

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE EM PLAQUETAS HUMANAS

Luciana R. Costa¹, Andressa K. Y. de Souza^{2*}, Ana M. O. Battastini³, Jeandre A. dos S. Jaques⁴, Fabiana F. Zanoelo⁵

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. Professor do Instituto de Biociências (InBio) da UFMS
5. Professora do InBio-UFMS/Orientadora

Resumo

A conversão da adenosina em inosina é catalisada pela enzima adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4). A E-ADA pode interferir na função das plaquetas, modulando o processo de angiogênese e agregação plaquetária. A quantificação da atividade da E-ADA em plaquetas humanas 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 nas plaquetas isoladas de sangue periférico humano; caracterizar as propriedades bioquímicas da E-ADA relacionadas à temperatura, pH, especificidade por substratos e influência de íons sobre a atividade enzimática nas plaquetas; e 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.

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

Palavras-chave: Sinalização purinérgica; Ensaios enzimáticos; 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 plaquetas isoladas de sangue periférico humano, apesar de vários dos trabalhos anteriormente citados 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 plaquetas isoladas de sangue periférico de humano, na ausência de processos patológicos envolvidos.

Metodologia

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi entregue aos participantes no primeiro contato com a pesquisadora, 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 seis para cada ensaio enzimático realizado.

O material biológico foi coletado, processado, armazenado, analisado e descartado no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio na UFMS, seguindo as normas de biossegurança. O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado conforme descrito por Lunkes et al. (2004) com pequenas modificações (JAQUES et al., 2011). Para a quantificação enzimática da E-ADA em plaquetas 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 guanossina. 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.

A quantificação de proteína foi realizada de acordo a metodologia descrita por Bradford (1976) utilizando-se soro-albumina bovina como padrão. 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 de uma via (*one-way ANOVA*) seguida pelo *test post hoc* de *Tukey* ou testes não paramétricos equivalentes. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. Os parâmetros cinéticos foram calculados através do *software* GraphPad Prism.

Resultados e Discussão

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 105 minutos (Figura 1A). Deste modo, foi escolhido o tempo de incubação de 105 minutos. A atividade enzimática se manteve linear na faixa de 7,5 a 20 μ g, equivalente a 0,3 a 0,8 mg/mL (Figura 1B). Para realização dos experimentos seguintes os conteúdos de proteína das amostras foram adequados para valores próximos a 20 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 fosfato de sódio (50 mM) pH 7.0.

Para estudo dos parâmetros cinéticos, as concentrações de adenosina utilizadas foram de 0,001 a 5 mM. Os valores de K_m aparente e V_{max} foram $0,0017 \pm 0,00045$ mM e $0,004 \pm 0,0001$ 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. A adenosina no meio extracelular desempenha papel importante nas plaquetas por provocar inibição da ativação e agregação plaquetária (KOUPENOVA et al., 2017). Para os próximos ensaios foi utilizada a adenosina na concentração de 1 mM.

