Determinação da atividade da anidrase carbônica eritrocitária

A técnica utilizada foi descrita originalmente por Tashian (1967) e modificada por Norato (1987), pela utilização de acetato de alfa-naftila ao invés de acetato de beta-naftila como substrato da enzima.

Em dois tubos de hemólise 75 x 11 mm, foram pipetados, com pipeta automática, 0,05 ml do hemolisado 1/40 (v/v) em água destilada, ao qual se acrescentou 1,0 ml de alfa-naftila a 1,7 mM em tampão fosfato 0,02 M pH 7,0 contendo dioxana a 2%.

A um dos tubos foi adicionado, antes do substrato, 1,0 ml de acetazolamida a 8 mM em uma solução diluída de NaOH, seguindo-se a incubação em banho-maria durante 20 min. a 37° C. Ao outro tubo a acetazolamida foi adicionada após o período de incubação. Ao final foi acrescentado, a ambos os tubos, 0,5 ml de 5-cloro-o-toluidina (Fast Red-IRsalt) a 2 mg/ml em uma solução de lauril-sulfato de sódio a 1,2%.

Após aguardar 15 min. para o completo desenvolvimento da cor a absorvância foi medida em 555 nm contra tubos brancos contendo água destilada em lugar da enzima e seguindo os mesmos procedimentos acima.

Durante o ensaio o pH da mistura de reação foi mantido entre 7,0 e 7,2, pois valores de pH superiores a esses determinam hidrólise espontânea e significativa do acetato de alfa-naftila (Mestriner, 1970).

A atividade da anidrase carbônica correspondeu à diferença A.555 tubo 2 - A.555 tubo 1, sendo o tubo 1 aquele que recebeu o inibidor no início da reação e o tubo 2 o que recebeu acetazolamida após transcorridos os 20 min. de incubação a 37° C.

A atividade específica foi calculada em relação à quantidade de hemoglobina presente no hemolisado e expressa em U/mgHb, onde U significa u moles de alfa-naftol/ min./ ml do hemolisado.

#### d. Quantificação protéica da anidrase carbônica eritrocitária

##### d.1 Extração da enzima

Para a obtenção de uma solução de anidrase carbônica eritrocitária parcialmente purificada foi utilizada a técnica da extração pelo etanol-clorofórmio de Tashian e Carter (1976).

Foi realizada hemólise de 0,5 ml do concentrado de hemácias lavadas (que foram previamente separados em alíquotas de 1,0 ml, e conservados a -20° C) em 3 volumes de água destilada gelada (4° C). Em seguida, 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 min. Após repouso de 30 min. centrifugou-se o

material em centrífuga refrigerada a 4<sup>o</sup> C, durante 30 min. a 6.000 r.p.m.

O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro, o qual serviu para a realização da eletroforese da anidrase carbônica e a dosagem do conteúdo protéico desse material.

#### d.2 Dosagem da concentração de proteína

A dosagem de proteína da solução de anidrase carbônica, foi feita pelo método da reação do biureto (Allan, 1948 ; Layne, 1957).

Acrescentou-se 0,5 ml da solução de anidrase carbônica parcialmente purificada a 2 ml de solução de biureto. Após repouso durante 30 min. à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância da solução em 546 nm. O cálculo da concentração de proteína, em cada amostra, foi realizado pela comparação dos valores de absorvância obtidos com aqueles de uma curva padrão preparada com solução de albumina bovina.

Com os dados da concentração de proteína da solução e o volume total obtido na purificação de 0,5 ml de concentrado de hemácias, calculou-se a concentração de anidrase carbônica por ml de concentrado de hemácias pela fórmula:

$$\text{mg/ml de hemácias} = \frac{2 \times \text{mg/ml da solução} \times \text{vol. da solução ml}}{\text{Vol. do conc. de hemácias ml}}$$

### d.3 Eletroforese da anidrase carbônica

A eletroforese para determinação das concentrações das isozimas da anidrase carbônica eritrocitária foi realizada em fitas de acetato de celulose, tampão tris glicina pH 8,6 sob 180 Volts, durante 60 min.

Ao término da eletroforese realizou-se a coloração e fixação das fitas em Ponceau S, a 0,5% em ácido tricloroacético, durante 1,5 min. A seguir, foi realizada a descoloração do fundo pela imersão das fitas em ácido acético a 5%, em três cubas distintas, na primeira durante 10 min., na segunda durante 1 hora e na terceira durante 24 horas (Ruiz-Reyes e Ramirez-Zorrilla, 1968 ; Tashian e Carter, 1976).

Após a fixação procedeu-se à diafanização das fitas de acetato de celulose pela sua desidratação em metanol durante 1 minuto, seguida de imersão durante 1 minuto em uma solução constituída de 85 ml de metanol, 13 ml de ácido acético e 2 ml de glicerina. As fitas foram, então, montadas em lâminas e incubadas em estufa a 60° C, durante aproximadamente 5 minutos.

A densitometria das fitas diafanizadas fornece um gráfico que apresenta 3 picos correspondentes às isozimas CAII, CAI e CAI(1), a partir do qual se pode calcular, o percentual de cada isozima. Assim, conhecendo-se a concentração total de proteína presente na solução utilizada para a eletroforese, pôde-se estimar a concentração de cada isozima, sendo os resultados expressos em miligrama de proteína por mililitro de concentrado de hemácias (mg/ml).

#### **d.4 Dosagem do zinco plasmático**

O zinco plasmático foi dosado de acordo com o método proposto por Kaplan (1990), para a dosagem em espectrofotômetro de absorção atômica com chama. A amostra de plasma, cerca de 1 ml, foi diluída na proporção de 1:5 em água desionizada, a leitura foi realizada no espectrofotômetro Zeiss, modelo FMD-4. A concentração de zinco, em cada amostra, expressa em ug/dl de plasma, foi calculada pela comparação da amostra com aquela fornecida por uma curva padrão. Para evitar contaminação pelo zinco, todo o material de vidro utilizado foi previamente lavado com ácido nítrico.

