

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE EM LINFÓCITOS HUMANOS

Luciana R. Costa^{1*}; Andressa K. Y. de Souza², Ana M. O. Battastini³, Fabiana F. Zanoelo⁴, Jeandre A. dos S. Jaques⁵

1. Mestre pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)
2. Aluna de Graduação em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN) da UFMS
3. Professora do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
4. Professora do Instituto de Biociências (InBio) da UFMS/Orientadora
5. Professor do InBio-UFMS

Resumo

A conversão da adenosina em inosina é catalisada pela enzima adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4). A E-ADA pode modular a função dos linfócitos, desempenhando também importante papel no desenvolvimento de tecidos. A quantificação da atividade da E-ADA em linfócitos humanos já foi previamente realizada, porém não há na literatura estudos apresentando a sua caracterização bioquímica e cinética detalhada. Assim, evidenciou-se a necessidade de padronizar condições como o intervalo de tempo de incubação e concentração de proteína em que há linearidade na atividade da E-ADA nos linfócitos isolados de sangue periférico humano; caracterizar as propriedades bioquímicas da E-ADA relacionadas à temperatura, pH, especificidade por substratos e influência de íons; determinar as constantes cinéticas, como a constante de Michaelis e Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) para E-ADA, com a adenosina como substrato; e determinar a presença da E-ADA nos linfócitos por meio da citometria de fluxo.

Autorização legal: Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS (CAAE: 89595518.3.0000.0021).

Palavras-chave: Sinalização purinérgica; Ensaio enzimático; Enzimologia.

Apoio financeiro: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Introdução

A conversão da adenosina em inosina (e do análogo desoxiadenosina em desoxinosina) é catalisada pela adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), representadas nos humanos por duas isoformas ADA1 e ADA2 (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005; KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012). Embora a caracterização da atividade enzimática da E-ADA em soro humano tenha sido proposta por Giusti (1974) e por Giusti e Gakis (1971), não há na literatura estudos apresentando a caracterização detalhada da atividade desta enzima em linfócitos isolados de sangue periférico humano, apesar de vários trabalhos quantificarem sua atividade nestas células específicas.

Deste modo, evidenciou-se a necessidade de padronização de condições como tempo, conteúdo de proteína, temperatura e pH, além da influência de íons, em linfócitos isolados de sangue periférico de humano, na ausência de processos patológicos envolvidos.

Metodologia

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi entregue aos participantes para que os mesmos conhecessem os objetivos do estudo e decidissem sua participação. Os critérios de inclusão compreenderam: adultos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, não portadores de doenças crônicas, e que não apresentavam processo infeccioso ou inflamatório agudo em curso no momento da coleta sanguínea, vinculados ao InBio/UFMS. Os critérios de exclusão foram: adultos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, portadores de doenças crônicas ou doenças autoimunes; menores de 18 anos de idade; fumantes; etilistas; e gestantes. Utilizou-se um número amostral (n) de quatro para cada ensaio enzimático.

O material biológico foi coletado e analisado no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio na UFMS, seguindo as normas de biossegurança. O PBMC rico em linfócitos foi separado por gradientes de densidade de Ficoll-Hypaque (BOYUM, 1968). A viabilidade celular foi determinada com Azul de Trypan (STROBER, 2001). A quantificação de proteína foi realizada pela metodologia de Bradford (1976). Para a quantificação enzimática da E-ADA nos linfócitos foi utilizada a metodologia descrita por Giusti e Gakis (1971) e Giusti (1974). Foi realizado o teste variando o tempo de incubação de 15 a 120 minutos e uma curva de atividade enzimática em função da concentração de proteína na amostra (0,04 a 0,8 mg/mL). Para testes com variação de pH foram utilizados os tampões acetato de sódio (pH 4.0, 5.0 e 6.0), fosfato de sódio (pH 7.0 e 7.4) e carbonato/bicarbonato de sódio (pH 8.0 e 9.0), todos na concentração de 50 mM. Foi utilizado o substrato

adenosina para determinação da constante de Michaelis e Menten (K_m) e velocidade máxima (V_{max}). A temperatura da incubação foi variada e testada em 25°C, 37°C, 45°C e 60°C. Para ensaio de especificidade, foram utilizados os substratos adenosina, desoxiadenosina e guanosina. Foi avaliada também a influência do zinco (Zn^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e EDTA, todos na concentração de 5 mM. Como inibidor foi utilizado o cloridrato de EHNA 0,1 mM. A reação catalisada pela E-ADA é interrompida ao fim do período de incubação com a adição da solução fenol/nitroprussiato. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente (620 nm), medindo-se a amônia produzida na reação, sendo expressa em nmol de NH_3 /min/mg de proteína. Para análise por citometria de fluxo, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-CD26 humano FITC (BD Biosciences) e o citômetro de fluxo BD Accuri™.