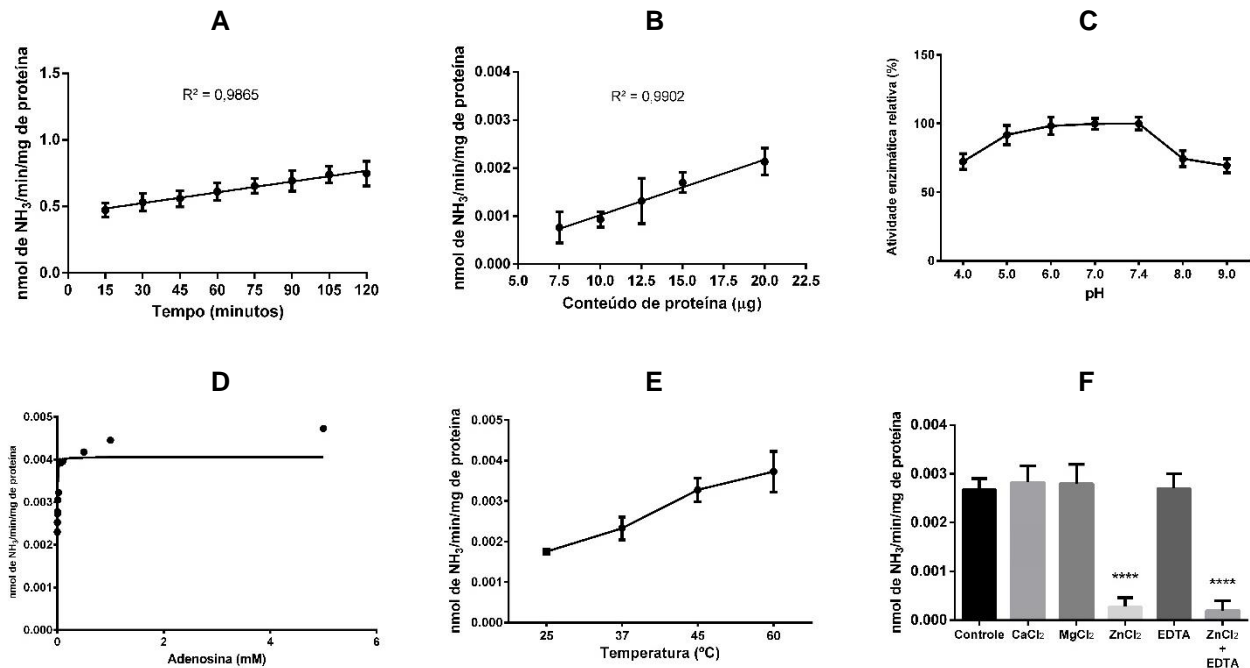
Foi avaliado ainda o efeito da temperatura em 25°C, 37°C, 45°C e 60°C (Figura 1E). A atividade enzimática relativa aumentou até a temperatura de 60°C. A atividade aumentada da E-ADA em temperaturas mais elevadas já foi descrita anteriormente, porém a temperatura de 37°C é comumente usada nos ensaios 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. No entanto, o EDTA (quando incubado junto ao $ZnCl_2$) não capaz de reverter o efeito inibitório 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). O “dedo de zinco” compreende cerca de 30 resíduos de aminoácidos que formam uma alça alongada unida na base por um único zinco, coordenado a quatro destes resíduos (quatro cisteínas ou duas cisteínas e duas histidinas) (NELSON; COX, 2014).

Assim, o zinco reduziu significativamente a atividade da E-ADA em outras pesquisas (ROSEMBERG et al., 2008). A reversão do efeito inibitório do zinco pelo EDTA, na mesma concentração de 5 mM, não foi observada

nas plaquetas. Contudo, já foi descrito previamente que a adição de EDTA saturado (ou seja, em concentrações mais elevadas que as condições do ensaio) restaura a inibição enzimática por metais (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 plaquetas humanas (n=6).



Quanto à especificidade (Tabela 1), observou-se preferência pela adenosina apenas quando comparada à guanosina. Koizumi e colaboradores (1985) não observaram diferenças significativas na especificidade entre adenosina e 2'-desoxiadenosina pela E-ADA, como ocorreu com as amostras de plaquetas deste estudo, apresentando diferença significativa apenas quando comparada à guanosina. O EHNA inibiu significativamente a atividade da E-ADA (Tabela 2). O composto EHNA possui características tanto do substrato adenosina quanto de outros inibidores não-nucleosídicos, ligando-se fortemente ao sítio ativo da enzima por várias ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals* (KINOSHITA; TADA; NAKANISHI, 2008). Visto que o EHNA é descrito como inibidor específico da ADA1 (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005) e apresentou inibição significativa nas plaquetas, 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).

Tabela 1 – Especificidade por substrato pela E-ADA em plaquetas humanas (1 mM; n=6).

SUBSTRATO	PLAQUETAS	
	Atividade da E-ADA ¹	Atividade relativa (%)
Adenosina	0,0056 ± 0,0010	100 ± 17,8
2'-desoxiadenosina	0,0046 ± 0,0009	82,1 ± 16,01
Guanosina	0,0019 ± 0,0001***	33,9 ± 1,7

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 plaquetas humanas por EHNA (n=6).

GRUPO	PLAQUETAS	
	Atividade da E-ADA ¹	Atividade relativa (%)
Controle	0,0057 ± 0,0011	100 ± 19,3
EHNA (0,1 mM)	0,0003 ± 0,0001***	5,3 ± 1,7

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 plaquetas humanas em estudos futuros.

Referências bibliográficas

- 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.
- 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.
- JAQUES, J. A. S. et al. Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. **Cell, Biochemistry & Function**, v. 29, p. 630-635, 2011.
- KINOSHITA, T.; TADA, T.; NAKANISHI, I. Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 1, p. 53-57, 2008.
- 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.
- LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, p. 1-6, 2004.
- 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.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- 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.
- 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.