



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ÍTALO JOSÉ MESQUITA CAVALCANTE

DISCRIMINAÇÃO DAS ISOENZIMAS DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) EM
FLUIDOS CORPORAIS HUMANOS

FORTALEZA

2010

ÍTALO JOSÉ MESQUITA CAVALCANTE

DISCRIMINAÇÃO DAS ISOENZIMAS DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) EM
FLUIDOS CORPORAIS HUMANOS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale

FORTALEZA

2010

C365d Cavalcante, Ítalo José Mesquita

Discriminação das isoenzimas da adenosina desaminase (ADA) em fluidos corporais humanos / Ítalo José Mesquita Cavalcante. – Fortaleza-Ce, 2010.

124 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Adenosina Desaminase 2. Isoenzimas 3. Eletroforese em Gel de Agar 4. Líquido Extracelular I. Vale, Marcus Raimundo (Orient.) II. Título.

CDD: 615.704

ÍTALO JOSÉ MESQUITA CAVALCANTE

DISCRIMINAÇÃO DAS ISOENZIMAS DA ADENOSINA DESAMINASE (ADA) EM
FLUIDOS CORPORAIS HUMANOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 15 de janeiro de 2010.

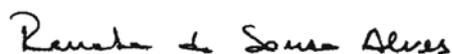
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC



Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Universidade Federal do Ceará – UFC



Profª. Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Aos meus pais César Cavalcante e Socorro Mesquita, alicerces que estruturaram meu ser. É um grande orgulho tê-los como o espelho para minha vida.

Aos meus irmãos César e Caroline (in memoriam), à minha irmã do coração Ticianara Saraiva e aos meus cunhados João Paulo, Raquel e Sabrina por fazerem parte de minha família.

Aos meus segundos pais Antônio Prado e Salete Moreira, por, além de me presentear com o seu bem mais valioso, acolherem-me tão carinhosamente em seu lar.

Em especial ao meu grande amor, Salene Cavalcante, minha musa inspiradora, para quem suspiro minhas declarações amorosas. Somente à você, a quem fiz minhas juras eternas de amor, entrego meu coração!

Ao meu querido filho Guilherme, semente de Deus na Terra, dedico a minha vida.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **DEUS**, por permitir que continuasse nesta caminhada até o final, dando-me força de vontade, garra e ajudando-me a ultrapassar todas as barreiras.*

*Ao Prof. Dr. **Marcus Raimundo Vale** pela orientação, amizade, respeito, ensinamentos, conselhos e enorme contribuição na realização deste trabalho.*

*À Prof^a. Dra. **Nylane Maria Nunes de Alencar**, por ter me acolhido em um dos momentos mais difíceis de minha jornada acadêmica.*

*Ao Prof. Dr. **Vietla Satyanarayana Rao** e à Prof^a. Dra. **Flávia Almeida Santos** por terem me ensinado a amar a ciência.*

*Ao Prof. Dr. **Reinaldo Barreto Oriá**, pelo conhecimento transmitido e apoio na execução deste trabalho.*

*Aos Professores Doutores **Alexandre Havt Bindá** e **Renata de Sousa Alves**, por aceitarem participar da banca avaliadora deste trabalho, e contribuírem significativamente nesta redação final.*

*Aos meus grandes amigos **Deive, Jonnathann, Michael, Roberto César e Rodney** por me ajudarem nesta difícil caminhada, por onde passamos por momentos felizes e por momentos difíceis.*

*Aos meus amigos de pós **Ana Paula, César, Danilo, Deyse, Flávio, Ingrid, Jozi, Karoline, (agora Prof. Dr.) Mário, Raquel Sombra e Tiago** e aos ICs **Carla, Cibele, Elmadan, Ingridzinha, Ivna, Luana, Lyara, Patrícia, Rachel, Robson e Tamires** pelo companheirismo nas horas de trabalho.*

*À **Patrícia Samara** por toda a ajuda fornecida para a realização deste trabalho.*

*À Prof^a **Maria Socorro Mesquita Cavalcante** pela correção gramatical e ortográfica.*

*Às bibliotecárias **Eliene Gomes e Rosane Costa** pela elaboração da ficha catalográfica e normalização da ABNT.*

*À Prof^a. Dra. **Helena Serra Azul Monteiro** (coordenadora), **Aura e Márcia** (secretárias) da Pós-Graduação, aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e do Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará.*

À CAPES pelo suporte financeiro.

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”

Albert Einstein

RESUMO

A adenosina desaminase (ADA – E.C.3.5.4.4.) é uma enzima fundamental no catabolismo das purinas. Ela catalisa a desaminação da adenosina ou 2'-deoxi-adenosina produzindo amônia e inosina ou 2'-deoxi-inosina, respectivamente. Sua atividade é expressa por 2 isoenzimas presentes em 3 isoformas. A ADA1 (36kDa) ou ADA1 ligada ao CD26 (280kDa) são amplamente distribuídas nos tecidos. Sua ação é particularmente importante porque altos níveis de 2'-deoxi-adenosina são tóxicos para as células do sistema imunológico. A ADA2 (100kDa) é normalmente encontrada no soro e sintetizada somente pelo sistema monocítico-macrofágico. A importância biológica da ADA2 ainda não está totalmente estabelecida, principalmente devido as suas características cinéticas. O presente trabalho teve como objetivo discriminar as isoenzimas da adenosina desaminase humana através de eletroforese em gel de agarose e pelo modelo proposto por Vale e Almeida (1998), bem como realizar um estudo descritivo retrospectivo sobre o perfil dos exames de ADA no Estado do Ceará. As amostras de líquido ascítico, pleural e pericárdico foram submetidas à eletroforese em agarose a 1% a 80 V por 7 horas. O gel foi fatiado e cada fatia foi incubada em adenosina (22 ou 0,55mM) por 20 horas para a detecção da amônia liberada pela reação enzimática. Os resultados encontrados a partir da eletroforese foram comparados com os resultados achados pelo modelo de Vale e Almeida (1998). O líquido pleural é o fluido que é mais frequentemente solicitado para a determinação da ADA, seguido pelos líquidos ascítico, cefalorraquidiano, pericárdico e soro. Observamos que os valores de atividade enzimática são influenciados pelo tipo de líquido corporal onde a enzima se encontra, podendo estar relacionada às barreiras corporais, tais como a barreira hematoencefálica. A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que o modelo matemático proposto pode ser usado em laboratórios clínicos para discriminar as isoenzimas da ADA.

Palavras-chave: Adenosina Desaminase. Isoenzimas. Eletroforese em Gel de Agar. Líquido Extracelular.

ABSTRACT

Adenosine deaminase (ADA – E.C.3.5.4.4.) is a fundamental enzyme in the catabolism of the purines. It catalyzes the deamination of adenosine or 2'-deoxy-adenosine producing ammonium and inosine or 2'-deoxyinosine, respectively. Its activity is expressed by two isoenzymes presented in three isoforms. ADA1 (36 kDa) and ADA1 bound to CD26 (280kDa) are widely distributed in the body tissues. Their action is particularly important because high levels of 2'-deoxy-adenosine are toxic for the immune system cells. ADA2 (100kDa) is normally found in serum and is synthesized only in monocyte-macrophage system. The biological importance of ADA2 is not yet fully clear, especially for its kinetics characteristics. The objective of the present work was to discriminate the isoenzymes of human adenosine deaminase using agarose electrophoresis and by mathematical model proposed by Vale and Almeida (1998). In addition, we performed a study of the profile of ADA tests in State of Ceara (Brazil). Samples of ascites, pleural and pericardial effusion were submitted to electrophoresis in 1% agarose at 80V for 7 hours. The gel was sliced and each slice was incubated in adenosine (22 or 0,55mM) for 20 hours to detect the ammonium released by enzymatic reaction. The results found from electrophoresis were compatible with the model proposed by Vale and Almeida (1998). The pleural fluid is the most frequently requested for the determination of ADA, followed by ascitic fluid, cerebrospinal fluid, pericardial fluid and serum. We observed that the value of enzymatic activity is influenced by corporal fluid type where the enzyme is localized. These data can be associated with the corporal barrier, like brain barrier. We concluded that the proposed mathematical model could be used in clinical laboratories to discriminate ADA isoenzymes to improve the diagnostic method.

Key words: Adenosine Deaminase. Isoenzymes. Electrophoresis. Agar Gel. Extracellular Fluid.

LISTA DE QUADROS

1	Principais agentes etiológicos para a meningite	34
2	Reagentes	44
3	Soluções	44
4	Aparelhos	45
5	Valores de corte (<i>cut off</i>) para a enzima adenosina desaminase nos fluidos corpóreos humanos	46

LISTA DE FIGURAS

1	Catabolismo dos nucleotídeos purínicos	23
2	Desaminação da adenosina e da 2'-deoxi-adenosina	24
3	Representação esquemática da Reação de Berthelot	48
4	Veias de acesso para coleta sanguínea periférica	50
5	a- Gel de agarose moldado sobre a ponte móvel; b- Ponte fixa; c- Cuba eletroforética aberta	52
6	Distribuição das amostras em função do sexo	58
7	Perfil das análises de ADA no líquido ascítico em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino	59
8	Perfil da atividade de ADA no líquido ascítico em função do sexo	60
9	Perfil das análises de ADA no líquido pericárdico em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino	61
10	Perfil da atividade de ADA no líquido pericárdico em função do sexo	62
11	Perfil das análises de ADA no líquido pleural em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino	63
12	Perfil da atividade de ADA no líquido pleural em função do sexo	64
13	Perfil das análises de ADA no líquido em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino	65
14	Perfil da atividade de ADA no líquido em função do sexo	66
15	Perfil das análises de ADA no soro em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino	67
16	Perfil da atividade de ADA no soro em função do sexo	68
17	Perfil das análises de ADA nos demais líquidos corpóreos. a- lavado brônquico; b- líquido sinovial; c- urina	69
18	Perfil da atividade de ADA no lavado brônquico, líquido sinovial e urina...	70
19	Variação da absorvância em função da variação do comprimento de onda ..	71
20	Curva de absorvância x concentração de sulfato de amônia	72

21	Curva de linearidade da reação de Berthelot	73
22	Curva de formação da cor / estabilidade	74
23	Produção de amônia pela ADA em função do tempo. a- Enzima incubada em adenosina 20mM. b- Enzima incubada em adenosina 0,5mM	75
24	Velocidade da reação enzimática em função do tempo de incubação. a- Enzima incubada em adenosina 20mM. b- Enzima incubada em adenosina 0,5mM	76
25	Variação da atividade enzimática em função da temperatura de incubação. a- Atividade enzimática entre a temperatura de -20 a 80°C. b- Atividade enzimática à 50°C em função do tempo	77
26	Influência do pH na atividade enzimática	78
27	Sentido de migração da ADA no gel de agarose. a- Migração de uma amostra de líquido pleural. b- Migração de uma amostra de ADA1 bovina .	79
28	Atividade enzimática em função do estado físico do gel	80
29	Atividade enzimática em função do tempo de incubação. a- Líquido ascítico. b- Líquido pericárdico	81
30	Perfil de migração da isoforma ADA1	82
31	Perfil comparativo da migração da isoforma ADA1 eritrocitária com as isoenzimas no líquido pleural	83
32	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pleural. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM	84
33	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido ascítico. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM	85
34	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pericárdico. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM	86
35	Gráfico de dispersão eletroforese vs modelo Vale e Almeida (1998). a- Correlação linear entre os valores da isoforma ADA1 na eletroforese vs modelo de Vale e Almeida (1998). b- Correlação linear entre os valores da isoforma ADA2 na eletroforese vs modelo de Vale e Almeida (1998).....	89

LISTA DE TABELAS

1	Valores da atividade da adenosina desaminase através da eletroforese em gel de agarose	87
2	Valores de atividade das isoenzimas da adenosina desaminase obtidos a partir do modelo proposto por Vale e Almeida (1998)	88
3	Comparação do perfil das isoenzimas da adenosina desaminase obtidos a partir de eletroforese em gel de agarose com o modelo proposto por Vale e Almeida (1998)	88

LISTA DE SIMBOLOS

$\Delta[P]$	Varição da concentração de produto (amônia)
Δt	Varição de tempo
$[P]_{t_1}$	Concentração de produto formado no tempo imediatamente anterior ao tempo escolhido para medição.
$[P]_{t_2}$	Concentração de produto formado no tempo escolhido para a medição.
5'-NT	5'-nucleotidase

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	Atividade da isoenzima ADA1 usando adenosina
A ₁	Receptor purinérgico da adenosina tipo A ₁
A2	Atividade da isoenzima ADA2 usando adenosina
A ₂	Receptor purinérgico da adenosina tipo A ₂
A ₃	Receptor purinérgico da adenosina tipo A ₃
Abs	Absorbância
Ad	Adenosina
ADA	Adenosina desaminase
ADA1	Adenosina desaminase isoforma 1
ADA1-CD26	Adenosina desaminase isoforma 1 ligada ao CD26
ADA2	Adenosina desaminase isoforma 2
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina tri-fosfato
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
AK	Adenosina quinase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA	Analyses of variance (análise de variância)
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
C _{amônia}	Concentração de amônia
CD	Cluster differentiation
cm	Centímetro
COMEPE	Comitê de ética em pesquisa
CSF	Cerebrospinal fluid (Líquido cefalorraquidiano / líquido)
D1	Atividade da isoenzima ADA1 usando 2'-deoxi-adenosina

D2	Atividade da isoenzima ADA2 usando 2'-deoxi-adenosina
dAd	Deoxi-adenosina
dATP	Deoxi-adenosina trifosfato
DPPIV	Dipeptidil peptidase IV
DPPIV-CD26	Dipeptidil peptidase IV ou CD26
E.C.	Enzyme commission
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EHNA	erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine hydrochloride
E.P.M.	Erro padrão da média
G _i	Proteína "G" inibitória
G _s	Proteína "G" estimulatória
GMP	Guanosina mono-fosfato
GPCR	G-protein-coupled receptors (Receptores acoplados à proteína G)
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIV	Human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)
K ⁺	Íon potássio
kDa	Quilo Dalton
K _m	Constante de Michaelis-Menten
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
min	Minutos
μL	Microlitros
mL	Mililitros
μM	Micro molar
mM	Mili molar
mm	Milímetro
mm ³	Milímetro cúbico
Na ₂ [Fe(CN) ₅ NO]·2H ₂ O	Nitroprussiato de sódio
NaCl	Cloreto de sódio

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sulfato de amônia
NH_3	Amônia
nm	Nanometros
O_2	Oxigênio
p	Probabilidade de ocorrência da hipótese nula
P1	Receptores purinérgicos tipo 1
P2	Receptores purinérgicos tipo 2
P_{2x}	Receptores purinérgicos subtipo 2x
P_{2y}	Receptores purinérgicos subtipo 2y
p/v	Peso por volume
PEG-ADA	ADA ligada a polietileno glicol
pH	Potencial de hidrogênio
Pi	Fosfato inorgânico
pI	Ponto isoelétrico
pK_a	Constante de equilíbrio ácido-base
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfato
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosil homocisteína
SCID	Severe combined immunodeficiency (Imunodeficiência severa combinada)
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
SMF	Sistema mononuclear fagocítico
Ta	Atividade total usando adenosina
Td	Atividade total usando 2'-deoxi-adenosina
tempo "x"	Tempo escolhido para a medição pontual
t_1	Tempo imediatamente anterior ao tempo escolhido para medição.
t_2	Tempo escolhido para a medição
UFC	Universidade Federal do Ceará
U/L	Unidade por litro

SUMÁRIO

1	Introdução	20
1.1	Adenosina	20
1.2	Adenosina desaminase (ADA)	21
1.3	Deficiência de ADA	25
1.4	Participação da ADA em diversas patologias	27
1.4.1	Neoplasias	28
1.4.2	Tuberculose	29
1.4.3	Tuberculose pleural vs neoplasia pleural	31
1.4.4	Tuberculose peritoneal	32
1.4.5	Pericardite tuberculosa	33
1.4.6	Meningite	34
1.4.7	Infecções virais	35
1.4.8	Leishmaniose	36
1.4.9	Doença de Behçet	37
1.4.10	Anemia hemolítica hereditária	38
1.5	Modelo de Vale e Almeida (1998)	39
1.6	Métodos de determinação da ADA	40
1.7	Justificativa	40
2	Objetivos	42
2.1	Objetivos gerais	42
2.2	Objetivos específicos	42
3	Materiais	43
3.1	Perfil dos exames realizados	43
3.2	Amostras analisadas por eletroforese e pelo modelo Vale e Almeida (1998)	43
3.3	Reagentes e soluções	44
3.4	Aparelhos	45
4	Métodos	46
4.1	Análise do perfil dos exames de ADA no Ceará	46

4.1.1	Critérios de exclusão	46
4.2	Determinação da faixa de comprimento de onda para leitura.....	47
4.3	Determinação da curva de calibração da reação	47
4.4	Determinação da curva de formação da cor/ estabilidade	47
4.5	Ensaio da enzima	47
4.6	Determinação da amônia: reação de Berthelot	48
4.7	Avaliação do tempo de incubação da amostra	49
4.8	Avaliação da temperatura na incubação da amostra	49
4.9	Avaliação do pH na incubação da amostra	50
4.10	Obtenção da adenosina desaminase eritrocitária	50
4.11	Eletroforese	51
4.12	Atividade da enzima no gel	53
4.13	Avaliação do sentido de migração da ADA no gel de agarose	53
4.14	Avaliação do estado físico do gel na atividade enzimática	53
4.15	Avaliação do tempo de incubação das fatias do gel de agarose	54
4.16	Discriminação das isoenzimas da ADA no gel de agarose	54
4.17	Mensuração da atividade enzimática no gel	55
4.18	Discriminação das isoenzimas da ADA: Modelo de Vale e Almeida (1998)	55
4.19	Modelo de Vale e Almeida (1998) vs eletroforese	56
4.20	Comitê de ética	57
4.21	Análise estatística	57
5	Resultados	58
5.1	Análise do perfil dos exames de ADA no Ceará	58
5.1.1	Perfil dos exames de ADA no líquido ascítico	59
5.1.2	Perfil dos exames de ADA no líquido pericárdico	61
5.1.3	Perfil dos exames de ADA no líquido pleural	63
5.1.4	Perfil dos exames de ADA no líquido	65
5.1.5	Perfil dos exames de ADA no soro	67
5.1.6	Perfil dos exames de ADA nos demais fluidos corpóreos	69
5.2	Determinação da faixa de comprimento de onda para leitura	71
5.3	Determinação da curva de calibração da reação	72
5.4	Determinação da curva de formação da cor/ estabilidade	74
5.5	Avaliação do tempo de incubação da amostra	75

5.6	Avaliação da temperatura na incubação da amostra	77
5.7	Avaliação do pH na incubação da amostra	78
5.8	Avaliação do sentido de migração da ADA no gel de agarose	79
5.9	Avaliação do estado físico do gel na atividade enzimática	80
5.10	Avaliação do tempo de incubação da amostra	81
5.11	Discriminação das isoenzimas da ADA no gel de agarose	82
5.11.1	Perfil de migração da isoforma ADA1	82
5.11.2	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pleural	83
5.11.3	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido ascítico	85
5.11.4	Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pericárdico	86
5.12	Modelo de Vale e Almeida (1998) vs eletroforese	87
6	Discussão	91
7	Considerações finais	100
8	Conclusões	102
	Referências	103
	Apêndices	118
	Anexos	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo purínico que age como sinal extracelular mediando um grande número de respostas via interação com receptores de membrana acoplados à proteína G (GPCR) (RODEN, 2005; RODWELL, 1998).

A produção de adenosina pode ocorrer em consequência da desfosforilação da adenosina monofosfato (AMP) pela 5'-nucleotidase (5'-NT) citosólica, por sua formação extracelular através da 5'-NT da membrana ou como produto da hidrólise da S-adenosil homocisteína (SAH), um produto da via da transmetilação da S-adenosil metionina. A adenosina pode também ser refosforilada pela adenosina quinase (AK) e formar, por consequência, o AMP ou pode, diferentemente, ser catabolizada pela adenosina desaminase (ADA), formando a inosina e na seqüência, a hipoxantina, xantina e ácido úrico ou alantoína, dependendo do tecido e da espécie animal (RODRIGUES, 2001).

A adenosina é encontrada sob a forma livre no citosol de todas as células e transportada por um transportador de membrana. A adenosina presente nos tecidos provém dessa fonte e do ATP ou ADP liberados (RANG *et al.*, 2004).

Foram caracterizados duas grandes famílias de receptores purinérgicos. Na classe P1 estão os GPCR, depois subdivididos em: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Os receptores A₁ e A₃ são acoplados à proteína G_i e estão associados à inibição da adenilato ciclase, à inibição de correntes de K⁺, à ativação de fosfolipase C em algumas circunstâncias e à regulação do canal iônico, enquanto os receptores A₂ ativam proteínas G_s que estimulam a adenilato ciclase (MARTINS, 2007; RODEN, 2005). Os receptores P₂ apresentam os subtipos P_{2x} e P_{2y} que respondem ao ATP e/ ou ADP. Os receptores P_{2x} são do tipo ionotrópicos multiméricos, enquanto que os receptores P_{2y} são GPCR acoplados à adenilato ciclase ou ao metabolismo dos fosfoinositídeos (RANG *et al.*, 2004).

Entre os efeitos fisiológicos da adenosina podemos citar a vasodilatação, inclusive dos vasos coronarianos, via receptor A₂ (exceto nos rins onde temos uma vasoconstrição via

receptor A₁), inibição da agregação plaquetária (receptor A₂), bloqueio da condução atrioventricular cardíaca (receptor A₁), broncoconstrição, particularmente em indivíduos asmáticos (receptor A₁), liberação de mediadores dos mastócitos (receptor A₃), estimulação de neurônios nociceptivos aferentes, particularmente no coração (receptor A₂) onde provavelmente atua no mecanismo da dor anginosa, dentre outros (RANG *et al.*, 2004).

A adenosina é um importante agente antiinflamatório, devido sua potente ação supressora em, virtualmente, todas as células do sistema imunológico (HASKO; CRONSTEIN, 2004). Bloqueia a adesão de neutrófilos (CRONSTEIN *et al.*, 1986), maturação e quimiotaxia de monócitos (FISCHER *et al.*, 1976), produção de íons superóxido pelos neutrófilos (CRONSTEIN *et al.*, 1985), citotoxicidade das células “killers” e “natural killers” (GREVER *et al.*, 1982), liberação de citocinas (BOUMA *et al.*, 1996), inibição da síntese de leucotrieno B₄ (LTB₄) (KRUMP *et al.*, 1996) e a liberação de histamina pelos basófilos (MARONE *et al.*, 1979).

A adenosina também é utilizada como medicamento devido as suas propriedades cardiovasculares, sendo utilizada para induzir hipotensão controlada em alguns procedimentos cirúrgicos e no diagnóstico de doenças na artéria coronária. Sua ação ocorre através da ativação da corrente de K⁺ sensível à acetilcolina no átrio e nos nódulos átrio-ventriculares e sinusal, resultando em encurtamento da duração do potencial de ação, hiperpolarização e retardamento da automaticidade normal (RODEN, 2005).

Seus níveis são modulados por intermédio de enzimas especializadas, dentre as quais a mais importante é a adenosina desaminase.

1.2 Adenosina desaminase (ADA)

A adenosina desaminase (adenosina aminohidrolase; ADA; E.C. 3.5.4.4), é uma enzima amplamente distribuída nos tecidos animais e em microorganismos. Em plantas, somente uma fonte da enzima foi referida em preparações comerciais de malte diástase e, posteriormente, extraída das raízes de cevada desidratada (RODRIGUES, 2001).

A ADA em humanos é expressa por duas isoenzimas presentes em três isoformas: ADA1, ADA1+Complexo Protéico (ADA1-CD26) e ADA2. (UNGERER *et al.*, 1992; WEYDEN; KELLEY, 1976). A ADA é uma enzima que participa da degradação das purinas (**figura 1**), catalisando a desaminação da adenosina (ou deoxi-adenosina) formando inosina (ou deoxi-inosina) e amônia (**figura 2**).

A ADA1 é uma proteína monomérica com massa molecular de aproximadamente 36 kDa, codificada no cromossomo 20, na região da banda 20q13.11 (PETERSEN *et al.*, 1987; PHILLIP *et al.*, 1980; UNGERER *et al.*, 1992), sendo amplamente distribuída nos tecidos. A ADA1 desamina eficientemente a adenosina (Ad), com um Km de $5,2 \times 10^{-5}$ M, e a 2'deoxi-adenosina (dAd), apresentando uma razão dAd/Ad de 0,75, funcionando como agente modulador dos níveis, intra e extracelulares de Ad e dAd (GAKIS, 1996).

A ADA1-CD26, consiste na ADA1 formando um complexo protéico com a enzima dipeptidil peptidase IV-CD26 (DPPIV-CD26), com massa molecular de aproximadamente 280 kDa, codificada nos cromossomos 2 e 6 (SHAROYAN *et al.*, 2006; UNGERER *et al.*, 1992), estando envolvida diretamente na ativação dos linfócitos T (DONG *et al.*, 1996).

A enzima DPPIV (E.C. 3.4.14.5) é uma glicoproteína multifuncional amplamente distribuída, expressa como um homodímero de 210 kDa ligado não covalentemente na superfície de praticamente todos os tecidos de mamíferos. Ela é definida como um antígeno CD26 em linfócitos T ativados e tímócitos, desenvolvendo um papel importante nos sistemas imunológico e endócrino, mobilização da medula óssea, crescimento de câncer e adesão celular. Os substratos para a DPPIV são várias quimiocinas e neuropeptídeos, o peptídeo glucagon-like e o peptídeo insulínico dependente de glicose. A forma solúvel da DPPIV-CD26 ocorre no soro, líquido seminal, líquido pleural, bile e nos rins (SHAROYAN *et al.*, 2006).

A ADA2 é uma isoenzima que coexiste com a ADA1 apenas em monócitos e macrófagos, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa, apresenta baixa afinidade pela adenosina, com um Km de 200×10^{-5} M e pela 2'deoxi-adenosina, apresentando uma razão dAd/Ad de 0,25 (GAKIS, 1996; UNGERER *et al.*, 1992; WEYDEN; KELLEY, 1976), sendo uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças inflamatórias e infecciosas como tuberculose, febre tifóide, hepatite viral e AIDS (GAKIS *et al.*, 1989).

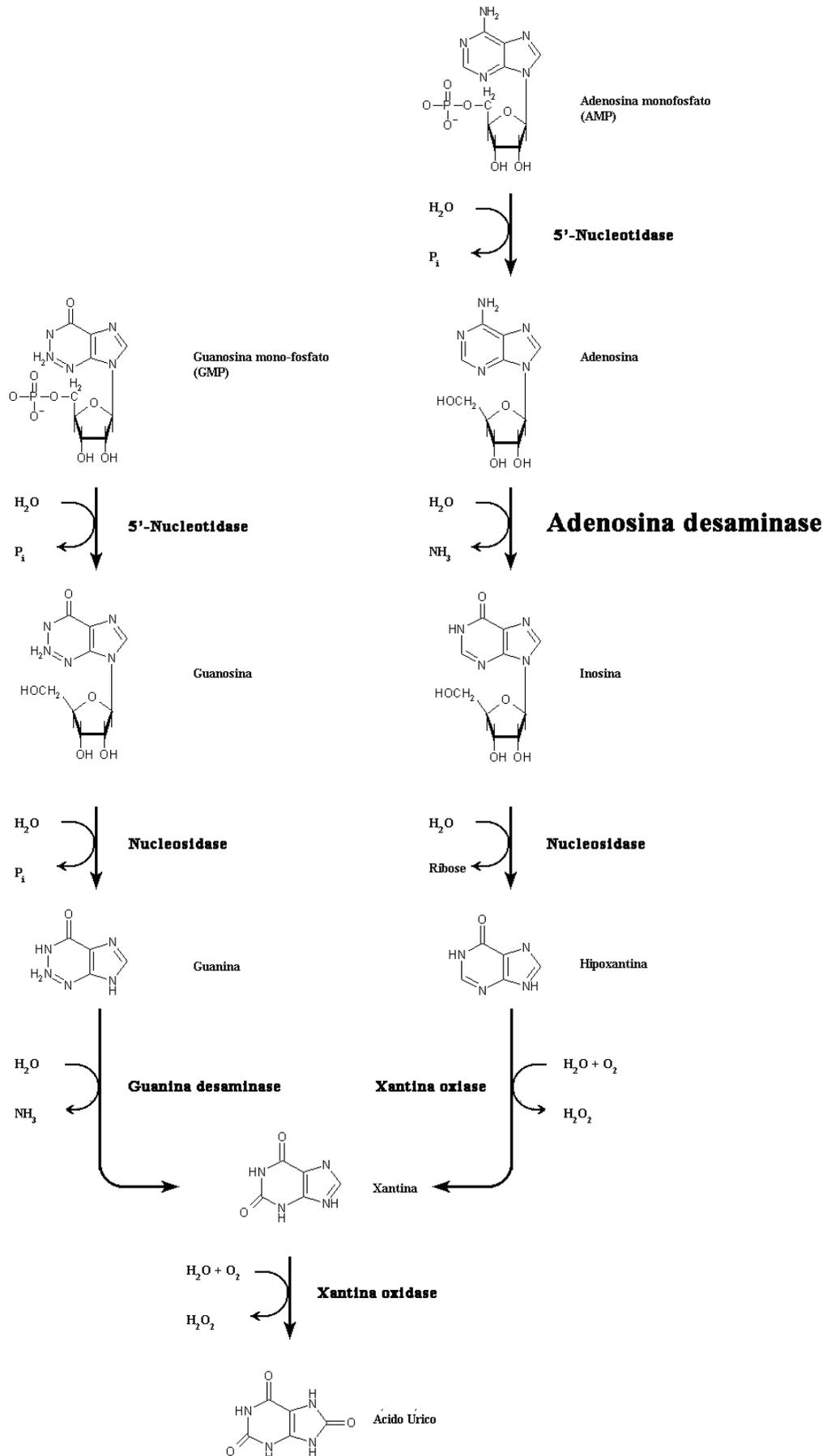


Figura 1: Catabolismo dos nucleotídeos purínicos
Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2002a)

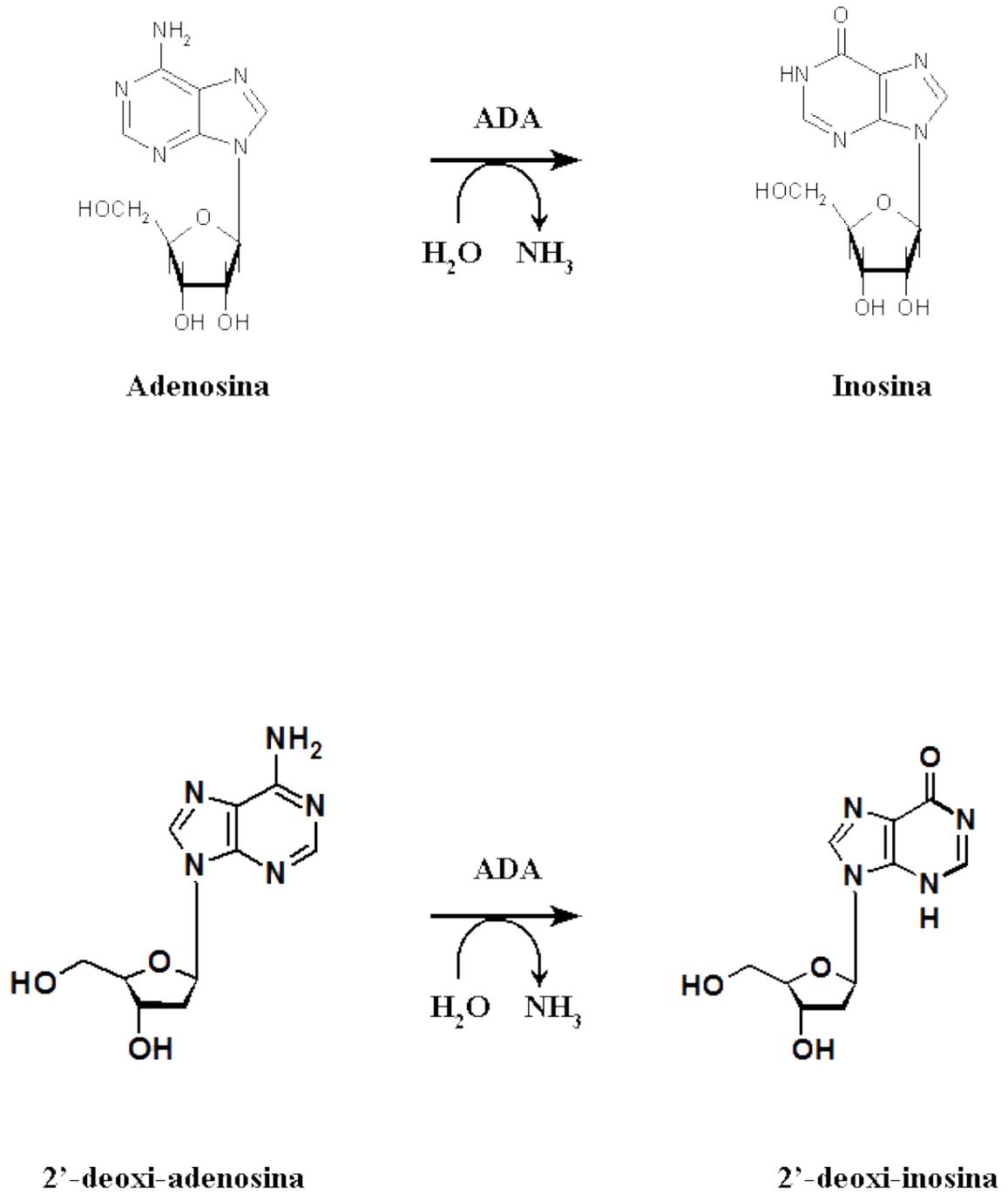


Figura 2: Desaminação da adenosina e da 2'-deoxy-adenosina

O poder antiinflamatório da adenosina tem despertado o interesse nas pesquisas de novos agentes terapêuticos. A possibilidade de que um inibidor da ADA possa mudar a concentração da adenosina especificamente no foco inflamatório, tem despertado o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento em potencial de um agente antiinflamatório com poucos efeitos colaterais (BARRETO *et al.*, 2007; TERASAKA, 2004).

Atualmente, os inibidores da ADA disponíveis no mercado apresentam uma série de desvantagens para o uso clínico, tais como problemas na sua farmacocinética e/ ou efeitos tóxicos severos. Dentre os inibidores da ADA utilizados na clínica médica podemos citar a pentostatina (ou 2'-deoxi-conformicina) que promove um acúmulo intracelular de nucleotídeos de adenosina e de deoxi-adenosina, bloqueando a síntese de DNA ao inibir a ribonucleotídeo redutase. A deoxi-adenosina inativa a S-adenosil hemocisteína hidrolase, promovendo um acúmulo de S-adenosil cisteína, que é tóxica para os linfócitos. Em combinação com a deoxi-adenosina, a pentostatina é capaz de induzir apoptose em células da leucemia monocitóide humana. Clinicamente este fármaco é utilizado como antineoplásico na leucemia de células pilosas e nos linfomas de células T (CHABNER *et al.*, 2005).

1.3 Deficiência de ADA

A deficiência de ADA é um raro distúrbio hereditário no metabolismo das purinas que leva ao aparecimento de anormalidades na função e desenvolvimento do sistema imunológico e vários defeitos sistêmicos (GASPAR *et al.*, 2009). Foi identificada em 1972, como sendo uma causa para a Imunodeficiência Severa Combinada (*Severe Combined Immunodeficiency -SCID*), representando aproximadamente 17% de todos os casos de SCID. Aproximadamente, 50% de todos os casos de SCID autossômica recessiva por deficiência de ADA são causadas por mutações no cromossomo 20q13.2-q13.11, resultando em acúmulo de adenosina, 2'-deoxi-adenosina e 2'-o-metil-adenosina. Estes produtos levam, diretamente ou indiretamente, a apoptose de linfócitos, resultando em ausência de linfócitos T, B e células *Natural Killer*, ou comprometendo as suas funções (ÖZDEMIR, 2006).