#### **d.5 análise estatística**

A comparação das médias das variáveis quantitativas no grupo de pacientes e no grupo controle, foi realizada pelo teste  $t$  de Student e a associação entre as variáveis por meio do cálculo do coeficiente de correlação simples.

#### IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores das variáveis investigadas nos pacientes com quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer, estão relacionados nas tabelas III e IV, enquanto que os valores das variáveis estudadas no grupo controle, estão relacionadas nas tabelas V e VI.

Tabela III Concentração e atividade da AC eritrocitária em pacientes com quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer.

PACIENTES	IDADE	SEXO	CONCENTRAÇÃO (mg/ml de hemácias)				ATIVIDADE (U/mgHb)
			CAII	CAI	CA I <sub>1</sub>	CA <sub>total</sub>	
M.K.P.	76a	F	0,3845	2,7339	0,4092	3,5276	0,1299
L.B.S.	75a	F	0,1781	1,5613	0,1470	1,8856	0,1377
O.F.	63a	M	0,1512	1,3145	0,1216	1,5876	0,1454
B.P.	66a	M	0,2192	1,5392	0,1274	1,8856	0,4012
M.D.V.	78a	F	0,2052	1,2447	0,1381	1,5876	0,1576
M.A.L.	67a	F	0,2010	1,6237	0,1607	1,9850	0,1308
N.O.H.	60a	M	0,1191	1,0958	0,1231	1,3386	0,1168
N.C.	56a	F	0,0980	0,8982	0,0940	1,0900	0,1932
M.A.S.B.	57a	F	0,1242	0,8927	0,0730	1,0900	0,1227
P.R.	75a	M	0,2090	1,4400	0,1381	1,7866	0,1554



Tabela IV Dosagens de Hb total e Zn plasmático em pacientes com quadro clínico da doença de Alzheimer.

PACIENTES	Hb (g/dl)	ZINCO (ug/dl)
M.K.P.	9,6232	96
L.B.S.	11,4203	192
O.F.	15,4783	246
B.P.	13,2174	120
M.D.V.	9,5652	192
M.A.L.	15,0725	120
N.D.H.	15,3623	138
N.C.	13,2174	168
M.A.S.B.	10,6087	126
P.R.	14,0290	120

Tabela V Concentração e atividade AC eritrocitária no grupo controle.

PACIENTES	IDADE	SEXO	CONCENTRAÇÃO (mg/ml de hemácias)				ATIVIDADE (U/mgHb)
			CA II	CA I	CA II	CA <sub>total</sub>	
N.D.	74a	F	0,1673	1,7057	0,1117	1,9850	0,2750
M.G.C.	74a	F	0,3415	2,0775	0,1626	2,5820	0,3035
A.G.S.	66a	M	0,3237	2,1327	0,1752	2,6320	0,1185
G.D.G.	69a	M	0,1549	0,8767	0,1074	1,1396	0,2100
F.R.	75a	F	0,1476	0,9999	0,1904	1,3386	0,2552
N.G.	66a	F	0,1016	0,9163	0,0722	1,0900	0,1558
J.F.S.	56a	M	0,2000	1,3248	0,1619	1,6870	0,2105
J.M.A.	58a	F	0,1417	1,3361	0,1095	1,5876	0,3140
M.H.F.	61a	F	0,1537	1,2172	0,1229	1,4800	0,2571
P.M.	70a	M	0,2754	1,9660	0,1413	2,3830	0,2363

Tabela VI Dosagens de Hb total e Zn plasmático no grupo controle.

CONTROLES	Hb (g/dl)	ZINCO (ug/dl)
N.D.	12,2899	96
M.G.C.	21,6812	126
A.G.S.	17,2174	120
G.D.G.	11,8841	84
F.R.	11,1884	96
N.G.	21,2174	156
J.F.S.	24,5048	78
J.M.A.	14,2609	168
M.H.F.	13,6232	246
P.H.	20,2319	114

Na tabela VII encontram-se relacionados os maiores e os menores valores das variáveis estudadas.

Tabela VII Valores mínimos e máximos  
das variáveis estudadas.

Variáveis	Grupo	Controle	Pacientes
1. Idade	56	- 75	56 - 78
2. Hb (g/dl)	11,1884	- 24,5048	9,5652 - 15,4783
3. Zn (ug/dl)	78,0000	- 246,0000	96,0000 - 246,0000
4. Atividade específica	0,1185	- 0,3140	0,1168 - 0,4012
5. [ ] CAII	0,1016	- 0,3415	0,0980 - 0,3845
6. [ ] CAI	0,8767	- 2,1327	0,8927 - 2,7339
7. [ ] CAI <sub>1</sub>	0,0722	- 0,1904	0,0730 - 0,4092
8. [ ] CA <sub>total</sub>	1,090	- 2,6320	1,0900 - 3,5276

Na tabela VIII estão relacionados os coeficientes de correlação entre a atividade específica e as demais variáveis analisadas, demonstrando não haver correlação significativa entre a primeira e as demais, tanto no grupo controle quanto no grupo de pacientes com quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer.

Tabela VIII. Correlação entre atividade específica e demais variáveis estudadas. Entre parênteses constam as funções que fornecem o maior valor do coeficiente de correlação.

---

	GRUPO CONTROLE	PACIENTES
	Atividade específica	
Variáveis		
1. idade	0,1322 (Exp)	-0,0656 (Lin)
2. Hb(g/dl)	-0,2730 (Pot)	0,0944 (Log)
3. Zn(ug/dl)	0,1678 (Lin)	-0,1471 (Lin)
5. CAII	-0,1441 (Exp)	0,1242 (Log)
6. CAI	0,1023 (Log)	0,0484 (Log)
7. CAII	0,0828 (Log)	-0,1797 (Exp)
8. CA <sub>total</sub>	0,0924 (Log)	-0,0498 (Exp)

---

Na tabela IX está relacionada a comparação das médias da variável atividade específica, entre o grupo controle e o grupo dos pacientes com quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer, obtida pela aplicação do teste  $t$  de Student.

Tabela IX Comparação das médias da atividade específica.

