UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de CAMPO GRANDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR – PMBqBM – SBBq

LUCIANA ROCHA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS HUMANOS

CAMPO GRANDE – MS

MARÇO – 2019

LUCIANA ROCHA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular - PMBqBM - SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo

Co-orientador: Profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini

CAMPO GRANDE – MS

MARÇO – 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANA ROCHA COSTA

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA ADENOSINA DESAMINASE EM LINFÓCITOS E PLAQUETAS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

_____ de _____ de 2019

Comissão Examinadora:

_____

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

_____

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

_____

Profa. Dra. Luciane Candeloro Portugal
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo, minha gratidão por sua paciência, dedicação, atenção e orientação.

Ao prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, também minha gratidão por seus ensinamentos e orientações.

À profa. Dra. Ana Maria Oliveira Battastini, pela orientação e suporte.

Aos meus pais, pela compreensão e por estarem sempre me apoiando e incentivando, principalmente nos momentos mais difíceis.

À Andressa, aluna de Iniciação Científica, minha gratidão por sua dedicação, responsabilidade e empenho desde o projeto anterior.

Aos colegas e técnicos do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio, pelo companheirismo e ajuda nos momentos necessitados.

À Bruna e Dhébora, por toda a ajuda e por seus ensinamentos desde o início dessa trajetória.

Aos participantes desta pesquisa, pois sem seu consentimento e colaboração este estudo não seria realizado, portanto minha gratidão a todos.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de realização deste projeto.

À CAPES pela bolsa concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A conversão da adenosina em inosina é catalisada pela enzima adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), que possui duas isoformas em humanos e pertence à família das hidrolases dependentes de zinco. A E-ADA pode modular a função dos linfócitos, desempenhando também importante papel no desenvolvimento de tecidos, e na função das plaquetas, devido a sua interferência no processo de angiogênese e agregação plaquetária. A quantificação da atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos já foi previamente realizada, porém não há na literatura estudos apresentando a sua caracterização bioquímica e cinética detalhada. Assim, evidenciou-se a necessidade de caracterização da atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas isolados de sangue periférico de humanos, na ausência de processos patológicos envolvidos. Antes do início da caracterização enzimática foi realizado ensaio de viabilidade das células mononucleadas (PBMC) ricas em linfócitos, que apresentou 88,4% de células com membrana íntegra após 20 horas. Na citometria de fluxo, observou-se que 53,8 ± 6,8% de células do PBMC no *gate* dos linfócitos foram marcadas com o anticorpo anti-CD26. Nos linfócitos, a atividade enzimática foi linear de 15 a 120 minutos de incubação, com 2,5 a 12,5 µg de conteúdo de proteína e entre a faixa de pH 6.0 a 7.4. Já nas plaquetas, a atividade foi linear de 15 a 105 minutos de incubação, com 7,5 a 20 µg de conteúdo de proteína e entre a faixa de pH 6.0 a 7.4. Para linfócitos, o K_m aparente e V_{max} foram 0,103 ± 0,051 mM e 0,025 ± 0,001 nmol de NH_3/min/mg de proteína, respectivamente. Para plaquetas, o K_m aparente foi 0,0017 ± 0,00045 mM e a V_{max} foi 0,004 ± 0,0001 nmol de NH_3/min/mg de proteína. O zinco (5 mM) exerceu inibição na atividade enzimática em ambas as células, porém o efeito preventivo do EDTA foi observado apenas nos linfócitos. A E-ADA nos linfócitos apresentou preferência pela adenosina como substrato em relação à 2'-desoxiadenosina e guanosina, enquanto que nas plaquetas observou-se preferência pela adenosina apenas quando comparada à guanosina. O EHNA apresentou inibição significativa da atividade da E-ADA nos linfócitos e nas plaquetas (>90%), demonstrando a predominância da isoforma ADA1 nestas células.

Palavras-chave: Adenosina desaminase; ensaios enzimáticos; sinalização purinérgica.