Em aproximadamente 85 – 90% dos pacientes com SCID, os sinais clínicos iniciam antes do primeiro ano de vida, enquanto que 15 – 20 % dos pacientes podem

apresentar um atraso da sintomatologia entre a idade de 1 a 8 anos. Têm sido visto ainda casos mais tardios da doença, com início após os 10 anos de idade, com a função imunológica completamente normal. Os indivíduos que apresentam deficiência genética de ADA, mas mantêm as funções imunológicas normais, são descritos como portadores de deficiência parcial (ÖZDEMIR, 2006).

A fisiopatologia da síndrome causada pela deficiência de ADA parece estar relacionada com o acúmulo dos substratos e sua subsequente metabolização a ATP e dATP. O acúmulo de nucleotídeos e nucleosídeos podem mediar vários eventos celulares, tais como; inibição da ribonucleotídeo redutase, a qual impede a proliferação de células imunocompetentes; depleção dos depósitos de pirimidina, devido a redução na síntese de 5-fosforibosil-1-pirofosfato (PRPP); seqüestro de hemocisteína, como a S-adenosil hemocisteína, que levará ao comprometimento das reações de metilação; modificação dos níveis celulares de AMP cíclico (AMPC); e bloqueio pela adenosina do estágio da prostaglandina dependente de cálcio da ativação linfocitária (FRANCO *et al.*, 1990).

A ausência de ADA leva a um acúmulo de deoxi-adenosina nos compartimentos intracelular e extracelular. No interior da célula, a deoxi-adenosina é convertida em deoxi-adenosina-trifosfato (dATP) através da enzima deoxi-citidina quinase levando a um aumento dos depósitos de dATP. O acúmulo de dATP e deoxi-adenosina têm efeitos deletérios no desenvolvimento e função dos linfócitos, sendo a principal causa dos defeitos no sistema imunológico (GASPAR *et al.*, 2009).

Os pacientes com deficiência de ADA apresentam os mesmos achados clínicos de outros tipos de SCID. Esses pacientes apresentam um sistema imunológico enfraquecido, apresentando infecções graves recorrentes, diarreia e deficiência no desenvolvimento. Os sinais clínicos desta doença são: linfopenia profunda; anormalidades esqueléticas; toxicidade metabólica sistêmica, com alterações em alguns órgãos não-linfóides; anormalidades neurológicas como distúrbios de movimento, nistagmo, surdez, anormalidades comportamentais cognitivas; e, em autópsias, apresentam esclerose mesangial renal, adrenal e na glândula pituitária (ÖZDEMIR, 2006).

A deficiência hereditária de ADA tem um curso fatal devido a múltiplas infecções. A conduta inicial destes pacientes deve ser reposição endovenosa de imunoglobulinas e a quimioprofilaxia com sulfametoxazol e trimetoprima. Se os pacientes

receberem a vacinação como o Bacilo de Calmette-Guerin (vacina BCG), então a terapia antimicrobacteriana deve ser indicada. Todas as imunizações com organismos vivos devem ser evitadas (ÖZDEMIR, 2006).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas entre doadores compatíveis apresenta uma boa resposta bioquímica e imunológica, com uma taxa de sobrevivência maior que 85%. Embora o tratamento de escolha para a SCID seja o transplante de medula óssea, menos de um terço dos pacientes tem acesso a um doador apropriado. Um tratamento alternativo é a reposição da enzima utilizando a ADA bovina ligada a polietileno glicol (PEG-ADA). Apesar de ser bastante dispendioso, o tratamento com PEG-ADA pode salvar a vida de pacientes que não conseguem doadores de medula óssea. A reposição com PEG-ADA reconstitui parcialmente a função imunológica da maioria dos pacientes com SCID, e, somente poucos pacientes não respondem bem ao tratamento (GASPAR *et al.*, 2006; ONODERA *et al.*, 1998).

Por outro lado, uma super-atividade da ADA está relacionada à anemia hemolítica hereditária devido ao aumento do catabolismo dos substratos que resulta em uma diminuição global nos depósitos de adenina ribonucleotídeo em eritrócitos, bem como a destruição prematura das células vermelhas (CHOTTINER *et al.*, 1987; FRANCO *et al.*, 1990).

1.4 Participação da ADA em diversas patologias

A atividade sérica da ADA está aumentada em diversas doenças caracterizadas pela proliferação ou ativação de células T. Portanto, a determinação de sua atividade sérica pode refletir a atividade das doenças mediadas via células T (CANPOLAT *et al.*, 2006).

A mensuração da atividade da ADA em fluidos biológicos é muito útil na clínica médica. Contudo, a atividade da ADA nos fluidos corporais é devido a uma mistura entre ADA1 e ADA2 (GAKIS, 1996). A ADA2 pode ser utilizada como um marcador da presença de parasitas vivos no sistema monocítico macrofágico (GAKIS, 1989).

1.4.1 Neoplasias

Neoplasia significa literalmente o processo de um “novo crescimento” e o novo crescimento é chamado de *neoplasma*. O termo tumor foi originalmente aplicado ao edema causado pela inflamação. Os neoplasmas também causam edemas, mas já há muito tempo o emprego não-neoplásico de tumor saiu de uso, sendo o termo considerado como sinônimo de neoplasma. Câncer é o termo comum para todos os tumores malignos. Embora a origem deste termo seja um pouco incerta, ela provavelmente é originada do termo em latim para caranguejo (*cancer*), presumivelmente porque um câncer “agarra-se de uma maneira obstinada a qualquer parte de que se apodera, como o caranguejo” (VINAY *et al.*, 2005).

Os níveis de ADA têm sido estudados em pacientes com diversos tipos de tumores. Alguns autores sugerem que o aumento da atividade de ADA desempenha um importante papel nas vias de recuperação das purinas e pirimidinas de células e tecidos cancerígenos (CAMICI *et al.*, 1990; DORNARD *et al.*, 1982), enquanto outros autores propõem um aumento da atividade da ADA como um mecanismo compensatório contra ao acúmulo de substratos tóxicos devido ao aumento do metabolismo acelerado das purinas e pirimidinas nas células e tecidos cancerígenos (DONOFRIO *et al.*, 1978; HERSFIELD; KREDICH, 1980).

Na leucemia linfóide aguda, a ADA1-CD26 é inicialmente a isoforma responsável pelo aumento total da ADA sérica. A ADA é encontrada em pequenas quantidades em soro normal, mas aumenta significativamente em pacientes com leucemia linfóide aguda e durante as crises blásticas da leucemia linfóide crônica (GAKIS *et al.*, 1982; UNGERER *et al.*, 1992). A atividade da ADA sérica é uma ferramenta útil como marcador tumoral e como prognóstico na evolução do tratamento dos pacientes (UNGERER *et al.*, 1992).

Eroğlu *et al.* (2000) descrevem a atividade de ADA no câncer colo retal, correlacionando a sua atividade com a localização do tumor, mostrando que a enzima apresenta diferenças específicas dentro da mesma região (colo vs reto).

Os níveis séricos de ADA são afetados por alguns fatores, tais como o extravasamento celular da enzima, indução enzimática em alguns tecidos específicos por alguns fatores e a proliferação de tipos celulares específicos. Entretanto, o aumento da

atividade de ADA pode dar uma vantagem seletiva para as células cancerígenas para crescer e desenvolver mais rapidamente (YILDIRIM *et al.*, 1999). Esse rápido crescimento pode ocorrer devido a adenosina inibir a proliferação tumoral tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DJALDETTI *et al.*, 1996; FISHMAN *et al.*, 1998). Alguns estudos relatam que a adenosina pode inibir a proliferação de células transformadas por vírus, células neoplásicas de várias origens (COLQUHOUN; NEWSHOLME, 1997; ISHII; GREEN, 1973; TEY *et al.*, 1992; WEISMAN *et al.* 1988) ou iniciar a apoptose em células cancerígenas sob certas circunstâncias (BAJAJ *et al.*, 1983; BARRY; LIND, 2000; TANAKA *et al.*, 1994).

Entretanto, existem evidências que a adenosina pode aumentar a proliferação de células leucêmicas (COLQUHOUN; NEWSHOLME, 1997; ORRICO *et al.*, 1991), carcinomas (LELIÈVRE *et al.*, 1998a; LELIÈVRE *et al.*, 1998b; TEY *et al.*, 1992) e astrocitoma (RATHBONE *et al.*, 1992).

A proliferação de células normais não foram afetadas nem estimuladas na presença de adenosina, levando a sugerir que a adenosina pode ser um inibidor específico do crescimento celular. Estes efeitos parecem estar mediados pelos receptores do subtipo A₃ da adenosina (FISHMAN *et al.*, 2000; OHANA *et al.*, 2001).

1.4.2 Tuberculose

A tuberculose tem como agente etiológico o complexo *Mycobacterium tuberculosis*, constituído pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Atualmente, é a causa de morte por doença infecciosa mais comum em todo o mundo. O Brasil, juntamente com outros 21 países em desenvolvimento, detém 80% dos casos mundiais da doença, apresentando aproximadamente 85 mil casos novos da doença por ano, com cerca de 5 a 6 mil mortes (BRASIL, 2005c).

O padrão ouro para o diagnóstico de tuberculose pleural é a identificação do *M. tuberculosis* no fluido pleural ou no tecido. Na prática médica, esta identificação é um problema devido à baixa taxa de identificação e ao lento crescimento do mycobacterium em cultura (ANTONANGELO *et al.*, 2007).

A tuberculose pleural é uma das formas mais freqüentes de apresentação extra-pulmonar da moléstia e pode apresentar até 10% de todos os casos da doença. Os métodos convencionais bastante úteis para o diagnóstico de tuberculose pulmonar têm baixo rendimento quando realizados no líquido pleural. A pesquisa direta do bacilo álcool-ácido resistente no líquido pleural pelo Ziehl-Neelsen é positiva em menos de 5% dos casos, e a cultura no meio de Löwenstein-Jensen não ultrapassa 40% dos casos. A tuberculose pleural é resultante de uma cascata de reações imunológicas que ocorrem como resposta à presença de antígenos bacterianos na cavidade pleural. O *Mycobacterium tuberculosis* raramente está presente na cavidade pleural e esta é a razão para que, a maioria dos exames diretos para tuberculose no líquido pleural, apresente resultados negativos (KAISEMANN *et al.*, 2004; ZARIĆ *et al.*, 2008).

Desde 1978, a atividade da ADA foi encontrada aumentada nos exsudatos pleurais tuberculosos e a detecção de sua atividade tem sido usada no diagnóstico de tuberculose pleural, apresentando uma sensibilidade de 99% e especificidade de 93%. Altos níveis de atividade de ADA, também podem ser encontrados em líquido pleural decorrente de outros processos ou lesões, especialmente pneumonia, empiema, linfoma, neoplasia e lúpus eritematoso sistêmico (VALDÉS *et al.*, 1996). A ADA2 é então liberada pelos macrófagos, quando estimulados pela presença de microorganismos vivos em seu interior. O aumento da atividade da ADA na tuberculose pleural é devido principalmente a ADA2, estimando-se em até 80% da atividade total da enzima (VALDÉS *et al.*, 1996; ZARIĆ *et al.*, 2008).

Castelo Filho *et al.* (2004) descrevem a realização da dosagem da atividade da adenosina desaminase como um dos métodos diagnósticos mais importantes para o diagnóstico da tuberculose extra-pulmonar, sendo um exame de fácil execução, baixo custo e bom rendimento.

Na tuberculose, a história clínica, o conhecimento da epidemiologia da doença na região, a análise bioquímica, a citologia do líquido pleural e a dosagem de ADA permitem o diagnóstico e agilizam o tratamento. É aceitável o início da terapêutica anti-tuberculose, com acompanhamento clínico, a partir da combinação entre a história clínica sugestiva de tuberculose, líquido pleural exsudativo com citometria quantitativa com predomínio de linfócitos (>75%), ausência de células neoplásicas na citologia e atividade de ADA >40U/L (CASTELO FILHO *et al.*, 2004).

1.4.3 Tuberculose pleural vs neoplasia pleural

A maioria dos casos de derrame pleural ocorre em decorrência de tuberculose ou câncer. O primeiro passo na investigação etiológica de um derrame pleural é determinar se o derrame é um transudato ou um exsudato. Transudados refletem a presença de uma doença sistêmica com repercussão nos mecanismos de produção e reabsorção do líquido pleural, enquanto que os exsudatos refletem a presença de uma doença pleural primária e requer uma investigação etiológica (ANTONANGELO *et al.*, 2007; MASKELL; BUTLAND, 2003).

O isolamento do *M. tuberculosis* é difícil devido à pleurisia tuberculosa ser um evento primariamente imunológico com pequena quantidade de bacilos tuberculosos (VALDÉS *et al.*, 1998). A demonstração do granuloma na amostra de biópsia a partir da pleura parietal, aliado a marcadores como a adenosina desaminase e interferon-gama, sugerem uma pleurisia tuberculosa (GOTO *et al.*, 2003; GRECO, *et al.*, 2003).

A atividade da adenosina desaminase é o melhor marcador bioquímico para o diagnóstico de tuberculose pleural (AOKI *et al.*, 1994; BLAKE; BERMAN, 1982; ENA *et al.*, 1990; MELO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1994), fornecendo uma base para a decisão de tratamento devido a sua alta sensibilidade, independentemente da sorologia para o HIV (MELO *et al.*, 2000; RIANTAWAN *et al.*, 1999).

Yildirim *et al.* (1999) relataram a importância do sistema imunológico e, particularmente, a resposta mediada por linfócitos para o desenvolvimento de neoplasias, sendo um importante fator do hospedeiro em pacientes com câncer. No líquido pleural, a principal fonte de ADA são os linfócitos ou as células do sistema monocítico-macrofágico, podendo ocorrer mudanças no perfil da população de linfócitos dependendo do tipo de tumor, com um domínio de linfócitos T CD4+, especialmente linfócitos T-helper tipo 2 em efusões malignas como resposta secundária ao desenvolvimento de câncer de pulmão ou ao câncer de mama. (YILDIRIM *et al.*, 2007).

DeLong *et al.* (2005) relatam que a proporção de linfócitos T CD8+ é significativamente maior que os linfócitos T CD4+ em efusões pleurais de pacientes com mesotelioma maligno, fato que fez o autor sugerir que diferentes tipos de tumores podem iniciar diferentes tipos de respostas das células imunológicas do hospedeiro.

O diagnóstico de um derrame pleural neoplásico é feito baseando-se na presença de células malignas no líquido pleural ou tecido de biópsia. A taxa de positividade nos exames citológicos varia entre 40 a 87%, maior que o obtido com uma biópsia que varia entre 35 a 65% (ANTONANGELO *et al.*, 2007). O maior obstáculo no diagnóstico de efusões malignas é a presença de resultados citológicos falsos negativos em aproximadamente 40% dos casos (MASKELL; BUTLAND, 2003).

1.4.4 Tuberculose peritoneal

A peritonite tuberculosa é a sexta localização mais freqüente de tuberculose extrapulmonar (HARLAN; GRIMM, 1997), apresentando sintomas inespecíficos como febre, dor abdominal e perda de peso (AGUADO *et al.*, 1990).

A confirmação da tuberculose peritoneal é difícil e demorada devido a necessidade da confirmação histológica dos granulomas caseosos ou pela confirmação bacteriológica através da coloração de Ziehl-Nielsen (coloração de BAAR) ou cultura. Devido o resultado da cultura demorar pelo menos 4 semanas e a coloração de BARR apresentar uma baixa sensibilidade, a confirmação frequentemente necessita ser feita através de procedimentos invasivos, como a laparoscopia (INADOMI *et al.*, 2001).

Riquelme *et al.* (2006) descrevem a dosagem de ADA no líquido ascítico como um teste rápido e preciso para o diagnóstico de tuberculose peritoneal, tendo um forte poder discriminatório para descartar ou confirmar a peritonite tuberculosa na maioria dos casos.

O início do tratamento empírico associado a uma atividade de ADA elevada no líquido peritoneal tem apresentado bons resultados enquanto o paciente aguarda o resultado dos exames de cultura ou biópsia (RIQUELME *et al.*, 2006).

1.4.5 Pericardite tuberculosa

A pericardite aguda é uma síndrome caracterizada por inflamação do pericárdio, manifestando-se através de dor torácica, atrito pericárdico e alterações eletro e ecocardiográficas (FRAGATA FILHO, 2000), tendo como principais causas as infecções, o infarto do miocárdio, a insuficiência cardíaca, a uremia, as neoplasias e doenças sistêmicas e metabólicas (SHABETAI, 1997).

Todas as causas de pericardite aguda podem cursar com derrame pericárdico. A efusão pericárdica pode se apresentar em quantidade mínima, clinicamente silenciosa, e até em nível compressivo, desencadeando sintomas de tamponamento cardíaco (FRAGATA FILHO, 2000).

A tuberculose é diagnosticada em apenas 4% dos casos agudos de pericardite. A pericardite tuberculosa pode ser encontrada em 1-2% dos pacientes com tuberculose pulmonar, podendo ser originada da árvore traqueo-bronquial, linfonodos regionais, estruturas ósseas ou disseminação hematológica (FOWLER, 1991).

O tamponamento cardíaco é uma complicação comum da pericardite tuberculosa, sendo diagnosticada tuberculose em 60% dos pacientes com tamponamento cardíaco (JAIN *et al.*, 1999).

Como ocorre nos demais casos de tuberculose extra-pulmonar, é difícil isolar as espécies de micobateria a partir de amostras de fluido pericárdico (RANA *et al.*, 1999). A probabilidade de obter um diagnóstico definitivo é maior quando amostras de fluido pericárdico e biopsia pericárdica são examinados antes do estagio de efusão (KOH *et al.*, 1994).

Koh *et al.* (1994) demonstraram que a determinação dos níveis de ADA no líquido pericárdico é bastante útil para o diagnóstico diferencial de efusão pericárdica de várias origens, apresentando um valor de “cut off” de 40 U/L para o diagnóstico de pericardite tuberculosa, com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97% (TUON *et al.*, 2007).

1.4.6 Meningite

O termo meningite expressa a ocorrência de um processo inflamatório das meninges (membrana que envolve o cérebro), que pode estar relacionado a uma variedade de causas, tanto de origem infecciosa como não infecciosa (ex.: traumatismo). As meningites de origem infecciosa, em particular a doença meningocócica, a meningite tuberculosa, a meningite por *Haemophilus influenzae* tipo b, a meningite por pneumococos e as meningites virais, são as mais importantes do ponto de vista da saúde pública, pela magnitude de sua ocorrência, potencial de transmissão, patogenicidade e relevância social. Podem ser causadas por uma variedade de microorganismos, sendo que os principais encontram-se listados no **quadro 1** (BRASIL, 2005b).

Bactérias	Vírus	Outros
<i>Neisseria meningitidis</i>	RNA Vírus	Fungos
<i>Haemophilus influenzae</i>	• Enterovírus	• <i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	• Arbovírus	• <i>Candida albicans</i> e <i>C. tropicalis</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	• Vírus do sarampo	
<i>Staphylococcus aureus</i>	• Vírus da caxumba	Protozoários
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	• Arenavírus – coriomeningite linfocitária	• <i>Toxoplasma gondii</i>
<i>Escherichia coli</i>	• HIV 1	• <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Klebsiella sp</i>	DNA vírus	• <i>Plasmodium sp</i>
<i>Enterobacter sp</i>	• Adenovírus	
<i>Salmonella sp</i>	• Vírus do grupo Herpes	Helmintos
<i>Proteus sp</i>	• Varicela zoster	• Infecção larvária da <i>Taenia solium</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	• Epstein Barr	• <i>Cysticercus cellulosae</i> (cisticercose)
<i>Leptospira sp</i>	• Citomegalovírus	

Quadro 1: Principais agentes etiológicos para meningite

Fonte: BRASIL (2005b)

Em alguns países, a meningite tuberculosa é a principal causa de meningite oportunista em pacientes HIV positivos (BERENGUER *et al.*, 1992; SÁNCHEZ *et al.*, 1996). Uma vez que o diagnóstico para a meningite tuberculosa pelo isolamento ou visualização

direta do *M. tuberculosis* no líquido cefalorraquidiano tem baixa sensibilidade ou pode ser um processo demorado, um tratamento empírico baseado nas características do líquido ou nos achados clínicos torna-se frequentemente necessário (CORRAL *et al.*, 2004).

A determinação da atividade da adenosina desaminase no líquido cefalorraquidiano é um exame diagnóstico rápido e econômico, o qual tem sido encontrado uma alta especificidade para o diagnóstico diferencial entre meningite tuberculosa e outros casos de meningite asséptica, com uma sensibilidade de 50% (CORTÉS *et al.*, 1995).

Em estudos realizados em pacientes portadores do vírus HIV, os níveis de ADA apresentam-se elevados no líquido cefalorraquidiano em casos de meningite criptocócica (MARTÍNES *et al.*, 1992), meningite por cândida (CASADO *et al.*, 1997) e toxoplasmose cerebral (BOTET *et al.*, 1991). Não foi encontrada diferença significativa da atividade de ADA no líquido cefalorraquidiano de pacientes portadores do vírus HIV quando comparado com os não portadores (CORRAL *et al.*, 2004).

1.4.7 Infecções virais

Cowan *et al.* (1986) observaram que pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) apresentam uma elevação da atividade da ADA eritrocitária, enquanto que Gakis *et al.* (1989) observaram níveis elevados de ADA sérica em todos os pacientes infectados, mas com padrões diferentes de acordo com a fase da doença, apontando como grande significância clínica a atividade da ADA2 nos pacientes HIV positivos.

Em doenças virais, pode ocorrer um aumento da atividade sérica de ADA2, analogamente como ocorre com as infecções bacterianas. O aumento desta enzima pode ser usado como um marcador de presença viral no sistema monocítico macrófago (GAKIS *et al.*, 1981). Sarampo, catapora, mononucleose infecciosa, hepatite viral são exemplos de doenças com aumento de atividade de ADA2 sérica, com o vírus responsável dentro do sistema monocítico macrófago (SHARPE; FIELDS, 1985).

1.4.8 Leishmaniose

A leishmaniose é um problema de saúde pública em várias partes do mundo. Aproximadamente 200 milhões de pessoas estão em áreas de risco para a doença, ocorrendo 100 mil casos com 50 mil mortes por ano (TRIPATHI *et al.*, 2008).

No Brasil, a leishmaniose é uma doença endêmica com registros de surtos frequentes, estando distribuída em 19 estados e quatro das cinco regiões. No período de 1984 a 2003, o Brasil apresentou uma média anual de casos de leishmaniose visceral de 3.383 casos com incidência de 2 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2005a).

A leishmaniose visceral ou calazar tem como agente etiológico o protozoário *Leishmania donovani* ou *Leishmania infantum* na África, Ásia e Europa ou pela *Leishmania chagasi* na América Latina. É uma infecção aguda com alta morbidade e alta mortalidade nos casos não tratados (TRIPATHI *et al.*, 2008).

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países nos quatro continentes, a maioria dos quais classificados como em desenvolvimento, onde existem cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco. Cerca de 90% dos casos mundiais estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (MICHALICK; GENARO, 2005).

A leishmaniose visceral é clinicamente caracterizada por febre, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e hipergamaglobulinemia. Os níveis séricos de ADA estão aumentados antes do início do tratamento, provavelmente devido à destruição dos eritrócitos e a ativação do sistema mononuclear fagocítico (SMF). À medida que os pacientes evoluem para a cura, os níveis de ADA total e ADA1 caem rapidamente, mantendo os níveis de ADA2 elevados por um período mais prolongado. A elevação da atividade sérica de ADA2 ocorre devido à manutenção da ativação do SMF. A determinação sérica de ADA no calazar é uma ferramenta importante de auxílio diagnóstico, bem como indicador de prognóstico desta moléstia (HOLANDA, 1999).

Nosso laboratório foi pioneiro na realização de estudos da participação da ADA na leishmaniose e o único a demonstrar a participação das isoenzimas da ADA nas diversas fases da doença (HOLANDA, 1999), havendo, ainda hoje, pouquíssimos trabalhos sobre a

ADA na leishmaniose registrados nos sítios de pesquisas acadêmicas (PubMed, Scielo, ScienceDirect).

1.4.9 Doença de Behçet

A doença de Behçet é uma inflamação crônica caracterizada principalmente por uma ulceração oral recorrente, lesões na pele e uveítes. Atualmente, a doença de Behçet é reconhecida como uma vasculite sistêmica, que pode afetar todos os tipos de vasos sanguíneos, articulações, pulmões, sistema nervoso central e sistema gastrointestinal (CANPOLAT *et al.*, 2006; GÖNÜL *et al.*, 2009).

O diagnóstico é apenas baseado em achados clínicos, sendo que o sinal clínico mais importante é a estomatite aftosa recorrente, caracterizada por uma doença inflamatória da mucosa oral, com úlceras rasas e dolorosas, geralmente recoberta com uma pseudomembrana branco-acinzentada rodeada por um halo eritematoso (GÖNÜL *et al.*, 2009).

O envolvimento articular se caracteriza por artrite/artralgia (mais freqüente em joelhos) que pode ser oligo ou poliarticular. O comprometimento vascular inclui artérias e veias e ocorre em 35% dos casos. O comprometimento do sistema nervoso central tem sido descrito em cerca de 18% dos pacientes, sendo a manifestação mais grave da doença. O envolvimento gastrointestinal se caracteriza por úlceras esofágicas e lesões anais, dor abdominal, gastrite, diarreia, hepatomegalia e esplenomegalia. Outros comprometimentos incluem: síndrome nefrótica, amiloidose, glomerulonefrite segmentar focal, epididimite, uretrite, cistite recorrente, miocardite, pericardite e infarto do miocárdio (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002).

Os exames laboratoriais podem ser úteis para o seguimento da atividade da doença e no diagnóstico diferencial. A pesquisa de auto-anticorpos é negativa. O antígeno de histocompatibilidade B5 ocorre em freqüências de 50 a 84% dos casos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002).

O aumento da atividade sérica de ADA está correlacionado com os níveis aumentados de malonaldeído no estágio ativo da doença. O malonaldeído é um dos produtos finais da peroxidação lipídica induzida pelas espécies reativas de oxigênio no plasma e nos eritrócitos (CANPOLAT *et al.*, 2006).

O aumento da peroxidação lipídica, como reflexo do aumento plasmático de malonaldeído, sustenta o conceito de que as espécies reativas de oxigênio possam levar ao dano oxidativo nesta doença. O aumento da atividade sérica da ADA na doença de Behçet pode ser originado nas células epiteliais e nos eritrócitos, devido ao dano resultante da peroxidação lipídica provocada em suas membranas, a partir dos radicais de oxigênio liberados de células mononucleares (CANPOLAT *et al.*, 2006).

1.4.10 Anemia hemolítica hereditária

Paglia *et al.* (1970) descreveram uma família com anemia hemolítica crônica e diminuição dos reservatórios de nucleotídeos de adenina. Posteriormente, demonstrou-se ser um defeito específico nas hemácias que apresentavam uma elevação de 45 a 70 vezes da atividade da adenosina desaminase, com 50 a 70% de depleção dos depósitos de ATP (PAGLIA *et al.* 1976).

O defeito foi um traço hereditário autossômico dominante, afetando 12 dos 24 membros da família com os fatores de risco. Estudos posteriores realizados com ADA parcialmente purificada de eritrócitos demonstraram propriedades físico-químicas e cinéticas normais, com um aumento de ADA estruturalmente normal nestes pacientes (PAGLIA *et al.*, 1978).

Hirschorron *et al.* (1979) demonstraram que a atividade da ADA em eritrócito é altamente estável, apresentando uma meia-vida de aproximadamente 231 dias e, como a vida média da hemácia é em torno de 120 dias, Chottiner *et al.* (1987) especulam que é impossível atribuir um aumento de até 70 a 100 vezes da atividade da ADA devido a uma mutação gênica que aumente a estabilidade desta enzima, tendo considerado, portanto, que o aumento da atividade eritrocitária da ADA seja devido a uma super-produção da enzima.

No caso de uma super atividade da ADA, o aumento do catabolismo dos substratos resulta em uma diminuição dos depósitos de nucleotídeos de adenina nos eritrócitos conduzindo a uma destruição prematura da hemácia.

1.5 Modelo de Vale e Almeida (1998)

A discriminação das isoenzimas da ADA pode ser realizada através de técnicas como eletroforese, cromatografia ou ensaios enzimáticos utilizando inibidores específicos, o que torna o processo financeiramente dispendioso e/ou inoportuno para a rotina de laboratórios clínicos. Por este motivo, os laboratórios clínicos realizam apenas a determinação da atividade de ADA total, ou seja, a atividade das isoenzimas ADA1 + ADA2.

Visando auxiliar o diagnóstico ou o acompanhamento da evolução clínica de pacientes, os professores Dr. Marcus Raimundo Vale (Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC) e Dra. Yacy Mendonça de Almeida (Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC) propuseram, em 1998, um modelo matemático para discriminar as isoenzimas da ADA, com uma maior agilidade.

O modelo se baseou nas diferenças de afinidade das isoenzimas por dois substratos (adenosina e 2'-deoxi-adenosina), cujos parâmetros já eram estabelecidos na literatura. Assim, foi proposto que o ensaio fosse realizado separadamente com adenosina e 2'-deoxi-adenosina para possibilitar o estabelecimento de 4 equações que definiriam uma fórmula final simples, conforme descrito na secção de métodos.

A aplicabilidade deste modelo foi comprovada empiricamente na prática clínica, auxiliando aos médicos no diagnóstico diferencial de diversas patologias, bem como o acompanhamento da evolução dos tratamentos. Holanda (1999) pôde evidenciar esta aplicabilidade através do acompanhamento da evolução das isoenzimas da ADA no processo de desenvolvimento do Calazar, conforme descrito anteriormente.

1.6 Métodos de determinação da ADA

Os laboratórios clínicos realizam, atualmente, apenas a determinação da atividade de ADA total (ADA1+ADA2). Vários métodos para esta determinação foram propostos, dentre eles métodos automatizados ou *kits* diagnósticos, mas a sua aplicação prática tem demonstrado resultados insatisfatórios.

O método de Giusti (1974) é um método que determina a atividade da ADA através da reação entre a enzima presente no espécime biológico a ser analisado e a adenosina (principal substrato da enzima). Este método baseia-se na quantidade de amônia estequiometricamente liberada na reação, sendo esses níveis medidos através da reação de Berthelot (1859). O método de Giusti (1974) é o método mais aceito e mais utilizado no Brasil (BRASIL, 2002).

No momento, apenas o laboratório de Farmacologia-Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, realiza exames laboratoriais para a dosagem da atividade desta enzima em fluidos de pacientes no estado do Ceará, apesar de alguns laboratórios clínicos cearenses terceirizarem este serviço, através do envio de amostras para outros estados.

1.7 Justificativa

A adenosina desaminase é uma ferramenta diagnóstica útil na clínica médica, porém na prática atual ainda deixa a desejar porquanto não permitem a discriminação de suas isoenzimas. Sabendo-se que o aumento dos níveis de ADA2 é que define a condição de infecção do sistema monocítico-macrofágico, característico na tuberculose, a discriminação de suas isoenzimas é fundamental. A atual metodologia, apesar de favorecer a detecção de ADA2 (pelo pH do ensaio e a alta concentração do substrato), mesmo assim ainda expressa atividade de ADA1. Dessa forma, é importante que se estabeleça uma metodologia simples para a rotina laboratorial que permita a discriminação das isoenzimas e assim melhor auxiliar o diagnóstico final.

O método científico é baseado na comprovação experimental das observações encontradas na natureza. A exigência de uma comprovação experimental dos resultados obtidos com o modelo matemático proposto por Vale e Almeida (1998) nos levou a desenvolver uma metodologia para discriminar as isoformas da ADA utilizando eletroforese em gel de agarose.

A necessidade de discriminar as isoenzimas e isoformas da ADA serviu como fator impulsionante para a realização deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Discriminar as isoenzimas e as isoformas da ADA em fluidos corporais humanos.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever o perfil de atividade da ADA nos exames realizados em nosso laboratório;
- Desenvolver uma nova metodologia para caracterização das isoformas da enzima adenosina desaminase por eletroforese;
- Revelar a atividade enzimática da adenosina desaminase após eletroforese em gel de agarose;
- Comprovar experimentalmente a aplicabilidade do modelo proposto por Vale e Almeida (1998) para a discriminação laboratorial das isoenzimas da adenosina desaminase humana.

3 MATERIAIS

3.1 Perfil dos exames realizados

Para a avaliação do perfil de atividade de ADA, utilizaram-se os dados armazenados no BANCO DE DADOS do Laboratório de Bioquímica-Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.

As amostras analisadas são provenientes de pacientes internados em hospitais da rede pública e privada no estado do Ceará, através da parceria entre o Laboratório de Bioquímica-Farmacologia com os hospitais Walter Cantídio, São José, Santa Casa de Misericórdia de Sobral e laboratórios clínicos da rede privada de assistência.

Foram coletados os dados referentes aos exames realizados no período de janeiro de 2005 a setembro de 2009.

3.2 Amostras analisadas por eletroforese e pelo modelo Vale e Almeida (1998)

Utilizaram-se amostras de líquido pleural, líquido pericárdico e/ou líquido ascítico que apresentaram atividade enzimática elevada. As amostras pertencem ao banco de amostras do laboratório de Bioquímica-Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (**APÊNDICE A**).

As amostras de soro ou eritrócitos foram coletadas de doadores saudáveis ou apresentando uma patologia específica de interesse ao trabalho. Os doadores foram informados do conteúdo do estudo e, após o seu consentimento, foi solicitada a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**APÊNDICE B**).

3.3 Reagentes e soluções

A seguir, no quadro 2, expomos os reagentes utilizados e, no quadro 3, descrevemos as soluções empregadas na realização deste trabalho.

Reagentes	Origem
Adenosina	Sigma
ADA1 bovina	Sigma
Agarose	Electran England
Fenol	VETEC
Fosfato dibásico de sódio	VETEC
Fosfato monobásico de sódio	VETEC
Hidróxido de sódio	VETEC
Hipoclorito de sódio	VETEC
Nitroprussiato de sódio	Merck
Solução salina fisiológica (NaCl 0,9%)	Fresenius-Kabi
Sulfato de amônia	VETEC

Quadro 2: Reagentes

Soluções	Concentração
Adenosina	22mM ou 0,55mM, em tampão de uso.
Tampão de uso	Fosfato dibásico de sódio 50 mM + fosfato monobásico de sódio 50 mM, misturados empiricamente até obtenção de pH 6,5.
Tampão de corrida	Fosfato dibásico de sódio 100 mM + fosfato monobásico de sódio 100 mM, misturados empiricamente até obtenção de pH 6,5.
Agarose	0,5 ou 1% p/v (10 x 4cm) em tampão de uso.
Fenol/ Nitroprussiato	106 mM / 0,17 mM.
Hipoclorito de Sódio Alcalino	Hipoclorito de Sódio 11mM + Hidróxido de Sódio 125mM.
Sulfato de Amônia	0, 25, 50, 75, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000 ou 2500 μ M.