---

Atividade específica (U/mgHb)	Média	Desvio padrão	n
Grupo controle	0,2336	0,0619	10
Pacientes	0,1691	0,0845	10

---

$t = 1,9484$  ; G.L. = 18 ;  $p = 0,0672$

A comparação das médias da variável concentração das isozimas da AC eritrocitárias estão, por sua vez, relacionadas na tabela X.

Tabela X Comparação das médias da concentração das isozimas da AC eritrocitária.

	Grupo controle		Pacientes		
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
CAII	0,2007	0,0831	0,1890	0,0809	t = 0,3216 p = 0,7514
CAI	1,4553	0,4819	1,4348	0,5269	t = 0,0909 p = 0,9286
CAI <sub>1</sub>	0,1355	0,0369	0,1532	0,0934	t = 0,5574 p = 0,5842

A análise dos dados obtidos mostraram que o padrão da AC eritrocitária dos pacientes com quadro clínico sugestivo da doença de Alzheimer não difere significativamente daquele dos indivíduos normais de mesma idade e raça, diferindo, porém, do padrão demonstrado por aqueles indivíduos portadores da síndrome de Down, uma vez que esses pacientes têm um aumento significativo da concentração eritrocitária da isozima CAI. Esse achado sugere que, caso a AC tenha um papel na fisiopatogenia dessas duas enfermidades, ele não é idêntico em ambas.

## V- RESUMO

A anidrase carbônica (AC) (EC 4.2.1.1) é uma metaloenzima que contém um átomo de zinco. Sua função de maior importância é a hidratação do dióxido de carbono e a desidratação do ácido carbônico, sendo o seu substrato natural o dióxido de carbono. Na espécie humana foram reconhecidas, até o presente, sete isozimas da anidrase carbônica, as quais diferem entre si quanto à estrutura molecular e as propriedades cinéticas, especificidade pelo substrato, padrões de inibição, de eficiência catalítica, além da distribuição tecidual. A mais alta concentração da anidrase carbônica é encontrada nos eritrócitos, nos quais se reconhecem três isozimas (CAI, CAII e CAIII).

Sabe-se, atualmente, que algumas doenças estão associadas a variações quantitativas e/ou qualitativas das isozimas eritrocitárias da anidrase carbônica. Visto que as pessoas com trissomia do cromossomo 21 (síndrome de Down) mostram aumento significativo da quantidade da CAI eritrocitária, passou a ser de crucial importância investigar se ocorreria fenômeno idêntico nos pacientes com a doença de Alzheimer, pois é notória a coincidência de alguns sinais nessas duas enfermidades, tais como a degeneração granulovacuolar de neurônios, placas senis, envoltórios neurofibrilares, calcificações cerebrais e alterações do metabolismo dos peróxidos.

A atividade total da anidrase carbônica eritrocitária e as concentrações de suas isozimas e do zinco plasmático foram investigadas em 10 pacientes com diagnóstico clínico confinante à certeza de doença de Alzheimer e em 10 indivíduos sadios, que se assemelhavam aos pacientes quanto à idade, sexo e raça (grupo controle). A determinação da



atividade total da anidrase carbônica baseou-se na sua inibição por acetazolamida, usando o acetato de alfa-naftila como substrato. As concentrações das isozimas foram determinadas por densitometria, após eletroforese, em fitas de acetato de celulose, das soluções parcialmente purificadas. A concentração de zinco plasmático foi obtida por intermédio de espectrofotômetro de absorção atômica com chama.

A atividade total da anidrase carbônica dos pacientes não diferiu da observada no grupo controle. Esses dois grupos também não diferiram quanto à distribuição das isozimas eritrocitárias e a concentração de zinco plasmático. Tais resultados conduzem à seguinte conclusão: o padrão da anidrase carbônica eritrocitária dos pacientes com quadro clínico sugestivo de doença de Alzheimer é diferente daquele encontrado em indivíduos com síndrome de Down, mas não difere daquele apresentado por pessoas normais.

## VI- SUMMARY

Carbonic anhydrase (CA) (EC 4.2.1.1) is a zinc-containing metalloenzyme, with central function is the hydration of carbon dioxide and the dehydration of carbonic acid, and its natural substrate is carbon dioxide. So far, in human species only seven isozymes of carbonic anhydrase have been identified, which differ from each other concerning their molecular structure, kinetic properties, specificity from substrate, inhibition sensitivity and catalytic in addition to tissue distribution. The highest concentration of carbonic anhydrase is founded in erythrocytes, in which three isozymes (CAI, CAII and CAIII) are recognized.

As is well known, some diseases are associated to quantitative or qualitative variations of carbonic anhydrases erythrocytes isozymes.

Concerning that people with Down's syndrome (chromosome 21 trisomy) show significant increase of erythrocyte CAI, it seemed extremely important to investigate if the same occurs in patients with Alzheimer's disease, since there is a prominent coincidence in some of the signs of the two diseases, such as granulovacuolar degeneration of neurons, senile plaques, neurofibrillary tangles, cerebellary calcifications and alterations of peroxide metabolism.

The whole activity of erythrocytic carbonic anhydrase and its isozymes and plasmatic zinc concentrations were investigated in 10 diseased with clinical diagnostic suggesting Alzheimer's disease and 10 healthy people, with similar characteristics of the diseased as for age, sex and race (control group). The determination of the whole activity of carbonic anhydrase was based on its inhibition by acetazolamide, using

alpha-naphtyl acetate as substrate. Concentration of isozymes was determined by densitometry, after electrophoresis in cellulose acetate membrane of partially purified solutions. Concentration of plasmatic zinc was measured by atomic absorption spectrophotometry (with flame).

Carbonic anhydrase total activity was similar in diseased group and the control group, as well as both groups did not differed concerning the distribution of erythrocytic isozymes and plasmatic zinc. These results conduct to the follow conclusion: the role of erythrocytic carbonic anhydrase of the people with clinical diagnostic suggesting Alzheimer's disease is different to that the found in people with Down's syndrome.

