

Artigo

Adenosina desaminase: uma enzima extraordinária e onipresente

Adenosine deaminase: an extraordinary and omnipresent enzyme

*Patricia Siqueira Silva¹, Cyro Teixeira da Silva Junior²,
Elizabeth Giestal de Araújo³, Salim Kanaan⁴, Analúcia Rampazzo Xavier⁵*

Resumo

Depois de introduzir os conceitos básicos da enzima adenosina desaminase (ADA), uma breve discussão sobre a estrutura, o mecanismo enzimático, terapia genética e potencial utilização terapêutica de inibidores de ADA são apresentados. O estudo da ADA é muito mais complexo do que simplesmente seu papel como biomarcador diagnóstico para tuberculose pleural que veio revolucionar o setor de diagnóstico na medicina clínica nos últimos anos. O aumento de sua atividade no líquido pleural, e em outros líquidos orgânicos, impede que o paciente na maioria dos casos com síndrome do derrame pleural por tuberculose seja submetido a procedimentos cirúrgicos invasivos com possíveis complicações potencialmente fatais.

Descritores: adenosina desaminase

Abstract

After introducing the basic concepts of ADA, a brief discussion on the structure, enzymatic mechanism, gene therapy and potential therapeutic use of ADA inhibitors are presented. The study of the ADA is much more complex than simply its role as a biomarker for pleural tuberculosis that has revolutionized the diagnostic in clinical medicine in recent years. The increase in its activity in the pleural fluid, and other body fluids, prevents the patient in most cases with pleural effusion tuberculosis is subjected to invasive surgical procedures with possible life-threatening complications.

Keywords: Adenosine deaminase; pleural tuberculosis; adenosine metabolism enzymes

1. Pós-Graduanda em Análises Clínicas pela Universidade Federal Fluminense
2. Departamento de Medicina Clínica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal Fluminense. Laboratório de Pesquisa em Líquido Pleural do Instituto de Biologia da UFF
3. Departamento de Neurobiologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense
4. Departamento de Patologia da Universidade Federal Fluminense
5. Departamento de Patologia da UFF. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Saúde Materno-Infantil da Universidade Federal Fluminense
Endereço para correspondência: Dr. Cyro Teixeira da Silva Junior - Rua da Conceição 13/210 – CEP: 24 020 080 - Centro – Niterói (RJ) – Brasil
Email: ctsilvajunior@predialnet.com.br

Introdução

Todo o funcionamento dos organismos vivos, em todas as etapas de suas vidas, depende de múltiplos e eficientes mecanismos de sinalização química. Desta forma, todas as reações obedecem às leis da química e da física. A manutenção do mais simples organismo vivo não o coloca à parte do estudo dos sólidos, dos líquidos e dos gases. Então, podemos dizer que a química da vida é de um tipo muito especial. Tal afirmativa está baseada na composição dos seres vivos, que tem como base compostos de carbono, e que cujas reações químicas são na sua maioria em meio aquoso.

Uma das propriedades dos seres vivos, que faz com que eles pareçam diferentes da matéria não-viva é que eles criam e mantêm ordem em um universo que está sempre tendendo à desordem. A ordem dos organismos vivos depende de uma série de reações químicas que nunca termina. Entretanto, muitas destas reações ocorrem lentamente para manter os processos vitais. Para resolver este problema os organismos criaram a catálise, isto é, um modo de acelerar a velocidade das reações químicas¹.

As ações catalíticas estão na dependência de enzimas que aceleram os processos vitais. Essas reações estão presentes desde vírus até os mamíferos superiores. Nestes últimos, encontramos enzimas em todos os tecidos e líquidos orgânicos¹.

Devido ao seu crucial papel na manutenção da vida, a enzimologia tem se tornado um elemento chave no diagnóstico médico e na terapêutica.

No diagnóstico do envolvimento de um órgão específico numa doença, seria ideal se houvessem enzimas particulares para cada órgão que pudessem ser identificadas. Entretanto, isto não é factível porque os processos metabólicos de vários órgãos são muito semelhantes. Contudo, existem enzimas que podem refletir a atividade e função de determinados órgãos ou tecidos, são as chamadas enzimas tecido específicas. Exemplos são a álcool desidrogenase do fígado e a fosfatase ácida da próstata².

O estudo da cinética do aparecimento e desaparecimento de enzimas particulares no plasma, devido a diversos mecanismos patogênicos, permite que o diagnóstico dos possíveis distúrbios de um órgão específico seja realizado³.