Quadro 3: Soluções

3.4 Aparelhos

A seguir, no quadro 4, temos os aparelhos que foram utilizados na execução dos experimentos

Aparelhos	Origem
Agitador de tubos vórtex	Fisions – Modelo Whirlimixer
Aquecedor – tipo banho-maria	Fanem – Modelo 100
Balança analítica	Kern – Modelo 410
Espectrofotômetro	Micronal – Modelo B582
Fatiador de gel	Desenvolvido pelo Prof. Dr. Marcus R. Vale
Homogeneizador de sangue	Phoenix – Modelo HS 22
pHmetro	Vidrotech – Modelo MPA210
Pipeta automática 200 – 100 µL	Labsystems Finland
Pipeta automática 5 – 40 µL	Labsystems Finland
Sistema para eletroforese	Desenvolvido pelo Prof. Dr. Marcus R. Vale
Ultra-centrífuga refrigerada	Fischer Scientific – Mod. Marathon 26KMR

Quadro 4: Aparelhos

4 MÉTODOS

4.1 Análise do perfil dos exames de ADA no Ceará

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo dos exames de ADA realizados pelo Laboratório de Bioquímica-Farmacologia no período de janeiro de 2005 a setembro de 2009. Os dados foram coletados utilizando o *software* Microsoft Excel 2007, e analisados utilizando os *softwares* GraphPad Prism versão 5.00 e SPSS versão 17.0.

Os dados foram coletados e analisados de acordo com os perfis de sexo (masculino/ feminino); material analisado (líquidos ascítico, cefalorraquidiano, pericárdico, pleural, soro e outros – lavado brônquico, líquido sinovial e urina) e valor da atividade enzimática. A atividade enzimática foi classificada em Normal ou Alterada de acordo com o valor de corte (*cut off*) presente na literatura, conforme listado no **quadro 5**.

Fluido Corpóreo	<i>cut off</i> (U/L)	Referência na Literatura
Líquido Ascítico	40	Riquelme <i>et al.</i> , 2006
Líquido Pericárdico	40	Tuon <i>et al.</i> , 2007
Líquido Pleural	40	Castelo Filho <i>et al.</i> , 2004
Líquor	9	Feres <i>et al.</i> , 2008
Soro	25	Lamsal <i>et al.</i> , 2007

Quadro 5: Valores de corte (*cut off*) para a enzima adenosina desaminase nos fluidos corpóreos humanos.

4.1.1 Critérios de exclusão

Foram excluídos da análise os dados que apresentaram a ausência de algum dado (sexo do paciente, tipo de fluido corporal e/ou valor da atividade enzimática). Os dados referentes às características clínicas, nosológicas, idade e diagnóstico final foram omitidos do estudo em decorrência da ausência destas informações em uma parcela significativa das amostras.

4.2 Determinação da faixa de comprimento de onda para leitura

Foi realizada a dosagem de amônia utilizando 200 μL de uma solução de sulfato de amônia 75 μM , através da reação de Berthelot (método descrito a seguir). O ensaio foi lido em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 400 a 800 nm.

4.3 Determinação da curva de calibração da reação

Foi realizada a dosagem de amônia utilizando 200 μL de uma solução de sulfato de amônia nas concentrações de 0, 25, 50, 100, 200, 400, 500, 1000, 2000 ou 2500 μM , através da reação de Berthelot (método descrito a seguir).

4.4 Determinação da curva de formação da cor/ estabilidade

Foi realizada a dosagem de amônia utilizando 200 μL de uma solução de sulfato de amônia 75 μM , através da reação de Berthelot (método descrito a seguir). O ensaio foi lido em espectrofotômetro nos tempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180, 240 e 1440 minutos.

4.5 Ensaio da enzima

A atividade da enzima é determinada utilizando o método descrito por Giusti (1974), onde a adenosina (200 μL) é incubada com a fonte da enzima (20 μL). Após 1h de incubação, os níveis de amônia são determinados através da reação de Berthelot (método descrito a seguir).

4.6 Determinação da amônia: reação de Berthelot

A reação de Berthelot é assim denominada em homenagem ao cientista que primeiro observou a coloração azul formada a partir da mistura entre fenol, hipoclorito e amônia em 1859. Esta reação ganhou uma maior popularidade após a descoberta que o nitroprussiato de sódio $[\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ aumenta significativamente a velocidade da reação (DARIDON *et al.*, 2001).

A reação ocorre em três etapas, iniciando com a cloração da amônia, seguida da formação da quinoneclorimina catalisada pelo nitroprussiato e finalizada com a adição do fenol à quinoneclorimina formando o produto colorimetricamente detectável azul de indofenol (**figura 3**) (DARIDON *et al.*, 2001; HARFMANN; CROUCH, 1989).

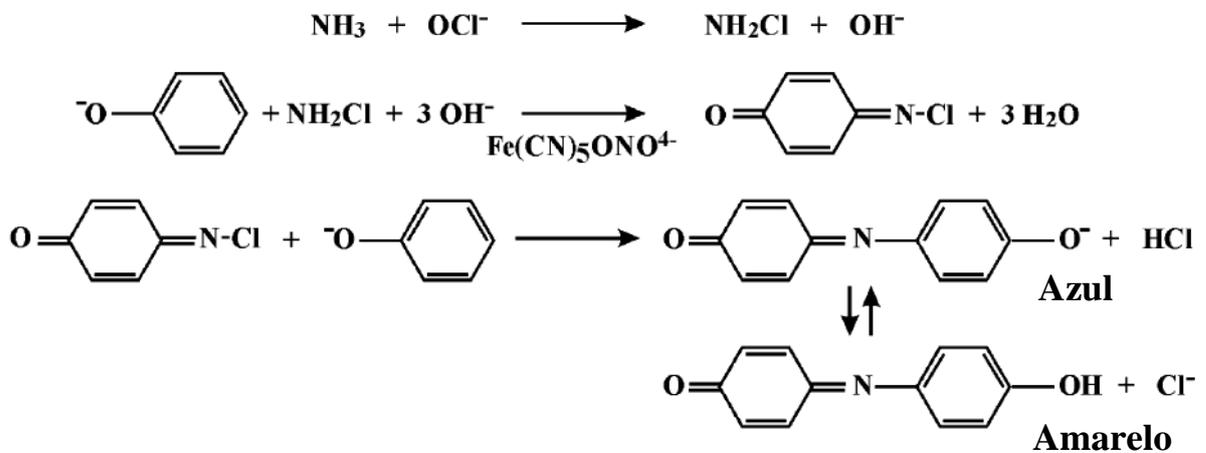


Figura 3: Representação esquemática da Reação de Berthelot

Fonte: Adaptado de Daridon *et al.* (2001)

A determinação da amônia foi baseada na reação de Berthelot (BERTHELOT, 1859). Aos 200 (ensaio do gel)/ 220 (ensaio da amostra) μL das reações descritas nas etapas anteriores, são adicionados 600 μL de fenol/nitroprussiato de sódio e 600 μL de hipoclorito de sódio alcalino. O ensaio é incubado a 37°C por 30 minutos e a coloração formada é medida em espectrofotômetro no comprimento de 628nm.

4.7 Avaliação do tempo de incubação da amostra

Incubou-se uma amostra de líquido pericárdico, conforme descrito em ensaio da enzima, contendo 47,16% de ADA1 e 52,84% de ADA2 (atividade total de 49,5 U/L), em uma solução de adenosina (concentração final: 0,5 ou 20 mM) por um período de 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10 ou 20 horas. Após a incubação, seguiu-se com o ensaio da ADA.

Determinou-se a velocidade de reação enzimática através da variação de amônia formada em função da variação do tempo de incubação da amostra, calculado através da medição em um tempo “x” (t_2) e o tempo medido imediatamente anterior (t_1), conforme a **equação 1**, onde [P] corresponde à concentração de produto e “t” corresponde ao tempo:

$$\text{Velocidade (v)} = \frac{\Delta[\text{P}]}{\Delta t} \leftrightarrow v = \frac{[\text{P}]_{t_2} - [\text{P}]_{t_1}}{t_2 - t_1} \text{ nmols de amônia/hora} \quad \dots(1)$$

4.8 Avaliação da temperatura na incubação da amostra

Incubou-se uma amostra de líquido pericárdico, conforme descrito em ensaio da enzima, contendo 47,16% de ADA1 e 52,84% de ADA2 (atividade total de 49,5 U/L), em uma solução de adenosina (concentração final: 0,5 ou 20 mM) a uma temperatura de -20; 5; 24; 37; 50 ou 80°C por um período de 1 hora e a 50°C por um período de até 2h. Após a incubação, seguiu-se com o ensaio da ADA.

4.9 Avaliação do pH na incubação da amostra

Incubou-se uma amostra de líquido pericárdico, contendo 47,16% de ADA1 e 52,84% de ADA2 (atividade total de 49,5 U/L), em uma solução de adenosina 20 mM com pH de 2,0; 4,0; 6,5; 8,0; 10,0 ou 12,0 por um período de 1 hora/ 37°C. Após a incubação, seguiu-se com o ensaio da ADA.

4.10 Obtenção da adenosina desaminase eritrocitária

A coleta do sangue foi realizada através de punção venosa nas veias cefálica, mediana cefálica, mediana cubital, basílica, mediana basílica, longitudinal (antebraquial), do dorso da mão ou marginal da mão, selecionada em decorrência das características de cada doador (**figura 4**).

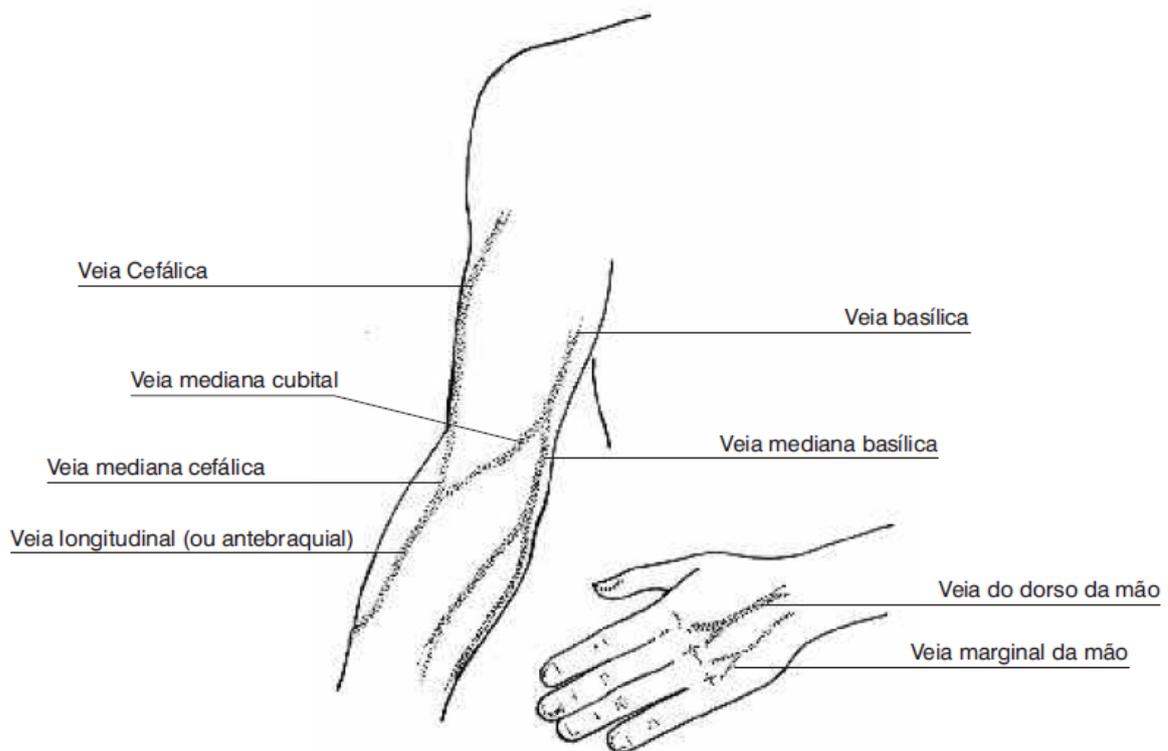


Figura 4: Veias de acesso para coleta sanguínea periférica

Fonte: Vaccuete do Brasil (2009)

Foram coletados aproximadamente 3 – 5 mL de sangue/ doador, em tubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) como agente anticoagulante. Retirou-se uma alíquota de cada amostra, misturando-as em um tubo de ensaio e homogeneizando em um homogeneizador de sangue por aproximadamente 30 minutos para a formação do *pool* sanguíneo.

Retiraram-se aproximadamente 7 mL do *pool* de sangue e centrifugou-se a 3.000 rpm (705 x g)/ 5 min/ 4°C. Após a precipitação dos eritrócitos, retirou-se e descartou-se o sobrenadante (plasma sanguíneo).

Em seguida, foram retirados três mililitros da “papa” de eritrócitos, adicionados 3 mL de solução salina fisiológica (meio isotônico – NaCl 0,9%) e misturado manualmente por aproximadamente 30 segundos. Essa suspensão de eritrócitos foi centrifugada a 3.000 rpm (705 x g)/ 5 min/ 4°C. O sobrenadante foi separado e descartado. Repetiu-se este procedimento de lavagem por ciclos de 5x ou até se verificar a ausência total de leucócitos em lâmina a fresco.

Após a lavagem dos eritrócitos, retirou-se 1 mL da “papa” de hemácias e adicionou-se 2 mL de água destilada (meio hipotônico). Após a hemólise osmótica, submeteu-se a amostra a uma hemólise mecânica através de agitação forte em agitador do tipo vórtex por um período de 5 minutos. A solução de eritrócitos lisados foi submetida a uma centrifugação a 10.000 rpm (7.840 x g) / 20 min / 4°C. Retirou-se a porção superior da solução, descartando-se a porção inferior contendo os restos celulares.

4.11 Eletroforese

Antes de iniciarmos nosso trabalho experimental, estabelecemos as condições experimentais necessárias para a separação das isoformas da ADA. Os primeiros ensaios foram realizados utilizando gel de agarose a 0,5 % usando uma tensão elétrica de 80 V e um tempo de corrida de 3 horas. Após vários testes, observamos que seria necessário aumentar a concentração do gel para 1% e o tempo de corrida para 7 horas, reduzindo a tensão elétrica para 60 V e preservando o gel. O gel foi preparado utilizando tampão de uso, apresentando as dimensões de 100 x 40 x 5 mm.

Utilizou-se uma cuba eletroforética desenvolvida em nosso laboratório, onde o gel de agarose é moldado sobre uma ponte móvel de polietileno (**figura 5a**) e acomodado na cuba através de uma ponte fixa (**figura 5b**). A cuba é adaptada com um sistema de câmara úmida e permanece fechada durante todo o experimento (**figura 5c**). O contato entre o gel e o tampão de corrida foi realizado através de papel filtro (40 x 70 mm). Após a montagem do gel, a cuba é transferida para um ambiente climatizado a uma temperatura de aproximadamente 4°C.

Após a montagem do sistema, adicionou-se *5 - 10 μ L da amostra a ser analisada nos poços e aplicou-se ao gel uma corrente elétrica de *60 - 80 V durante *3 - 7 horas (*ver metodologia de cada ensaio). Utilizou-se 250 mL de tampão de corrida em cada eletrodo.

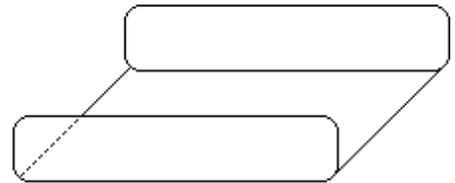
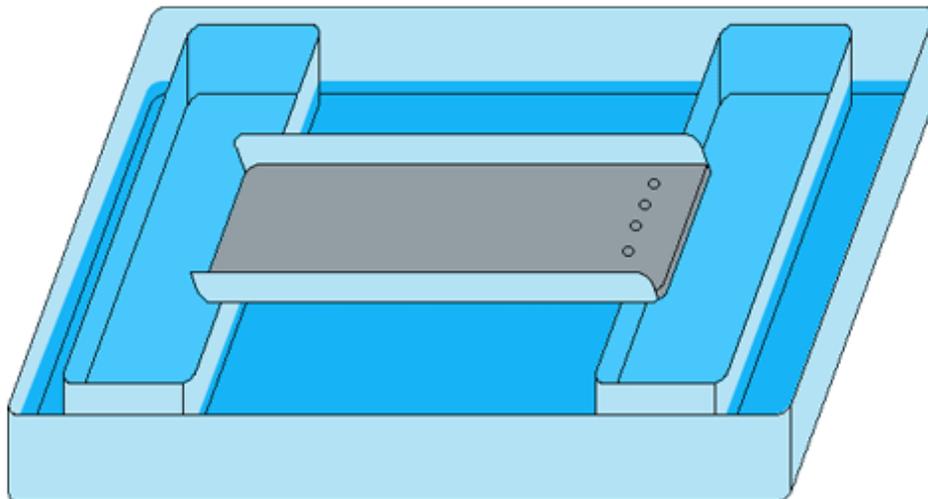
a**b****c**

Figura 5: a- Gel de agarose moldado sobre a ponte móvel; b- Ponte fixa; c- Cuba eletroforética aberta.

4.12 Atividade da enzima no gel

Após a realização da eletroforese, o gel foi conduzido a um dispositivo adequado para ser fatiado, conforme descrito por VALE (1988/1989). O gel foi cortado em tiras e cada tira foi novamente seccionada em fatias de aproximadamente 3 x 7 x 5 mm (com um volume de aproximadamente 105mm³).

Cada fatia foi incubada em 200µL de adenosina (0,55 ou 22mM) ou em 200 µL de tampão de uso (branco da reação- resultado não mostrado) a 37°C por 1 a 20 horas (ver metodologia de cada ensaio). Em seguida, determinou-se a quantidade de amônia formada por reação enzimática através da reação de Berthelot. A absorbância do produto final foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 628nm.

4.13 Avaliação do sentido de migração da ADA no gel de agarose

Em um gel de agarose a 0,5%, aplicou-se 5 µL de uma amostra de líquido pleural e de uma amostra de ADA1 bovina no centro do gel e iniciou-se a corrida (80V/ 3h/ 4°C). Após a corrida, o gel foi fatiado e determinou-se a atividade enzimática em adenosina 22mM (1h/37°C) e verificou-se a direção de migração da enzima no pH analisado.

4.14 Avaliação do estado físico do gel na atividade enzimática

Em um gel de agarose a 0,5%, aplicou-se 5 µL de uma amostra de líquido pleural e iniciou-se a corrida (80V/ 3h). Após a corrida, as fatias do gel foram divididas em dois grupos: (a) fatia de gel íntegra e (b) fatia de gel mecanicamente triturada. As fatias do gel foram então incubadas em adenosina 22mM/ 60 min e seguiu-se o ensaio da ADA.

4.15 Avaliação do tempo de incubação das fatias do gel de agarose

Em um gel de agarose a 1,0%, aplicou-se 10 µL de uma amostra de líquido ascítico com atividade enzimática muito elevada (240 U/L) ou 10 µL de uma amostra de líquido pericárdico com atividade enzimática relativamente baixa (49 U/L). Realizou-se uma corrida a 80 V/ 4h.

Após a corrida, o gel foi fatiado e as fatias foram incubadas em adenosina 22mM. A amostra de líquido ascítico apresentando alta atividade enzimática foi incubada por um período de 1, 2 ou 3h. A amostra de líquido pericárdico apresentando atividade enzimática relativamente baixa foi incubada por um período de 1, 2, 5 ou 20h.

Após a incubação, seguiu-se o ensaio da ADA e verificou-se o melhor tempo para a visualização das isoformas da ADA.

4.16 Discriminação das isoenzimas da ADA no gel de agarose

A discriminação das isoenzimas da ADA foi realizada utilizando 10 µL de amostra em gel de agarose a 1%. A eletroforese foi realizada a 60 V/ 7 horas. Em seguida, o gel foi fatiado e as fatias incubadas em adenosina (22 ou 0,55mM) a 37°C por um período de 20 horas.

A isoenzima ADA1 apresenta uma alta afinidade pela adenosina, com um Km de $5,2 \times 10^{-5}$ M (0,052 mM), enquanto que a isoenzima ADA 2 tem uma baixa afinidade pelo mesmo substrato, apresentando um Km de 200×10^{-5} M (2 mM) (GAKIS, 1996).

A partir dessa diferença de afinidade das isoenzimas da ADA pela adenosina, as fatias do gel foram incubadas utilizando uma solução de adenosina 22mM (11 vezes maior que o Km da ADA2 e aproximadamente 400 vezes maior que o Km da ADA1), permitindo a detecção de ambas as isoenzimas da ADA, ou incubadas em uma solução de adenosina 0,55mM (aproximadamente 11 vezes maior que o Km da ADA1 e aproximadamente ¼ do Km da ADA2), possibilitando a detecção preferencialmente da isoenzima ADA1.

As isoformas ADA1 e ADA1-CD26 apresentam alta afinidade pela adenosina. Para diferenciar essas isoformas no gel após a corrida, utilizamos a enzima adenosina desaminase eritrocitária humana como marcador de migração enzimática, uma vez que os eritrócitos apresentam apenas a isoforma ADA1 (CAVALCANTE *et al.*, 2009).

4.17 Mensuração da atividade enzimática no gel

A atividade enzimática de cada fatia do gel (representada em quantidade de nmols de amônia liberada na reação) foi “plotada” em um gráfico no formato “x” vs “y” (n° da fatia vs atividade da enzima na fatia). À curva formada, separaram-se as regiões encontradas em regiões α (início do gel), β (meio do gel) e γ (final do gel). Mediu-se a área sob a curva de cada região através de planimetria computadorizada com o auxílio do programa ImageJ Versão 1.41. A área foi medida em *pixels* e o resultado expresso em área percentual de cada região, com a área total correspondendo ao somatório das regiões α , β e γ .

4.18 Discriminação das isoenzimas da ADA: modelo de Vale e Almeida (1998)

Gakis (1996) demonstrou que a isoenzima ADA1 apresenta uma alta afinidade entre os substratos adenosina (Ad) e 2'-deoxi-adenosina (dAd) com uma razão dAd/Ad de 0,75. Já a isoenzima ADA 2 apresenta uma baixa afinidade por ambos substratos, apresentando uma razão dAd/Ad de 0,25.

Vale e Almeida (1998) propuseram um modelo matemático para quantificar as isoenzimas da ADA utilizando a diferença de afinidade das isoenzimas da ADA pelos substratos adenosina e 2'-deoxi-adenosina.

Segundo o modelo de Vale e Almeida, o ensaio da enzima é realizado com adenosina (Ta) e 2'-deoxi-adenosina (Td), separadamente como substratos. Usando parâmetros conhecidos, foram propostas quatro equações:

$$Ta = A1 + A2 \quad \dots(2)$$

$$T_d = D_1 + D_2 \quad \dots(3)$$

$$D_1 = 0,75.A_1 \quad \dots(4)$$

$$D_2 = 0,25.A_2 \quad \dots(5)$$

Onde A1 e D1 são as atividades da ADA1, A2 e D2 são as atividades da ADA2 e Ta e Td correspondem a atividade de ADA total usando adenosina e 2'-deoxi-adenosina, respectivamente como substratos.

A partir dessas equações, foram deduzidas as seguintes formulas para o cálculo e discriminação das atividades da ADA1 e da ADA2:

$$A_1 = \frac{(4.T_d - T_a)}{2} \quad \dots(6)$$

$$A_2 = T_a - A_1 \quad \dots(7)$$

4.19 Modelo de Vale e Almeida (1998) vs eletroforese

Estabelecido as condições necessárias para a realização da eletroforese, realizamos a determinação das isoenzimas da ADA utilizando a eletroforese e o modelo de Vale e Almeida (1998).

Após o estabelecimento destas condições experimentais, conseguimos coletar um total de oito amostras apresentando atividade de ADA total elevada e realizamos as análises necessárias.

As atividades das isoenzimas da ADA foram medidas utilizando o modelo de Vale e Almeida (1998) e os resultados foram expressos em atividade percentual de cada isoenzima.

Os valores percentuais das isoenzimas da ADA determinados através do modelo de Vale e Almeida (1998) foram comparados com os valores percentuais encontrados através da eletroforese utilizando a correlação de Pearson.

4.20 Comitê de ética

Os protocolos experimentais adotados foram submetidos e aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE) sob o protocolo COMEPE n° 173/08 (ANEXO A).

4.21. Análise estatística

Os resultados foram expressos como medida simples, quando realizado apenas uma medição de cada variável, como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), para múltiplas medidas de cada variável ou como valor percentual.

Para comparação múltipla dos dados paramétricos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman Keul. Para comparação de associação linear, foi utilizada a correlação de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

A coleta dos dados, a confecção dos gráficos e a análise estatística foram realizadas através dos softwares Microsoft Excel 2007, GraphPAD Prism versão 5.00 e SPSS versão 17.0.

5 RESULTADOS

5.1 Análise do perfil dos exames de ADA no Ceará

No período de janeiro de 2005 a setembro de 2009, foram realizadas 2.300 dosagens de ADA em diversos fluidos corpóreos, sendo excluídas das análises 109 amostras conforme os critérios de exclusão. A principal dificuldade na realização desta análise residiu na omissão de informações sobre as características das amostras (dados clínicos, nosológicos, idade e diagnóstico final) em uma parcela significativa das amostras.

Os principais fluidos corporais onde é realizado o exame de ADA são o líquido pleural, líquido ascítico e líquor.

Houve uma predominância de amostras do sexo masculino em relação aos exames no líquido pleural (53,5%) e líquido ascítico (55,5%), uma predominância de amostras do sexo feminino no líquido pericárdico (52,2%) e soro (55%) e uma distribuição relativamente igualitária nas amostras de líquor.

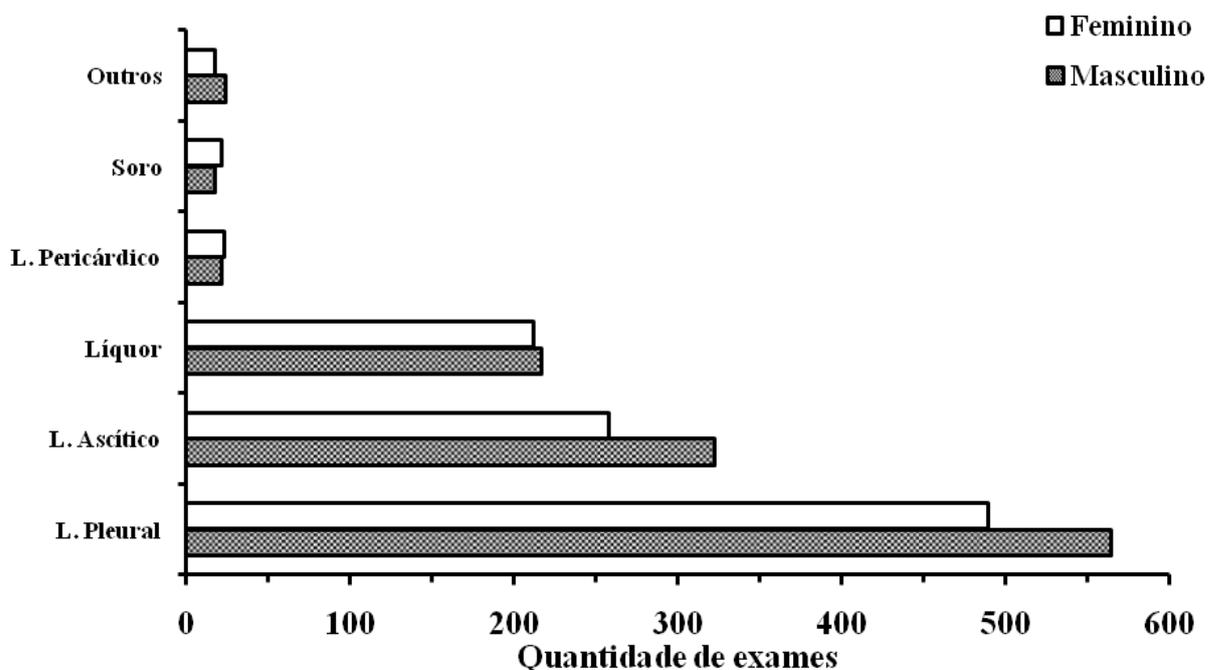


Figura 6: Distribuição das amostras em função do sexo.

Os resultados são expressos como quantidade total de amostras analisadas distribuídas por tipo de fluido corporal em função do sexo.

5.1.1 Perfil dos exames de ADA no líquido ascítico

No período analisado, foram realizadas 322 dosagens em amostras provenientes de pacientes do sexo masculino e 258 dosagens em amostras do sexo feminino, perfazendo um total de 580 dosagens. Utilizando um valor de corte (*cut off*) de 40 U/L (RIQUELME *et al.*, 2006), os dados foram separados em NORMAL (atividade de ADA < 40 U/L) ou em ALTERADO (atividade de ADA \geq 40 U/L).

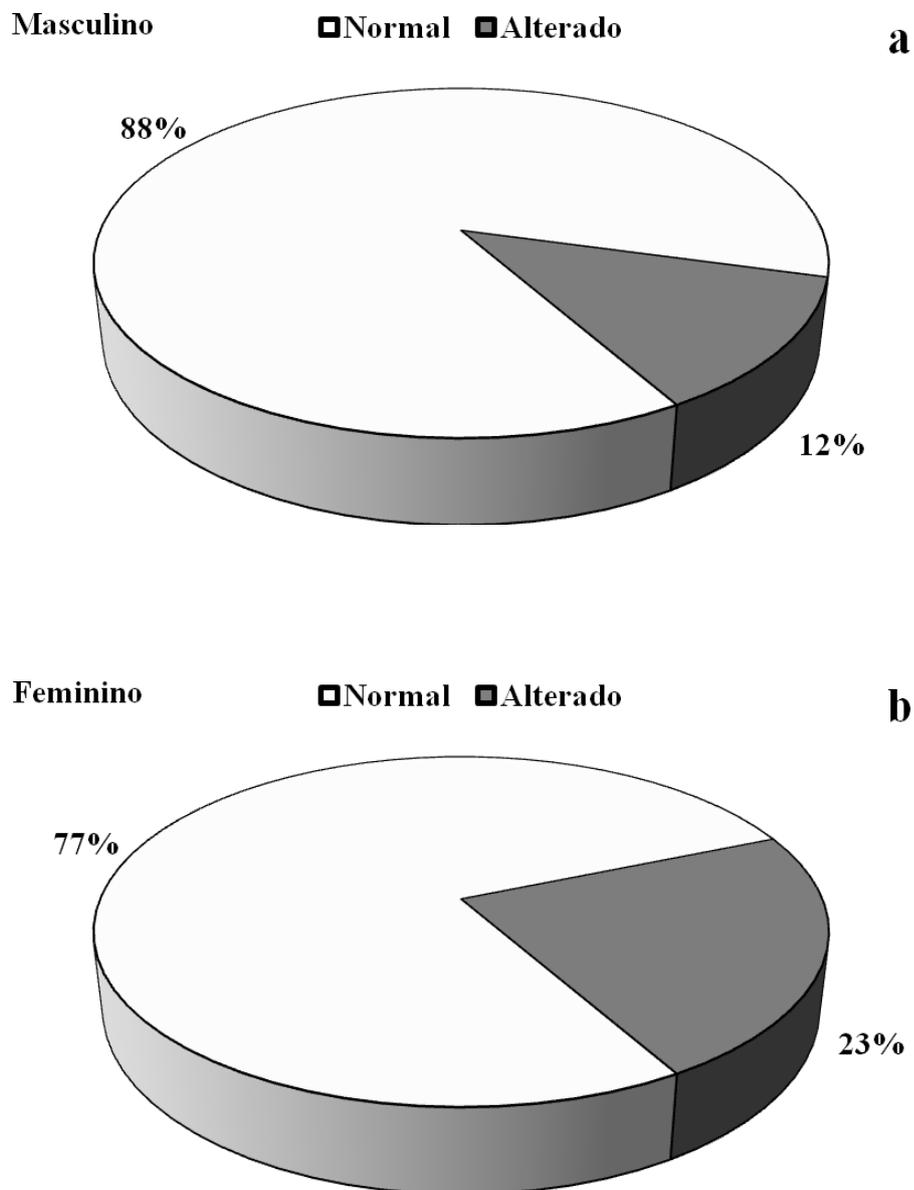


Figura 7: Perfil das análises de ADA no líquido ascítico em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino.

Os resultados são expressos como percentual de amostras de líquido ascítico analisadas, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo.

As amostras normais apresentaram uma média de atividade enzimática de $15,34 \pm 0,45$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,6 vezes menor que o valor determinado para o ponto de corte.

As amostras com atividade enzimática aumentada apresentaram uma média de atividade de $91,7 \pm 7,33$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,3 vezes maior que o valor determinado para o ponto de corte.

Não foi encontrada diferença estatística entre as atividades normais e alteradas, quando comparamos relação ao sexo.

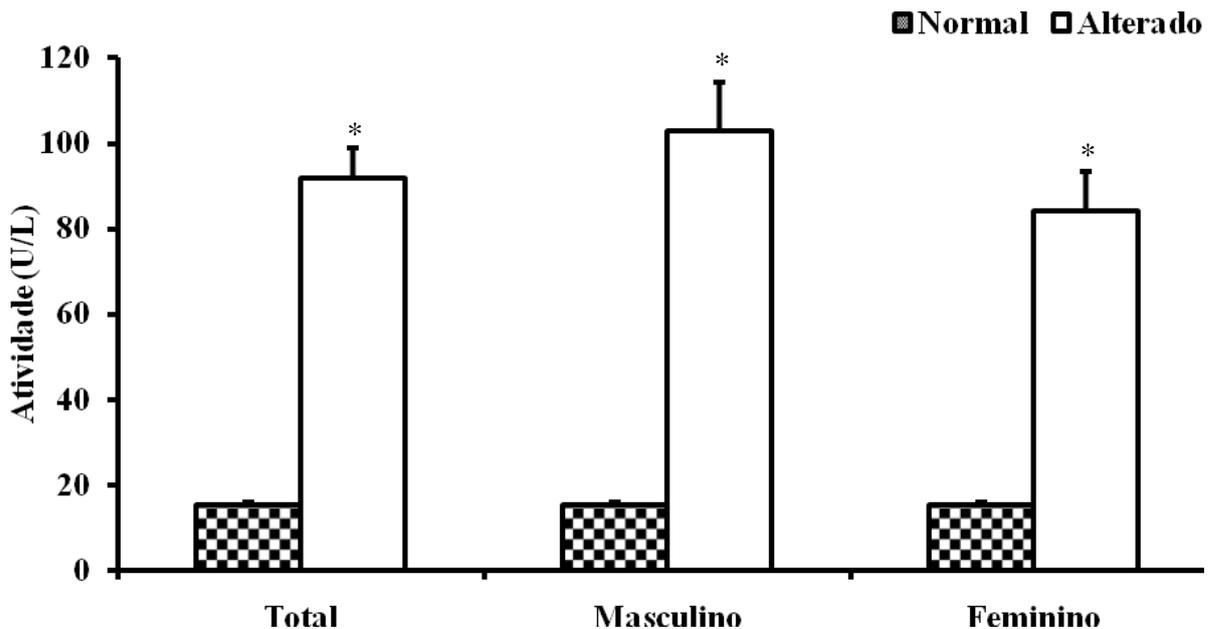


Figura 8: Perfil da atividade de ADA no líquido ascítico em função do sexo.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA no líquido ascítico, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo. * $p < 0,001$ vs normal (ANOVA; Student- Newman-Kuels).

5.1.2 Perfil dos exames de ADA no líquido pericárdico

No período analisado, foram realizadas 22 dosagens em amostras provenientes de pacientes do sexo masculino e 24 dosagens em amostras do sexo feminino, perfazendo um total de 46 dosagens. Utilizando um valor de corte (*cut off*) de 40 U/L (TUON *et al.*, 2007), os dados foram separados em NORMAL (atividade de ADA < 40 U/L) ou em ALTERADO (atividade de ADA \geq 40 U/L).