**VII- BIBLIOGRAFIA**

1. Alfrey, A.C.; Le Gendre, G.R. e Kaechny, W.D. The encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Eng. J. Med.*, 294:184-188, 1976.
2. Aliakbar, S.; Brown, P.R. e Nicolaidis, K.H. Localization of CAI and CAII isozymes in normal term human placenta by immunofluorescence techniques. *Placenta*, II:35-39, 1990.
3. Allsop, D.; Kidd, M.; Landon, M. e Tomlinson, A. Isolated senile plaque cores in Alzheimers disease and Downs syndrome show diferences in morphology. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 49:886-896, 1986.
4. Bavles, K.A. Age at onset of Alzheimers disease relation to language disfunction. *Arch. Neurol.*, 48:155-159, 1991.
5. Beiguelman, B. O teste t para a comparação das médias. In: \_\_\_\_\_. *Curso Prático de Bioestatística*. 2ª ed., Ribeirão Preto, Revista Brasileira de Genética, 1991. p. 135-152.
6. Berfenstam, R. Studies on carbonic anydrase activity in children. *Acta Paediatrica*, 41:32-52, 1952.
7. Besson, J.A.O.; Corrigan, F.M.; Foreman, E.; Ascroft, G.W. e Eastwood, L.M. Differenting senile dementia of Alzheimer type and multi infarting dementia by proton NMR imaging. *Lancet*, :189- , Oct. 1983.
8. Bidani, A. e Grandall, E.D. Velocity of CO<sub>2</sub> exchanges in the lungs. *Ann. Rev. Physiol.*, 50:639-652, 1988.
9. Blass, J.P. , Baker, A.C.; Ko, L.; Shew, R.K. e Black, R.S. Expression of Alzheimer antigens in cultured skin fibroblasts. *Arch Neurol.* 48:709-717, 1991.

10. Bourke, E.; Debney, J.B.; Mosawi, M.; Reavey, P. e Weston, M. Renal tubular acidosis and osteopetrosis in siblings. *Nephron*, 28:268-272, 1981.
11. Bouthier, M.; Oriol, C. e Reynold, J. Comparative study of the optical rotatory dispersion and circular dichroism of human erythrocyte carbonic anhydrases. *Biochimie*, 55:37-40, 1973
12. Braak, H.; Braak, E. e Grundke-Iqbal, I. Ocurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, 65:351-355, 1986.
13. Braak, H. e Braak, E. Neuropil threads dendrites of tangle bearing nerve cells. *Neuropathol. Applied Neurol.*, 14:39-44, 1988
14. Cammer, W. Carbonic anhydrase in myelin and glial cells in the mammalian central nervous system. In: ----- . *The carbonic anhydrase cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publish. Corp., 1991. p. 325-331
15. Candy, J.M.; Klinawski, J.; Perry, R.H. < Perry, E.K. e Fairbairn, A. Aluminisilicates and senile plaque formation in Alzheimers disease. *Lancet*, :354-357, Feb. 1986.
16. Cao, H. e Gay, C.V. Effects of parathyroid hormone and calcitonin on carbonic anhydrase location in osteoclasts of cultured embrryonic chick. *Experientia*, 41:1472-1474, 1985.
17. Carter, M.J. Carbonic anhydrase: Isoenzymes, properties, distribution and functional significance. *Biol. Rev.*, 47:465-513, 1972.

18. Carter, N.D. Hormonal and neuronal control of carbonic anhydrase III gene expression in the skeletal muscle. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E. Gros, G. e Carter, N.D. The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publish. Corp., 1991. p. 249-262.
19. Carter, N.D.; Fryer, A.; Grant, A.G.; Hume, R. e Strange, R.G. Membrane specific carbonic anhydrase (CAIV) expression in human tissues. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1026:113-116, 1990.
20. Cochat, P.; Loras-Duclaux, I. e Guibaud, P. Deficit en anhydrase carbonique II: Osteopetrose, acidose renale tubulaire et calcification intracranienem. *Pediatric*, 42:121-128, 1987.
21. Conley, L.C.; Weatheral, D.J.; Richardson, S.N.; Shepard, M.K. e Charache, S. Hereditary persistence of fetal hemoglobin: A study of 79 affected persons in 15 negro families in Baltimore. *Blood*, 21:261-281, 1963.
22. Corrigan, F.M.; Reynolds, G.P. e Ward, N.I. Letter. *Lancet*, :268-269, feb 1989.
23. Coulson, R.A. e Herbert, J.D. A role for carbonic anhydrase in intermediary metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:505-515, 1984.
24. Curran, S. e Hindmarch, I. Letter. *Lancet*, :269, feb 1989.
25. Davenport, H.W. Secreção gástrica. In:\_\_\_\_\_ Fisiologia do trato digestivo. 3<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1978. p. 94-120.
26. \_\_\_\_\_ Secreção pancreática. In: \_\_\_\_\_ Fisiologia do trato digestivo. 3<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1978. p. 120-131.

27. \_\_\_\_\_ . Carbonic anhydrase in tissues other than blood. *Physiological Reviews*, 26:560-573, 1946.
28. Davenport, H.W. e Wilhelmi, A.E. Renal carbonic anhydrase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 48:53-56, 1941.
29. Davis, M.B.; West, L.F.; Barlow, J.H.; Buttherworth, P.H.W. e Lloyd, J.C. Regional localization of carbonic anhydrase genes CA1 and CA3 on human chromosome 8. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 13:173-178, 1987.
30. Davis, R.P. Carbonic Anhydrases. In: *The enzymes* 2<sup>a</sup>. ed. New York, Academic Press N.Y., 1961, p. 545-562.
31. Dodgson, S.J. The carbonic anhydrase in the kidney. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 345-350.
32. \_\_\_\_\_ . The carbonic anhydrases: Overview of their importance in cellular physiology and in molecular genetics. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 3-15.
33. Dodgson, S.J.; Forster II, R.E.; Sly, W.S. e Tashian, R.E. Carbonic anhydrase activity of intact carbonic anhydrase II-deficient human erythrocytes. *J. Applied. Physiol.*, 65:1472-1480, 1988.
34. Dodgson, S.J.; Forster II, R.E. e Storey, B.T. The role of carbonic anhydrase in hepatocyte metabolism. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:516-524, 1984.
35. DuBose Jr, T.D. Carbonic anhydrase-dependent bicarbonate transport in the kidney. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:528-537, 1984.