Todas as variáveis foram testadas para normalidade de distribuição e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos *in vitro* foram analisados através do teste t de *Student* ou análise de variância *one-way* ANOVA seguida pelo *test post hoc* de *Tukey*, ou testes não paramétricos equivalentes. Os parâmetros cinéticos foram calculados através do software GraphPad Prism. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Para se quantificar a atividade de enzimas localizadas na face externa da membrana celular, é necessário garantir a integridade e a viabilidade celular para uma quantificação enzimática mais precisa, principalmente quando existem enzimas intracelulares que possuem a mesma atividade. A E-ADA está localizada na membrana plasmática com sítio catalítico voltado ao meio extracelular em várias células, como linfócitos (GIUSTI, 1974; ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005). Um dos métodos de isolamento de linfócitos periféricos mais utilizados consiste na separação por gradiente de densidade (BOYUM, 1968; BROSSERON; MARCUS; MAY, 2015). Nossos resultados demonstram que os linfócitos mantiveram uma alta viabilidade (média de 88,4%; dados não mostrados) mesmo 20 horas após a separação, possibilitando o uso destas células em ensaios posteriores, sem a necessidade de quantificação enzimática imediata após o isolamento.

Para os primeiros ensaios de atividade da E-ADA foi utilizado como substrato adenosina 20 mM, conforme preconizado por Guisti e Gakis (1971), até que as condições ideais fossem determinadas. A atividade enzimática foi linear de 15 a 120 minutos (Figura 1A). Deste modo, foi escolhido o tempo de incubação de 120 minutos. A atividade enzimática se manteve linear na faixa de 2,5 a 12,5 μ g de proteína, correspondente a 0,1 a 0,5 mg/mL (Figura 1B). Para realização dos experimentos seguintes os conteúdos de proteína das amostras foram adequados para valores próximos a 12,5 μ g de proteína. Rosemberg e colaboradores (2008) caracterizaram a E-ADA em cérebro de *zebrafish* e obtiveram linearidade na atividade enzimática nos tempos de 105 minutos para a fração solúvel da enzima, e 180 minutos para a fração de membrana. Já o conteúdo de proteína apresentou-se linear entre 5 e 20 μ g, semelhante ao que foi identificado no presente estudo.

Os níveis de atividade enzimática relativa permaneceram mais elevados e lineares na faixa de pH entre 6.0 a 7.4 (Figura 1C). Koizumi e colaboradores (1985) realizaram a caracterização da E-ADA em células epidérmicas humanas normais e de carcinoma, observando um pH ótimo em torno de 7.0. Singh e Sharma (2000) caracterizaram esta enzima em intestino de camundongos e obtiveram perfil de estabilidade do pH entre 6.5 e 9.0. Já Lindley e Pisoni (1993) identificaram o pH ótimo entre 7.0 e 8.0, em lisossomos de fibroblastos humanos. Considera-se que os resultados obtidos neste estudo (faixa de pH entre 6.0 e 7.4) estão em conformidade com que tem sido descrito na literatura. Portanto, para os ensaios seguintes foi escolhido o tampão acetato de sódio (50 mM) pH 6.0 para linfócitos.