ABSTRACT

The conversion of adenosine to inosine is catalyzed by the enzyme adenosine deaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), which has two isoforms in humans and belongs to the family of zinc-dependent hydrolases. E-ADA may modulate the lymphocyte function, also playing an important role in tissue development, and in platelet function, due to its interference in the process of angiogenesis and platelet aggregation. The quantification of E-ADA activity in human lymphocytes and platelets has been previously performed, however there are no studies in the literature presenting its detailed biochemical and kinetic characterization. Thus, the characterization of the activity of E-ADA in lymphocytes and platelets isolated from human peripheral blood is needed, in the absence of pathological processes involved. Before the enzymatic characterization, a viability assay of the lymphocyte-rich peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) was performed, which presented 88.4% of cells with whole cytoplasmic membrane after 20 hours. In flow cytometry, 53.8 ± 6.8% of PBMC cells at the lymphocyte gate were labeled with the anti-CD26 antibody. In lymphocytes, the enzymatic activity was linear from 15 to 120 minutes incubation, with 2.5 to 12.5 µg of protein content and between the pH range of 6.0 to 7.4. In the platelets, the activity was linear from 15 to 105 minutes of incubation, with 7.5 to 20 µg of protein content and between the pH range of 6.0 to 7.4. For lymphocytes, the apparent K_m and V_{max} were 0.103 ± 0.051 mM and 0.025 ± 0.001 nmol NH_3/min/mg of protein, respectively. For platelets, the apparent K_m was 0.0017 ± 0.00045 mM and the V_{max} was 0.004 ± 0.0001 nmol NH_3/min/mg of protein. Zinc (5 mM) exerted inhibition on enzymatic activity in both cells, but the preventive effect of EDTA was observed only on lymphocytes. In lymphocytes, E-ADA showed preference for adenosine as a substrate instead of 2'-deoxyadenosine and guanosine, while in platelets adenosine was preferred only when compared to guanosine. EHNA showed significant inhibition of E-ADA activity in lymphocytes and platelets (> 90%), demonstrating the predominance of the ADA1 isoform in these cells.

Keywords: Adenosine deaminase; enzymatic assays; purinergic signaling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes da sinalização purinérgica.....15

Figura 2 – Estrutura dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina.....16

Figura 3 – Estrutura da adenosina e da desoxiadenosina.....17

Figura 4 – Receptores purinérgicos.....18

Figura 5 – Reação catalisada pela E-ADA.....21

Figura 6 – Estrutura por raio x da ADA2 humana.....21

Figura 7 – Estrutura por raio x da E-ADA bovina em complexo com DPPIV humana...22

Figura 8 – Imunidade humoral e imunidade mediada por célula.....24

Figura 9 – Função plaquetária na hemostasia.....27

Figura 10 – Papel das plaquetas ativadas na formação de placas aterogênicas.....28

Figura 11 – Viabilidade celular dos linfócitos isolados de sangue venoso periférico em um período de 20 horas.....37

Figura 12 – Efeito do tempo na atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....38

Figura 13 – Efeito do conteúdo de proteína na atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....39

Figura 14 – Efeito do pH na atividade relativa da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....40

Figura 15 – Efeito do substrato e *plot* de Eadie-Hofstee para determinação do Km e da vmax para E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....41

Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade relativa da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....42

Figura 17 – Efeito de íons na atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....43

Figura 18 – Histograma da citometria de fluxo com marcação do anticorpo anti-CD26 humano FITC no *gate* de linfócitos de amostras de PBMC.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificidade por substrato pela E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos.....44

Tabela 2 – Inibição da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos por EHNA.....44

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS 58

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 63

ANEXO III - Declaração de Uso de Material Biológico e Dados Coletados 66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA1	Isoforma 1 da adenosina desaminase
ADA2	Isoforma 2 da adenosina desaminase
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AP	Fosfatase alcalina
ATP	Adenosina trifosfato
Ca^{2+}	Íon cálcio
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico
CD	*Cluster* de diferenciação
$CD4^{+}$	Linfócitos T auxiliares
$CD8^{+}$	Linfócitos T citotóxicos
CD26	Dipeptidil peptidase IV
CD73	Ecto-5'-nucleotidase
CNTs	Transportadores de nucleosídeos concentrativos
dATP	Trifosfato de desoxiadenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPIV	Dipeptidil peptidase IV
ENTs	Transportadores de nucleosídeos equilibrativos
fMLP	*N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina
FPR	Receptores do tipo formil peptídeo
E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina desaminase
EHNA	Eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENTPDs	Ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
K_m	Constante de Michaelis-Menten
Mg^{2+}	Íon magnésio
NPP	Ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase
NTPDase	Nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas

pH	Potencial hidrogeniônico
PRP	Plasma rico em plaquetas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
T_{reg}	Linfócitos T reguladores
UDP	Uridina difosfato
UDP-glicose	Difosfato de uridina-glicose
V_{max}	Velocidade máxima
Zn^{2+}	Íon zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **12**
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **15**
2.1 Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares **16**
2.2 Receptores purinérgicos **18**
2.3 Ectoenzimas **20**
2.3.1 Ectonucleotidases **20**
2.3.2 E-ADA **20**
2.4 Linfócitos **22**
2.5 Funções da E-ADA nos linfócitos **24**
2.6 Plaquetas **26**
2.7 Funções da E-ADA nas plaquetas **28**
2.8 Cinética enzimática **29**
3. OBJETIVOS **32**
3.1 Objetivo geral **32**
3.2 Objetivos específicos **32**
4. MATERIAL E MÉTODOS **33**
4.1 Aspectos éticos **33**
4.2 Seleção de amostragem **33**
4.3 Coleta e processamento do material biológico **34**
4.4 Separação do PBMC rico em linfócitos e do plasma rico em plaquetas .. **34**
4.5 Quantificação da atividade enzimática da E-ADA **34**
4.6 Quantificação de proteína **35**
4.7 Viabilidade celular **36**
4.8 Citometria de fluxo **36**
4.9 Análise estatística **36**
5. RESULTADOS **37**
6. DISCUSSÃO **45**
7. CONCLUSÃO **48**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **49**
ANEXOS **58**

1. INTRODUÇÃO

Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares (como ATP, ADP, AMP e adenosina) são liberados no sangue por leucócitos, linfócitos, células endoteliais e plaquetas, por ativação celular decorrente de degranulação ou morte celular (DEAGLIO; ROBSON, 2011). Estes nucleotídeos e nucleosídeos podem ser ainda metabolizados por enzimas ligadas à membrana plasmática que possuem sítio ativo voltado para o meio extracelular, também chamadas de ectoenzimas (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011).

A conversão da adenosina em inosina (e do análogo desoxiadenosina em desoxinosina) é catalisada pela adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), representada nos humanos por duas isoformas ADA1 e ADA2 (ZAVIALOV; ENGSTRÖM, 2005; KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012).

Os efeitos fisiológicos da adenosina extracelular são mediados por sua interação com quatro receptores acoplados à proteína G, os receptores de adenosina A1, A2A, A2B e A3 (LANE; JAAKOLA; IJZERMAN, 2011). Estes receptores podem mediar a sinalização celular desempenhando papeis na proteção de tecidos e órgãos contra danos, agindo por diversos mecanismos que aumentam a oferta e demanda de oxigênio, provocam efeitos anti-inflamatórios e estimulam a angiogênese. Seu estudo tem demonstrado aplicações no tratamento da dor, glaucoma, lesões isquêmicas, asma, artrite, câncer, inflamação e outros distúrbios (GESSI et al., 2011).

A adenosina é considerada neuromoduladora e neuroprotetora, além de atuar em outros sistemas periféricos envolvidos na regulação da pressão arterial, resposta imune, dor, angiogênese, dentre outros (BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012). Em condições de privação de energia, os níveis de adenosina aumentam influenciando a homeostase energética de várias formas, provocando alterações no suprimento sanguíneo e no metabolismo celular (por exemplo, atuando na manutenção do potencial de membrana) (FREDHOLM; JOHANSSON; WANG, 2011).

A modulação da cascata de sinalização purinérgica pelos nucleotídeos e nucleosídeos apresenta uma complexa influência em processos inflamatórios, principalmente nas células e vasos sanguíneos provocando respostas extravasculares (DEAGLIO; ROBSON, 2011).