Através da nossa experiência prévia em pesquisas clínicas pioneiras realizadas na Universidade Federal Fluminense, objetivamos neste trabalho, ressaltar e atualizar a importância clínica da enzima Adenosina desaminase para o diagnóstico de tuberculose pleural possibilitando a ampliação de seu estudo em nosso país.

Adenosina desaminase

a) Nomenclatura

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) a Adenosina desaminase possui como símbolo oficial: ADA; sinônimo: Adenosina aminohidrolase e código: 3.5.4.4.

b) Definição

Adenosina desaminase é uma denominação genérica dada a um grupo de enzimas com pesos moleculares distintos, que possuem uma função química semelhante no metabolismo das purinas. Ela catalisa, irreversivelmente, o nucleosídeo adenosina (Ado) e 2' desoxiadenosina (dAdo) em inosina e 2' desoxinosina³.

A inosina e a 2' desoxinosina são convertidas a hipoxantina, xantina e finalmente a ácido úrico. Deve-se esperar, portanto, que o aumento da atividade de ADA resulte em aumento da produção de ácido úrico. Valores de Km para Ado e dAdo são 45 e 34 μ M, respectivamente, e o pH ótimo para sua atividade está em torno de 7,0³.

c) Distribuição filogenética

A ADA tem uma distribuição filogenética ampla e sua sequência de aminoácidos é altamente conservada desde as bactérias até ao homem, sugerindo que, evolutivamente, a ADA seja uma enzima chave no metabolismo das purinas⁴.

Existe uma evidente similaridade entre a arquitetura da ADA e outras enzimas, como, por exemplo, a Urease e Fosfotriesterase⁴. Além disso, a ADA também tem sido encontrada em plantas, bactérias, invertebrados, vertebrados e mamíferos, incluindo o homem. Esta enzima está presente virtualmente em todo organismo humano onde, principalmente, é encontrada em altos níveis em órgãos linfóides, tais como baço, timo e linfonodos. Nestes lugares sua atividade é maior nas células T do que nas células B⁵.

No sistema nervoso a atividade da ADA já foi demonstrada tanto em neurônios como em células gliais. Entretanto, a atividade da ADA é maior em células gliais do que em células neuronais⁶.

d) Fisiologia

A ADA é uma enzima polimórfica. Sua ação regula as concentrações intra e extracelular de adenosina. A adenosina é um produto de degradação do nucleotídeo adenina³. Tem sido postulado que outros nucleosídeos modificados da adenina, que existem naturalmente e são encontrados tanto na urina de indivíduos normais ou com deficiência genética de ADA, são possíveis substratos para ADA. São exemplos 1-metilAdo, N6-metilAdo e N6, 2'-O-dimetil Ado³.

e) *Localização celular da ADA*

A ADA é enzima localizada principalmente no citoplasma celular (citosol), mas também na superfície celular (ecto-enzima)⁷. Nesta última localização, a ADA tem sido detectada na superfície de células hematopoiéticas e possui uma função estimulatória em linfócitos, independente de sua função catalítica⁷.

Existem dois tipos de proteínas na superfície celular que ancoram a ecto-ADA: a CD 26 e os receptores de adenosina (AR)⁷.

A CD 26, também conhecida como dipeptil peptidase IV (DPP-IV) tem o código 3.4.14.5. É uma glicoproteína transmembrana tipo II multifuncional de 110 KDa que, funcionalmente, atua como um receptor para ADA. É expressa em células epiteliais (túbulos proximais do rim, intestinos e ducto biliar), diversos tipos de células endoteliais, fibroblastos e células linfóides. É constituída por 766 aminoácidos que se organizam em duas subunidades cada uma com um sítio ativo. É uma exopeptidase que cliva, com grande especificidade, dipeptídeos da terminação N de cadeias polipeptídicas onde o aminoácido prolina ocupa a penúltima posição⁷.

A atividade da DPP-IV pode ser dosada em líquidos biológicos e no sangue onde existe sob uma forma solúvel⁸. A DPP-IV interage com a proteína Tat do vírus da imunodeficiência do tipo 1. O envelope proteico gp120 deste vírus inibe a ligação da DPP-IV com a ADA⁹.