36. Edwards, Y.H. Structure and expression of mammalian carbonic anhydrases. *Biochemical Society transaction*, 18:171-175, 1990.
37. Erikson, E.A. e Liljas, A. X-ray cristallographic studies of carbonic anhydrases isozymes I, II and III. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 33-47.
38. Eriksson, E.A. Structural differences between high and low activity forms of carbonic anhydrases. Sweden. 188. Tesisn, PhD, University of Upsalla - Sweden.
39. Fernley, R.T. Carbonic anhydrases secreted in the saliva. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p.. 365-373.
40. Finlwy, D. e Varshovsky, A. The ubiquitin system: function and mechanisms. *TIBS*, :343-347, 1985.
41. Fitch, N.; Becker, R. e Heller, A. The inheritance of Alzheimers disease: a new interpretation. *Ann. Neurol.*, 23:14-19, 1988.
42. Freitas, A.R. Doença de Alzheimer uma revisão bibliográfica. *Rev. Bras. de Neurol.* (no prelo).
43. Funakoshi, S. e Deutsch, F.H. Human carbonic anhydrases. *The Journal of Biological Chemistry*, 244:3438-3446, 1969.
44. Garcia-Marin, J.J.; Perez-Barriocanal, F.; Garcia, A. e Serrano, M.A. Evidence for the presence carbonic anhydrase in the plasma membrane of rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 945:17-22, 1988.



45. Geers, C. e Gros, G. Muscle carbonic anhydrases function in muscle contraction and in the homeostasis of muscle pH and CO<sub>2</sub>. In: Dodgson, S.J., Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 227-239.
46. Ghandour, M.S.; Lagley, D.K., Vincendom, G. e Gombos, G. Double labeling imunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 27:1634-1637, 1979.
47. Glenner, G.G. The pathobiology of Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Med.*, 40:45-51, 1989.
48. Goate, A.M.; Owen, M.J.; James, L.A.; Mullan, M.J.; Rossor, M.N. e Haynes, A.R. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet*, :352-355, 1989.
49. Grapper; McLachlan, D.R.; Lukiw, W.J. e Krick, T.P.A. New evidence for an active role of aluminum in Alzheimers disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 16:490-497, 1989.
50. Graves, A.B. White, E.; Koepsell, T.D.; Reifler, B.V. e Van Belle, G. The association between head trauma and Alzheimers disease. *Ann. JJ. Epidemiol.*, 131:491-501, 1990.
51. Guillaume, D.; Grisar, T. e Vergniolle, B. Glial contribution to seizure: carbonic anhydrase activity in epileptic mammalian brain. *Epilepsia*, 32:10-15, 1991.
52. Guyton, A.C. Mecânica da respiração; fluxo sanguíneo pulmonar e transporte de oxigênio e de gás carbônico. In: \_\_\_\_\_ *Fisiologia Humana*. 6<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro, Interamericana, 1985. p. 349-382.

53. Hajimahammadreza, I. e Brammer, M. Brain membrane fluidity and lipid peroxidation in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, 333:333-337, 1990.
54. Hallwell, B. Oxidants and the CNS: Is oxidant damage relevant to Parkinsons disease, Alzheimer s disease traumatic injury or stroke? *Acta Neurol. Scand.*, 126:23-33, 1989.
55. Hayer, S.; Oesterreich, K. e Wagner, O. Glucose metabolism as the site of the primary abnormality in early onset dementia of Alzheimer type. *J. Neurol.*, 235:145-148, 1988.
56. Headgins, V.E. e Tashian, R.E. Isozymes of carbonic anhydrase from primate red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 236:353-359, 1971.
57. Hunter, S.J.; Schraer, H. e Gay, C.V. *J. Bone Miner. Res.*, cf. Silverton, 1991, 3:297-303.
58. Hyman, B.T.; Damasio, H.; Damasio, A.R. e Van Hoesen, G.W. Alzheimer's disease. *Ann. Rev. Public. Health.*, 10:115-140, 1989.
59. Janini, P. e Janini Filho, P. *Interpretação clínica do hemograma*. 9ª. ed. São Paulo, Ed. Sarvier, 1978.
60. Jeffery, S.; Wilson, C.A.; Mode, A.; Gustafsson, J.A. e Carter, N.A. Effects of hypophysectomy and growth hormone infusion on rat hepatic carbonic anhydrases. *J. Endocrinol.*, 110:123-126, 1986.
61. Jones, A.W.R. Alzheimer's disease: Clinical and pathological characteristics. *Intern. J. Neuroscience*, 50:147-168, 1990.
62. Kaiser, E.T. e Kwok-Wing, Lo. The carbonic anhydrase catalyzes hydrolysis of 2-hidroxi-5-nitro-alfa-toluenosulfonic acid sulfone. *Journal of the American Chemical Society*, 91:4912-4918, 1969.

63. Kaplan, L.A.; Pesce, J.A. *Química clínica. Métodos.* Ed. Panamericana, 1990.
64. Kass, M.A. Topical carbonic anhydrase inhibitors. *American Journal of Ophthalmology*, 107:280-282, 1989.
65. Katzman, R. Alzheimer's disease. *N. Eng. J. Med.*, 314:964-971, 1986.
66. ----- Doenças degenerativas do sistema nervoso. In: Rowland, E. *Tratado de neurologia.* Rio de Janeiro, Guanabara Koogan,
67. Kay, D.W.K. The genetics of Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.*, 42:19-23, 1986.
68. ----- Heterogeneity in Alzheimer's disease: Epidemiological and family studies. *TINS*, 10:194-195, 1987.
69. Khacahaturian, Z.S. Diagnosis of Alzheimer's disease. *Arch. Neurol.*, 42:1097-1105, 1985.
70. Kischida, K.; Ochi, N.; Emi, K.; Izuka, S. e Tsuboi, SA. Effects of carbonic anhydrase inhibitors on electrical phenomenon of the ciliary body of the rabbit eye. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:580-581, 1984.
71. Kowal, N.W. e Kosic, K.S. Axonal disruption and aberrant localization of tau protein characterize the neuropil pathology of Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.*, 22:639-643, 1987.
72. Kumar, A.; Shapira, M.B.; Grody, C.L.; Matacha, M.F. e Hoxby, J.V. Anatomic, metabolism, neuropsychological and molecular genetic studies of three pairs twins discordant for Alzheimer's. *Arch. Neurol.*, 48:1670-168, 1991.
73. Kurata, Y. Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity. *Stain Technologi*, 28:231-233, 1953.