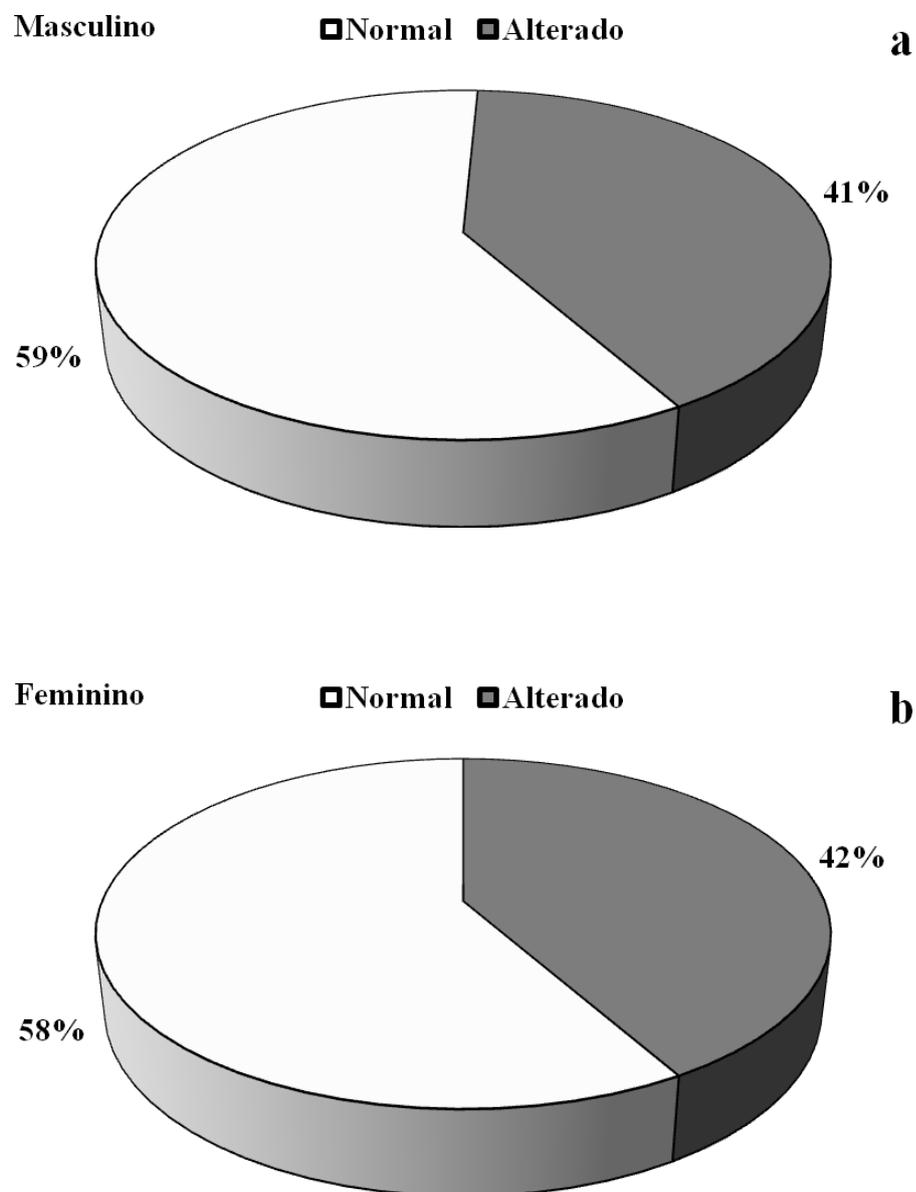


Figura 9: Perfil das análises de ADA no líquido pericárdico em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino.

Os resultados são expressos como percentual de amostras de líquido pericárdico analisadas, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo.

As amostras normais apresentaram uma média de atividade enzimática de $15,18 \pm 1,76$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,6 vezes menor que o valor determinado para o ponto de corte.

As amostras com atividade enzimática aumentada apresentaram uma média de atividade de $121,9 \pm 27,69$ U/L, correspondendo a uma atividade três vezes maior que o valor determinado para o ponto de corte.

Não foi encontrada diferença estatística entre as atividades normais e alteradas, quando comparamos relação ao sexo.

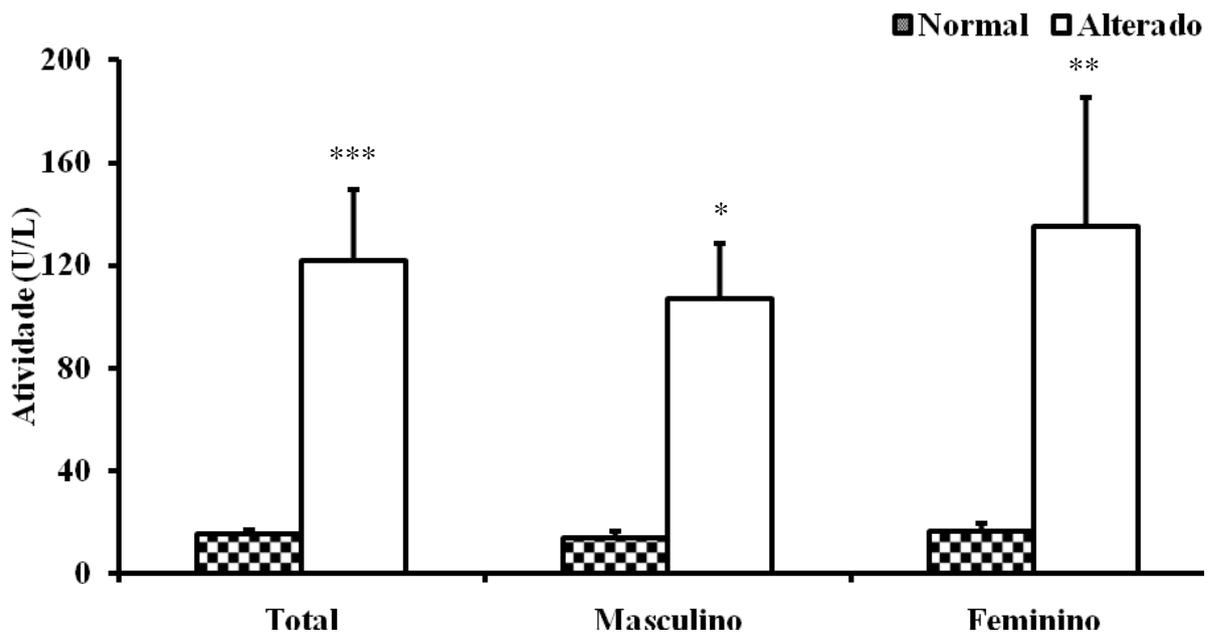


Figura 10: Perfil da atividade de ADA no líquido pericárdico em função do sexo.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA no líquido pericárdico, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ vs normal (ANOVA; Student-Newman-Kuels).

5.1.3 Perfil dos exames de ADA no líquido pleural

No período analisado, foram realizadas 564 dosagens em amostras provenientes de pacientes do sexo masculino e 490 dosagens em amostras do sexo feminino, perfazendo um total de 1.054 dosagens. Utilizando um valor de corte (*cut off*) de 40 U/L (CASTELO FILHO *et al.*, 2004), os dados foram separados em NORMAL (atividade de ADA < 40 U/L) ou em ALTERADO (atividade de ADA \geq 40 U/L).

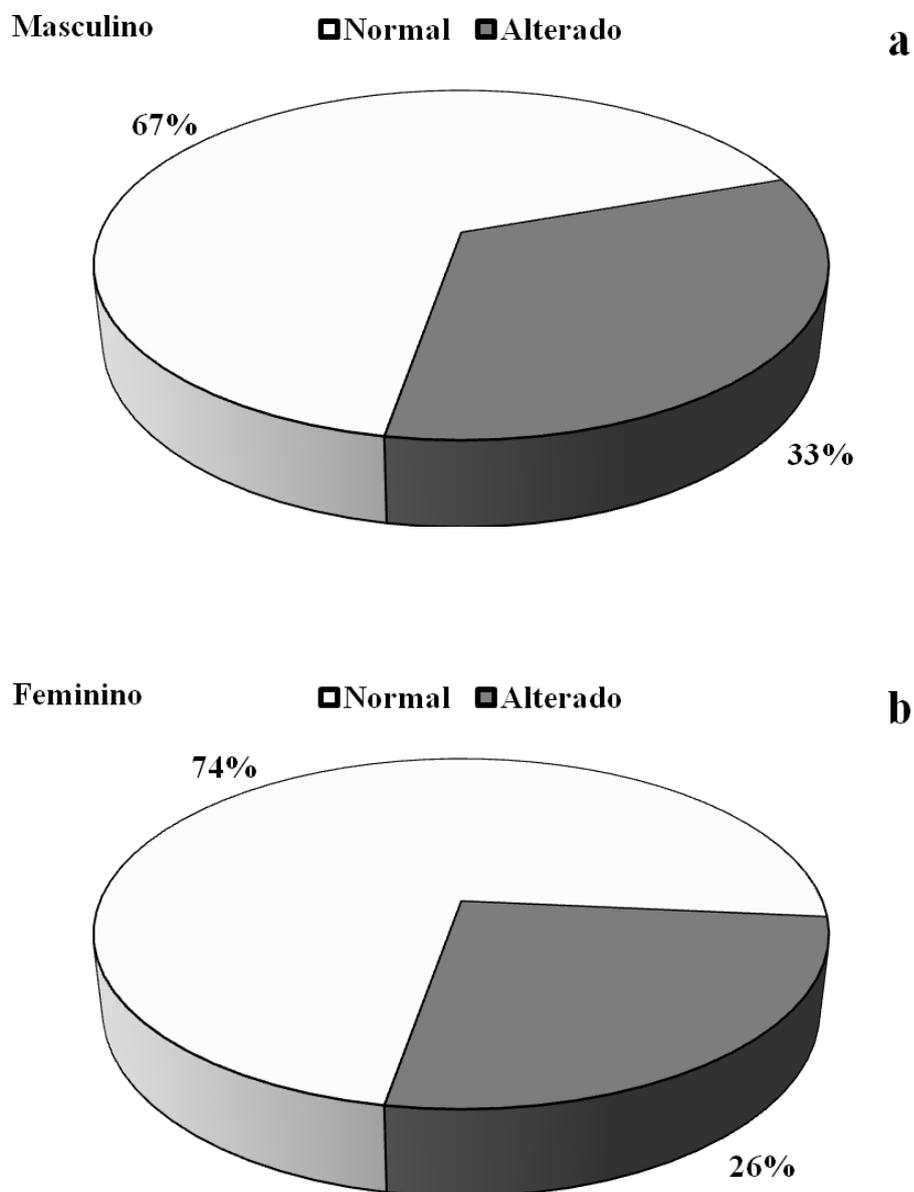


Figura 11: Perfil das análises de ADA no líquido pleural em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino.

Os resultados são expressos como percentual de amostras de líquido pleural analisadas, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo.

As amostras normais apresentaram uma média de atividade enzimática de $17,06 \pm 0,38$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,3 vezes menor que o valor determinado para o ponto de corte.

As amostras com atividade enzimática aumentada apresentaram uma média de atividade de $105,0 \pm 5,35$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,6 vezes maior que o valor determinado para o ponto de corte.

Não foi encontrada diferença estatística entre as atividades normais e alteradas, quando comparamos relação ao sexo.

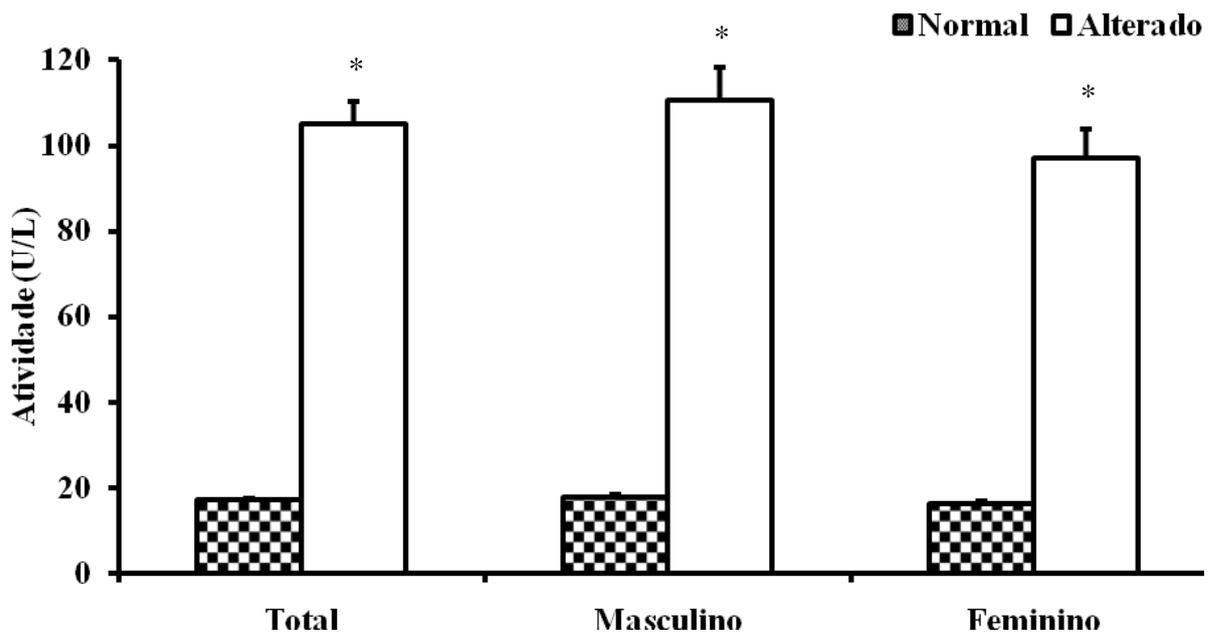


Figura 12: Perfil da atividade de ADA no líquido pleural em função do sexo.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA no líquido pleural, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo. * $p < 0,001$ vs normal (ANOVA; Student- Newman-Kuels).

5.1.4 Perfil dos exames de ADA no líquido

No período analisado, foram realizadas 217 dosagens em amostras provenientes de pacientes do sexo masculino e 212 dosagens em amostras do sexo feminino, perfazendo um total de 429 dosagens. Utilizando um valor de corte (*cut off*) de 9 U/L (FERES *et al.*, 2008), os dados foram separados em NORMAL (atividade de ADA < 9 U/L) ou em ALTERADO (atividade de ADA \geq 9 U/L).

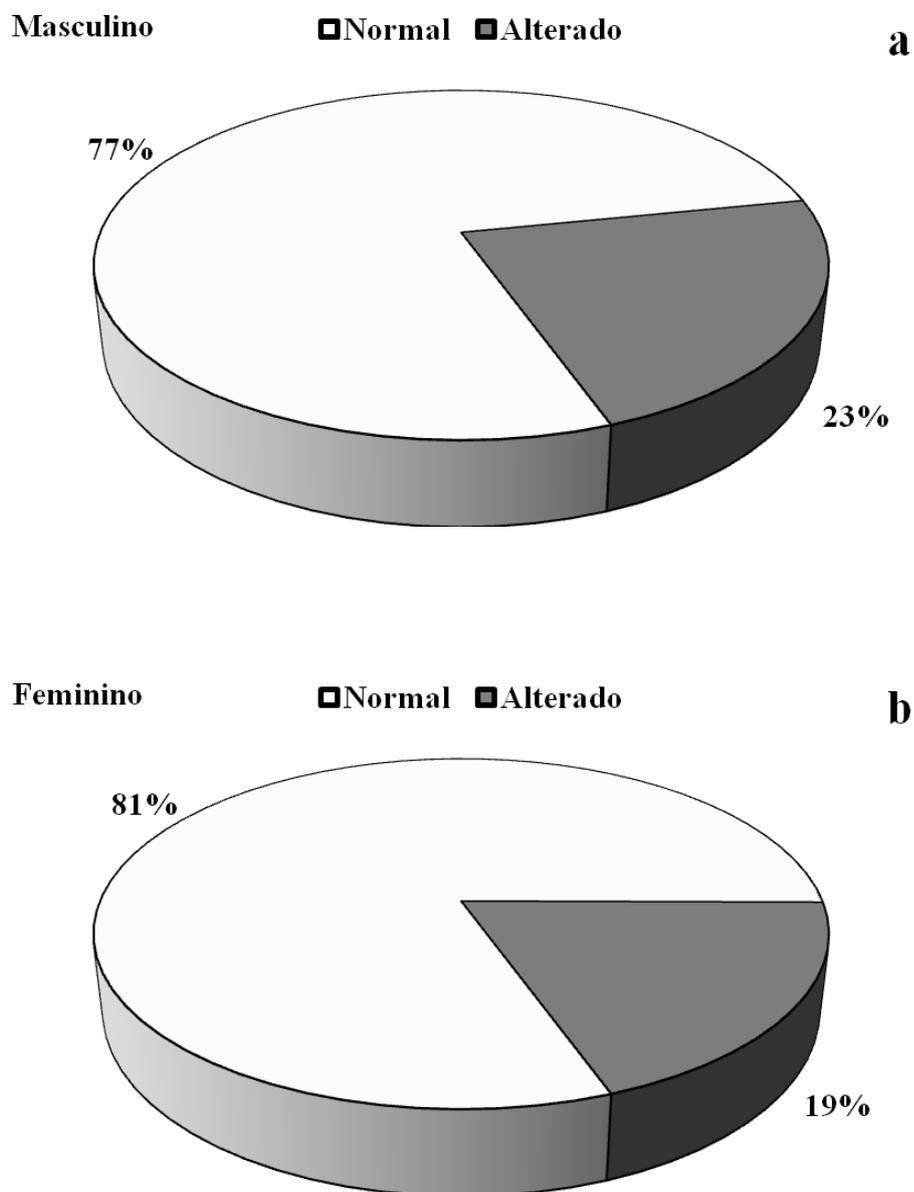


Figura 13: Perfil das análises de ADA no líquido em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino. Os resultados são expressos como percentual de amostras de líquido analisadas, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo.

As amostras normais apresentaram uma média de atividade enzimática de $2,81 \pm 0,12$ U/L, correspondendo a uma atividade 3,2 vezes menor que o valor determinado para o ponto de corte.

As amostras com atividade enzimática aumentada apresentaram uma média de atividade de $22,22 \pm 1,79$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,5 vezes maior que o valor determinado para o ponto de corte.

Não foi encontrada diferença estatística entre as atividades normais e alteradas, quando comparamos relação ao sexo.

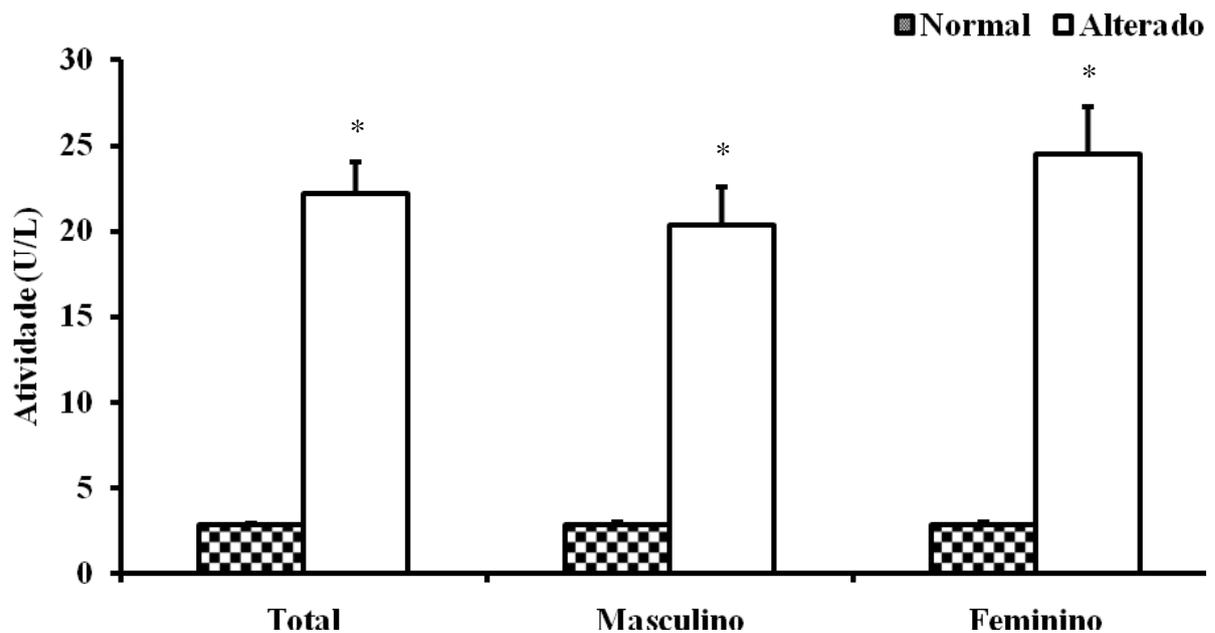


Figura 14: Perfil da atividade de ADA no líquido em função do sexo.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA no líquido, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo. * $p < 0,001$ vs normal (ANOVA; Student-Newman-Kuels).

5.1.5 Perfil dos exames de ADA no soro

No período analisado, foram realizadas 18 dosagens em amostras provenientes de pacientes do sexo masculino e 22 dosagens em amostras do sexo feminino, perfazendo um total de 40 dosagens. Utilizando um valor de corte (*cut off*) de 25 U/L (LAMSAL *et al.*, 2007), os dados foram separados em NORMAL (atividade de ADA < 25 U/L) ou em ALTERADO (atividade de ADA \geq 25 U/L).

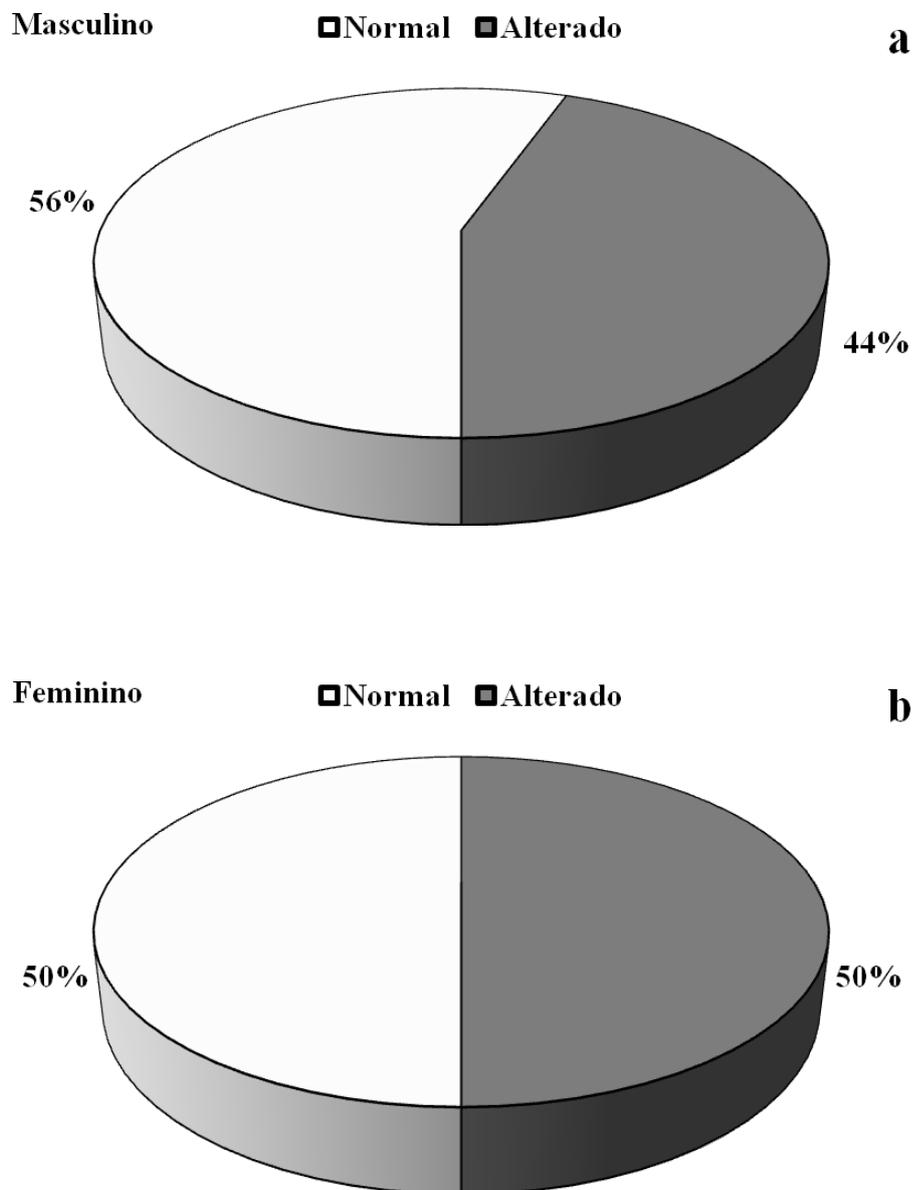


Figura 15: Perfil das análises de ADA no soro em função do sexo. a- sexo masculino. b- sexo feminino. Os resultados são expressos como percentual de amostras de soro analisadas, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo.

As amostras normais apresentaram uma média de atividade enzimática de $11,41 \pm 1,61$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,2 vezes menor que o valor determinado para o ponto de corte.

As amostras com atividade enzimática aumentada apresentaram uma média de atividade de $61,70 \pm 11,95$ U/L, correspondendo a uma atividade 2,5 vezes maior que o valor determinado para o ponto de corte.

Não foi encontrada diferença estatística entre as atividades normais e alteradas, quando comparamos relação ao sexo.

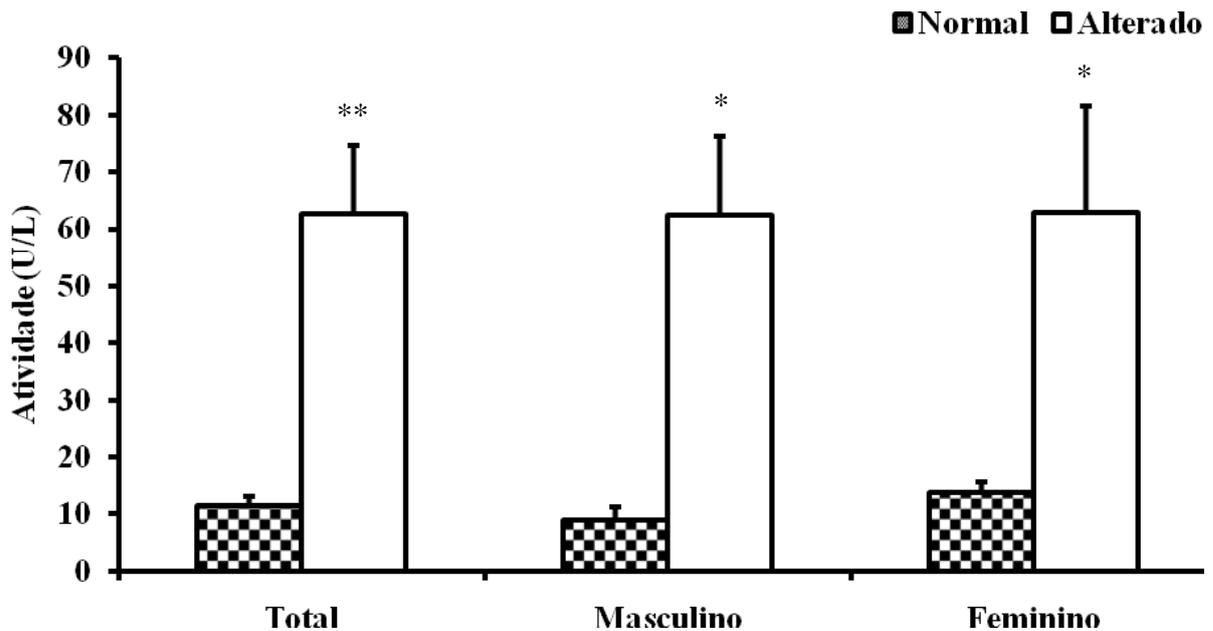


Figura 16: Perfil da atividade de ADA no soro em função do sexo.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA no soro, distribuídas por atividade normal / alterada em função do sexo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ vs normal (ANOVA; Student- Newman-Kuels).

5.1.6 Perfil dos exames de ADA nos demais fluidos corpóreos

No período analisado, foram realizadas 30 dosagens em amostras de lavado brônquico, 11 dosagens em amostras de líquido sinovial e uma amostra de urina.

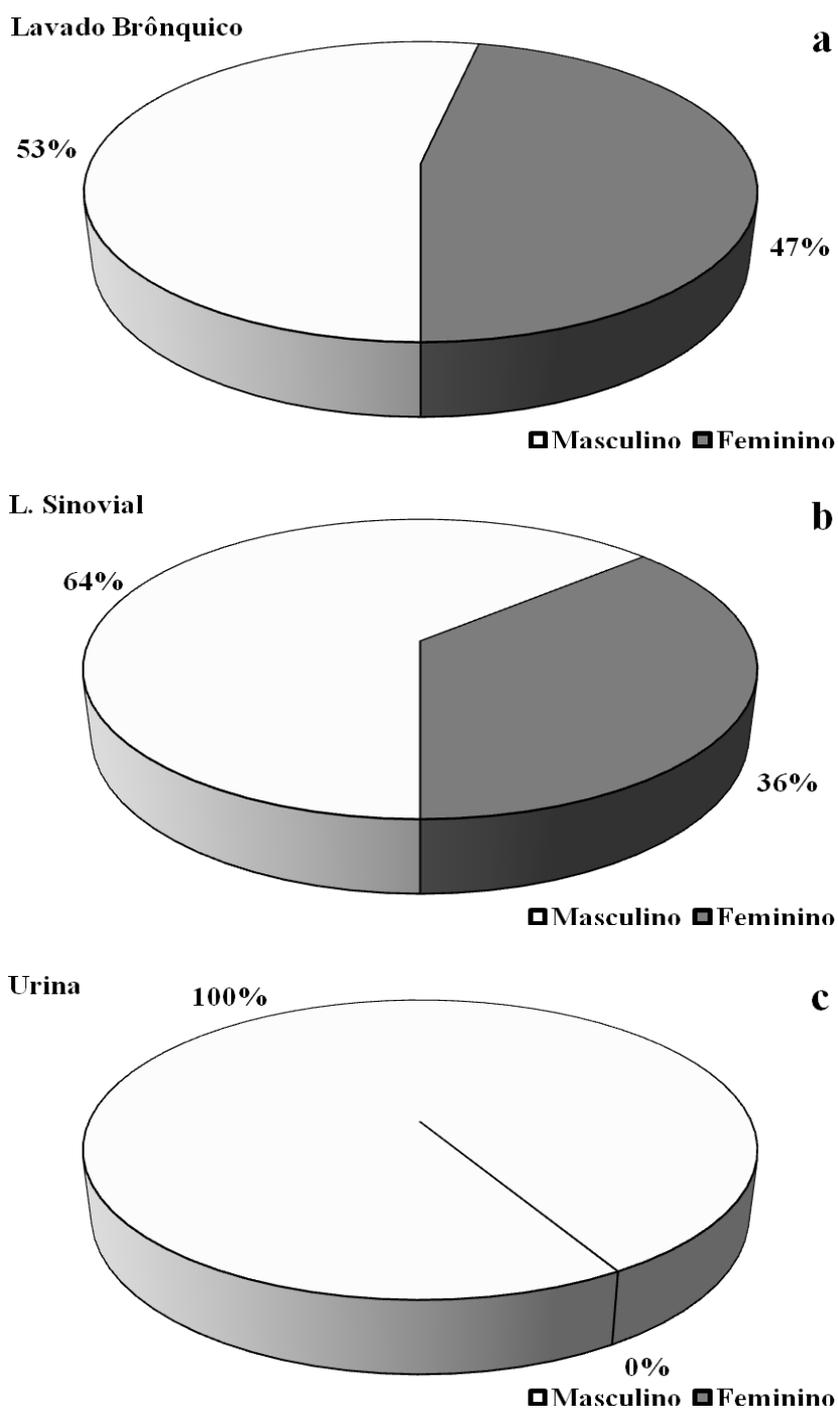


Figura 17: Perfil das análises de ADA nos demais líquidos corpóreos. a- lavado brônquico; b- líquido sinovial; c- urina.

Os resultados são expressos como percentual de amostras analisadas, distribuídas por sexo masculino / feminino.

Os fluidos corporais representados nas **figuras 17 e 18** representam os líquidos que têm menor solicitação de dosagem de ADA. Os valores de corte para estes fluidos ainda não estão bem estabelecidos na literatura.

Observamos uma diferença significativa entre a atividade no líquido sinovial quando comparamos o sexo masculino e feminino. Estudos complementares devem ser realizados para confirmar e justificar os resultados encontrados, bem como estabelecer a importância destas análises na rotina clínica.

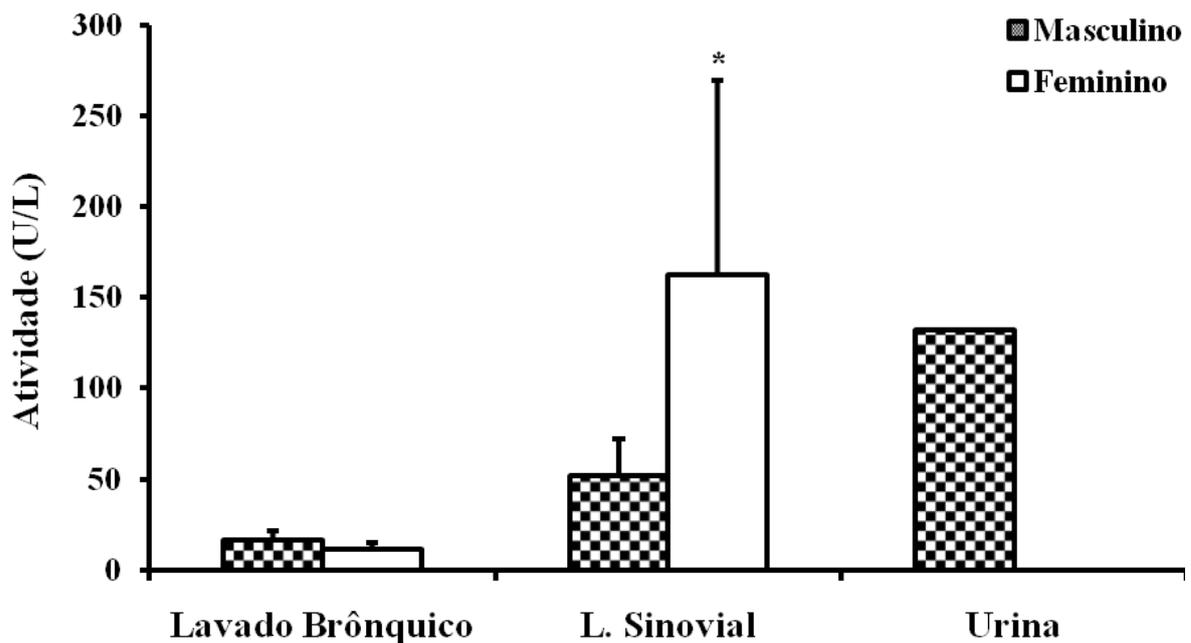


Figura 18: Perfil da atividade de ADA no lavado brônquico, líquido sinovial e urina.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. da atividade da ADA nos fluidos corporais. * $p < 0,05$ vs L. sinovial masculino (ANOVA; Student-Newman-Kuels)

5.2 Determinação da faixa de comprimento de onda para leitura

O pico de absorbância do produto formado encontra-se margeando o comprimento de onda de 600 nm. A leitura da coloração formada pode ser realizada, sem prejuízos, na faixa que compreende os comprimentos de onda de 620 a 640nm. O comprimento de onda de 628 nm é utilizado classicamente por diversos pesquisadores sendo, portanto, o comprimento de onda escolhido para a realização das nossas leituras.