Os AR dos tipos A₁ (A₁R) e A₂B (A₂B_R) são expressos em células dendríticas. Estas são as mais potentes células apresentadoras de antígenos (APC) para iniciar uma resposta imune. São células de formato irregular, não fagocíticas. Elas são competentes na apresentação de antígenos tanto às células T CD4+ como às CD8+. Dentre as APCs especializadas, as células dendríticas são as mais eficientes para iniciar a resposta imune dependente das células T. Fazem parte do sistema monocítico fagocitário (SMF), pois vem da maturação dos monócitos que chegam pelo sangue. Existem na região subcortical dos linfonodos⁹.

Estudos demonstram que a ADA está colocada com receptores de adenosina nas células dendríticas e interagem com CD26 linfocitária. Estas interações na sinapse imunológica conduzem a um aumento na produção de células T *helper* 1 e citocinas pró-inflamatórias (interferon gama, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF) e interleucina 6)¹⁰.

f) *Estrutura e mecanismo enzimático*

O complexo ADA possui uma estrutura tridimensional e mecanismo catalítico molecular estudados por análise cristalográfica, computacional e mutagênica¹¹. É uma metalo-enzima que necessita de um cátion divalente (zinco ou cobalto) para sua atividade catalítica mas não de um cofator¹¹. Cabe recordar que as metaloenzimas tra-

zem em sua composição um átomo de metal.

O mecanismo enzimático da ADA pode ser resumido da seguinte maneira: um grupo inicial hidroxil estereoisomérico específico do sítio ativo enzimático acrescenta na posição C6 do substrato, a molécula de adenosina para formar um tetraedro em estado intermediário, com eliminação final de amônia, para formar o produto final inosina¹¹.

g) *Isoenzimas da ADA*

Dois diferentes isoenzimas da ADA, designadas como ADA1 e ADA2 foram encontradas em mamíferos e vertebrados inferiores¹². A ADA total representa a soma das isoenzimas ADA 1 e ADA 2.

No homem quase toda atividade da ADA é atribuída a ADA1. ADA 1 consiste em duas formas: um monômero de peso molecular de 35 KDa e um dímero que forma um complexo de 280 KDa com DPP-IV (CD 26). O complexo ADA1/DPP-IV não tem atividade catalítica¹¹. ADA 1 está presente em todas as células e em todos os tecidos do homem e nas hemácias. Uma pequena quantidade desta isoenzima circula no plasma. O papel crucial da ADA1 é no desenvolvimento do sistema imune adaptativo, em particular, na proliferação dos linfócitos T onde sua atividade catalítica se faz necessária porque reduz a concentração local de adenosina, um imunossupressor poderoso¹².

ADA2 existe unicamente como um monômero com peso molecular de 100 KDa e é a forma predominante no plasma/soro humano. Alguns estudos concluíram que monócitos e macrófagos podem ser a maior fonte de ADA 2 no homem. Outros afirmam que a ADA2 é encontrada somente em monócitos. Vários trabalhos aceitam que a atividade de ADA reflita a função das células T e sua dosagem tem sido utilizada para avaliar a gravidade de pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida¹². A ADA2 pleural é útil para diagnóstico de tuberculose pleural. Entretanto, um estudo concluiu que sua sensibilidade para tuberculose pleural é semelhante à da ADA total¹³.

h) *Biologia molecular do gene da ADA*

Um simples *locus* genético situado sobre o braço maior do cromossomo 20 controla a síntese da ADA em todos os tecidos do homem¹⁴. No homem, uma redução ou ausência de atividade da ADA1 está associada com um distúrbio hereditário autossômico ou recessivo ligado ao cromossomo X, conhecido como Imunodeficiência Combinada Grave (SCID)¹⁴. Cerca de 50% da forma recessiva autossômica da SCID, e cerca de 20% de todos os casos, devem-se à deficiência de ADA. Outras deficiências enzimáticas associadas à SCID, além da ADA, incluem: deficiência de purina nucleosídeo fosforilase (PNP) e síndrome dos linfócitos desnudos¹⁴. A SCID é uma denominação para um grupo heterogêneo de doenças caracter-

zadas por desenvolvimento defeituoso dos linfócitos B e T, linfocitopenia profunda e imunidade humoral e celular deficiente¹⁴.