74. Landom, M. e Kidd, M. Amyloid in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.*, 17:69-72, 1989.
75. Lees, M.B.; Sapirstein, V.S.; Reiss, D.S. e Kolodny, E.H. Carbonic anhydrase and 2,3 cyclic nucleotide 3-phosphohydrolase activity in normal human brain and demyelinating disease. *Neurology*, 30:719-725, July, 1980.
76. Lester, W.P. e Juhl, H.J. *Interpretação radiológica*. 3ª. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1977.
77. Liang, J.Y. e Lipscomb, W.N. Hydration of CO<sub>2</sub> by carbonic anhydrase: Intramolecular proton transfer between Zn<sup>2+</sup> bound H<sub>2</sub>O and histidine 64. *Biochemistry*, 27:8676-8682, 1988.
78. Lie-Injo, L.E. e Tarail, R. Carbonic anhydrase deficiency with persistence of total haemoglobin: a new syndrome. *Nature*, 211:47-49, 1966.
79. Lindskog, S.; Engberg, P.; Forsman, C.; Ibrahim, A.S. e Jonsson, B.H. Kinetics and mechanism of carbonic anhydrases isoenzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 419:61-75, 1984.
80. Ling, A.E. e Leblond, C.P. Investigation of glial cells in semithin sections. *J. Comp. Neuro.*, 149:73-82, 1973.
81. Lonnerholm, G.; Selking, O. e Wistrand, P.J. Amount and distribution of carbonic anhydrases CAI and CAII in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 88:1151-1161, 1985.
82. Mann, D.M.A.; Lincoln, J. e Yates, P.O. Monoamine metabolism in Down syndrome. *Lancet*, :1366-1367, Dec 1980.
83. Maren, T.H. Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology and inhibition. *Physiological Reviews*, 47:595-765, 1967.

84. ----- The general physiology of reactions catalyzed by carbonic anhydrase and their inhibition by sulfonamides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:568-579, 1984.
85. Maren, T.H.; Rayburn, C.S. e Liddell, N.E. Inhibition by anion of human red cell carbonic anhydrase B: Physiological and biochemical implication. *Science*, 191:469-472, 1976.
86. Marie, J. e Hott, M. Histomorphometric identification of carbonic anhydrase in fetal rat bone embedded in glycolmethacrylate. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 35:245-250, 1987.
87. Markerberg, W.R. Alzheimer's disease: a mini review. *K W A Journal*, 87:333-335, 1989.
88. Martin, J.B. Molecular genetics studies in the neuropsychiatric disorders. *TINS*, 12:130-137, 1989.
89. Martin, J.J.; Ghevens, J.; Bryland, M.; Cras, P. e Vandenbergue, A. Early-onset Alzheimer's disease in two large Belgians families. *Neurology*, 41:62-68, 1991.
90. Mazusawa, T.; Hasegawa, T.; Nakahara, N.; Idda, K. e Sato, F. Localization of carbonic anhydrase in the rat choroid plexus epithelial cell. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:4005-407, 1984.
91. McGeer, P.L.; McGeer, E.; Rogers, J. e Sibley, J. Anti-inflammatory drugs and Alzheimers disease. *Lancet*, 33351037- , 1990.
92. McGeer, P.I. Brain imaging in Alzheimer's disease. *Br. Med. Bull.*, 42:24-28, 1986.
93. McKusic, V.A. Mendelian inheritance in man. Catalog of autossomal dominant, autossomal recessive, and X-linked phenotypes. 7<sup>a</sup>. ed. Londres, The Johns Hopkins University Press, 1986. 1740 p.

94. Meldrum, N.V. e Roughton, F.J.W. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *J. Physiol.*, 80:113-142, 1933.
95. Mondrup, M.; Anker, N. e Christensen, F. Carbonic anhydrase isoenzyme determination: An aid to the diagnosis of "small for date" infants. *Clinica Chimica Acta*, 100:107-112, 1980.
96. Moore, J.M. Quantitative variation of erythrocyte carbonic anhydrase levels. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:277-299, 1984.
97. Morris, J.H. Sistema nervoso. In: Cotran, R.S.; Kumer, V. e Robbins, S.L. *Robbins Patologia estrutural e funcional*. 4ª. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.
98. Nakai, H.; Byers, M.B.; Venta, P.J.; Tashian, R.E. e Shows, T.B. The gene for human carbonic anhydrase II (CA2) is located at chromosome 8q22. *Cytogenet. Cell Genet.*, 44:234-235, 1987.
99. Neubauer, J.A. Carbonic anhydrase and sensory function in the central nervous system. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrase cellular physiology and molecular genetics*. 1ª. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 319-324.
100. Nioka, S. e Forster II, R.E. Lunf carbonic anhydrase. In: Dogson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrase cellular physiology and molecular genetics*. 1ª. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991.
101. Nitrini, R. Demências. In: \_\_\_\_\_. *A neurologia que todo o médico deve saber*. 1ª. ed. São Paulo, Ed. Santos, 1991.