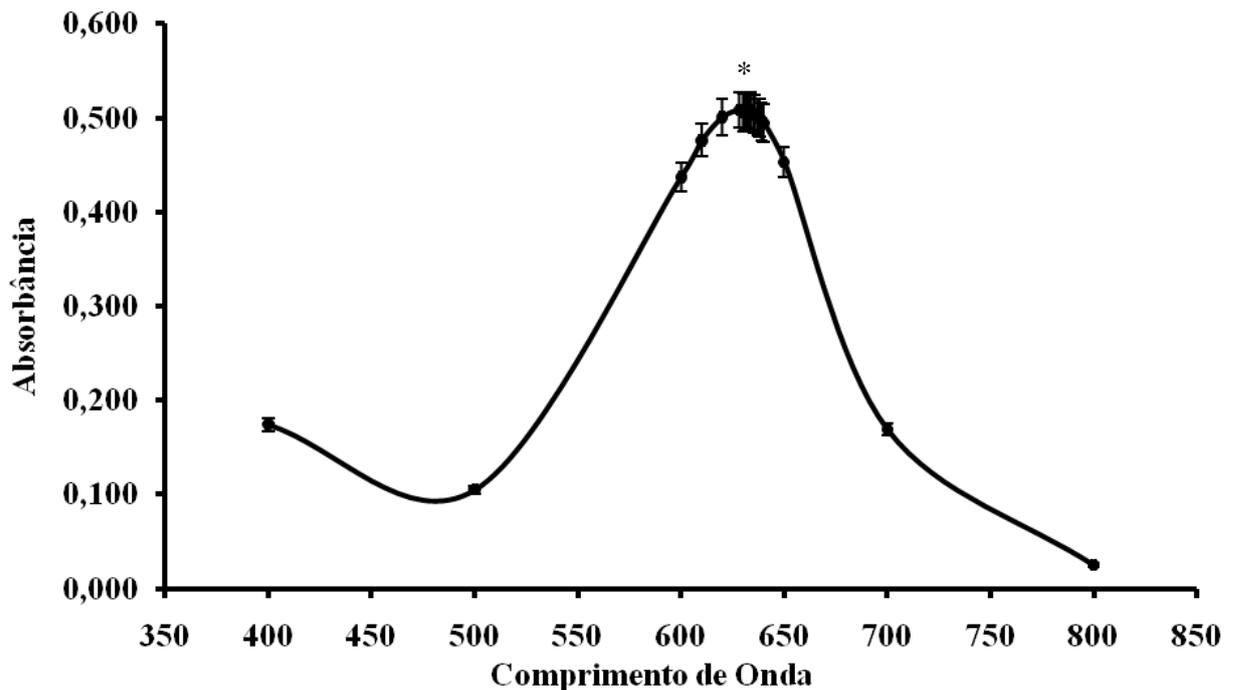


Figura 19: Variação da absorbância em função da variação do comprimento de onda.

O resultado é expresso como média \pm E.P.M. da leitura das amostras em diversos comprimentos de onda. * $p < 0,001$ vs 400, 500, 700 e 800 nm. ANOVA. Student-Newman-Kuels. (n=8)

5.3 Determinação da curva de calibração da reação

As reações colorimétricas apresentam uma faixa de leitura onde a variação da absorvância apresenta uma variação diretamente proporcional à concentração do produto formado. Entretanto, a partir de certo valor de absorvância, esta linearidade é perdida e a variação de absorvância, encontrada, não reflete mais a variação de concentração do produto formado. É necessário que se conheça esta faixa confiável de leitura para que, quando a reação apresentar uma leitura de absorvância fora desta faixa, as medidas corretivas necessárias sejam aplicadas, como por exemplo, diluindo-se a amostra.

A reação apresenta-se linear até a absorvância de 1,200 (**figura 20**). Portanto, amostras que apresentarem leituras de absorvância superiores a 1,200, foram diluídas, e os resultados foram corrigidos pelo seu fator de diluição. Quando não foi possível a diluição da amostra, o produto formado foi diluído e corrigido pelo seu fator de diluição.

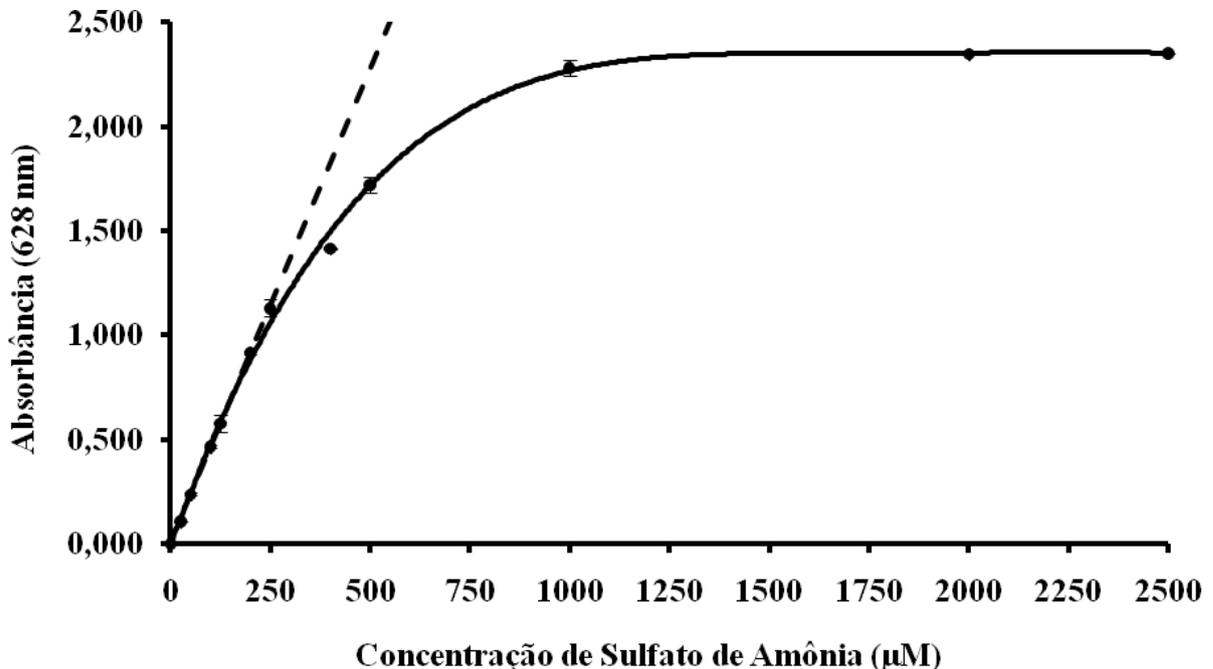


Figura 20: Curva de absorvância x concentração de sulfato de amônia.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da variação da absorvância em função da concentração de sulfato de amônia. (n=4)

A partir dos resultados expressos na **figura 20**, obtemos a reta que demonstra a formação do produto azul de indofenol (produto da reação de Berthelot) em função da concentração amônia (em nmols) presente no meio (**figura 21**).

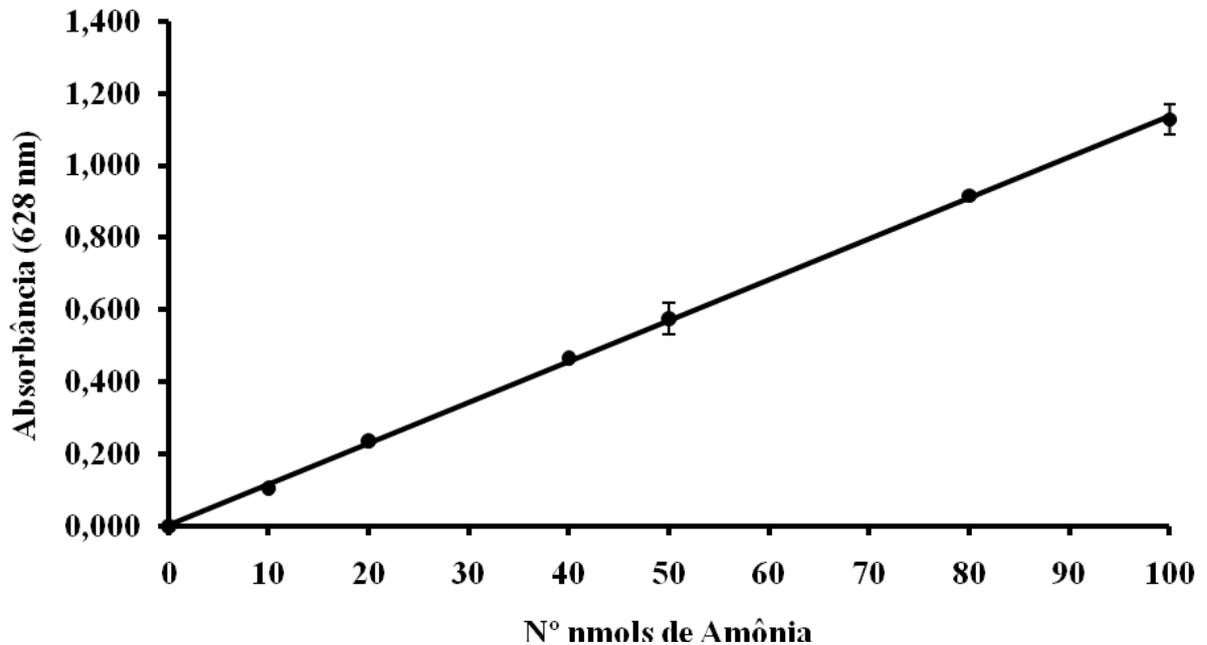


Figura 21: Curva de linearidade da reação de Berthelot.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. e representam a linearidade da variação da absorbância do produto azul de indofenol em função da variação da concentração amônia, dentro da faixa de leitura. (n=4)

A curva de linearidade da reação de Berthelot mostrada na **figura 21** é definida pela equação da reta:

$$y = 0,0113x + 0,0037 \quad \dots(8)$$

onde “y” corresponde à absorbância (Abs) e “x” corresponde à concentração de amônia ($C_{\text{amônia}}$). A partir da **equação 8**, obtemos a concentração de amônia presente na reação de Berthelot pela curva de calibração através da equação:

$$C_{\text{amônia}} = \frac{\text{Abs} - 0,0037}{0,0113} \text{ nmols} \quad \dots(9)$$

5.4 Determinação da curva de formação da cor/ estabilidade

O tempo mínimo necessário para a realização da leitura da cor formada a partir da reação de Berthelot é de 30 minutos. A coloração formada permanece estável por um período de pelo menos 24h.

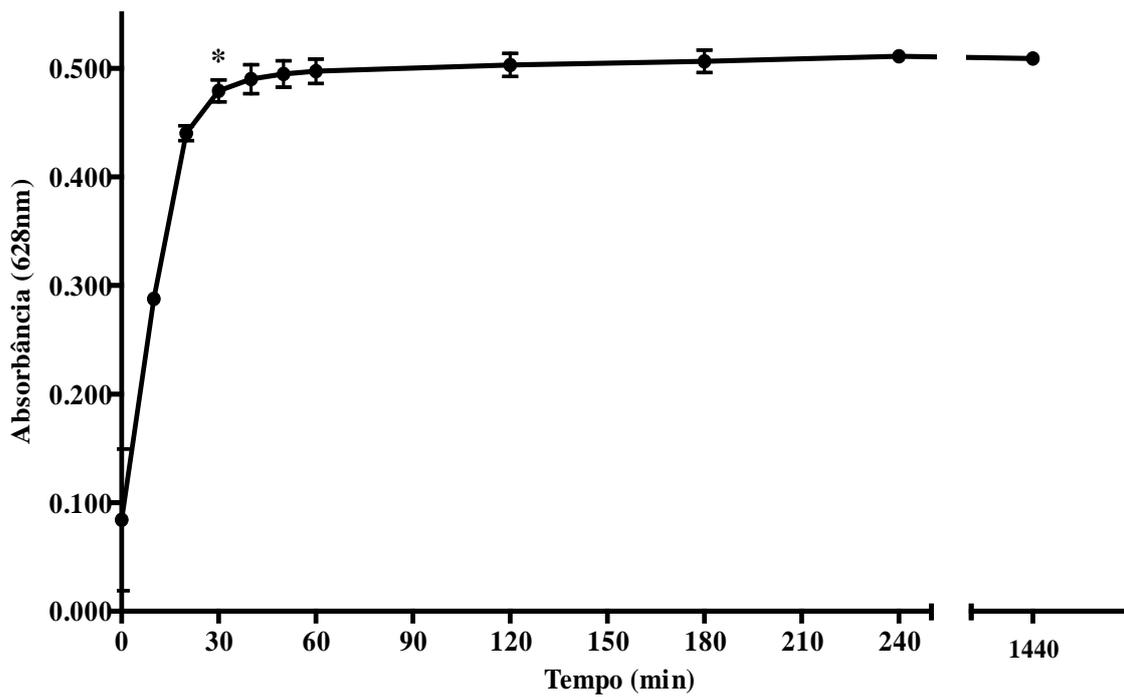


Figura 22: Curva de formação da cor / estabilidade.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M das medidas de absorbância do produto azul de indofenol em função do tempo necessário para a formação da coloração do produto final e o tempo de estabilidade da coloração formada. * $p < 0,01$ vs tempo = 20 min (ANOVA; Student Newman Kuels). (n=4)

5.5 Avaliação do tempo de incubação da amostra

Observamos na **figura 23a** que a amônia é produzida por um período de pelo menos 20 horas, quando a ADA de uma amostra de líquido pericárdico é incubada com adenosina 20mM a 37°C. Na **figura 23b**, observamos que a mesma amostra, após 6 horas de incubação, pára de reagir, quando incubada com adenosina 0,5mM a 37°C.

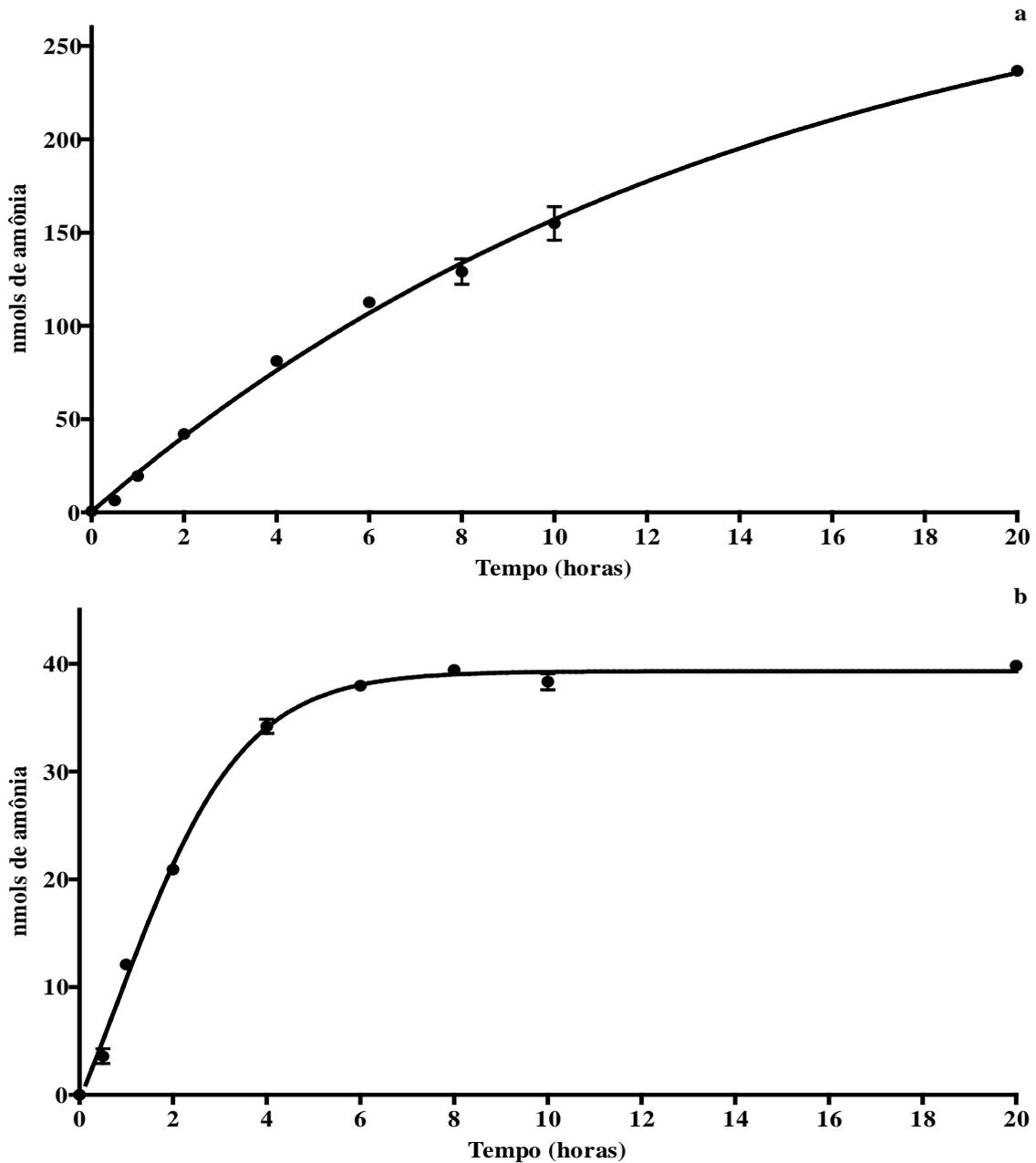


Figura 23: Produção de amônia pela ADA em função do tempo. a- Enzima incubada em adenosina 20mM. b- Enzima incubada em adenosina 0,5mM.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da quantidade de nmols de amônia produzida na reação enzimática (n=4).

Observamos na **figura 24** que a ADA atinge a velocidade máxima após uma hora de reação, reduzindo-a na medida em que o substrato é consumido.

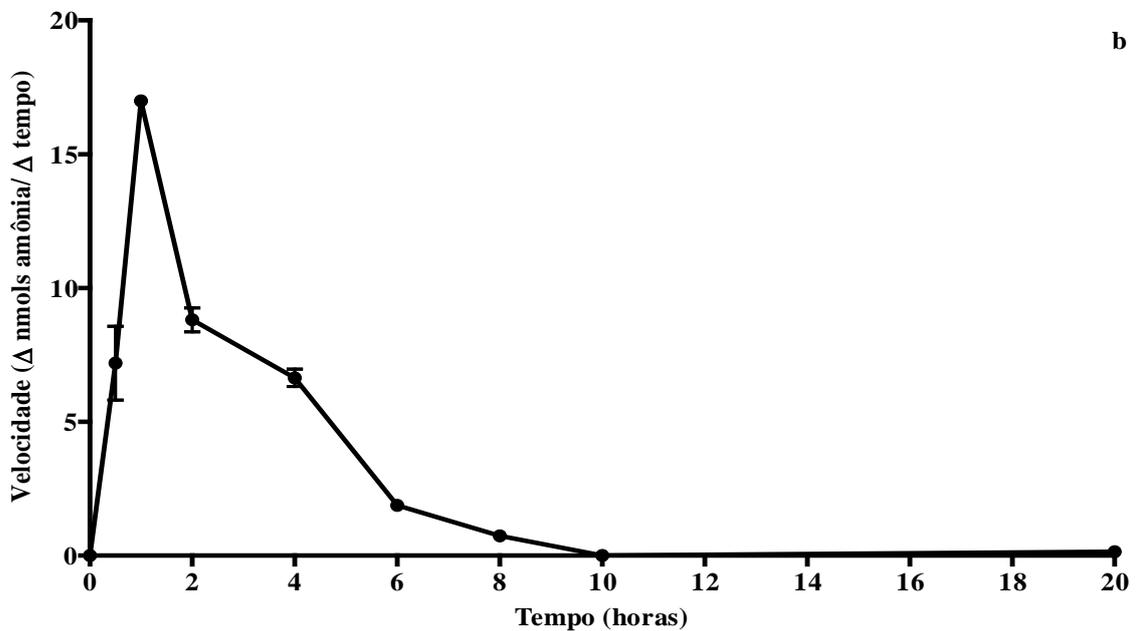
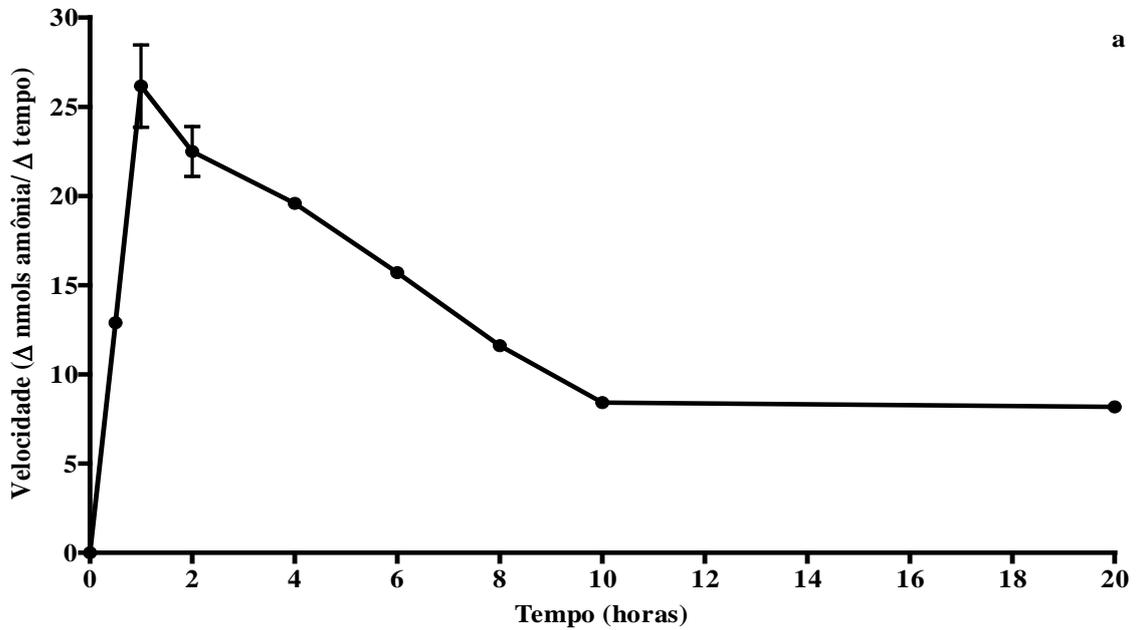


Figura 24: Velocidade da reação enzimática em função do tempo de incubação. a- Enzima incubada em adenosina 20mM. b- Enzima incubada em adenosina 0,5mM.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da velocidade (Δ nmols de amônia/ Δ tempo) em função do tempo na reação enzimática (n=4).

5.6 Avaliação da temperatura na incubação da amostra

Observamos na **figura 25a** que a incubação da ADA de uma amostra de líquido pericárdico incubada a uma temperatura de 50°C/1h favorece a uma maior atividade enzimática, mantendo a enzima ativa até um período superior a 2 horas em incubação com adenosina, conforme observado na **figura 25b**.

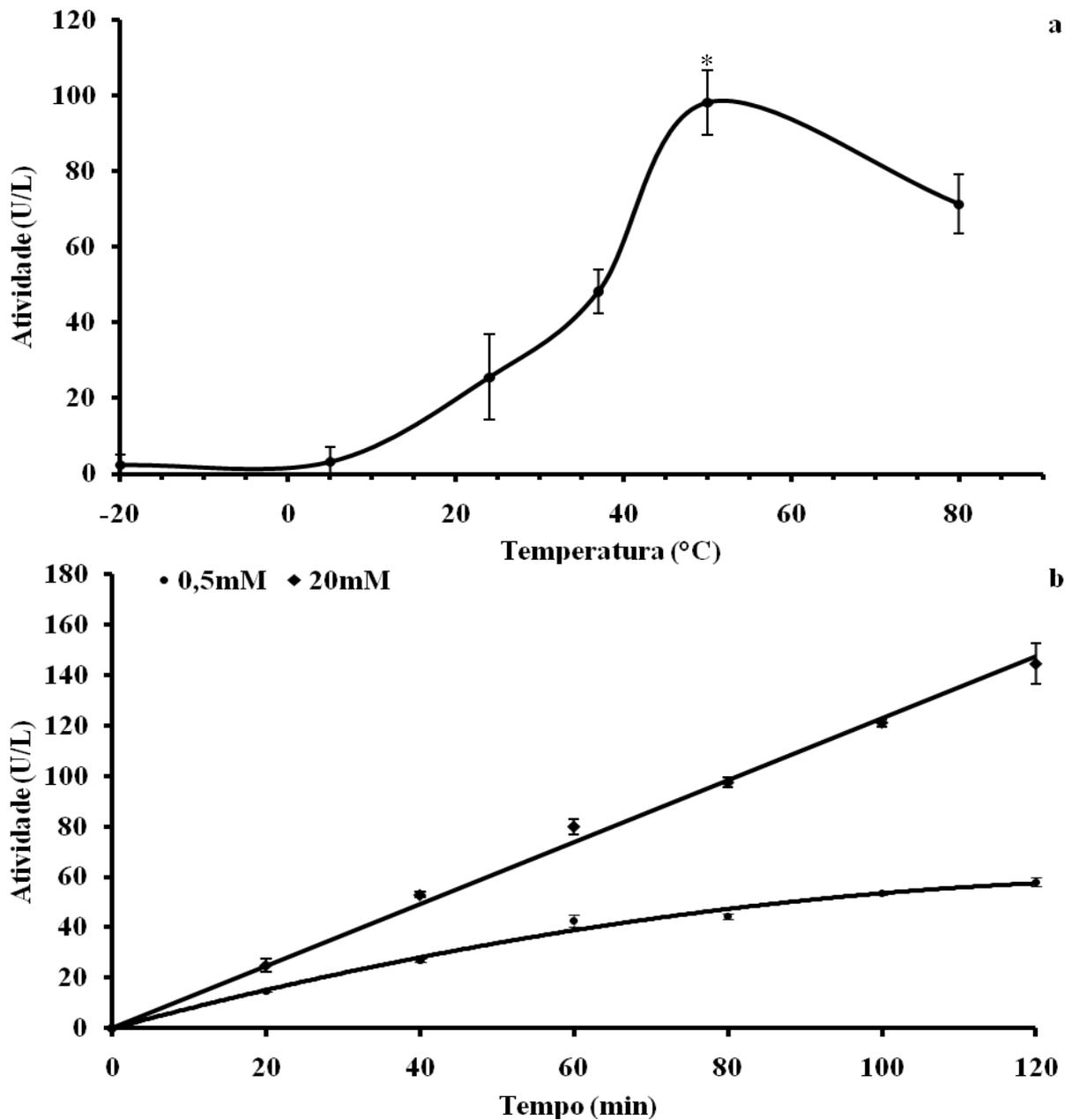


Figura 25: Variação da atividade enzimática em função da temperatura de incubação. a- Atividade enzimática entre a temperatura de -20 a 80°C. b- Atividade enzimática à 50°C em função do tempo. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da atividade enzimática em U/L. * $p < 0,001$ vs -20, 5, 24, 37 e 80°C (ANOVA; Student Newman Kuels), (n=4).

5.7 Avaliação do pH na incubação da amostra

Observamos que a amostra de líquido pericárdico, quando incubada em adenosina 20 mM, apresentou uma maior atividade enzimática em torno do pH de 6,5.

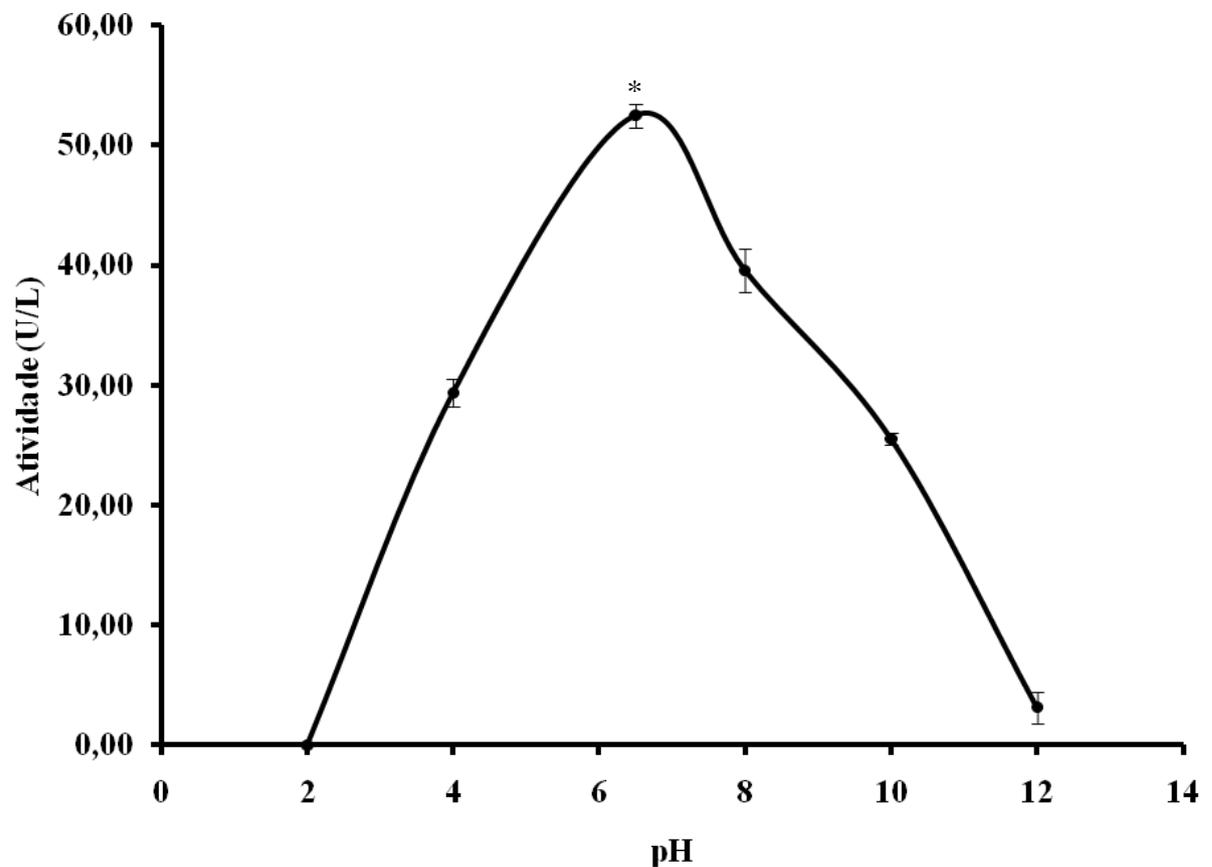


Figura 26: Influência do pH na atividade enzimática.

Os resultados são expressos como média \pm E.P.M da atividade enzimática em U/L. * $p < 0,001$ vs pH 2,0; 4,0; 8,0; 10,0 e 12,0 (ANOVA; Student Newman Kuels) (n=4).

5.8 Avaliação do sentido de migração da ADA no gel de agarose

Uma amostra de líquido pleural (**figura 27a**) e de ADA bovina (**figura 27b**) foram aplicadas no centro do gel (fatia 11). Após a corrida, determinou-se a atividade enzimática nas fatias do gel. A ADA apresenta um ponto isoelétrico em torno do pH 4,7 (KOIZUMI *et al.*, 1985). No pH analisado, observou-se uma migração enzimática no sentido do catodo (fatia 0 - eletrodo negativo) para o anodo (fatia 22 - eletrodo positivo).

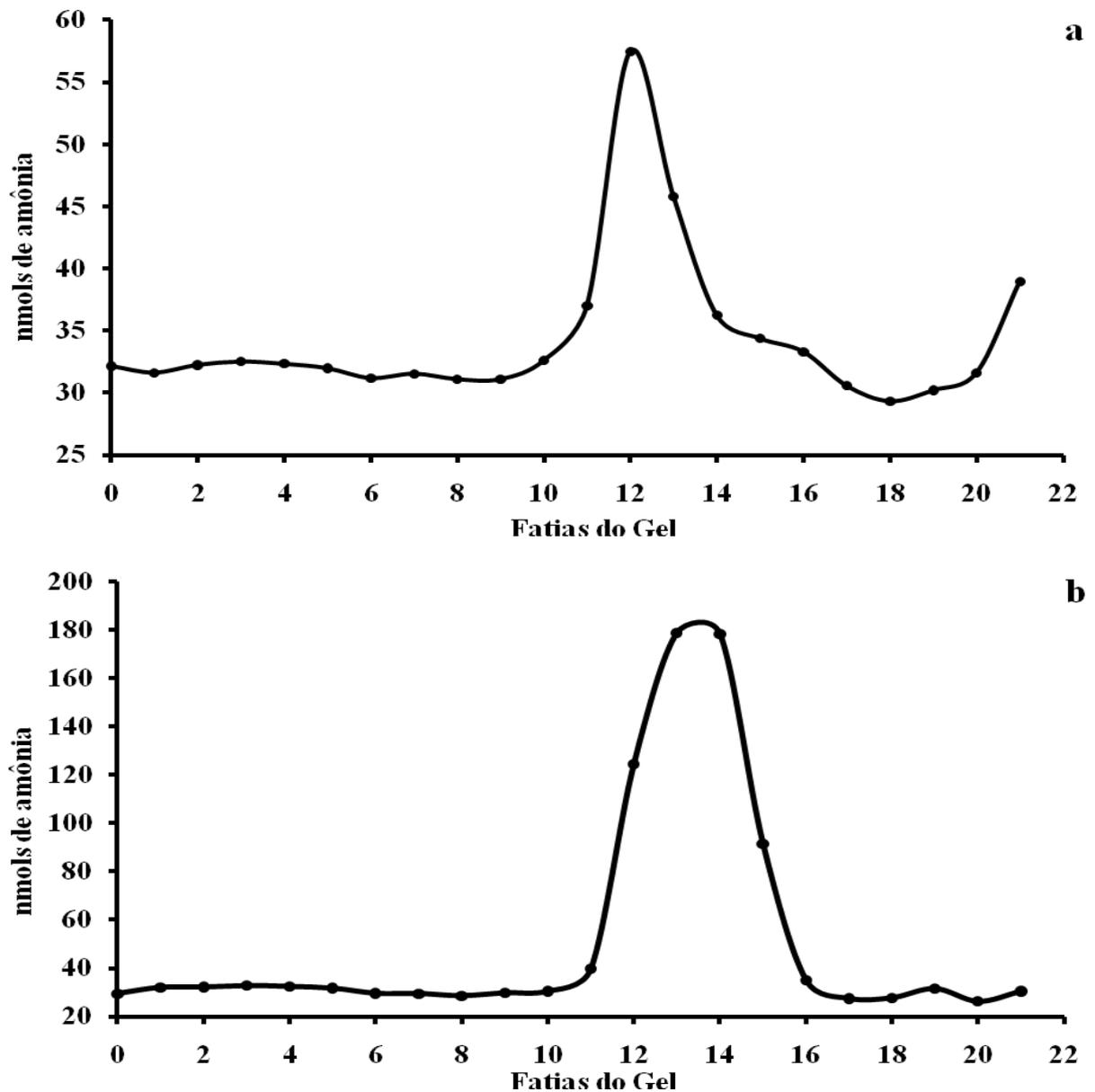


Figura 27: Sentido de migração da ADA no gel de agarose. a- Migração de uma amostra de líquido pleural. b- Migração de uma amostra de ADA1 bovina.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.9 Avaliação do estado físico do gel na atividade enzimática

Após a eletroforese, o gel de agarose contendo uma amostra de líquido pleural foi fatiado e as fatias foram divididas em dois grupos: fatias íntegras ou fatias trituradas.

Utilizando a correlação de Pearson, observa-se uma correlação linear ao nível de significância de $p < 0,001$ entre a atividade enzimática no gel íntegro vs triturado.

A enzima presa na malha do gel é liberada na solução durante a incubação, não havendo interferência do estado físico do gel na atividade enzimática.