A sinalização purinérgica consiste na interação entre as purinas extracelulares, as enzimas que hidrolisam estes nucleotídeos e nucleosídeos, e os receptores com os quais estes se ligam. Este tipo de sinalização apresenta implicações na proliferação celular, migração, diferenciação e morte no desenvolvimento embrionário, no processo de cicatrização, na inflamação, na neuroproteção, no câncer e em várias outras doenças (BURNSTOCK, 2006).

A quantificação da atividade da E-ADA já foi previamente realizada em células linfoides de carneiros durante produção de anticorpos após estímulo antigênico (HALL, 1963), em células de sangue periférico de pacientes com distúrbios hematológicos como leucemia linfoide e mieloma (MEIER; COLEMAN; HUTTON, 1976), em soro de pacientes com diferentes desordens hepáticas (SÁNCHEZ et al., 1989), em soro de pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (GAKIS et al., 1989), em fluido sinovial de pacientes com artrite reumatoide (NAKAMACHI et al., 2003), em plaquetas de ratos expostos a fumaça de cigarro (JAQUES et al., 2011), em plaquetas de pacientes com forma indeterminada da doença de chagas (SOUZA et al., 2012), em líquor e soro para diagnóstico de meningite tuberculosa (CHO et al., 2013), em soro de pacientes com leucemia linfoide crônica (GHADERI et al., 2016), em plaquetas de gestantes com diabetes, hipertensão e HIV (LEAL et al., 2016), dentre outros estudos.

Já a caracterização da atividade da E-ADA foi realizada em células leucêmicas (MORISAKI; FUJII; MIWA, 1985), em células epidérmicas normais e de carcinoma (KOIZUMI et al., 1985), em intestino de camundongos (SINGH; SHARMA, 2000), em fígado humano e de galinha (IWAKI-EGAWA; WATANABE, 2002), em hemolinfa do molusco *Biomphalaria glabrata* (VALE et al., 2005), em cérebro de peixe *zebrafish* (ROSEMBERG et al., 2008), dentre outros estudos.

Embora a caracterização da atividade enzimática da E-ADA em soro humano tenha sido proposta por Giusti (1974) e por Guisti e Gakis (1971), não há na literatura estudos apresentando a caracterização detalhada da atividade desta enzima em linfócitos e plaquetas isolados de sangue periférico humano, apesar de vários dos trabalhos anteriormente citados quantificarem sua atividade nestas células específicas.

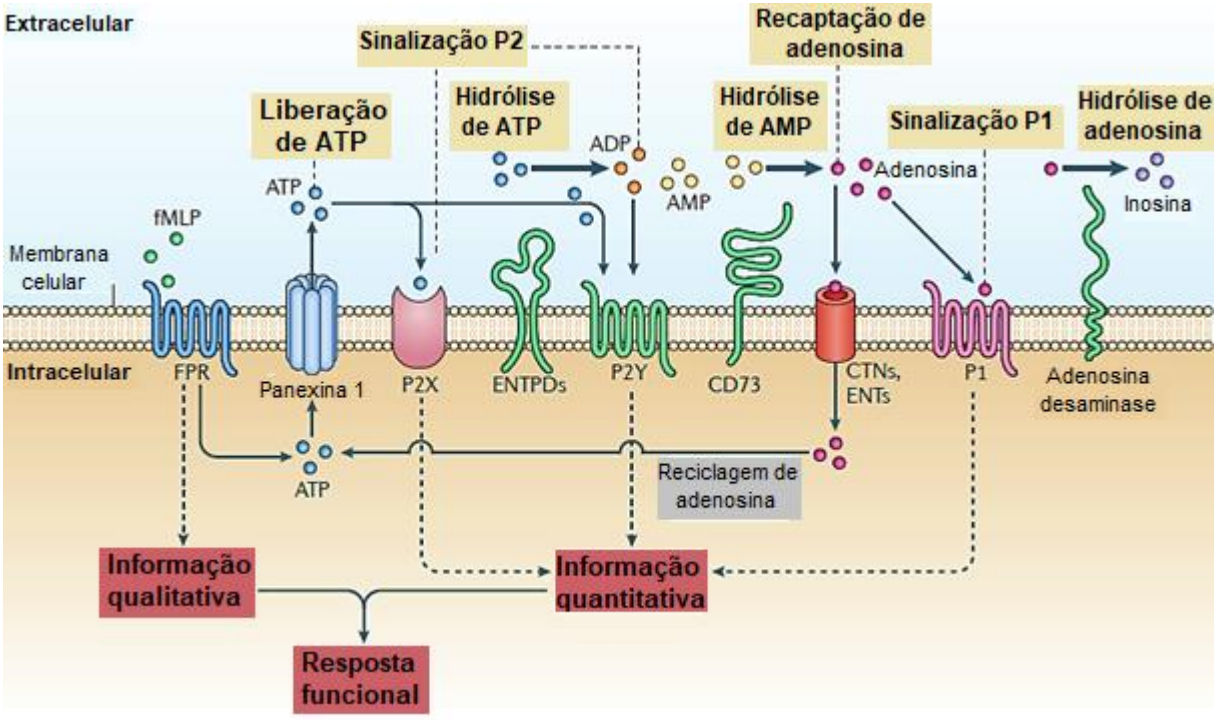
Deste modo, evidenciou-se a necessidade de padronização de condições como tempo, conteúdo de proteína, temperatura e pH, além da influência de íons, em