102. Nogradi, A. Mihaly, A. Light microscopic histochemistry of the post natal development and localization of carbonic anhydrase activity. *Histochemistry*, 94:441-447, 1990.
103. Norato, D.Y.J. A anidrase carbônica eritrocitária na síndrome de Down. Campinas. 1987. Tese, Doutorado, Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP.
104. Okamoto, K.; Hirano, A.; Yamaguchi, H. e Hirai, S. The fine structure of eosinophilic stages of Alzheimer's disease. *J. Cli. Electron Microsc.*, 16:77-82, 1983.
105. Oropeza, I.S.; Ruiz-Reyes, G.; Loria, A.; Ramirez-Zorrilla, M.J. e Lopez, M.M. Variations des iso-enzymes d'anhydrase carbonique erythrocytaire dans l'erythropoiese megaloblastica. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.*, XV:765-770, 1970.
106. Osborne, W.R.A. e Tashian, R.E. Thermal inactivation studies of normal and variant human erythrocyte carbonic anhydrase by using a sulphonamide. *Biochem. J.*, 141:219-225, 1974.
107. Parkkilla, S.; Kaunista, K.; Rajaniemi, L.; Kumpulainen, T. e Jorkinem, K. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzymes VI, II and I in human parotid and submandibular glands. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 20:941-947, 1990.
108. Percy, M.E.; Dalton, A.J.; Markovic, V.D.; Crapper McLachlam, D.R. e Hummel, J. Red cell SOD, glutathione peroxidase, and catalase in Down syndrome patients and without manifestation of Alzheimer's. *Am. J. Genet.*, 35:459-467, 1990.
109. Perry, E.K. The colinergic hypotesis-ten years on. *Br. Med. Bull.*, 42:63-69, 1986.

110. Perry, R.H. Recent advances in neuropathology. *Br. Med. Bull.*, 42:34-41, 1986.
111. Pocker, Y. e Meany, J.E. The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochemistry*, 4:2535-2541, 1965.
112. Pocker, Y. e Tamoka, N. Inhibition of carbonic anhydrase by anions in the carbon dioxide bicarbonate system. *Science*, 199:907-909, 1978.
113. Ramalho, A.S. Estudo médico de polimorfismos genéticos de importância clínica no Brasil. Campinas. 1978. Tese, Livre-Docência, Faculdade de Ciências Médica, UNICAMP.
114. Reynolds, G.P. e Godridge, H. Alzheimer - like brain monoamine deficits in adult with Down's syndrome. *Lancet*,:1369- , Dec 1985.
115. Richards, E.P. e Adams, R.D. Doenças degenerativas do sistema nervoso. In: Wilson, J.D. (editor). *Harrison: Medicina Interna*. 10ª. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1984.
116. Riehl, B. e Schulze, W.R. Localization of carbonic anhydrase in identified glial cells of the leech central nervous system. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 38:1173-1178, 1990.
117. Rifat, S.L.; Eastwood, M.R.; Crapper McLachlan, D.R. e Corey, P.N. Effect of exposure of miners to aluminum powder. *Lancet*, 336:1162-1165, 1990.
118. Roth, M. The association of clinical and neurological finding and its bearing on the classification and aetiology of Alzheimer's. *Br. Med. Bull.*, 42:42-50, 1986.
119. Ruiz-Reyes, G. Eritropoiesis megaloblastica y anhidrasas carbonicas eritrocitarias. *Gazeta Med. Mex.*, 99:345-352, 1969.



120. Ruiz-Reyes, G.; Dropezza, I.S.; Zorrila-Ramirez, M.J. e Castro, R. Utilidad clinica de las variaciones de isoenzimas de anhidrasa carbonica eritrocitaria. *Rev. Invest. Clin.*, 20:463-479, 1968.
121. Sanyal, G. Comparative carbon dioxide hydration kinetics and inhibition of carbonic anhydrase isoenzymes in vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:165-177, 1984.
122. Sanyal, G.; Ferrero, J.L. e Maren, T.H. Kinetics and inhibition of carbonic anhydrase catalyzed hydrolysis of 2-hydroxy-5-nitro- $\alpha$ -toluenosulfonic. *Biochimica et Biophysica Acta*, 744:171-179, 1983.
123. Schellenberg, G.D.; Bird, T.D.; Wysman, E.M.; Moore, D.K. e Boehnke, M. Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science*, 241:1307-1310.
124. Scholtz, C.L. Neurofibrillary neuronal degeneration in dialysis dementia: a feature of aluminium toxicity. *Clin. Neuropathol.*, 6:93-97, 1987.
125. Selkoe, D.J. Deciphering Alzheimer's disease the pace quickens. *TINS*, 10:181-184, 1987.
126. Shapira, E.; Ben-Yoseph, Y.; Eyal, G.F. e Russel, A. Enzymatically inactive red cell carbonic anhydrase B in a family with renal tubular acidosis. *The Journal of Clinical Invest.*, 53:59-63, 1974.
127. Silverton, S.F. Carbonic anhydrases and skeletogenesis. In: Dodgson, S. J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup> ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991.
128. Silverton, S.F.; Dodgson, S.J.; Fallon, D.M. e Forster II, R.E. Carbonic anhydrase activity of chick osteoclasts is increased by parathyroid hormone. *Am. J. Physiol.*, 253:670-674, 1987.

129. Sinet, P.M. Metabolism of oxygen derivatives in Down's syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 396:83-94, 1982.
130. Sly, W.S. Carbonic anhydrase II deficiency syndrome. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 183-193.
131. Sly, W.S.; Hewett-Emmett, D.; Whyte, M.P.; Yu, Y.S. e Tashian, R.E. Carbonic anhydrase II deficiency identified as the primary defect in the autossomal recessive syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:2752-2756, 1983.
132. St George-hyslop, P.H.; Tanzi, R.E.; Polinski, R.J. e Haines, J.L. The genetic causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235:885-890, 1987.
133. Stadie, W.C. e OBrien, H. The catalisys of the hidration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid by enzyme isolated from red blood cells. *Journal of Biological Chemistry*, 103:521-529, 1933.
134. Sundaram, .; Rumbolo, P.; Jeffrey, G.; Strisciuglio, P. e Sly, W.S. Carbonic anhydrase II deficiency: Diagnosis and carrier detection using differential enzyme inhibition and inactivation. *Am. J. Genet.*, 38:125-136, 1986.
135. Sutherland, G.R.; Baker, E.; Fernandez, K.E.W. e Callen, D.F. The gene for human carbonic anhydrase VI (CA6) is on the tip of the short arm of chromossome 1. *Cytogenet. Cell Genet.*, 50:149-150, 1989.