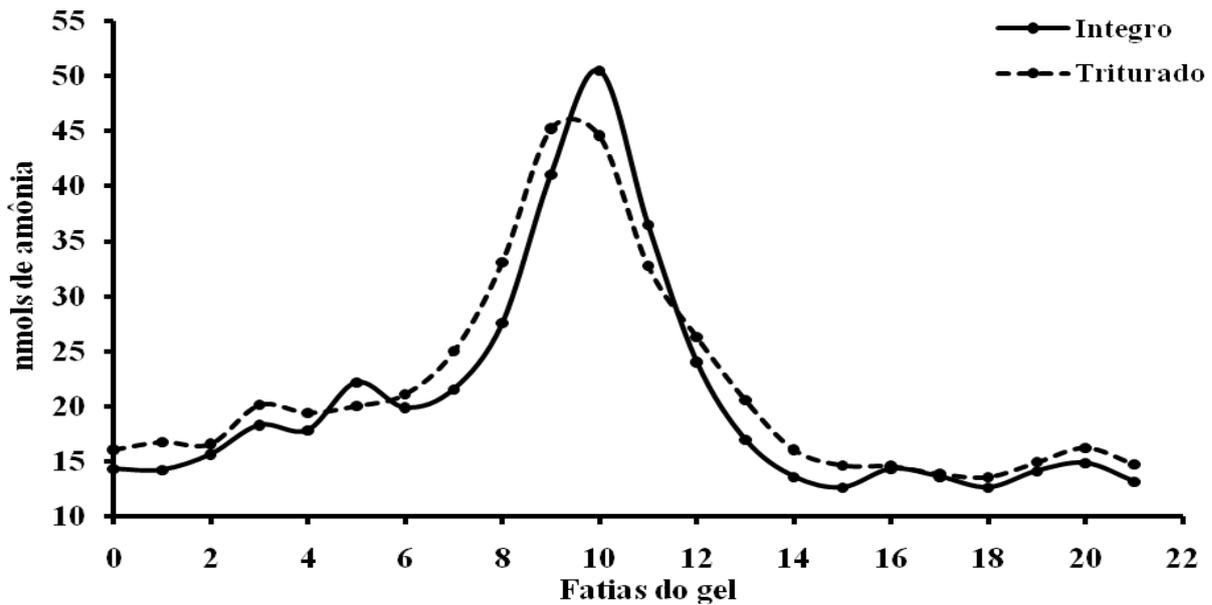


Figura 28: Atividade enzimática em função do estado físico do gel.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose. $p < 0,001$ íntegro vs triturado (Correlação de Pearson).

5.10 Avaliação do tempo de incubação da amostra

À medida que variamos o tempo de incubação das fatias do gel, observamos um aumento do pico de atividade enzimática. Na **figura 29a** observamos a formação dos picos enzimáticos de uma amostra de líquido ascítico que contém uma atividade enzimática muito elevada (240 U/L), enquanto que na **figura 29b** observamos a evolução da formação dos picos enzimáticos de uma amostra de líquido pericárdico que contém uma atividade enzimática relativamente baixa (49 U/L).

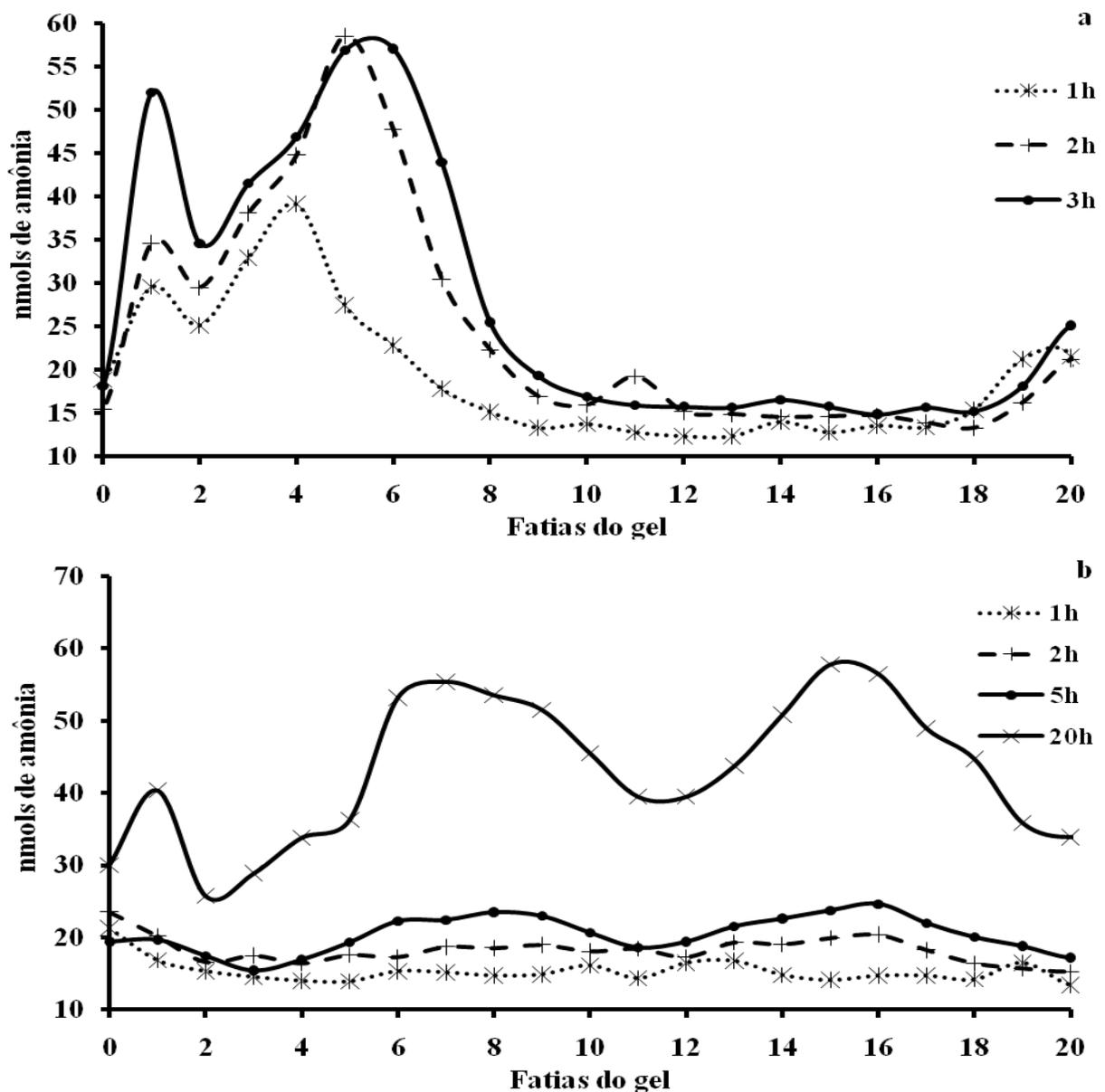


Figura 29: Atividade enzimática em função do tempo de incubação. a- Líquido ascítico. b- Líquido pericárdico.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.11 Discriminação das isoenzimas da ADA no gel de agarose

5.11.1 Perfil de migração da isoforma ADA1

Utilizando o modelo descrito por Cavalcante *et al.* (2009), extraiu-se a isoforma ADA1 da adenosina desaminase eritrocitária humana. Esta enzima foi utilizada como marcador de migração para esta isoforma.

Observa-se que a isoforma ADA1 apresenta um perfil de migração, utilizando as condições experimentais estabelecidas, na região γ .

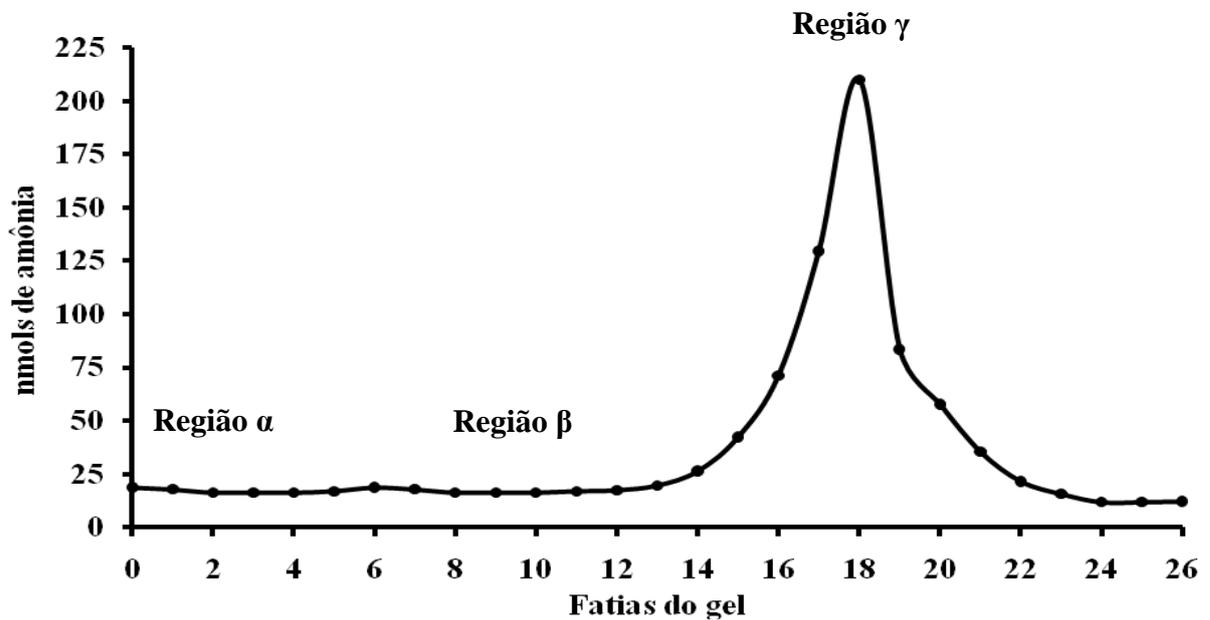


Figura 30: Perfil de migração da isoforma ADA1.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.11.2 Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pleural

Na **figura 31**, comparamos o perfil de migração da isoforma ADA1 quando utilizamos uma amostra de homogenato de eritrócitos como marcador de migração.

Na **figura 32a**, observamos a presença das três isoformas da ADA. Quando incubamos as fatias do gel em baixas concentrações de adenosina, observamos uma supressão do pico na região β , que é compatível com o elevado K_m da isoenzima ADA2 (**figura 32b**).

Na **figura 32b**, observamos a isoforma ADA1-CD26 migrando na região α e a isoforma ADA1 migrando na região γ .

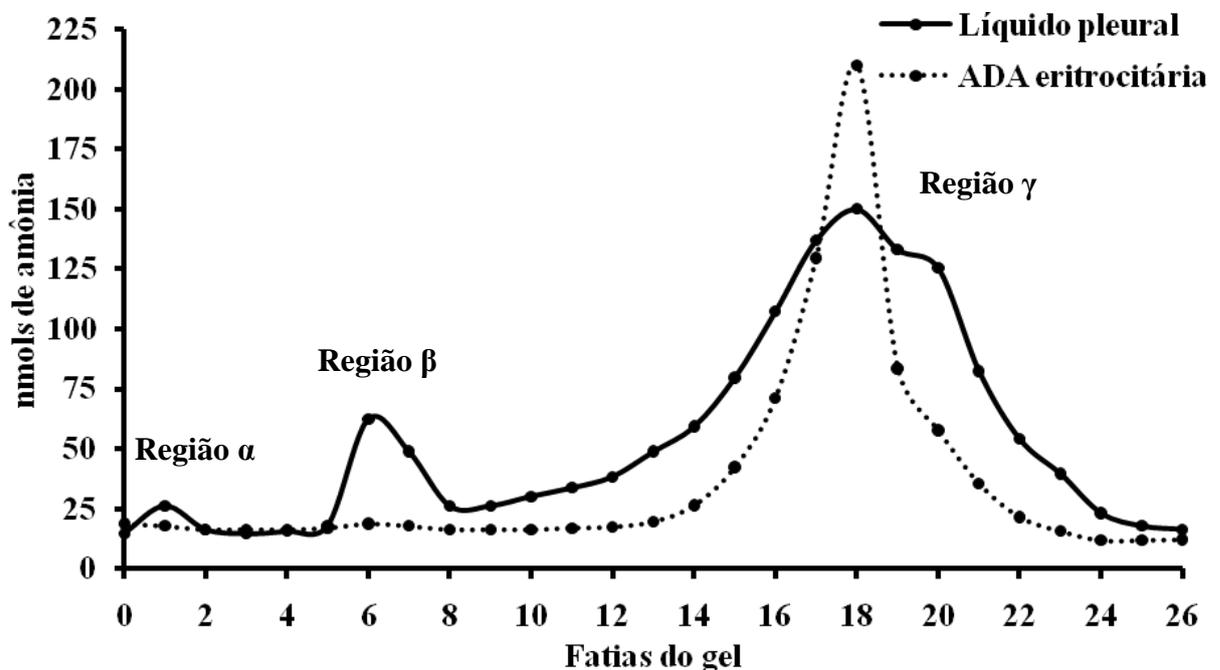


Figura 31: Perfil comparativo da migração da isoforma ADA1 eritrocitária com as isoenzimas no líquido pleural.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

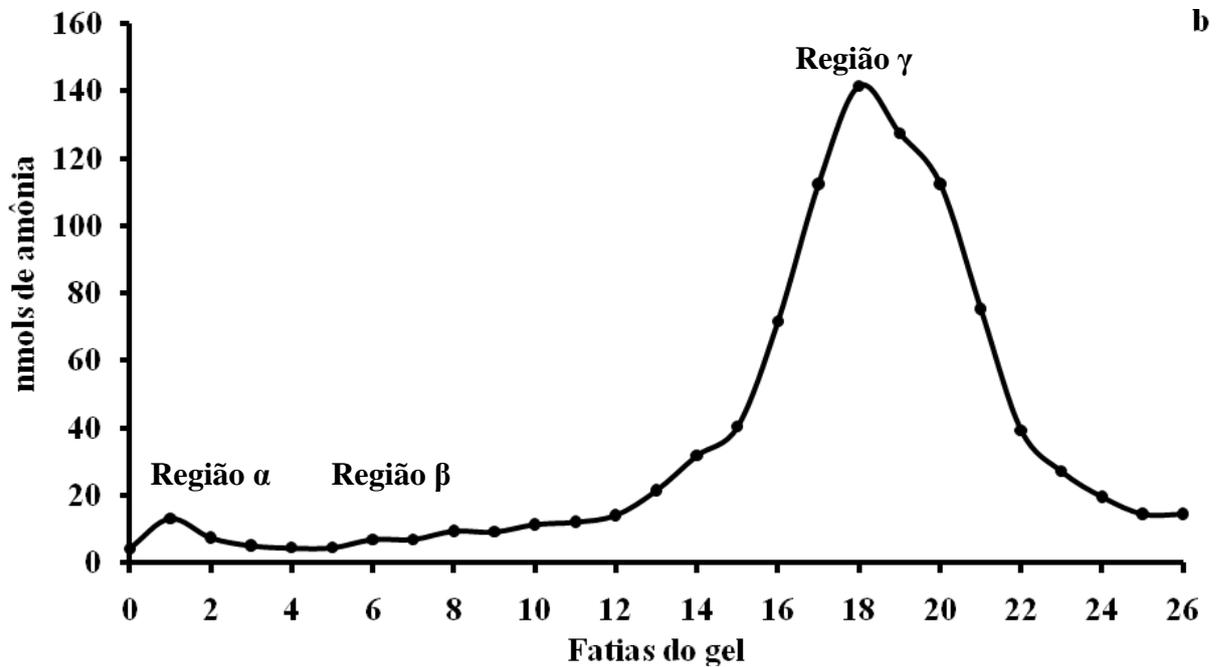
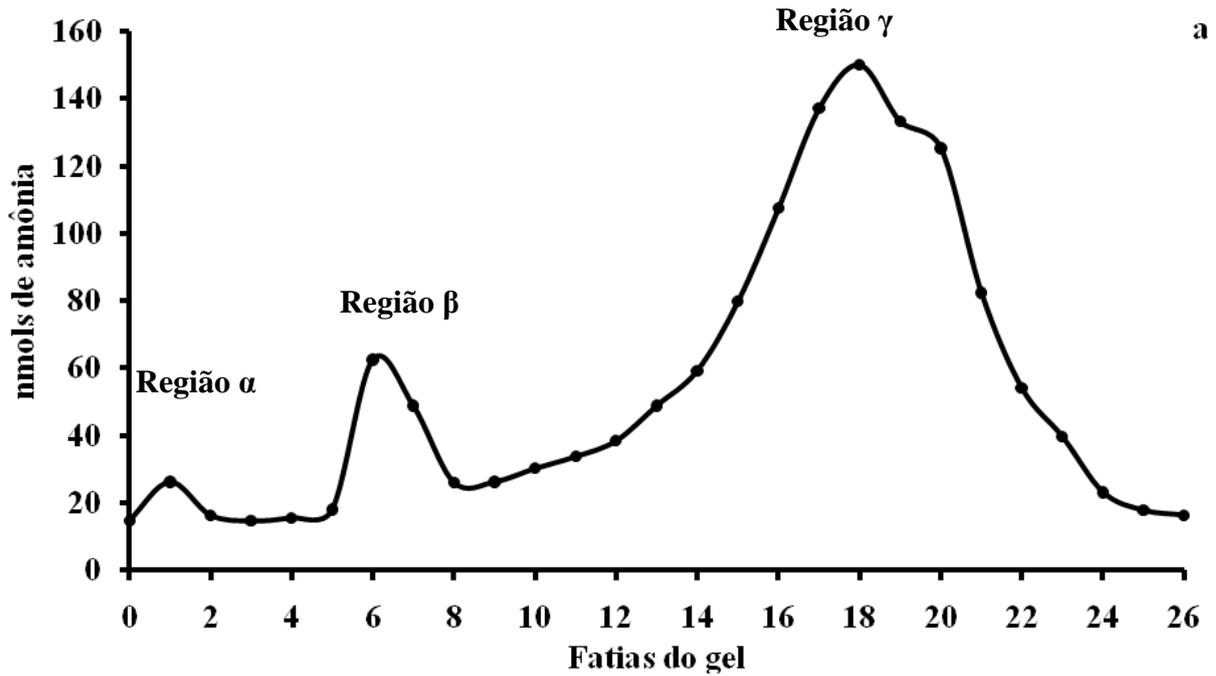


Figura 32: Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pleural. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.11.3 Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido ascítico

Na **figura 33** observamos uma amostra de líquido ascítico apresentando uma alta atividade enzimática na região β , caracterizando uma predominância da isoforma ADA2.

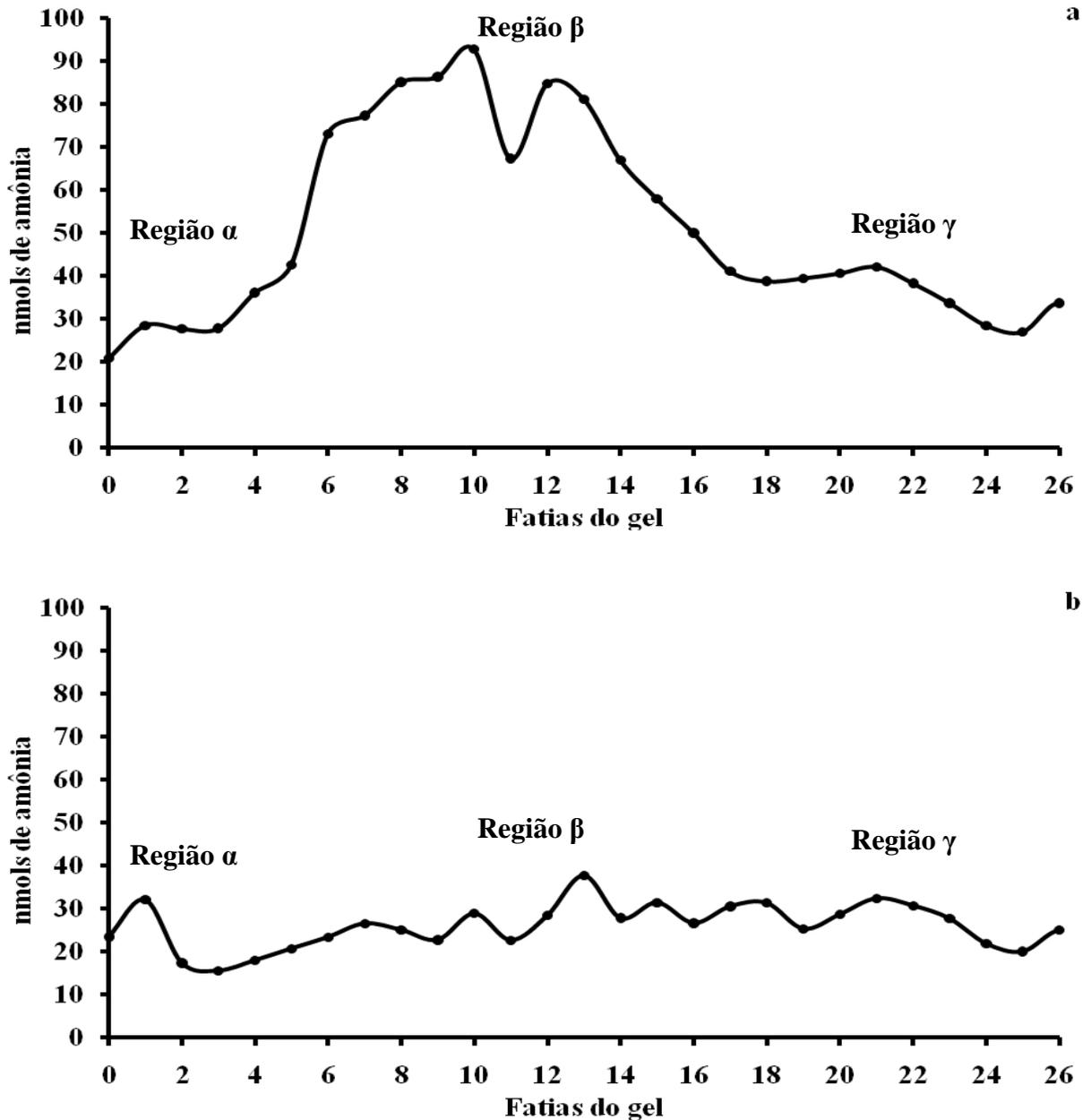


Figura 33: Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido ascítico. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.11.4 Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pericárdico

Observamos na **figura 34** uma amostra de líquido pericárdico apresentando um perfil enzimático compatível com alta atividade das isoformas ADA1 (região γ) e ADA2 (região β), e baixa atividade de ADA1-CD26 (região α).

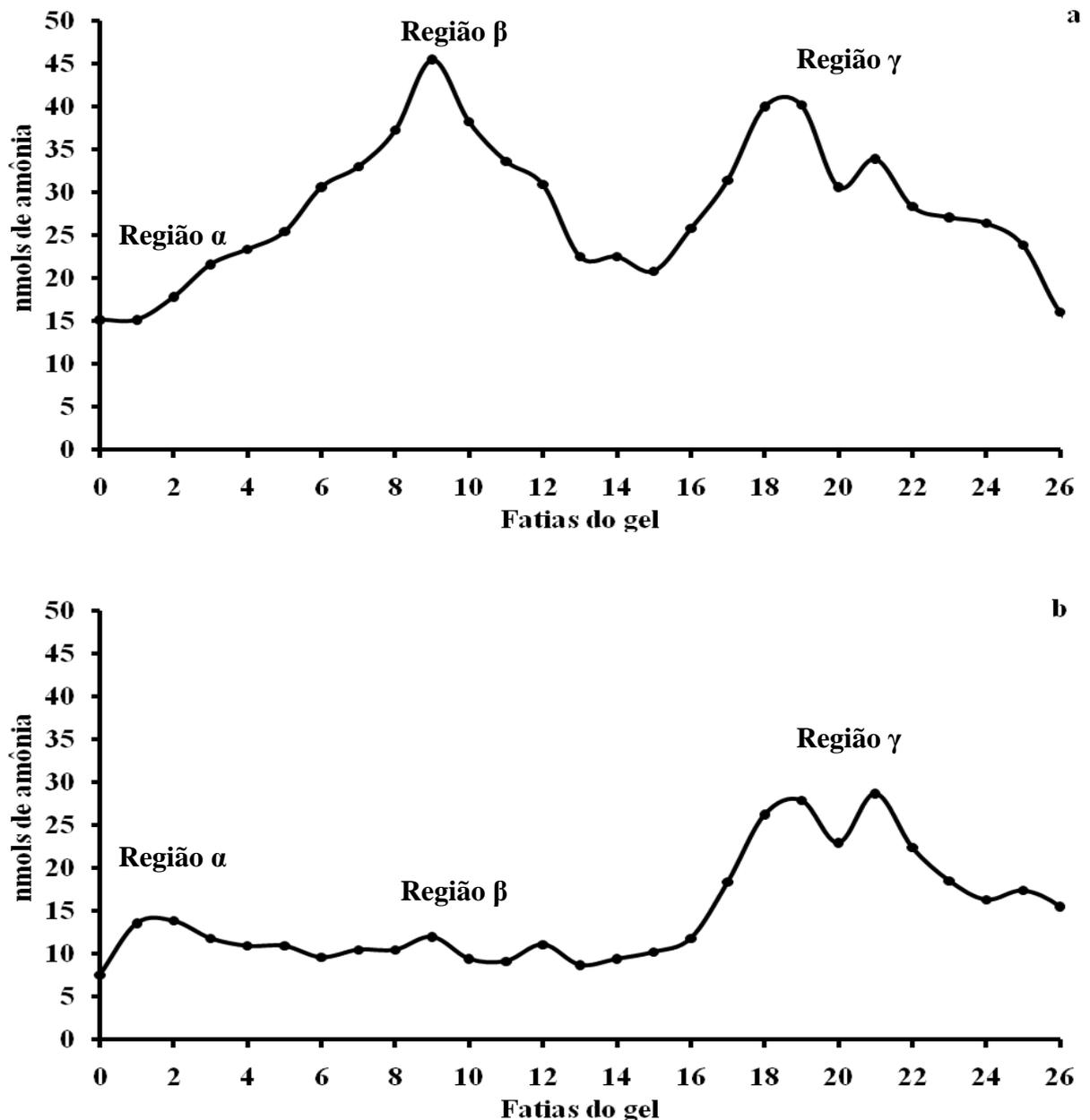


Figura 34: Discriminação das isoenzimas da ADA no líquido pericárdico. a – Fatias de gel incubadas com adenosina 22mM. b- Fatias de gel incubadas com adenosina 0,55mM.

Os resultados são expressos como quantidade de amônia liberada pela reação enzimática da ADA em fatias de agarose.

5.12 Modelo de Vale e Almeida (1998) vs eletroforese

Mediu-se a área das regiões α , β e γ através de planimetria computadorizada com o auxílio do programa ImageJ. Os resultados foram expressos em valores de pixels. Os pixels foram transformados em área percentual. A atividade da enzima ADA1 corresponde ao somatório da atividade das regiões α e γ . A atividade da enzima ADA2 corresponde a atividade da região β . Os resultados obtidos foram expressos na **tabela 1**.

Tabela 1: Valores da atividade da adenosina desaminase através da eletroforese em gel de agarose.

Amostra	Área (pixels)			Área (%)		
	Região α	Região β	Região γ	Região α	Região β	Região γ
1	570	5.597	59.405	0,87	8,54	90,60
2	151	11.445	982	1,20	90,99	7,81
3	1.066	43.523	8.779	2,00	81,55	16,45
4	1.482	4.884	16.652	6,44	21,22	72,34
5	640	1.752	20.929	2,74	7,51	89,74
6	0	10.384	469	0,00	95,68	4,32
7	139	17.628	15.593	0,42	52,84	46,74
8	463	23.225	20.287	1,05	52,81	46,13

Os resultados são expressos como área das regiões α , β e γ , medida em pixels através de planimetria eletrônica, ou em percentual de área das regiões α , β e γ .

As amostras utilizadas na eletroforese tiveram suas atividades determinadas utilizando o método descrito por Giusti (1974). A discriminação das isoenzimas foi realizada através do método descrito por Vale e Almeida (1998) e os resultados obtidos foram expressos na **tabela 2**.

Tabela 2: Valores de atividade das isoenzimas da adenosina desaminase obtidos a partir do modelo proposto por Vale e Almeida (1998).

Amostra	Atividade (U/L)		Atividade (%)	
	ADA1	ADA2	ADA1	ADA2
1	85,34	20,65	80,52	19,48
2	1,55	125,75	1,22	98,78
3	8,35	61,75	11,91	88,09
4	40,20	13,00	75,56	24,44
5	85,34	20,65	80,52	19,48
6	0,00	139,39	0,00	100,00
7	16,27	33,25	32,86	67,14
8	23,16	38,28	37,70	62,30

Os resultados são expressos como atividade (em U/L) das isoenzimas da adenosina desaminase humana, medida através do método descrito por Vale e Almeida (1998), ou em percentual de atividade das isoenzimas.

Comparou-se o perfil enzimático das amostras, obtido através de eletroforese em gel de agarose, com o perfil obtido a partir do modelo proposto por Vale e Almeida (1998). Os resultados obtidos foram expressos na **tabela 3**.

Tabela 3: Comparação do perfil das isoenzimas da adenosina desaminase obtidos a partir de eletroforese em gel de agarose com o modelo proposto por Vale e Almeida (1998).

Amostras	Eletroforese - %		Modelo Vale e Almeida (1998) - %	
	ADA1	ADA2	ADA1	ADA2
1	91,46	8,54	80,52	19,48
2	9,01	90,99	1,22	98,78
3	18,45	81,55	11,91	88,09
4	78,78	21,22	75,56	24,44
5	92,49	7,51	80,52	19,48
6	4,32	95,68	0,00	100,00
7	47,16	52,84	32,86	67,14
8	47,19	52,81	37,70	62,30

Os resultados são expressos como atividade percentual das isoenzimas da adenosina desaminase humana, obtidos por eletroforese e pelo modelo Vale e Almeida (1998).

Para observar a possível existência de uma correlação linear entre os valores achados na eletroforese e os valores obtidos com o modelo de Vale e Almeida (1998), construiu-se, utilizando os dados expressos na **tabela 3**, um gráfico de dispersão das variáveis analisadas, conforme exposto na **figura 35**.

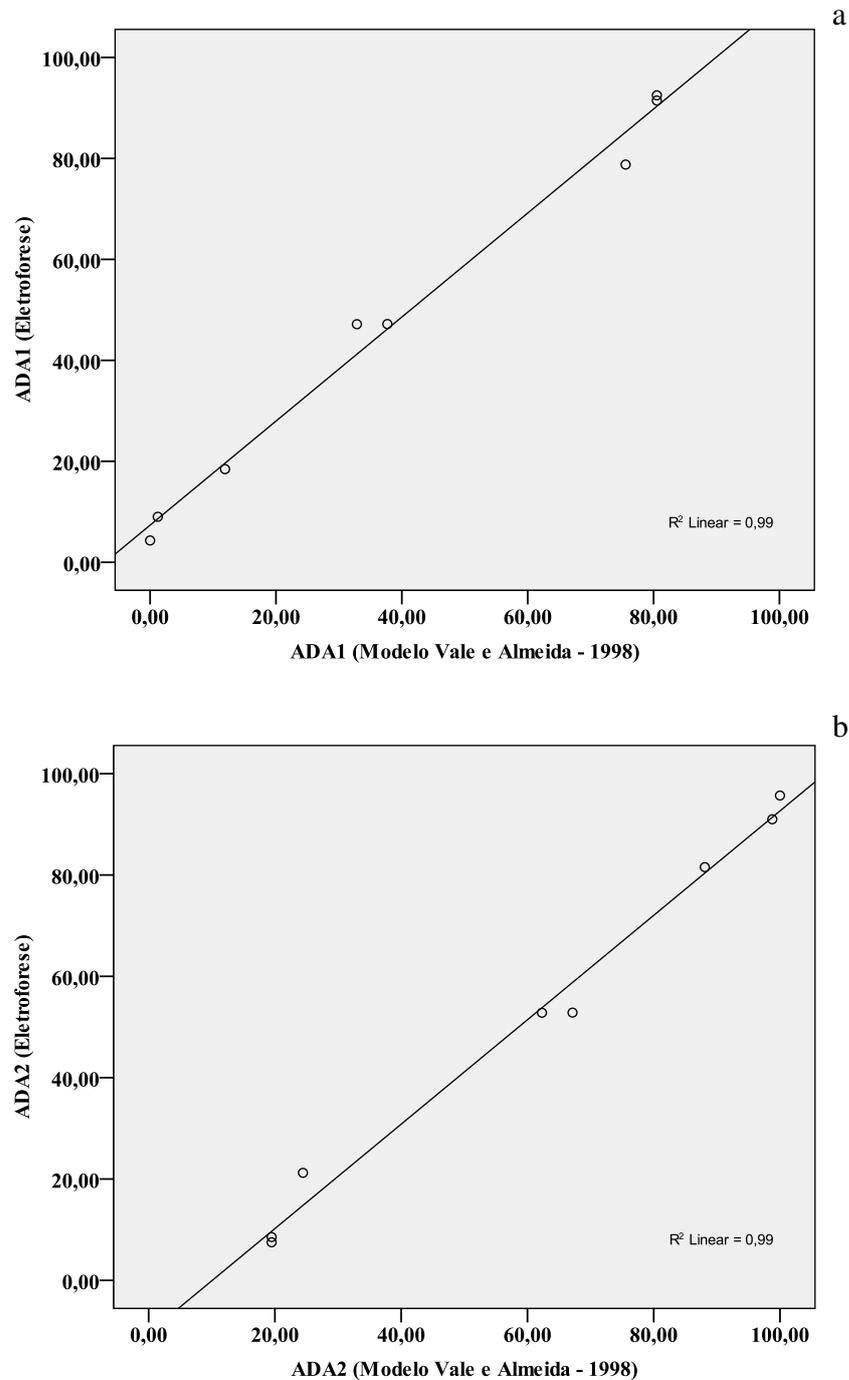


Figura 35: Gráfico de dispersão eletroforese vs modelo Vale e Almeida (1998). a- Correlação linear entre os valores da isoforma ADA1 na eletroforese vs modelo de Vale e Almeida (1998). b- Correlação linear entre os valores da isoforma ADA2 na eletroforese vs modelo de Vale e Almeida (1998).

Os resultados são expressos como valor percentual de atividade das isoformas da ADA nos modelos testados.

Observamos nas **figuras 35a e 35b** que existe uma forte correlação linear positiva entre os valores de ADA1 e ADA2, respectivamente, encontrados na eletroforese e os demonstrados pelo modelo de Vale e Almeida (1998) (coeficiente de correlação linear de Pearson $r = 0,9948$), ao nível de significância $p < 0,001$ (correlação de Pearson).

6 DISCUSSÃO

No Ceará, até o presente momento, apenas o nosso laboratório (Laboratório de Farmacologia Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará) realiza a dosagem de ADA. Os demais laboratórios de análises clínicas do Estado terceirizam este serviço enviando as amostras coletadas para laboratórios de referência em grandes centros do país.

Nosso laboratório recebe diariamente amostras de fluidos corporais de pacientes provenientes de praticamente todas as regiões do Estado, através de uma parceria que mantemos com o Hospital Universitário Walter Cantídio, Maternidade Escola Assis Chateaubriand, Hospital Estadual São José, Santa Casa de Misericórdia de Sobral e laboratórios da rede privada de assistência à saúde.

Um dos primeiros relatos publicados sobre a adenosina desaminase data de 1939, quando Conway e Cook descreveram as propriedades de desaminases no sangue e tecidos, demonstrando que uma enzima de extratos de sangue e tecidos poderia agir sobre a adenosina (CONWAY; COOKE, 1939). Brady (1942) publica uma das primeiras descrições sobre as propriedades, preparações e os estágios de purificação da adenosina desaminase.

Apesar dos setenta anos que nos separam dos primeiros relatos sobre a adenosina desaminase, há pouco conhecimento sobre a sua função e uso por parte dos profissionais de saúde no Brasil.

Nesse estudo, buscamos desenvolver uma metodologia para discriminar as isoformas da ADA através de eletroforese, bem como comprovar experimentalmente o modelo matemático proposto por Vale e Almeida (1998) na discriminação de suas isoenzimas. Descrevemos também o perfil dos exames realizados no Estado do Ceará.