linfócitos e plaquetas isolados de sangue periférico de humano, na ausência de processos patológicos envolvidos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A sinalização purinérgica compreende a interação entre as purinas extracelulares, as enzimas que hidrolisam estes nucleotídeos e nucleosídeos, e os receptores com os quais estes se ligam (Figura 1) (BURNSTOCK, 2006).

Figura 1 – Componentes da sinalização purinérgica.



*fMLP, *N*-formil-metionil-leucil-fenilalanina; FPR, receptores do tipo formil peptídeo; ENTPDs, ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolases; CD73, ecto-5'-nucleotidase; CNTs, transportadores de nucleosídeos concentrativos; ENTs, transportadores de nucleosídeos equilibrativos. Fonte: Adaptado de Junger (2011).

O termo sinalização purinérgica foi proposto em 1972, porém este conceito só passou a ser melhor aceito na década de 90, após a clonagem e a caracterização dos subtipos de receptores purinérgicos (BURNSTOCK, 2016). Este tipo de sinalização apresenta implicações na proliferação celular, migração, diferenciação e morte no desenvolvimento embrionário, no processo de cicatrização, na neuroproteção, dentre outros (BURNSTOCK, 2006).

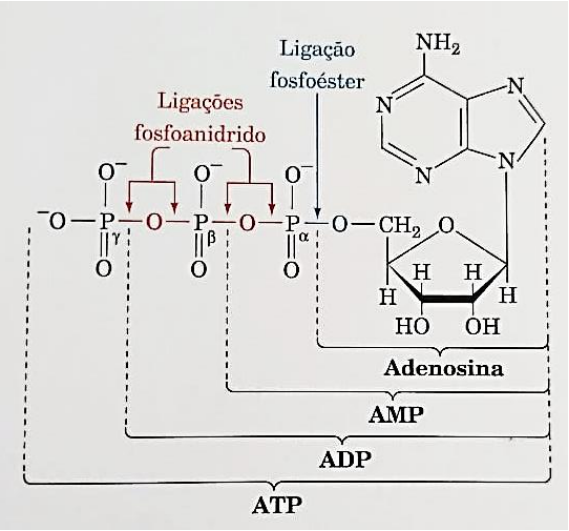
Alterações na sinalização purinérgica são observadas em diversas condições fisiopatológicas como desordens do sistema nervoso central, doenças cardiovasculares, distúrbios nas vias aéreas, desequilíbrios nos sistemas sensoriais,

regulação do sistema imunológico e inflamação, infecções, distúrbios endócrinos e obesidade, doenças intestinais, transtornos renais e do trato urinário, doenças hepáticas, doenças do sistema reprodutivo, transtornos de pele e distúrbios musculoesqueléticos (BURNSTOCK, 2017).