O primeiro exemplo de SCID foi descoberto na Suíça em 1950 por Glanzmann e Riniker e, por este motivo, tal doença foi originalmente denominada agamaglobulinemia do tipo suíço. Possui como quadro clínico: lactentes com sinais e sintomas sugestivos de imunodeficiência nos primeiros três meses de vida ou adultos com quadro clínico de imunodeficiência¹⁴. A SCID já pode ser diagnosticada, atualmente, antes do nascimento pelo procedimento de amniocentese e pela confirmação laboratorial de diminuição ou ausência de atividade da ADA nas hemácias. O seu tratamento tem sido realizado com transplante de medula óssea ou terapia genética¹⁴.

i) ADA, diabetes mellitus e funções da adenosina

O diabetes mellitus é uma das doenças crônicas de maior incidência na população mundial. A atividade da ADA também vem sendo estudada em pacientes com diabetes mellitus do tipo 2. A ADA ao catalisar, irreversivelmente, a desaminação da adenosina para inosina passa a ter um papel importante na regulação da concentração de adenosina¹⁵.

A adenosina é precursora de ácidos nucleicos (adenosina intracelular) e uma molécula sinalizadora envolvida na regulação de vários processos. As respostas à adenosina incluem vasodilatação coronariana, redução na frequência cardíaca e força contrátil do miocárdio, inibição da agregação plaquetária, degranulação de mastócitos, inativação de migração de eosinófilos, vasoconstrição renal, regulação dos canais iônicos, potencial de membrana, neurotransmissores e liberação hormonal¹⁵.

A adenosina também tem um papel importante na modulação da ação insulínica e na modulação do metabolismo de energia, em especial potencializando sua ação no tecido adiposo e miocárdio. Ação inibidora na musculatura esquelética. No miocárdio alguma atividade receptor-mediada é requerida pela insulina para estimular a captação de glicose pelo miocárdio. A adenosina modula a responsividade hepática a insulina e pode causar resistência insulínica local, sendo o efeito também observado no músculo esquelético, via possivelmente um efeito pós-receptor¹⁶.

Em relação aos pacientes diabéticos, a adenosina age diretamente influenciando a atividade insulínica, atuando no transporte de glicose, síntese lipídica, atividade da Piruvato desidrogenase, oxidação da leucina e atividade da Fosfodiesterase dos nucleotídeos cíclicos. Aumento da atividade da ADA no diabetes mellitus tipo 2 vem sendo estudada como um possível marcador para indicação de insulina. No trabalho de Kurtul e colaboradores os níveis séricos de ADA apresentavam uma correlação positiva e significativa com os níveis séricos de HbA1c¹⁶.

j) Níveis de ADA e outras doenças

Além da diabetes mellitus, anormalidades nos níveis de ADA tem sido relatado na síndrome de imunodeficiência adquirido (AIDS), tuberculose, meningite bacteriana, leishmaniose cutânea, pneumonia adquirida na comunidade, hepatite viral, algumas doenças linfoproliferativas, neoplasias, anemia hemolítica hereditária, hipoplasia congênita, anemia de Diamond e Blackfan, artrite reumatóide, esclerose múltipla, miastenia gravis, lúpus eritematoso sistêmico, síndrome de Down, doença de Parkinson, angina pectoris e stress¹¹.

k) Pesquisas com dosagem de ADA na Universidade Federal Fluminense

Na UFF, desde 1987 os níveis de ADA têm sido pesquisados no soro e líquido pleural em diversas doenças que evoluem ou se apresentam com síndrome do derrame pleural¹⁶. São trabalhos pioneiros realizados no Brasil. Uma das conclusões destes trabalhos foi que com níveis de atividade de ADA total maior ou igual a 40 UI/L, dosada no líquido pleural pelo método colorimétrico de Giusti e Galanti, aceita-se o diagnóstico de tuberculose pleural com sensibilidade de mais de 80% e especificidade de mais de 90%¹⁶.

O diagnóstico bioquímico de tuberculose pleural pela dosagem da ADA no líquido pleural obtido após uma simples punção da cavidade pleural com anestesia local (toracocentese). Uma toracocentese com exame de ADA no líquido pleural impede que os pacientes sejam submetidos a um procedimento invasivo e com complicações potencialmente graves e fatais. Este outro procedimento é a biópsia pleural fechada com agulha (CPB) e serve para exame de amostras de tecido pleural¹⁸. Outros procedimentos mais invasivos também podem ser indicados porque a sensibilidade da CPB para diagnóstico de tuberculose pleural está em torno de 40% e 60% na nossa casuística e na literatura internacional¹⁷. A dosagem no soro ou plasma da ADA não possui sensibilidade e especificidade para diagnóstico de qualquer forma de tuberculose^{16,17}.

l) Potencial terapêutico com uso de inibidores da ADA

Há muitos anos tem sido pesquisado que inibidores da ADA podem ser úteis no tratamento de infecções virais e alguns tipos de doenças linfoproliferativas. Os principais inibidores estudados são: antagonistas do receptor de adenosina A₁, coformicina e análogos da pentostatina, derivados de 1-deoxiadenosina, compostos EHNA *like*, flavonóides, dipiridamol, fenilbutazona, entre outras¹¹.