136. Swenson, E.R. Distribution and functions of carbonic anhydrase in the gastrointestinal tract. In: Dodgson, S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1<sup>a</sup>. ed. New York, Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 265-287.
137. Tabatan, M.; Mandybur, T.I.; Perry, G.; Onorato, M. e Autilio-Garibetti, L. The widespread alteration of neurites in Alzheimers diseasemay be unrelated to amyloid deposition. *Ann. Neurol.*, 26:771-778, 1989.
138. Tanzi, R.E.; George-Hyslop, P.H. e Gusella, J.F. Molecular genetic approach to Alzheimer's disease. *TINS*, 12:152-158, 1989.
139. Tashian, R.E. The carbonic anhydrases: Widening perspectives on their evolution, expression and functions. *BioEssays*, 10:186-191, 1989.
140. Tashian, R.E.; Douglas, D.P. e Yu, L.S.Y. Esterase and hydrase activity of carbonic anhydrase I from primate erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 14:256-261, 1964.
141. Tashian, R.E.; Hewett, D.E.; Dodgson, S.J.; Foster II, R.E. e Sly, S.W. The value of inhereted deficiencies of human carbonic anhydrases isozymes in understanding. Their cellular roles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 429:263-275, 1984.
142. Tashian, R.E.; Tanis, R.J. e Ferrel, R.E. Comparative aspects of the primary structures and activities of mammalian carbonic anhydrases. *Alfred Benzon Symp.* (Cf. Tashian e Carter, 1976), IV:353- ,
143. Tashian, R.E. e Nicholas, D.C. Biochemical genetics of carbonic anhydrase. *Advances in Human Genetics*, 7:1-55, 1976.

144. Tu, C.; Silverman, D.N.; Forsman, C.; Johnsson, H.B. e Lindskog, S. Role of histidine 64 in the catalytic mechanism of human carbonic anhydrase II. Studied with a site specific mutant. *Biochemistry*, 28:7913-7918, 1989.
145. Turnberg, L.A.; Foraltran, J.S.; Carter, N.W. e Rector Jr., F.C. Mechanism of bicarbonate absorption and its relation ship to sodium transport in the human jejunum. *The Journal of Clinical Investigation*, 49:548-556, 1970.
146. Vaananem, H.K. Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isoenzyme I. *Histochemistry*, 81:485-487, 1984.
147. Vaananen, K.H. e Parvinen, E.K. Localization of carbonic anhydrase isozymes in calcified tissues. In: Dodgson, S.J.; Tashian, E.R.; Gros, G. e Carter, N.D. *The carbonic anhydrases cellular physiology and molecular genetics*. 1ª. Ed. Plenum Publis. Corp., 1991. p. 351-355.
148. Verport, J.A.; Mehta, S. e Edsall, J.T. Esterase activities of human carbonic anhydrases band C. *The Journal of Biological Chemistry*, 242:4221-4229, 1967.
149. Victor, M. e Adams, R.D. Doenças metabólicas do sistema nervoso. In: Wilson, J.D. (editor). *Harrison: Medicina Interna*. 10ª. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1984.
150. Waite, L.C. Carbonic anhydrase inhibitors, parathyroid hormone and calcium metabolism. *Endocrinology*, 91:1160-1165, 1972.
151. Wallin, J.D. O rim e a urina. In: Harper, H.A.; Rodwell, V.W. e Mayes, P.A. *Manual de Química Fisiológica*. 5ª. ed. São Paulo, Atheneu Editora Ltda., 1982. p. 657-678.

152. Walze, S.; Gerald, P.S.; Brean, G.; O'Neill, D.B.S. e Diamond, L.K. Hematologic changes in the D1 trisomy syndrome. *Pediatrics*, 38:419-429, 1966.
153. Weatherall, D.J. e McIntyre, A.P. Developmental and acquired variation in erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes. *Brit. J. Haemat.*, 13:106-114, 1967.
154. Wehinger, H. Untersuchungen über die erythrocyten carboanhydrasen bei pathologischen Zuständen im Kindesalter. *Z. Kinderheilk.*, 114:163-174, 1973.
155. White, M.P.; Murphy, W.A.; Fallon, M.D.; Sly, W.S. e Teitelbaum, S.L. Osteopetrosis, renal tubular acidosis and basal ganglia calcification in three sisters. *The American Journal of Medicine*, 69:64-73, 1980.
156. Wischik, C.M. e Crouter, R.A. Subunit structure of the Alzheimer tangle. *Br. Med. Bull.*, 42:52-56, 1986.
157. Wisniewski, K.E.; Wisniewski, H.M. e Wen, G.Y. Occurrence of neuropathological change and dementia of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Ann. Neurol.*, 17:278-282, 1985.
158. Wistrand, P.J.; Lindahl, S. e Wahlstrand, T. Human renal carbonic anhydrase. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, 57:189-195, 1975.
159. Wistrand, P.J. e Knuttila, G.K. Renal membrane bound carbonic anhydrase. Purification and properties. *Kidney International*, 35:851-859, 1989.
160. Woodbury, D.M. *Antiepileptic drugs: mechanism of action*. New York, New York Raven Press (Cf. Guillaume, 1991), 1991.

161. Woodbury, D.M., Engstorm, F.L.; White, H.S.; Chen, C.F.; Kemp, J.W. e Chow, S. Ionic and acid-base regulation of neurons and glia during seizures. *Ann. Neurol.*, 16(Supl.):135-144, 1984.
162. Yamaguchi, H.; Nakazato, Y., Tawarabayashi, T.; Ishiguro, K. e Ihana, Y. Extracellular neurofibrillar tangles associated with degenerating neurites and neuropil threads in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*, 81:603-609, 1991.
163. Yates, C.M.; Simpson, J.; Maloney, A.F.J.; Gordon, A. e Reid, A.H. Alzheimer like cholinergic deficiency in Down syndrome. *Lancet*, :979- , Nov. 1980.
164. Yates, C.M.; Simpson, J. e Gordon, A. Regional brain 5-hidroxitriptóamine levels are reduced in senile Down's syndrome as in Alzheimer's disease. *Neurosci. Letters*, 65:189-192, 1986.
165. Zemlan, F.P.; Thienhaus, O.J. e Bosmanmm, B. Superoxido dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical formation. *Brain Res.*, 476:160-162, 1989.
166. Zhu, L.X. e Sly, W.S. Carbonic anhydrase IV from human lung. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:8795-8801, 1990.