2.1 Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares

Nucleotídeos, como o ATP (Figura 2), e nucleosídeos, como a adenosina, são encontrados em todos os tecidos e sistemas de animais, nos quais produzem efeitos por mecanismos intra e extracelulares (YEGUTKIN, 2008). Estes podem atuar como componentes importantes da resposta imune inata por induzir o recrutamento de células inflamatórias ao estimular a liberação de citocinas e a produção de mediadores inflamatórios, como as espécies reativas de oxigênio (ROS) e o óxido nítrico (NO) (COUTINHO-SILVA; OJCIUS, 2012).

Figura 2 – Estrutura dos nucleotídeos ATP, ADP e AMP, e do nucleosídeo adenosina.



Fonte: Adaptado de Voet, Voet e Pratt (2014).

O ATP e a adenosina são liberados no meio extracelular em sítios de infecção e inflamação. O ATP está envolvido no desenvolvimento de inflamação pela combinação de ações como liberação de histamina pelos mastócitos, produção de prostaglandinas e produção e liberação de citocinas por células do sistema imune. Já a adenosina exerce efeito contrário, induzindo ações anti-inflamatórias (BURNSTOCK, 2006). A sinalização a longo-termo mediada por ATP e adenosina

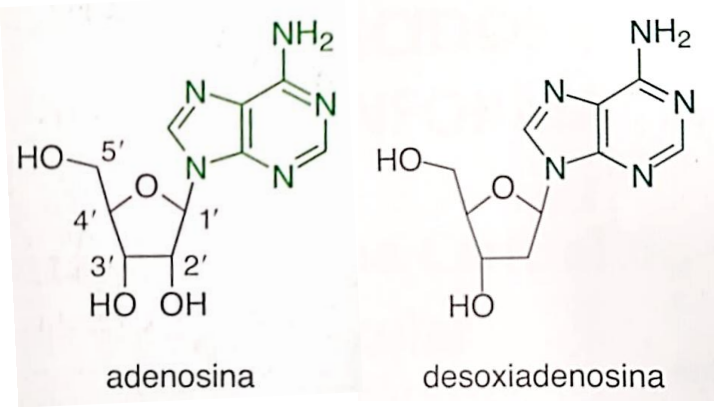
ocorre também durante desenvolvimento embrionário, angiogênese, angioplastia e aterosclerose (BURNSTOCK, 2014).

O ADP no meio extracelular, por exemplo, pode ativar plaquetas por meio de sua ligação com dois receptores acoplados a proteína G, $P2Y_1$ e $P2Y_{12}$ (LINDEN, 2011). A ativação do receptor $P2Y_1$ por ADP também induz a agregação plaquetária, relaxamento muscular e vasodilatação (JACOBSON et al., 2011). Além disso, as plaquetas se acumulam e liberam ADP como fator de recrutamento de mais plaquetas, podendo contribuir na formação de trombos (DEAGLIO; ROBSON, 2011).

A adenosina (Figura 3) produzida após as sucessivas hidrólises iniciadas com o ATP, contribui como componente tardio na vasodilatação por ação direta de receptores P1 na musculatura vascular lisa (BURNSTOCK, 2006).

Em células da musculatura lisa de artérias, observou-se que a ativação de receptores A_1 e A_2 por adenosina ocasiona elevação nos níveis de AMP cíclico (cAMP), devido a interação com adenilato ciclase ligada a esses receptores, e paralela inibição na síntese de DNA nestas células (JONZON; FREDHOLM; NILSSON, 1985). A adenosina pode também exercer papel fundamental no desenvolvimento de aterosclerose e também regular a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) nas plaquetas ativadas (BURNSTOCK, 2008).

Figura 3 – Estrutura da adenosina e da desoxiadenosina.



Fonte: Woski e Schmidt (2011).