Para atingir o nosso objetivo, dividimos o nosso estudo em duas etapas: iniciamos por uma análise descritiva retrospectiva das dosagens de ADA realizadas em um período de aproximadamente cinco anos, e, em uma segunda etapa, seguimos realizando uma análise experimental das amostras de fluidos corporais humanos através de eletroforese e avaliação das isoenzimas da ADA para comprovação de um modelo matemático.

No Estado do Ceará, no período de 2005 a 2008, foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), 13.772 novos casos de tuberculose, sendo 1.527 casos de tuberculose extrapulmonar (**ANEXO B**) (BRASIL, 2009). No período de janeiro de 2005 a setembro de 2009, realizamos 2.300 dosagens de ADA em diversos fluidos corporais com suspeita de tuberculose extrapulmonar, obtendo 543 amostras alteradas.

Lopes *et al.* (2006) relatam a pleura como sendo a principal localização da tuberculose extrapulmonar, seguida dos gânglios, articulações ósseas, trato geniturinário, intestinal, peritoneal, pericárdio, no sistema nervoso central, ocular e cutânea. Uma maior solicitação de exames de ADA realizada no líquido pleural em nosso trabalho corrobora com esses achados. Ainda segundo Lopes *et al.* (2006), a dosagem de ADA no líquido pleural apresenta uma sensibilidade e especificidade acima de 90%.

A maior quantidade de exames realizados em pacientes do sexo masculino pode estar relacionada a uma maior prevalência de tuberculose neste grupo populacional. (SEISCENTO *et al.*, 2009). Observamos que a atividade enzimática não é influenciada pelo sexo dos pacientes, sendo compatível com os dados publicados na literatura (MORISSON; NEVES, 2008; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2006).

Quando comparamos a atividade média enzimática em pacientes apresentando atividades normais e alteradas com os valores de referência utilizados, obtivemos uma média de atividade 2,58 vezes menor que o valor de referência para as amostras com atividade normal e 2,58 vezes maior que o valor de referência para as amostras com atividade alterada.

A atividade enzimática normal ou alterada parece estar relacionada ao tipo de fluido corporal, tendo uma maior atividade localizada nos líquidos ascítico, pericárdico e pleural, e uma menor atividade no soro e líquido. A atividade enzimática muito baixa no líquido pode estar relacionada, em parte, à presença da barreira hematoliquórica e hematoencefálica que são praticamente impermeáveis às proteínas plasmáticas e a muitas moléculas orgânicas (GUYTON; HALL, 1996a).

São necessários estudos complementares para melhor estabelecer a relação da atividade da ADA nos demais fluidos corpóreos.

Antes de iniciarmos nossos ensaios experimentais, tivemos como uma preocupação inicial estabelecer as condições experimentais ótimas para o ensaio proposto.

Desta forma, avaliamos a melhor faixa de comprimento de onda para realizarmos nossas leituras; traçamos uma curva de calibração para podermos correlacionar, quando necessário, nossas leituras em absorbância com a quantidade de amônia liberada no ensaio, bem como estabelecer a faixa de absorbância em que podemos realizar a leitura sem prejuízos para o ensaio; avaliamos qual o tempo mínimo e máximo necessário para que possamos realizar nossas leituras em espectrofotômetro; e, avaliamos também, o comportamento da enzima durante a incubação com a adenosina em várias condições experimentais bem como após a eletroforese.

Em ensaios colorimétricos, é necessário que o comprimento de onda utilizado para a leitura das amostras possibilite a maior absorbância possível, tornando a determinação do comprimento de onda ideal como o passo inicial para a realização de qualquer ensaio colorimétrico. A faixa que compreende os comprimentos de onda de 620 a 640 nm apresentou a maior absorbância do produto final na reação da ADA, sendo consagrado, na literatura, o comprimento de onda de 628 nm (GIUSTI, 1974).

Após a determinação do comprimento de onda ideal, outro passo essencial é determinar qual a faixa de absorbância que permite uma correlação linear da absorbância e a concentração do produto formado. Neste ensaio, observamos que a absorbância do produto final apresenta uma correlação linear até uma absorbância de 1,200.

Dentro dos limites de linearidade, a variação de absorbância é diretamente proporcional à variação de concentração de produto formado. Esta correlação direta permite a adoção de uma curva de calibração para a definição da concentração de amônia liberada no ensaio da ADA em gel de agarose.

O produto colorimetricamente detectável apresenta um tempo mínimo de 30 min para apresentar uma máxima absorbância do ensaio, permanecendo, a coloração formada, estável por um período de pelo menos 24 horas.

Em relação às condições de necessárias para a coleta da amostra para a realização do ensaio da ADA, Giusti e Gakis (1971) sugerem que a coleta deve ser realizada utilizando EDTA, sem provocar nenhuma consequência negativa na atividade enzimática, devendo ser evitado o uso de heparina na coleta das amostras, por influenciar nos resultados. Antonangelo *et al.* (2006) demonstraram que as amostras coletadas com EDTA podem ser armazenadas em

geladeira ou freezer e analisadas em um período de pelo menos 28 dias após a coleta, sem apresentar diminuição significativa da atividade. Miller *et al.* (2004) demonstraram que a ADA pode ser conservada à temperatura ambiente ou à 37°C utilizando glicerol, etilenoglicol e sulfato de sódio por um período de pelo menos 20 dias, facilitando o transporte para laboratórios distantes.

A ADA apresenta-se como uma enzima bastante estável e de fácil manuseio, não necessitando de condições especiais para armazenamento e determinação de sua atividade. Quando exposta a uma temperatura de 37°C, utilizando uma concentração baixa de adenosina e uma amostra contendo uma atividade enzimática de aproximadamente 40 U/L, podemos observar uma parada na reação enzimática após seis horas de incubação, provavelmente devido a uma depleção do substrato. Quando expomos esta amostra às mesmas condições experimentais, na presença de uma grande concentração de adenosina, observamos que a enzima pode permanecer reagindo por um período superior a 20 horas.

A ADA atinge a sua velocidade máxima após uma hora de reação, mantendo a sua velocidade em função da concentração de substrato. Com o aumento do tempo de reação, observamos um decaimento da velocidade de reação enzimática que pode estar relacionada à diminuição da quantidade de substrato disponível, bem como pode estar havendo perda de atividade enzimática.

O aumento da temperatura de incubação da enzima durante a reação possibilita um aumento de energia disponível para se chegar ao estado de transição. O aumento da velocidade com o aumento de temperatura ocorre somente até certo ponto limite, onde ocorre a desnaturação da enzima por calor. Acima dessa temperatura, o calor adicional desnatura ainda mais a enzima, o que diminui a velocidade da reação (CAMPBELL, 2000b).

O aumento da temperatura na reação da ADA favorece o aumento da velocidade enzimática, obtendo uma velocidade máxima a uma temperatura margeando os 50°C. Observamos que a enzima pode permanecer reagindo por um período de pelo menos 2 horas nesta temperatura, o que nos leva a sugerir que não ocorra desnaturação enzimática nesta temperatura. Nossos resultados são compatíveis com os achados de Rodrigues (2001) que demonstrou a ADA sérica caprina apresentando uma atividade máxima quando incubada a 55°C por 60 minutos.

Uma possível explicação para o fato de não ocorrer desnaturação da ADA nestas temperaturas não-fisiológicas pode estar relacionada ao estado imunológico do indivíduo, uma vez que há um aumento da temperatura corporal em decorrência de um processo patológico. O aumento da temperatura corporal, devido a um estado febril do paciente, proporciona um concomitante aumento na atividade enzimática, determinando, assim, na diminuição dos depósitos de adenosina, provocando um aumento do processo inflamatório e diminuindo a atividade imunossupressora da adenosina (BOUMA *et al.*, 1996; CRONSTEIN *et al.*, 1985; CRONSTEIN *et al.*, 1986; FISCHER *et al.*, 1976; GREVER *et al.*, 1982; HASKO; CRONSTEIN, 2004; KRUMP *et al.*, 1996; MARONE *et al.*, 1979).

As enzimas têm um pH ótimo (ou um intervalo de pH) no qual a sua atividade é máxima. Em um pH maior ou menor, a atividade diminui. As cadeias laterais do centro ativo dos aminoácidos podem atuar como ácidos e bases fracas com funções críticas que dependem da manutenção de certos estados de ionização e, em algum lugar da proteína, as cadeias laterais ionizadas podem desempenhar um papel essencial nas interações que mantêm a estrutura da proteína (NELSON; COX; 2002b).

A faixa normal de pH no líquido extracelular varia entre o pH de 7,3 a 7,5, apresentando uma faixa de tolerância não-letal entre o pH 6,9 a 8,0 (GUYTON; HALL, 1996b). Observamos que a ADA apresenta uma atividade máxima na região de pH próxima da neutralidade, sendo compatível com o pH fisiológico no líquido extracelular. Gakis (1996) demonstrou que a ADA1 apresenta um pH ótimo na faixa de 7 a 7,5, enquanto que a isoenzima ADA2 apresenta um pH ótimo de 6,5, valor que se apresenta na faixa fora dos padrões compatíveis com os níveis fisiológicos.

Devido a isoenzima ADA2 apresentar um Km e pH ótimo não fisiológicos, nos leva a especular que a atividade de ADA desta enzima possa não ser a sua principal função no organismo ou que ela possa apresentar um comportamento alostérico.

Em eletroforese, comumente promovemos a coloração inespecífica das proteínas no gel ou marcamos as proteínas de interesse utilizando marcadores específicos, o que pode encarecer o processo. Desenvolvemos um novo modelo de eletroforese para isoenzimas da ADA no qual, após corrida, o gel é fatiado e as fatias incubadas na presença de adenosina. Após a reação enzimática, determinamos a concentração do produto formado e os resultados podem ser expressos através de gráficos de atividade (ou produto) vs fatias de gel.

Após verificarmos o desempenho dos ensaios utilizando diversas condições experimentais, partimos para um segundo momento do nosso trabalho experimental, onde visamos verificar o comportamento enzimático no gel de agarose.

O fato de aminoácidos, peptídeos e proteínas terem pK_a s diferentes possibilita que eles possam ter cargas diferentes a um dado pH. Essa característica é a base para a eletroforese, um método para a separação de moléculas baseado em suas cargas. O pH no qual uma molécula tem carga líquida igual a zero é chamado de pH (ou ponto) isoelétrico (pI). Neste pI, uma molécula não migrará em um campo elétrico. Em um ambiente onde o $pH > pI$, predominam as cargas negativas e as moléculas se comportam como ânions. Quando o $pH < pI$, há o predomínio de cargas positivas e a molécula se comporta como um cátion (CAMPBELL, 2000a; HENEINE, 1995).

A ADA apresenta uma pI em torno do pH 4,7 (KOIZUMI *et al.*, 1985). Durante a eletroforese, utilizando um gel com pH 6,5, bem como um tampão de corrida com o mesmo pH. Uma vez que o pH utilizado é maior que o pI enzimático, a enzima deverá apresentar uma carga predominantemente negativa e a sua migração deverá ocorrer no sentido catodo → anodo. Observamos que, após aplicar a amostra no centro do gel de agarose, utilizando as condições acima descritas (pH = 6,5), a enzima apresentou uma migração para o anodo conforme esperávamos.

A agarose é um polissacarídeo gelificante extraída de *Gracilaria verrucosa*, uma espécie de alga vermelha (*Rhodophyceae*). Sua estrutura química consiste de unidades (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranosila e (1 \rightarrow 4)-3,6-anidro- α -L-galactopiranosila, ligadas alternadamente (ANDRADE *et al.*, 1997).

Devido a possibilidade de a enzima ficar retida na malha do gel de agarose após a eletroforese, impedindo a reação da ADA com a adenosina, comparamos a atividade enzimática em um gel submetido à trituração mecânica com um gel íntegro. Observamos que o estado físico do gel não parece ser um fator que interfere na atividade enzimática da ADA. A atividade levemente diminuída no gel triturado pode estar relacionada a perdas de material durante a trituração, bem como a uma possível desnaturação protéica em decorrência da agitação, contudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos testados.

Na eletroforese, aplicamos uma pequena quantidade de amostra no sistema. Após a corrida, a pequena quantidade de amostra aplicada encontra-se distribuída em várias partes do gel. Para detectar a atividade enzimática da ADA no gel após a eletroforese, necessitamos utilizar amostras com alta atividade enzimática, para que a amostra “diluída” nas diversas fatias do gel ainda possa apresentar uma quantidade suficiente para ser detectada.

Quando trabalhamos com amostras humanas, podemos ter a dificuldade de obter amostras apresentando atividade enzimática bastante elevada, ou, mesmo quando apresentar uma atividade de ADA total elevada, pode ainda apresentar uma de suas isoformas em baixa atividade, o que iria acarretar em uma discriminação errônea.

A necessidade de avaliar amostras apresentando uma atividade enzimática baixa, aliada à necessidade de discriminar corretamente todas as isoformas, fez necessário promover adaptações no método. Observamos então, que uma amostra apresentando baixa atividade não expressa as suas isoformas nas primeiras horas de incubação, mas quando aumentamos bastante o tempo de incubação, possibilitamos que a enzima possa trabalhar por mais tempo, e, mesmo que lentamente consumindo o substrato, o seu produto vai acumulando e, com o produto concentrado, podemos visualizar os picos enzimáticos.

Em um terceiro momento de nosso trabalho experimental, promovemos a discriminação das isoenzimas da ADA utilizando a eletroforese em gel de agarose.

A ADA apresenta duas isoenzimas presentes em três isoformas. O nosso desafio inicial foi discriminar as três isoformas presentes nos fluidos corporais humanos a partir da sua expressão em gel de agarose. Com base nos pesos moleculares, esperamos que a isoforma ADA1-CD26 migre pouco, a ADA2 migre em um ponto intermediário e a ADA1 migre em um ponto mais avançado. Entretanto, necessitamos comprovar que cada isoforma está migrando na região esperada.

No mercado existem inibidores para a isoenzima ADA1, tais como o EHNA e a pentostatina, os quais inibem inespecificamente as isoformas ADA1 e ADA1-CD26. Esses inibidores apresentam um alto custo e elevada toxicidade. Devido à indisponibilidade de uso desta ferramenta, buscamos outra estratégia para discriminar as isoformas da ADA, conforme descrito a seguir.

Sabendo-se que os eritrócitos apresentam apenas a isoforma ADA1 (SCHRADER *et al.*, 1979), utilizamos a ADA eritrocitária humana como marcador para a migração da isoforma ADA1 nos fluidos corpóreos, conforme descrito por Cavalcante *et al.* (2009). Observamos que a ADA1 apresenta o perfil de migração na região γ , perfil este compatível com o seu baixo peso molecular (UNGERER *et al.*, 1992)

Uma vez identificada a isoforma ADA1, necessitamos identificar as demais isoformas da ADA. Aproveitamos, então, as diferenças nas características cinéticas das isoenzimas da ADA pela adenosina para podermos diferenciá-las, uma vez que a ADA1 apresenta uma alta afinidade pela adenosina, com um K_m de 0,052mM e que a ADA2 apresenta baixa afinidade pelo mesmo substrato, com um K_m de 2mM (GAKIS, 1996).

Em um primeiro grupo experimental, utilizamos uma solução de adenosina 22mM como substrato para a reação enzimática no gel de agarose após a eletroforese. Nestas condições, estamos disponibilizando uma quantidade de substrato em excesso para ambas as isoenzimas, o que corresponde a aproximadamente 400 vezes o K_m da ADA1 e 11 vezes o K_m para a ADA2, possibilitando que todas as isoenzimas da ADA possam se expressar.

Em um segundo grupo experimental, utilizamos uma solução de adenosina 0,55mM como substrato para a reação enzimática no gel de agarose após a eletroforese. Nestas condições, estamos disponibilizando excesso de substrato para a isoenzima ADA1 (aproximadamente 11 vezes o K_m da ADA1), mas temos uma solução muito pobre em substrato para a ADA2 (aproximadamente $\frac{1}{4}$ do K_m da ADA2). Neste grupo, temos, basicamente, a expressão apenas da isoenzima ADA1.

Dividimos as fatias do gel em três regiões, as quais denominamos de região α (no início do gel), região β (no centro do gel) e região γ (no final do gel). Comparando o perfil de migração da ADA eritrocitária com as isoenzimas dos fluidos, obtemos que a ADA1 migra na região γ . Comparando a expressão das isoenzimas utilizando diferentes concentrações de adenosina, observamos uma migração da ADA2 na região β . Por exclusão e devido ao seu alto peso molecular, observamos que a isoforma ADA1-CD26 migra na região α .

Devido as características cinéticas da isoenzima ADA2, aliada ao fato de seu pH ótimo ser mais baixo que o pH nos locais onde encontramos esta isoenzima, podemos sugerir que a mesma possa apresentar uma outra função que ainda é desconhecida ou apresentar um

comportamento alostérico, uma vez que as condições para a sua atividade não são fisiológicas (GAKIS, 1996).

Após discriminarmos as isoenzimas da ADA em gel de agarose, observamos a presença de “descontinuidade” na formação dos picos enzimáticos. A presença de irregularidades nos picos de atividade enzimática surgiram como um achado inesperado em nossos resultados. Buscamos na literatura uma explicação para este ocorrido, mas como não foi possível encontrar nada relacionado aos nossos achados, analisamos o comportamento da ADA em artigos científicos através de densitometria computadorizada do gel utilizando o programa ImageJ (**ANEXO C**) e encontramos um comportamento semelhante aos nossos achados. Com base nesses achados, podemos sugerir a presença de uma leve variação de peso molecular e/ou de carga elétrica para as mesmas isoformas em uma mesma amostra de fluido corporal.

Em um quarto momento de nosso trabalho experimental, comparamos os valores das isoenzimas da ADA determinados através do modelo matemático descrito por Vale e Almeida (1998) com os valores encontrados pela eletroforese. Embora mantenha uma correlação clara, observa-se que no método usando eletroforese a relação ADA1/ADA2 é sempre maior. Pode-se especular que essa diferença com o modelo matemático ocorra devido ao uso de dois diferentes substratos em um método e apenas um no outro.

Nesses onze anos em que o modelo de Vale e Almeida (1998) tem sido aplicado na discriminação das isoenzimas da ADA, temos observado, embora empiricamente, uma forte correlação dos achados com os quadros clínicos dos pacientes. Este modelo foi aplicado com sucesso, também, no diagnóstico e acompanhamento do calazar (HOLANDA, 1999).

A necessidade de comprovação científica deste modelo serviu como um agente inspirador para o desenvolvimento deste trabalho. Utilizando a discriminação das isoenzimas da ADA através de eletroforese como nosso padrão de referencia, observamos que os valores encontrados pelo modelo matemático proposto apresentaram uma forte correlação com os valores encontrados pela eletroforese.

Através dos nossos resultados, podemos sugerir que a discriminação das isoenzimas da ADA utilizando o modelo matemático de Vale e Almeida (1998) pode ser utilizado como um método auxiliar de diagnóstico na rotina de laboratórios clínicos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Não há interferência do sexo dos pacientes na atividade da ADA;
- A atividade normal ou alterada da ADA pode apresentar variação em decorrência do tipo de fluido corporal coletado;
- A atividade da ADA pode ser determinada na faixa de comprimento de onda entre 620 a 640 nm;
- O tempo mínimo necessário para a determinação da cor do produto azul de indofenol é de 30 minutos, com a cor formada permanecendo estável por um período de pelo menos 24 horas;
- A ADA pode permanecer reagindo com a adenosina, *in vitro*, por um período de pelo menos 20 horas a 37°C;
- A ADA atinge a sua velocidade máxima, quando incubada com adenosina a 37°C, em aproximadamente 1 hora de reação;
- A ADA é uma enzima termoestável, podendo permanecer reagindo com a adenosina a uma temperatura de 50°C por um período de pelo menos 2 horas;
- O gel de agarose não impede a ação enzimática da ADA em sua malha, possibilitando a reação enzimática das fatias do gel íntegro contendo as enzimas em presença de seu substrato;
- As fatias de gel contendo as isoenzimas da ADA devem ser incubadas por um longo período de tempo, possibilitando que as isoenzimas que estejam presentes em baixa quantidade, mesmo com uma atividade total elevada, possam ser detectadas;

- O modelo de eletroforese proposto neste trabalho possibilita uma análise quantitativa e qualitativa das isoenzimas da ADA;
- É possível discriminar as isoenzimas da ADA através de eletroforese em agarose utilizando apenas a adenosina em diferentes concentrações. Essa discriminação é possível devido as diferenças nas características cinéticas das isoenzimas pelo substrato;
- É possível discriminar as isoenzimas da ADA através do modelo matemático proposto por Vale e Almeida (1998), utilizando as diferenças nas características cinéticas das isoenzimas da ADA pela adenosina e 2'-deoxi-adenosina como substrato.

8 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram o desenvolvimento de uma nova metodologia para discriminar as isoenzimas e isoformas da adenosina desaminase (ADA) em fluidos corporais humanos.

Utilizando eletroforese em gel de agarose, é possível discriminar as isoenzimas e as isoformas da ADA através da reação enzimática das fatias do gel utilizando diferentes concentrações de adenosina como substrato.

Utilizando como padrão de referência o modelo de eletroforese desenvolvido, comprovamos experimentalmente a aplicabilidade do modelo matemático proposto por Vale e Almeida (1998), validando-o.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

_____.**NBR 6024**: Numeração progressiva das seções de um documento – Procedimento. Rio de Janeiro, 2003.

_____.**NBR 6027**: Sumário – Procedimento. Rio de Janeiro, 2003.

_____.**NBR 6028**: Resumos – Procedimento. Rio de Janeiro, 2003.

_____.**NBR 6034**: Preparação de índice de publicações – Procedimento. Rio de Janeiro, 2004.

_____.**NBR 10520**: Informação e documentação - Apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

_____.**NBR 14724**: Informação e documentação — Trabalhos acadêmicos — Apresentação. Rio de Janeiro, 2005.

AGUADO, J.M.; PONS, F.; CASAFONT, F.; MIGUEL, G.S.; VALLE, R. Tuberculous peritonitis: a study comparing cirrhotic and non cirrhotic patients. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 12, p. 550-554, 1990.

ALBUQUERQUE, P.R.; TERRERI, M.T.R.A.; LEN, C.A.; HILÁRIO, M.O.E. Doença de Behçet na infância. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 128-132, 2002.

ANDRADE, C.T.; GARCIA, R.B.; LOBÃO, M.W.N. Aplicação de modelo matemático às propriedades reológicas de géis mistos de agarose e de goma guar. **Quím. Nova**, v. 20, p. 132-136, 1997.

ANTONANGELO, L.; VARGAS, F.S.; ALMEIDA, L.P.; ACENCIO, M.M.P.; GOMES, F.D.M.; SALES, R.K.; SEICENTO, M.; TEIXEIRA, L.R. Influence of storage time and temperature on pleural fluid adenosine deaminase determination. **Respirology**, v. 11, p. 488–492, 2006.

ANTONANGELO, L.; VARGAS, F.S.; SEISCENTO, M.; BOMBARDA, S.; TEIXERA, L.; SALES, R.K. Clinical and laboratory parameters in the differential diagnosis of pleural effusion secondary to tuberculosis or cancer. **Clinics**, v. 62, p. 585-590, 2007.

AOKI, Y.; KATOH, O.; NAKANISHI, Y. A comparison study of IFN-gamma, ADA, and CA125 as the diagnostic parameters in tuberculous pleuritis. **Respir. Med.**, v. 88, p. 139-143, 1994.

BAJAJ, S.; INSEL, J.; QUAGLIATA, F.; HIRSCHHORN, R.; SILBER, R. Adenosine and adenosine analogues are more toxic to chronic lymphocytic leukemia than to normal lymphocytes. **Blood**, v. 62, p.75-80, 1983.

BARRY, C.P.; LIND, S.E. Adenosine-mediated killing of cultured epithelial cancer cells. **Cancer Res.**, v. 60, p. 1887-1894, 2000.

BARRETO, A.R.; CAVALCANTE, I.C.; CASTRO, M.V.; JUNQUEIRA, A.F.; VALE, M.R.; RIBEIRO, R.A.; SOUZA, M.H.; BRITO, G.A. Fucoidin prevents Clostridium difficile toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 990-996, 2007.

BERENGUER, J.; MORENO, S.; LAGUNA, F.; VICENTE, T.; ADRADOS, M.; ORTEGA, A.; GONZÁLEZ-LAHOZ, J.; BOUZA, E. Tuberculous meningitis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, p. 668-672, 1992.

BERTHELOT, M. **Répertoire chimie purê appliquée**, v. 1, p. 284, 1859.

BLAKE, J.; BERMAN, P. The use of adenosine deaminase assays in the diagnosis of tuberculosis. **S. Afr. Med. J.**, v. 62, n. 1, p. 19-21, 1982.

BOTET, J. P.; SORIANO, J. C.; MIRALLES, R.; PRAT, J. R. Adenosine deaminase in cerebrospinal fluid of cerebral toxoplasmosis in AIDS. **Infection**, v. 19, p. 13, 1991.

BOUMA, M. G.; VAN DEN WILDENBERG; F. A. J. M.; BUURMAN, W. A. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. **J. Physiol.**, v.270, p.522-529, 1996.

BRADY, T. Adenosine deaminase. **Biochem. J.**, v. 36, p. 478-484, 1942.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. In: _____. **Guia de vigilância epidemiológica: Influenza/varíola**. 5. ed. Brasília, DF, 2002. v. 2, p. 824-846.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. In: _____. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6 ed. Brasília, DF, 2005. p. 467-501.

_____. Meningites. In: _____. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, DF, 2005. p. 541-569.

_____. Tuberculose. In: _____ **Guia de vigilância epidemiológica**. 6. ed. Brasília, DF, 2005. p. 732-756.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação: SINAN**. Disponível em: <[http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet /tuberculose/bases/tubercbrnet.def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def)>. Acesso em: 5 out. 2009.

CAMICI, M.; TOZZI, M.G.; ALLEGRINI, S.; DEL-CORSO, A.; SANFILIPPO, O.; DAIDONE, M.G.; DE MARCO, C.; IPATA, P.L. Purine salvage enzyme activities in normal and neoplastic human tissues. **Cancer Biochem. Biophys.**, v. 11, p. 201-209, 1990.

CAMPBELL, M. K. Aminoácidos e peptídeos. In:_____. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 94-117.

_____. O comportamento das proteínas: enzimas. In:_____. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 156-201.

CANPOLAT, F.; ÜNVER, M.; ESKIOĞLU, F.; KÖSEBALABAN, Ş.; DURMAZLAR, S.P.K. Serum and erythrocyte adenosine deaminase activities in patients with Behçet's disease. **Int. J. Dermatol.**, v. 45, p.1053-1056, 2006.

CASADO, J. L.; QUEREDA, C.; OLIVA, J.; NAVAS, E.; MORENO, A.; PINTADO, V.; COBO, J.; CORRAL, I. Candidal meningitis in HIV-infected patients: analysis of 14 cases. **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 673-676, 1997.

CASTELO FILHO, A.; KRITSKI, A.L.; BARRETO, A.W.; LEMOS, A.C.M.; NETTO, A.R.; GUIMARÃES, C.A.; SILVA, C.L.; SANT'ANNA, C.C.; HADDAD, D.J.; LIMA, D.S.; MATOS, E.D.; MELO, F.C.Q.; MELO, F.A.F.; GERHARDT FILHO, G.; MARSICO, G.A.; SILVA, G.; SIQUEIRA, H.R.; CAMPOS, H.; SACONATO, H.; DOURADO. I.; ROSEMBERG, J.; BRAGA, J.U.; SANTOS, J.R.; SEISCENTO, M.; CONDE, M.B.; DALCOLMO, M.P.; ALMEIDA, M.M.B.; PENNA, M.L.F.; BARRETO, M.L.; HIJJAR, M.A.; ANDRADE, M.K.N.; CARDOSO, N.C.; PINEDA, N.I.S.; LEITE, O.H.M.; PICON, P.; SILVA, R.F.; CAVALCANTI, S.; PEREIRA, S.M.; AUGUSTO, V.M.; GALES, V.; PEREIRA, W. II Consenso Brasileiro de Tuberculose - Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, p. s2 – s56, 2004.

CAVALCANTE, I.J.M.; LUZ, P.B.; CARMO, J.R.F.; SOUSA, P.S.; GONÇALVES, R.P.; ALENCAR, N.M.N.; VALE, M.R. Detection of erythrocyte adenosine deaminase (ADA) in agarose electrophoresis. **Rev. Eletrônica Pesqui. Méd.**, v. 3, p. 32-36, 2009.

CHABNER, B.A.; RYAN, D.P.; PAZ-ARES, L.; GARCIA-CARBONERO, R.; CALABRESI, P. Antineoplásicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. p. 1041-1093.

CHOTTINER, E.G.; CLOFT, H.J.; TARTAGLIA, A.P.; MITCHELL, B.S. Elevated Adenosine Deaminase Activity and Hereditary Hemolytic Anemia Evidence for Abnormal Translational Control of Protein Synthesis. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p.1001-1005, 1987.

COLQUHOUN, A.; NEWSHOLME, E.A. Inhibition of human tumour cell proliferation by analogues of adenosine. **Cell Biochem. Funct.**, v. 15, p. 135-139, 1997.

CONWAY, E.J.; COOKE, R. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. **Biochem. J.**, v. 33, p. 479-492, 1939.

CORRAL, I.; QUEREDA, C.; NAVAS, E.; DÁVILA, P.M.; ELIAS, M.J.P.; CASADO, J.L.; PINTADO, V.; COBO, J.; PALLARÉS, E.; RUBI, J.; MORENO, S. Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid of HIV-infected patients: limited value for diagnosis of tuberculous meningitis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 23, p. 471-476, 2004.

CORTÉS, L.F.L; RUIZ, M.C.; MATEOS, J.G.; HERNÁNDEZ, D.J.; MEJÍAS, E.J.; PACHÓN, J.; CASTILLO, J. Adenosine deaminase activity in the CSF of patients with aseptic meningitis: utility in the diagnosis of tuberculous meningitis and neurobrucellosis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, p. 525-530, 1995.

COWAN, M.J.; BRADY, R.O.; WIDDER, K.J. Elevated adenosine deaminase activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 83, p. 1089-1091, 1986.

CRONSTEIN, N. B.; LEVIN, R. I.; BELANOFF, J.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, v.78, p.760-770, 1986.

CRONSTEIN, N. B.; ROSENSTEIN, E. D.; KRAMER, B.; WEISSMAN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. **J. Immunol.**, v. 135, p. 1366-1371, 1985.

DARIDON, A.; SEQUEIRA, M.; THOMAS, G.P.; DIRAC, H.; KROG, J.P.; GRAVESEN, P.; LICHTENBERG, J.; DIAMOND, D.; VERPOORTE, E.; ROOIJ, N.F. Chemical sensing using an integrated microfluidic system based on the Berthelot reaction. **Sensors Actuators B.**, v. 76, p. 235-243, 2001.

DELONG, P.; CARROLL, R.G.; HENRY, A.C.; TANAKA, T.; AHMAD, S.; LEIBOWITZ, M.S.; STERMAN, D.H.; JUNE, C.H.; ALBELDA, S.M.; VONDERHEIDE, R.H. Regulatory T cells and cytokines in malignant pleural effusions secondary to mesothelioma and carcinoma. **Cancer Biol. Ther.**, v.4, p. 342-346, 2005.

DJALDETTI, M.; SREDNI, B.; ZIGELMAN, R.; VERBER, M.; FISHMAN, P. Muscle cells produce a low molecular weight factor with anti-cancer activity. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 14, p. 189-196, 1996.

DONG, R. P.; KAMEOKA, J.; HEGEN, M.; TANAKA, T.; XU, Y.; SCHLOSSMAN, S. F.; MORIMOTO, C. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. **J. Immunol.**, v. 156, p. 1349-1355, 1996.

DONOFRIO, J.; COLEMAN, M.S.; HUTTON, J.J.; DAOUD, A.; LAMPKIN, B.; DYMINSKI, J. Overproduction of adenosine deoxynucleosides and deoxyadenosine in adenosine deaminase deficiency with severe combined immunodeficiency disease. **J. Clin. Invest.**, v. 62, p. 884-887, 1978.

DORNARD, J.; BONNAFOUS, J.C.; FAVERO, J.; MANI, J.C. Ecto 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities of lymphoid cells. **Biochem. Med.**, v. 28, p. 144-156, 1982.

ENA, J.; VALLIS, V.; OTEYZA, C.P.; SALAMANCA, R.E. Utilidad y limitaciones de la adenosina desaminasa en el diagnóstico de la pleuresía tuberculosa. Estudio metaanalítico. **Med. Clin. (Barc.)**, v. 95, p. 333-335, 1990.

EROĞLU, A.; CANBOLAT, O.; DEMIRCI, S.; KOCAOĞLU, L.H.; ERYAVUZ, Y.; AKGTIL, H. Activities of adenosine deaminase and 5'-nucleotidase in cancerous and noncancerous human colorectal tissues. **Med. Oncol.**, v. 17, p. 319-324, 2000.

FERES, M.C.; MARTINO, M.C.; MALDIJIAN, S.; BATISTA, F.; GABRIEL JÚNIOR, A.; TUFIK, S. Laboratorial validation of an automated assay for the determination of adenosine deaminase activity in pleural fluid and cerebrospinal fluid. **J. Bras. Pneumol.**, v. 34, p.1033-1039, 2008.

FISCHER, D.; VAN DER WEYDEN, M.; SNYDERMAN, R.; KELLEY, W. N. A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. **J. Clin. Invest.**, v. 58, p. 399-407, 1976.

FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; OHANA, G.; PATHAK, S.; WASSERMAN, L.; BARER, F.; MULTANI, A.S. Adenosine acts as an inhibitor of lymphoma cell growth: a major role for the A3 adenosine receptor. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1452-1458, 2000.

FISHMAN, P.; BAR-YEHUDA, S.; VAGMAN, L. Adenosine and other low molecular weight factors released by muscle cells inhibit tumor cell growth. **Cancer Res.**, v. 58, p. 3181-3187, 1998.

FOWLER, N.O. Tuberculous pericarditis. **JAMA**, v. 266, p. 99-103, 1991.

FRAGATA-FILHO, A. Pericardites. In: TIMERMAN, A.; CÉSAR, L.A.M. **Manual de cardiologia**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 242-251.

FRANCO, R.; ARAN, J.M.; COLOMER, D.; MATUTES, E.; VIVES-CORRONS, J.L. Association of Adenosine Deaminase with Erythrocyte and Platelet Plasma Membrane: An Immunological Study Using Light and Electron Microscopy. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 38, p. 653-658, 1990.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **Eur. Respir. J.**, v.9, p. 632-633, 1996.

GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.; PIRINO, D.; SERRU, G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects- A hypothesis on the significance of ADA2. **Panminerva Med.**, v. 31, p. 107-113, 1989.

GAKIS, C.; PIRAS, M.A.; ROMANI, G.; SABA, F.; LONGINOTTI, M. Behaviour of serum 2'-deoxyadenosine/ adenosine-deaminase ratio in infectious diseases and haemopoietic malignancies. **IRCS Med. Sci.**, v. 9, p. 518-519, 1981.

GAKIS, C.; CALIA, G.; CHERCHI, G.B.; ANDREONI, G. Serum adenosine deaminase activity in brucellosis. **IRCS Med. Sci.**, v.11, p. 481 - 482, 1983.

GAKIS, C; PIRAS, M.A.; ROMANI,G.; Unusual biochemical pattern of serum adenosine deaminase activity in acute lymphoblastic leukaemia. **Haematologica**, v. 67, p. 199-206, 1982.

GASPAR, H.B.; AIUTI, A.; PORTA, F.; CANDOTTI, F.; HERSHFIELD, M.S.; NOTARANGELO, L.D. How I treat ADA deficiency. **Blood**, v. 114, n. 17, p. 3524-3532, 2009.