Conclusões

O estudo da ADA é muito mais complexo do que simplesmente seu papel como biomarcador diagnóstico para tuberculose pleural que veio revolucionar o setor de

diagnóstico na medicina clínica nos últimos anos. O aumento de sua atividade no líquido pleural, e em outros líquidos orgânicos, impede na maioria dos casos que o paciente com síndrome do derrame pleural por tuberculose seja submetido a procedimentos cirúrgicos invasivos

com possíveis complicações potencialmente fatais. Como perspectivas futuras, outros métodos de dosagem do que o colorimétrico de Giusti e Galanti para dosagem de sua atividade em líquidos orgânicos estão sendo avaliados para seu uso na pesquisa e rotina laboratorial.

Referências

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell, 4th ed., Garland Publishing Inc: New York, 2002.
2. Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6ª Edição. Artmed editora Ltda, 2014.
3. Boyer PD. The Enzymes, 3rd. ed., Academic Press: New York, 1974.
4. Brady TG, O'Donovan CI. A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp Biochem Physiol.* 1965; 14:101-12.
5. Daddona PE. Human adenosine deaminase. Properties and turnover in cultured T and B lymphoblasts. *J Biol Chem.* 1981; 256: 12496-12501.
6. Cevallos G, Tuttle B, Rubio R. Differential distribution of purine metabolizing enzymes between glia and neurons. *J Neurochem.* 1994; 62 (3): 1144-1153.
7. Franco R, Casado V, Ciruela F, Saura C, Mallol J, Canela EI, et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog Neurobiol.* 1997; 52: 283-294.
8. Iwakiegawa S, Watanabe Y, Kikuya Y, Fugimoto Y. Dipeptidyl peptidase IV from human serum: Purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence. *J Biochem.* 1998 124: 428-433.
9. Weihofen WA, Liu J, Reutter W, Saenger W, Fan H. Crystal structures of HIV-1 Tat-derived nonapeptides Tat-(1-9) and Trp2-Tat-(1-9) bound to the active site of dipeptidyl-peptidase IV (CD26). *J Biol Chem.* 2005; 280: 14911 - 14917.
10. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell J.M, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102, 9583-9588.
11. Cristalli G, Costanzi S, Lambertucci C, Lupidi G, Vittori S, Volpini R, Camaioni E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev.* 2001; 21 (2): 105-128.
12. Zavalov AV, Engstrom A. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J.* 2005; 391 (Pt 1): 51-57.
13. Inase N, Tominaga S, Yasui M, Tsukada Y, Oukouchi M, Miura H. Adenosine deaminase 2 in the diagnosis of tuberculous pleuritic. *Kekkaku.* 2005; 80 (12): 731-734.
14. Buckley RHJ. The multiple causes of human SCID. *Clin Invest.* 2004; 114 (10): 1409-1411.
15. Bottini N, Bottini F, Borgiani P, Antonacci E, Lucarelli P, Bottini E. Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: A study of interaction between adenosine deaminase and acid phosphatase locus 1 polymorphisms. *Metabolism.* 2004; 53 (8): 995-1001.
16. Kurtul N, Pence S, Akarsu E, Kocoglu H, Aksoy Y, Aksoy H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2004; 47 (1): 33-36.
17. Silva Junior CT, Behrsin RF, Cardoso GP, Araújo EG. Evaluation of adenosine deaminase activity for the diagnosis of pleural TB in lymphocytic pleural effusions. *Biomarkers Med.* 2013; 7 (1): 113-118.
18. Behrsin RF, Silva Junior CT, Cardoso GP, Barillo JL, Souza JBSS, Araújo EG. Combined evaluation of adenosine deaminase level and histopathological findings from pleural biopsy with Cope's needle for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7239-7246.

Apoiadores PulmãoRJ



Apoiadores SOPTERJ