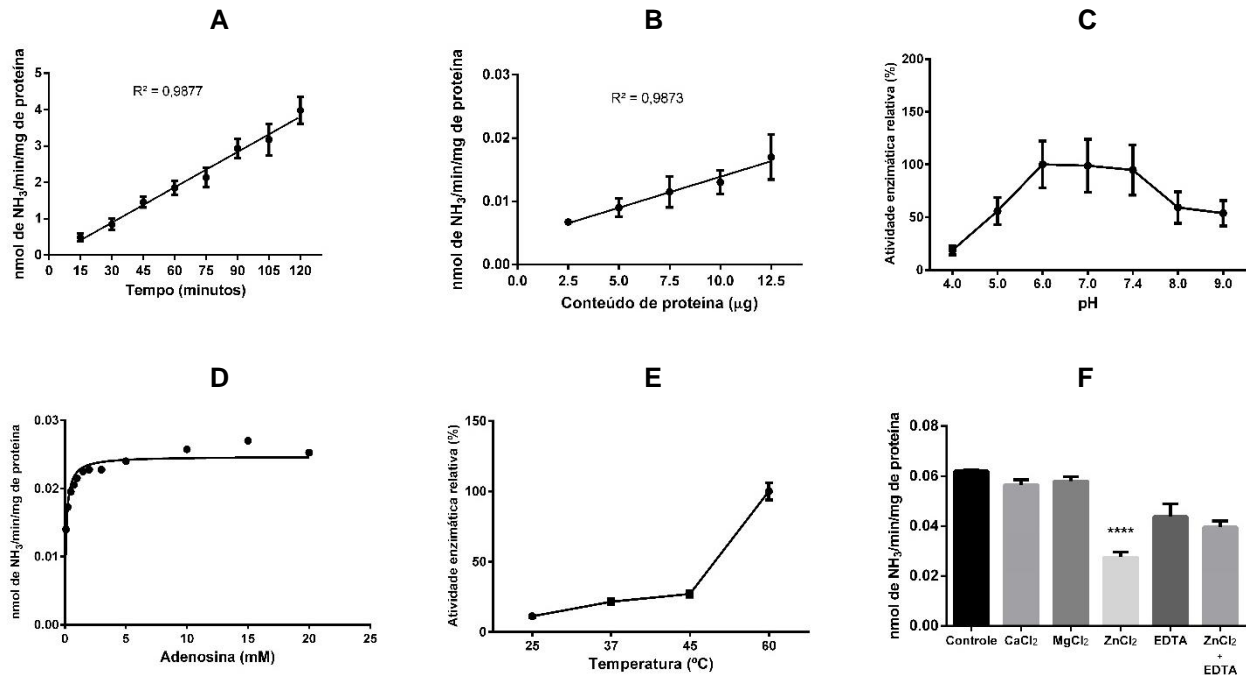
Para estudo dos parâmetros cinéticos, as concentrações de adenosina utilizadas foram de 0,1 a 20 mM. Os valores de K_m aparente e V_{max} foram $0,103 \pm 0,051$ mM e $0,025 \pm 0,001$ nmol de NH_3 /min/mg de proteína, respectivamente (Figura 1D). O K_m aparente da E-ADA com o substrato adenosina foi investigado em outros tecidos e células, normalmente apresentando-se com valores baixos na mesma faixa identificada neste estudo (MORISAKI; FUJII; MIWA, 1985; KOIZUMI et al., 1985; LINDLEY; PISONI, 1993; SINGH; SHARMA, 2000; IWAKI-EGAWA; WATANABE, 2002; VALE et al., 2005; ROSEMBERG et al., 2008). A concentração fisiológica de adenosina no plasma humano é de aproximadamente 0,1 μ M (GERMAN; KREDICH, 1984), o que sugere que a atividade da E-ADA em condições normais é quase nula (KOUPENOVA et al., 2017). Para os próximos ensaios foi utilizada a adenosina na concentração de 10 mM.

Foi avaliado ainda o efeito da temperatura em 25°C, 37°C, 45°C e 60°C (Figura 1E). A atividade enzimática relativa aumentou até a temperatura de 60°C. A atividade aumentada da E-ADA em temperaturas mais elevadas já foi descrita anteriormente, porém a temperatura de 37°C é comumente usada nos ensaios enzimáticos devido ao risco de desnaturação proteica (ROSEMBERG et al., 2008). Vale e colaboradores (2005) observaram uma maior atividade da E-ADA com 37°C e perda da atividade quando incubada a 50°C. No entanto, Koizumi et al. (1985) relataram que, em células epidérmicas humanas normais e de carcinoma, uma isoforma maior da E-ADA se mostrou estável até 65°C. No entanto, a temperatura de 37°C continuou sendo utilizada nos testes posteriores, por ser a temperatura mais estável aos sistemas biológicos, procurando evitar a desnaturação proteica provocada por temperaturas mais elevadas.

Quanto ao efeito dos íons sobre a atividade enzimática, o $ZnCl_2$ foi capaz de inibir significativamente a E-ADA. O EDTA (quando incubado junto ao $ZnCl_2$) foi capaz de prevenir o efeito do zinco sobre a enzima. Já o $CaCl_2$ e $MgCl_2$ não influenciaram significativamente a atividade enzimática (Figura 1F). O zinco desempenha importante papel na desaminação da adenosina por estar localizado no sítio ativo da E-ADA, porém também demonstrou-se que o zinco e outros cátions divalentes podem interagir com outros resíduos de aminoácidos, provocando inibição competitiva da atividade enzimática. Sugere-se que o zinco possa interagir com resíduos de

aminoácidos, localizados no sítio ativo ou próximos dele, formando uma ligação metálica semelhante à encontrada na estrutura do “dedo de zinco”, que ocuparia uma porção do sítio ativo e impediria a ligação completa com o substrato (COOPER et al., 1997).

Figura 1 – Efeito do tempo (A), do conteúdo de proteína (B), do pH (C), do substrato pela equação de Michaelis-Menten para determinação do K_m e da V_{max} (D), da temperatura (E), e de íons (F) na atividade enzimática da E-ADA em linfócitos humanos (n=4).