GASPAR, H.B.; BJORKEGREN, E.; PARSLEY, K.; GILMOUR, K.C.; KING, D.; SINCLAIR, J.; ZHANG, F.; GIANNAKOPOULOS, A.; ADAMS, S.; FAIRBANKS, L.D.; GASPAR, J.; HENDERSON, L.; XU-BAYFORD, J.H.; DAVIES, E.G.; VEYS, P.A.; KINNON, C.; THRASHER, A.J. Successful Reconstitution of Immunity in ADA-SCID by Stem Cell Gene Therapy Following Cessation of PEG-ADA and Use of Mild Preconditioning. **Mol. Ther.**, v. 14, p. 505-513, 2006.

GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In:_____. **Methods of enzymatic analysis**. New York: Academic Press, 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.

GÖNÜL, M.; GÜL, U.; KILINÇ, C.; ÇAKMAK, S.K.; SOYLU, S.; KILIÇ, A. Homocysteine levels in patients with Behçet's disease and patients with recurrent aphthous stomatitis **Clin. Rheumatol.**, v. 28, p. 1153-1156, 2009.

GOTO, M.; NOGUCHI, Y.; KOYAMA, H.; HIRA, K.; SHIMBO, T.; FUKUI, T. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a meta-analysis. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 40, p. 374-381, 2003.

GRECO, S.; GIRARDI, E.; MASCIANGELO, R.; CAPOCETTA, G.B.; SALTINI, C. Adenosine deaminase and interferon gamma measurements for the diagnosis of tuberculous pleurisy: a meta-analysis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v. 7, p. 777-786, 2003.

GREVER, M. R.; SIAW, M. F. E.; COLEMAN, M. S.; WHISLER, R. L.; BARCERZAC, S. P. Inhibition of K and NK lymphocyte cytotoxicity by an inhibitor of adenosine deaminase and deoxy-adenosine. **J. Immunol.**, v. 129, p. 365-369, 1982.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Fluxo Sanguíneo Cerebral; o Líquido Cefalorraquidiano e o Metabolismo Cerebral. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 593-598.

_____. Organização funcional do corpo humano e controle do “meio interno”. In: _____. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 2-7.

HARFMANN, R.G.; CROUCH, S.R.; Kinetic study of Berthelot reaction steps in the absence and presence of coupling reagents. **Talanta**, v. 36, p. 261, 1989.

HARLAN, W. R.; GRIMM, I.S. Tuberculous peritonitis: can ADA keep the laparoscope away? **Gastroenterology**, v. 113, p. 687-689, 1997.

HASKO, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.**, v. 25, p. 33-39, 2004.

HENEINE, I. F. Generalidades. In: _____. **Eletroforese em medicina**: um texto para a prática médica da metodologia ao resultado. Belo Horizonte: Lemi, 1995. p. 15-24.

HERSFIELD, M.S.; KREDICH, N.M. Resistance of adenosine kinase deficient human lymphoblastoid cell line to effects of deoxyadenosine on growth. S-Adenosylhomocystein hydrolase inactivation and dATP accumulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 4292-4296, 1980.

HIRSCHHORN, R.; ROEGNER, V.; JENKINS, T.; SEAMAN, C.; PIOMELLI, S.; BORKOWSKY, W. Erythrocyte adenosine deaminase deficiency without immunodeficiency. **J. Clin. Invest.**, v. 56, p.1130-1139, 1979.

HOLANDA, C. M. C. X. **Estudo dos níveis de adenosina desaminase e suas isoenzimas em pacientes com calazar**. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

INADOMI, J.M.; KAPUR, S.; KINKHABWALA, M. The laparoscopic evaluation of ascites. **Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.**, v. 11, p. 79-91, 2001.

ISHII, K.; GREEN, H. Lethality of adenosine for cultured mammalian cells by interference with pyrimidine biosynthesis. **J. Cell Sci.**, v. 13, p. 429-439, 1973.

JAIN, S.; SHARMA, N.; VARMA, S.; RAJWANSHI, A.; VERMA, J.S.; SHARMA, B.,K. Profile of cardiac tamponade in the medical emergency ward of a North Indian hospital. **Can. J. Cardiol.**, v. 15, p. 671-675, 1999.

KAISEMANN, M.C.; KRITSKI, A. L.; PEREIRA, M.F.C.; TRAJMAN, A. Dosagem da atividade da adenosina deaminase no líquido pleural para o diagnóstico da tuberculose pleural. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, p. 549-556, 2004.

KOH, K.K.; KIM, E.J.; CHO, C.H.; CHOI, M.J.; CHO, S.K.; KIM, S.S.; KIM, M.H.; LEE, C.J.; JIN, S.H.; KIM, J.M. Adenosine deaminase and carcinoembryonic antigen in pericardial effusion diagnosis, especially in suspected tuberculous pericarditis **Circulation**, v. 89, p. 2728-2735, 1994.

KOIZUMI, H.; IIZUKA, H.; AOYAGI, T.; MIURA, Y. Characterization of adenosine deaminase from normal human epidermis and squamous cell carcinoma of the skin. **J. Invest. Dermatol.**, v. 84, p. 199-202, 1985.

KRUMP, E.; LEMAY, G.; BORGEAT, P. Adenosine A2 receptor-induced inhibition of leukotriene B4 synthesis in whole blood ex-vivo. **J. Pharmacol.**, v. 117, p. 1639-1644, 1996.

LAMSAL, M.; GAUTAM, N.; BHATTA, N.; MAJHI, S.; BARAL, N.; BHATTACHARYA, S.K. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 38, p. 363-369, 2007.

LELIÈVRE, V.; MULLER, J.M.; FALCÓN, J Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. II. Differential behavior of HT29, DLD-1, Caco-2 and SW403 cell lines. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 341, p. 299-308, 1998.

_____. Adenosine modulates cell proliferation in human colonic adenocarcinoma. I. Possible involvement of adenosine A1 receptor subtypes in HT29 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 341, p. 289-297, 1998.

LOPES, A.J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLLO, B.; CUNHA, D.L.; CAPONE, R.B.; SIQUEIRA, H.R.; JANSEN, J.M. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ**, v. 15, p.253-261, 2006.

MARONE, G.; FINDLEY, S. R.; LICHTENSTEIN, L. M. Adenosine receptor of human basophiles: modulation of histamine release. **J. Immunol.** v., 123, p.1473, 1979.

MARTINEZ, E.; DOMINGO, P.; RIS, J.; SAMBEAT, M.A.; CADAFALCH, J. Cerebrospinal fluid adenosine deaminase levels in a patient with cryptococcal meningitis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, p. 1061-1062, 1992.

MARTINS, R.D. **Efeitos renais e vasculares do extrato bruto da anêmona marinha *Bunodosoma caissarum* e sua fração fosfolipase A2: estudo dos mediadores envolvidos.** Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

MASKELL, N. A.; BUTLAND, R. J. BTS guidelines for the investigation of a unilateral pleural effusion in adults. **Thorax**, v. 58, p. 8-17, 2003.

MELO, A. C.; MOURA, E.; ANSELMO, G.; MESQUITA, M.; AQUINO, M.; COSTA, R. **Normas para Apresentação de Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal do Ceará.** Fortaleza: Biblioteca Universitária, 2007.

MELO, F.A.F.; AFIUNE, J.B.; SANTOS, M.L.; CASTELO-FILHO, A. Diagnóstico da tuberculose pleural pela ADA, isolada ou combinada a outras variáveis, inclusive em HIV-positivos. **Folha Médica**, v. 119, p. 9-21, 2000.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARD P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MILLER, K.D.; BARNETTE, R.; LIGHT, R.W. Stability of Adenosine Deaminase During Transportation. **Chest**, v. 126, p. 1933-1937, 2004.

MORISSON, P.; NEVES, D.D. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. **J. Bras. Pneumol.**, v. 34, p. 217-224, 2008.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Biossíntese de aminoácidos, nucleotídeos e moléculas relacionadas. In: _____. **Lehninger: princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Worth Publishers, 2002. p. 639-681.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: _____. **Lehninger: Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Worth Publishers, 2002. p. 189-224.

OHANA, G.; BAR-YEHUDA, S.; BARER, F.; FISHMAN, P. Differential effect of adenosine on tumor and normal cell growth: focus on the A3 adenosine receptor. **J. Cell Physiol.**, v. 186, p. 19-23, 2001.

OLIVEIRA, H.G.; ROSSATTO, E.R.; PROLLA, J.C. Pleural fluid adenosine deaminase and lymphocyte proportion: clinical usefulness in the diagnosis of tuberculosis. **Cytopathology**, v. 5, p. 27-32, 1994.

ONODERA, M.; ARIGA, T.; KAWAMURA, N.; KOBAYASHI, I.; OHTSU, M.; YAMADA, M.; TAME, A.; FURUTA, H.; OKANO, M.; MATSUMOTO, S.; KOTANI, H.; MCGARRITY, G.J.; BLAESE, R.M.; SAKIYAMA, Y. Successful Peripheral T-Lymphocyte-Directed Gene Transfer for a Patient With Severe Combined Immune Deficiency Caused by Adenosine Deaminase Deficiency. **Blood**, v. 91, p. 306, 1998.

ORRICO, A.; CAPECCHI, P.L.; DE MAGISTRIS, T.; NUTI, S.; LAGHI, P.F. Differential effect of adenosine on DNA synthesis in lymphoid and myeloid cell lines. **Exp. Hematol.**, v. 19, p. 1003-1007, 1991.

ÖZDEMİR, O. Severe combined immune deficiency in an adenosine deaminase-deficient patient. **Allergy Asthma Proc.**, v. 27, p. 172-174, 2006.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N.; TARTAGLIA, A. P.; GILSANZ F. Perturbations in erythrocyte adenine nucleotide metabolism: a dominantly inherited hemolytic disorder with implications regarding normal mechanisms of adenine nucleotide preservation. **Blood**, v. 48, p. 959, 1976.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N.; TARTAGLIA, A. P.; KONRAD, P. N. Adenine nucleotide reductions associated with a dominantly transmitted form of nonspherocytic hemolytic anemia. **Blood**, v. 36, p. 837, 1970.

PAGLIA, D.E.; VALENTINE, W.N.; TARTAGLIA, A.P.; GILSANZ, F.; SPARKES, R.S. Control of red blood cell adenine nucleotide metabolism studies of adenosine deaminase. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 21, p. 319-338, 1978.

PETERSEN, M.B.; TRANEBJAERG, L.; TOMMERUP, N.; NYGAARD, P.; EDWARDS, H. New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13.11 by study of a patient with interstitial deletion 20q. **J. Med. Genet.**, v. 24, p. 93-96, 1987.

PHILLIP, T.; FRAISSE, J.; HAMET, N.; LAURAS, B.; LENOIR, G.; PHILLIP, I.; ROLLAND, M.O. Regional assignment of the ADA locus 20q13.2 qtr by gene dosage studies. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 27, p. 187-189, 1980.

RANA, B.S.; JONES, R.A.; SIMPSON, I.A. Recurrent pericardial effusion: the value of polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis. **Heart**, v. 82, p. 246-247, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Outros mediadores periféricos: 5-hidroxitriptamina e purinas. In: _____. **Farmacologia**. 5. ed. São Paulo: Elsevier, 2004. p. 209-224.

RATHBONE, M.P.; MIDDLEMISS, P.J.; KIM, J.K.; GYSBERS, J.W.; DEFORGE, S.P.; SMITH, R.W.; HUGHES, D.W. Adenosine and its nucleotides stimulate proliferation of chick astrocytes and human astrocytoma cells. **Neurosci. Res.**, v. 13, p. 1-17, 1992.

RIANTAWAN, P.; CHAOWALIT, P.; WONGSANGIEM, M.; ROJANARAWEEWONG, P. Diagnostic value of pleural fluid adenosina deaminase in tuberculous pleuritis with reference to HIV coinfection and bayesian analysis. **Chest**, v. 116, p. 97-103, 1999.

RIQUELME, A.; CALVO, M.; SALECH, F.; VALDERRAMA, S.; PATTILLO, A.; ARELLANO, M.; ARRESE, M.; SOZA, A.; VIVIANI, P.; LETELIER, L.M. Value of Adenosine Deaminase (ADA) in Ascitic Fluid for the Diagnosis of Tuberculous Peritonitis - A Meta-analysis. **J. Clin. Gastroenterol.**, v. 40, p. 705-710, 2006.

RODEN, D.M. Fármacos Antiarrítmicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. p. 703-729.

RODRIGUES, L.F.S. **Caracterização da adenosina desaminase (ADA) e suas isoenzimas em tecidos de caprino: um modelo para o estudo da artrite encefalite caprina (CAE)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

RODWELL, V. W. Estrutura, função e replicação das macromoléculas informacionais. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper: bioquímica**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

SÁNCHEZ, P.J.; CECILIA, P.E.; ESCRIG, J.A.; RABADÁN, M.P.; ROCA, V.; YAGÜE, R.M.; VIVAS, R.J.; PALAU, E.; PICAZO, J.J. Tuberculous meningitis. Clinical characteristics and comparison with cryptococcal meningitis in patients with human immunodeficiency virus infection. **Arch. Neurol.**, v. 53, p. 671-676, 1996.

SCHRADER, W. P.; STACY, A. R.; POLLARA, B. Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity column chromatography. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 4026-4032, 1976.

SCHRADER, W.P.; WOODWARD, F.J.; POLLARA, B. Purification of an Adenosine Deaminase Complexing Protein from Human Plasma. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 11964-11968, 1979.

SEISCENTO, M.; VARGAS, F.S.; RUJULA, M.J.P.; BOMBARDA, S.; UIP, D.E.; GALES, V.M.N. Aspectos epidemiológicos da tuberculose pleural no estado de São Paulo (1998-2005). **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, p. 548-554, 2009.

SHABETAI, R. Doenças do pericárdio. In: BENNETT, J.C.; CECIL, P.F. **Tratado de medicina interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 372-378.

SHAROYAN, S.; ANTONYAN, A.; MARDANYAN, S.; LUPIDI, G.; CRISTALLI, G. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim. Polonica**, v. 53, p. 539-546, 2006.

SHARPE, A.H.; FIELDS, B.N. Pathogenesis of viral infections. Basic concepts derived from the reovirus model. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 486-497, 1985.

SILVA JUNIOR, C.T.; CARDOSO, G.P.; SILVA, C.S.; Araujo, e.g. Influência do sexo dos doentes sobre a atividade da adenosina desaminase na tuberculose pleural. **Pulmão RJ**, v. 15, p. 157-160, 2006.

TANAKA, Y.; YOSHIHARA, K.; TSUYUKI, M.; KAMIYA, T. Apoptosis induced by adenosine in human leukemia HL-60 cells. **Exp. Cell Res.**, v. 213, p. 242-252, 1994.

TERASAKA, T.; KINOSHITA, T.; KUNO, M.; NAKANISHI, I. A Highly Potent Non-Nucleoside Adenosine Deaminase Inhibitor: Efficient Drug Discovery by Intentional Lead Hybridization. **J. Am. Chem. Soc.**, v.126, p.34-35, 2004.

TEY, H.B.; KHOO, H.E.; TAN, C.H. Adenosine modulates cell growth in human epidermoid carcinoma (A431) cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 187, p. 1486-1492, 1992.

TRIPATHI, K.; KUMAR, R.; BHARTI, K.; KUMAR, P.; SHRIVASTAV, R.; SUNDAR, S.; PAI, K. Adenosine deaminase activity in sera of patients with visceral leishmaniasis in India. **Clin. Chim. Acta.**, v. 388, p. 135-138, 2008.

TUON, F.F.; SILVA, V.I.; ALMEIDA, G.M.D.; ANTONANGELO, L. HO, Y.L. The usefulness of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pericarditis. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v. 49, p. 165-170, 2007.

UNGERER, J.P.J.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMAAK, W.J.H. Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application. **Clinicalchemistry**, v. 38, p.1322-1326, 1992.

VACQUETE DO BRASIL. **Guia prático para coleta de sangue.** Disponível em: <http://www.vacurette.com.br/download/Guia_de_Coleta_de_Sangue.pdf>. Acesso em: 5 set. 2009.

VALDÉS, L.; ALVAREZ, D.; SAN-JOSE, E.; PENELA, P.; VALLE, J.M.; GARCIA-PAZOS, J.M.; SUÁREZ, J.; POSE, A. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. **Arch. Intern. Med.**, v. 158, p. 2017-2021, 1998.

VALDÉS, L.; JOSÉ, E.S.; ALVAREZ, D.; VALLE, J.M. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. **Eur. Respir. J.**, v. 9, p.747-751, 1996.

VALE, M. R. Metodologias simples de fabricação de alguns equipamentos de uso em biologia experimental. **Rev. Med. UFC**, v. 28/29, p. 61-64, 1988/1989.

VALE, M.R.; ALMEIDA, Y.M. Discriminação das atividades das isoenzimas da adenosina deaminase humana. In: REUNIÃO ANUAL DA FESB, **Resumos**. Caxambu: Federação de Sociedades de Biologia Experimental, p. 122, 1998.

VINAY, K.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. Neoplasias. In:_____.**Robbins & Cotran: patologia: bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 281-356.

WEISMAN, G.A.; LUSTIG, K.D.; LANE, E.; HUANG, N.N.; BELZER, I.; FRIEDBERG, I. Growth inhibition of transformed mouse fibroblasts by adenine nucleotides occurs via generation of extracellular adenosine. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 12367-12372, 1988.

WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. **J. Biol. Chem.**, v. 251, p. 5448-5456, 1976.

YILDIRIM, H.; METINTAS, M.; AK, G.; ERGINEL, S.; ALATAS, F.; KURT, E.; METINTAS, S.; UCGUN, I. Increased Pleural Fluid Adenosine Deaminase Levels in Patients with Malignant Pleural Effusions: A Potential Predictor of Talc Pleurodesis Outcome. **Lung**, v. 185, p. 349–354, 2007.

YILDIRIM, Z.; HASANOGLU,H.C.; AKYOL, O.M.; GOKIRMAK, M.N.; KSAL, N.K. Serum Adenosine Deaminase Activities in Lung Cancer and Mesothelioma. **Clin. Biochem.**, v. 32, p. 283–285, 1999.

ZARIĆ, B.; KURUC, V.; MILOVANČEV, A.; MARKOVIV, M.; ŠARČEV, T.; ČANAK, V.; PAVLOVIČ, S. Differential diagnosis of tuberculous and malignant pleural effusions: What is the role of adenosine deaminase? **Lung**, v. 186, n. 4, p. 233-240, 2008.

APÊNDICE A - Justificativa de ausência de termo de consentimento livre e esclarecido.



**Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Laboratório de Farmacologia-Bioquímica**

**JUSTIFICATIVA DE AUSÊNCIA DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

**Amostra de Fluidos Biológicos (Líquidos: Pleural, Pericárdico, Cefalorraquidiano,
Ascítico ou Sinovial)**

Título da Pesquisa: **“Isoenzimas da Adenosina Desaminase Humana: Método Alternativo para Diagnóstico Clínico da Tuberculose”**

Nome do Pesquisador: **Ítalo José Mesquita Cavalcante**

Nome do Orientador: **Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale**

Nosso laboratório possui um **banco de amostras** para a realização desta pesquisa. Serão utilizadas amostras de Líquido Pleural, Líquido Pericárdico, Líquido Cefalorraquidiano, Líquido Ascítico e/ ou Líquido Sinovial. As amostras presentes nesse banco são **codificadas** e **descaracterizadas**. Os códigos criados serão arquivados e somente o pesquisador principal e o orientador sabem a origem do material.

Em **nenhum momento** o pesquisador principal, o seu orientador ou qualquer pessoa a sua ordem, entrará em contato com qualquer paciente para tratar desta pesquisa, seja paciente internado, seja paciente ambulatorial.

A não aplicação deste termo de consentimento não significa que os preceitos éticos de pesquisa humana não serão respeitados.

Esta pesquisa não visa à obtenção de lucros nem tem como fonte financiadora empresas particulares. Esta pesquisa será conduzida respeitando-se as diretrizes e normas estabelecidas pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Ressaltamos que nenhuma das amostras supracitadas será coletada para a realização exclusiva desta pesquisa, nem haverá contatos com os pacientes após a coleta.

APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Laboratório de Farmacologia-Bioquímica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: **“Isoenzimas da Adenosina Desaminase Humana: Método Alternativo para Diagnóstico Clínico da Tuberculose”**

Nome do Pesquisador: **Ítalo José Mesquita Cavalcante**

Nome do Orientador: **Prof. Dr. Marcus Raimundo Vale**

1. **Natureza da pesquisa:** O(A) sr.(a) está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade identificar a presença de uma enzima conhecida como Adenosina Desaminase (ADA) no seu sangue. As suas células sanguíneas apresentam uma porção desta Enzima, a qual está presente apenas em pessoas saudáveis, sendo útil, portanto, para ajudar a diferenciar esta enzima em pacientes doentes. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra sua vontade.
2. **Participantes da pesquisa:** Esta etapa da pesquisa visa estabelecer a presença da enzima Adenosina Desaminase (ADA) em tecidos de pessoas saudáveis, por este motivo, estamos convidando-lhe para participar desta pesquisa através de única doação de aproximadamente 5 mL (cinco mililitros) de seu sangue venoso.
3. **Envolvimento na pesquisa:** Ao participar deste estudo, o(a) sr(a) permitirá que o pesquisador utilize seu sangue para as análises laboratoriais que forem necessárias para o desenvolvimento da pesquisa. O(A) sr(a) tem liberdade de se recusar a participar desta pesquisa e sua participação na mesma é voluntária.
4. **Riscos e desconforto:** A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Durante a obtenção de sua amostra o(a) sr(a) poderá sentir dor ou algum desconforto devido a perfuração de sua veia para a retirada do seu sangue, bem como poderá aparecer um hematoma (mancha rocha) no local da retirada do sangue. Seu nome não irá constar em nenhum dos resultados, sendo garantido o seu completo anonimato. Não será utilizada nenhuma informação que possa ligar a sua pessoa aos resultados obtidos. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com

Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o pesquisador e o orientador terão conhecimento dos dados.
6. **Benefícios:** ao participar desta pesquisa o(a) sr(a) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a presença desta enzima em pessoas saudáveis, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para o diagnóstico de algumas doenças, onde o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.
7. **Pagamento:** o(a) sr(a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Endereço do responsável pela pesquisa:

Instituição: Universidade Federal do Ceará – Laboratório de Bioquímica-Farmacologia

Endereço: Rua Coronel Nunes de Melo, 1127.

Bairro Rodolfo Teófilo – Fortaleza/ CE.

CEP: 60430-270

Telefone: (85) 3366-8339

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1127. Bairro Rodolfo Teófilo – Fortaleza/ CE.

Telefone: (85) 3366-8338

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.



Assinatura do(a) Participante (ou impressão datiloscópica – Quadro ao lado)

Assinatura do Pesquisador

ANEXO A - Ofício nº 711/08 (Comitê de ética em pesquisa).



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 711/08

Fortaleza, 19 de dezembro de 2008

Protocolo COMEPE nº 173/08

Pesquisador responsável: Ítalo José Mesquita Cavalcante

Deptº./Serviço: Departamento de Fisiologia e Farmacologia/ UFC

Título do Projeto: "Isoenzimas da adenosina desaminase humana: método alternativo para diagnóstico bioquímico da tuberculose"

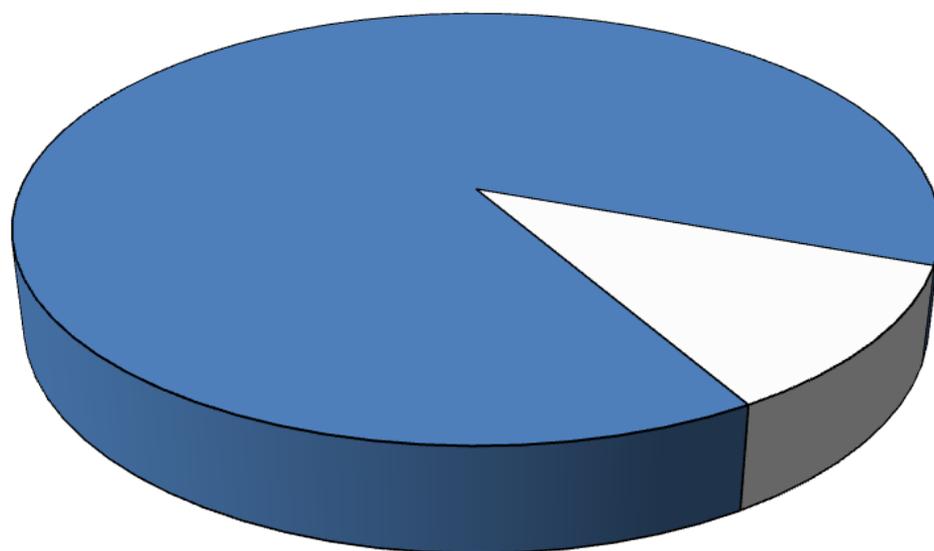
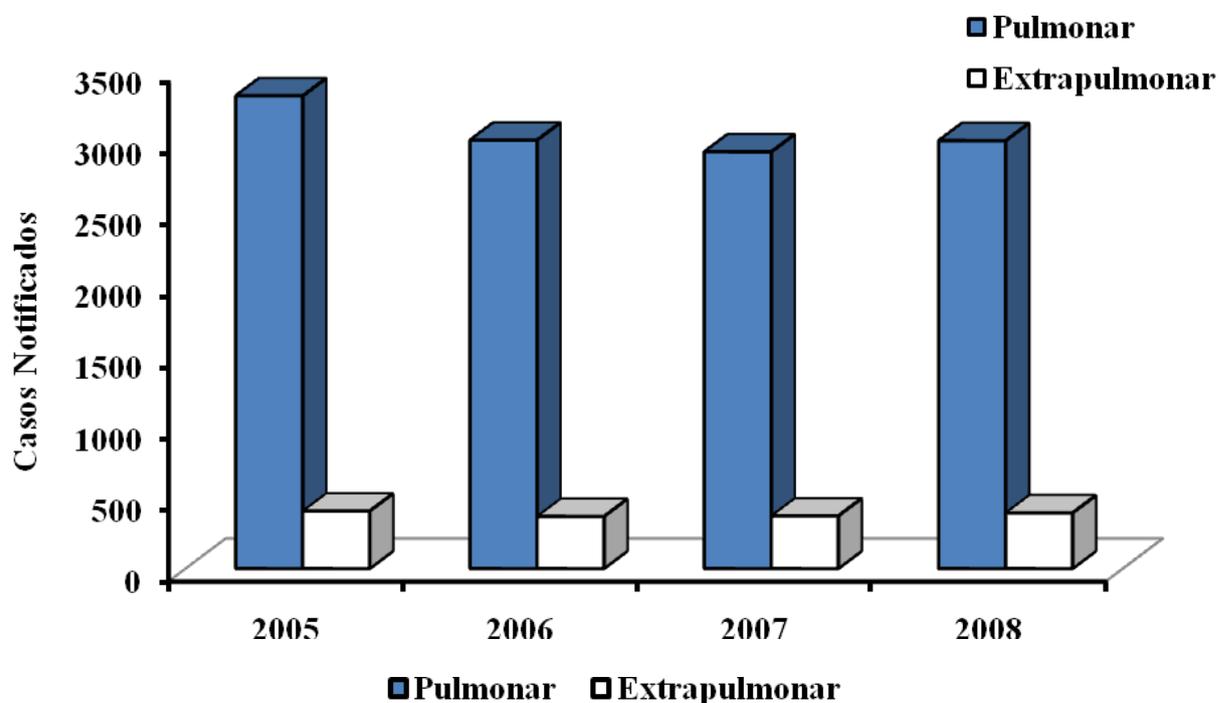
Levamos ao conhecimento de V.Sª. que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 18 de dezembro de 2008.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

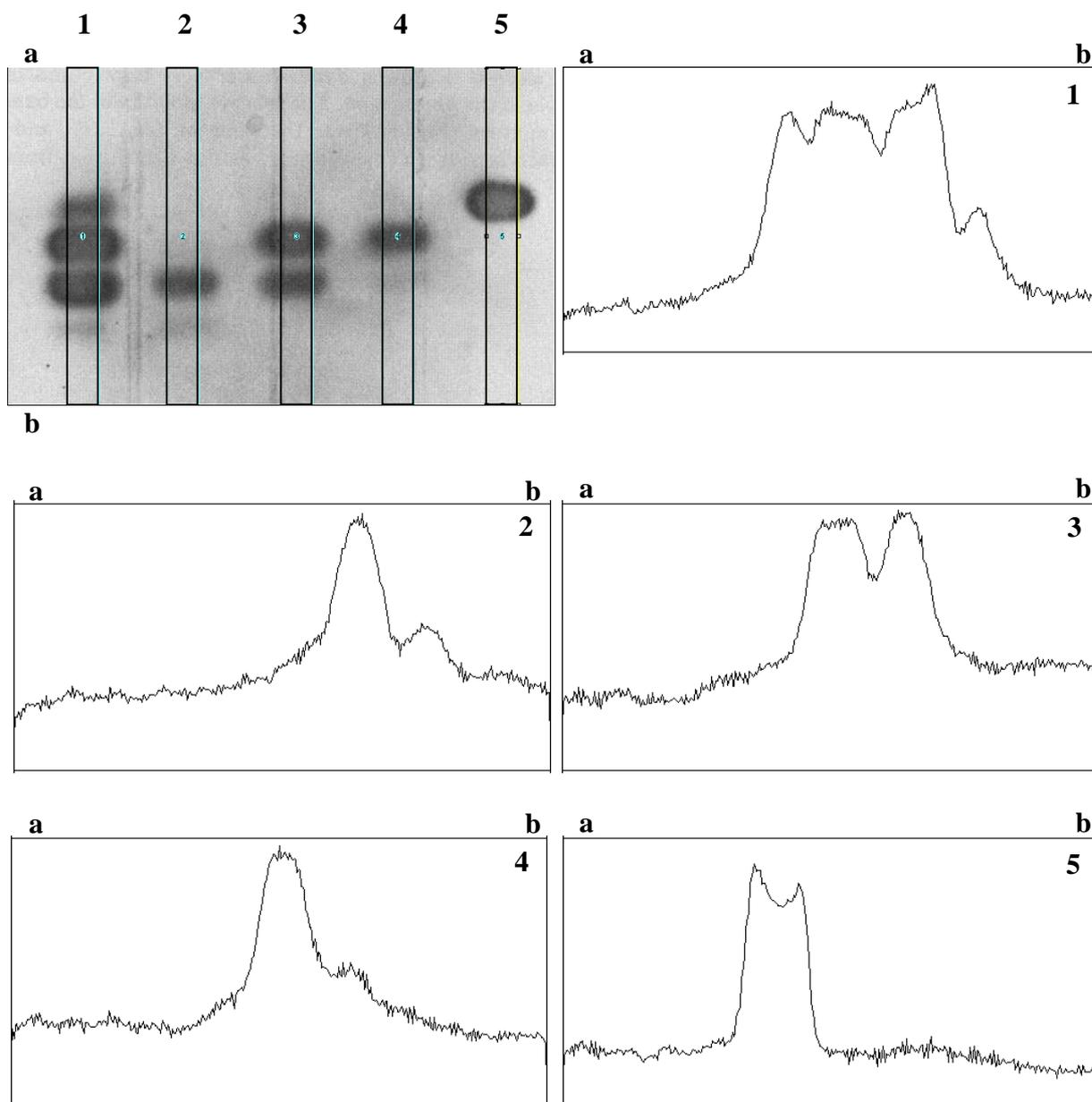
Dra. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/UFC

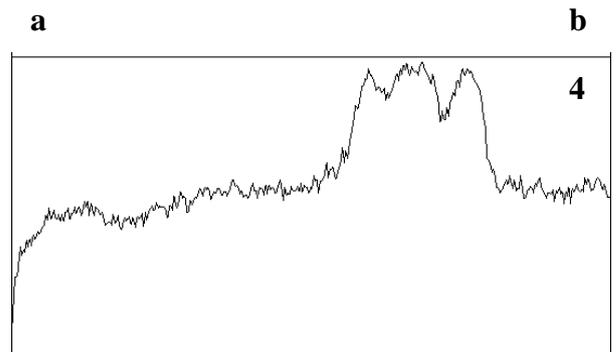
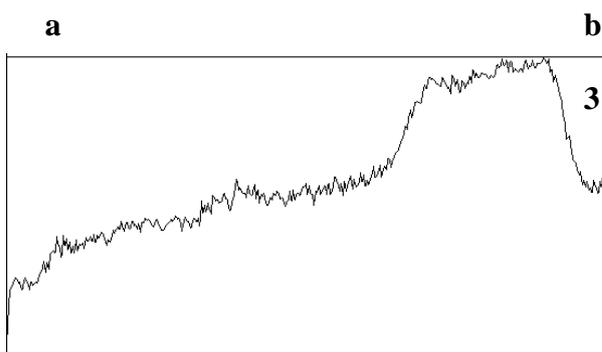
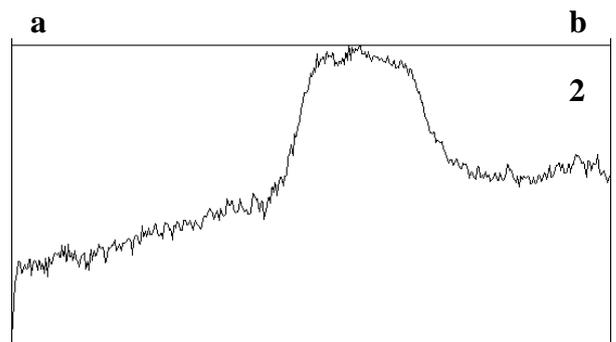
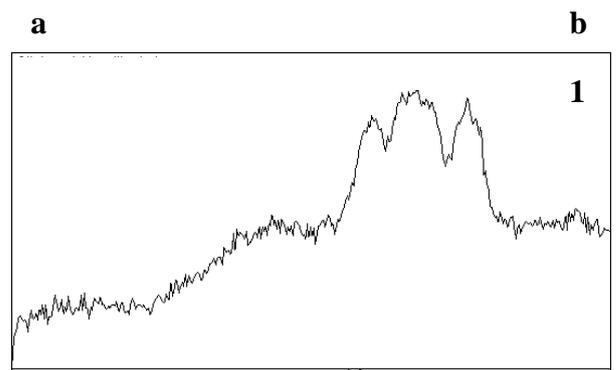
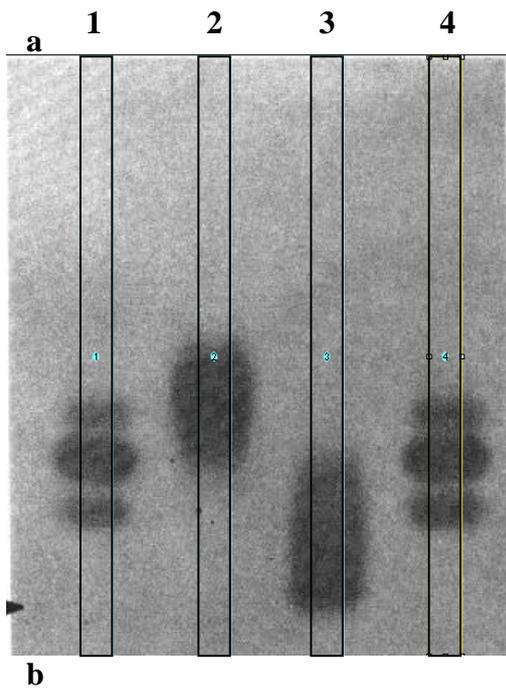
ANEXO B – Casos de tuberculose notificados pelo sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) no Ceará no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2008.



Fonte: Adaptado a partir dos dados coletados em:
<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/tuberculose/bases/tubercbrnet.def>.
Acessado em 5/10/2009, às 11h00min.

ANEXO C – Avaliação da ADA em eletroforese em gel de agarose por densitometria computadorizada utilizando o programa ImageJ.





Fonte: SCHRADER *et al.*, 1979.