Quanto à especificidade (Tabela 1), foi observada a preferência da E-ADA pela adenosina como substrato em relação a 2'-desoxiadenosina e guanosina. Iwaki-Egawa e Watanabe (2002) caracterizaram a E-ADA purificada de fígado humano e de galinha, e os resultados mostraram que a enzima possui preferência pela adenosina sobre a desoxiadenosina, apresentando o mesmo perfil dos resultados obtidos com os linfócitos no presente estudo. O EHNA inibiu significativamente a atividade da E-ADA (Tabela 2). Visto que o EHNA é descrito como inibidor específico da ADA1 (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005) e apresentou inibição significativa nos linfócitos, supõe-se que esta seja a isoforma predominante nesta célula. Este inibidor na mesma concentração de 0,1 mM foi utilizado em outros estudos apresentando efeito apenas sobre a ADA1, como descrito por Iwaki-Egawa e Watanabe (2002).

Na citometria de fluxo de amostras de PBMC rico em linfócitos, observou-se que 53,8±6,8% de células no gate dos linfócitos foram marcadas com o anticorpo anti-CD26 (dados não mostrados). Por meio da citometria de fluxo, foi possível confirmar a presença indireta da E-ADA nos linfócitos do PBMC ao se utilizar o anticorpo anti-CD26 humano, visto que a associação da enzima com CD26 formando um dímero já foi descrita anteriormente na literatura (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005).

Tabela 1 – Especificidade por substrato pela E-ADA em linfócitos humanos (10 mM; n=4).

SUBSTRATO	LINFÓCITOS	
	Atividade da E-ADA ¹	Atividade relativa (%)
Adenosina	0,06354 ± 0,00504	100 ± 7,9
2'-desoxiadenosina	0,03636 ± 0,00299***	57,2 ± 4,7
Guanosina	0,00148 ± 0,00001***	2,3 ± 0,01

¹ Atividade enzimática expressa em nmol de NH₃/min/mg de proteína.

*** Diferença significativa em relação a adenosina (one-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Tukey, p < 0,01).

Tabela 2 – Inibição da E-ADA em linfócitos humanos por EHNA (n=4).

GRUPO	LINFÓCITOS	
	Atividade da E-ADA ¹	Atividade relativa (%)
Controle	0,0583 ± 0,0046	100 ± 7,9
EHNA (0,1 mM)	0,0010 ± 0,0001***	1,7 ± 0,1

¹ Atividade enzimática expressa em nmol de NH₃/min/mg de proteína.

*** Diferença significativa em relação ao controle (teste t de Student, p < 0,0001).

Conclusões

Espera-se que as características bioquímicas e cinéticas descritas possam melhorar as condições para quantificação da atividade da E-ADA em linfócitos humanos em estudos futuros.

Referências bibliográficas

- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. Supplementum, v. 97, p. 77-89, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BROSSERON, F.; MARCUS, K.; MAY, C. Isolating peripheral lymphocytes by density gradient centrifugation and magnetic cell sorting. **Methods in Molecular Biology**, v. 1295, p. 33-42, 2015.
- BURNSTOCK, G. VERKHRATSKY, A. **Purinergic Signalling and the Nervous System**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.
- COOPER, B. F. et al. The role of divalent cations in structure and function of murine adenosine deaminase. **Protein Science**, v. 6, n. 5, p. 1031-1037, 1997.
- GERMAN, D. C.; KREDICH, N. M. A radioenzymatic assay for plasma adenosine. **Analytical Biochemistry**, v. 142, n. 2, p. 536-541, 1984.
- GIUSTI, G. Adenosine Deaminase. In: Bergmeyer, H. U., **Methods of Enzymatic Analysis**. 2nd Edition, Academic Press, New York, 1092-1099, 1974.
- GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v. 12, p. 417-425, 1971.
- IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y. Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, n. 2, p. 173-182, 2002.
- KOIZUMI, H. et al. Characterization of Adenosine Deaminase from Normal Human Epidermis and Squamous Cell Carcinoma of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 199-202, 1985.
- KOUPENOVA, M. et al. Thrombosis and platelets: an update. **European Heart Journal**, v. 38, p. 785–791, 2017.
- KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; SÉVIGNY, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 9.
- LINDLEY, E. R.; PISONI, R. L. Demonstration of adenosine deaminase activity in human fibroblast lysosomes. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 457-462, 1993.
- MORISAKI, T.; FUJII, H.; MIWA, S. Adenosine deaminase (ADA) in leukemia: Clinical value of plasma ADA activity and characterization of leukemic cell ADA. **American Journal of Hematology**, v. 19, p. 37-45, 1985.
- ROSEMBERG, D. B. et al. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (*Danio rerio*) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, n. 1, p. 96-101, 2008.
- SINGH, L.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 204, p. 127–134, 2000.
- STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, New York, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.
- VALE, M. R. I. et al. Characterization of adenosine deaminase (ADA) in hemolymph of *Biomphalaria glabrata*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 2, 2005.
- ZAVIALOV, A. V.; ENGSTRÖM, Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 51-57, 2005.