Já a desoxiadenosina apresenta um átomo de oxigênio a menos na posição 2' da ribose e demonstrou não ser efetiva no relaxamento da musculatura lisa intestinal, porém efetuou o relaxamento efetivo da musculatura lisa vascular. Então, foi sugerido que no músculo liso intestinal há uma interação significante com a posição 2' da ribose

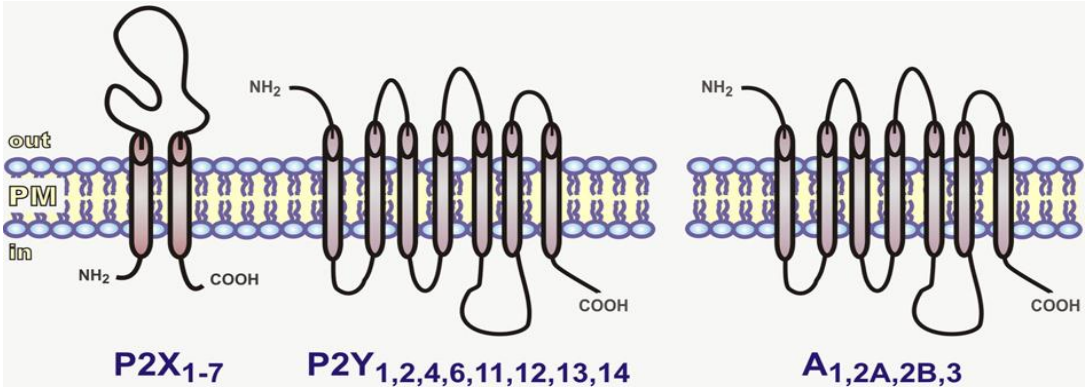
da molécula de adenosina, enquanto que no músculo liso vascular tal interação completa desta porção não é necessária para que haja sua atividade máxima (BURNSTOCK, 1976).

2.2 Receptores purinérgicos

Os receptores purinérgicos (Figura 4) foram identificados em vários terminais nervosos (centrais e periféricos) e células sanguíneas, estando amplamente distribuídos em diversos tecidos nos humanos (BURNSTOCK; BROWN, 1981).

Estes receptores são divididos em dois tipos: receptores P1, que possuem a adenosina ou AMP como agonistas; e os receptores P2, que possuem como agonistas nucleotídeos di e/ou trifosfatos derivados das bases nitrogenadas adenina ou uracila, e também moléculas estruturalmente relacionadas como a UDP-glicose (BURNSTOCK, 2014).

Figura 4 – Receptores purinérgicos.



Fonte: Adaptado de Yegutkin (2008)

Todos os receptores P1 de adenosina são acoplados a proteína G (metabotrópicos), possuindo agonistas e antagonistas específicos para cada subtipo: A_1, A_{2A}, A_{2B} e A_3 (BURNSTOCK, 2006).

Os receptores A_1 e A_3 são acoplados a proteína G_i ou G_q, enquanto que os receptores A_{2A} e A_{2B} são acoplados a proteína G_s, desencadeando portanto respostas fisiológicas distintas (CORRIDEN; INSEL, 2012). Por exemplo, a ativação dos receptores A_2 provoca a estimulação da adenilato ciclase e consequente elevação dos níveis de cAMP (FUENTES et al., 2014).

Bynoe e colaboradores (2015) consideram que a ativação dos receptores P1 nas células da barreira hematoencefálica, cuja permeabilidade é altamente seletiva, promove a entrada de pequenas moléculas e macromoléculas no sistema nervoso central de forma tempo-dependente. Logo, a modulação destes receptores poderia ser utilizada em conjunto com novas terapias de entrega dos fármacos às células cerebrais.

Os receptores A_1 são amplamente distribuídos nos tecidos, porém este subtipo não está presente ou é pouco expresso em células linfoides, sendo mais estudada sua expressão no sistema nervoso central (FRANCO et al., 1998).

Já os receptores P2 são divididos nos subtipos P2X e P2Y: os receptores P2X pertencem à família de receptores ligados a canais iônicos, possuindo sete subtipos; enquanto que os receptores P2Y são receptores acoplados a proteína G, com oito subtipos identificados (BURNSTOCK, 2006).

Os subtipos de receptores P2 se diferem quanto a sua seletividade por nucleotídeos e se relacionam com diferentes vias de sinalização celular: P2X e $P2Y_{11}$ são ativados por ATP; $P2Y_2$ por ATP e UTP; $P2Y_1$, $P2Y_{12}$, e $P2Y_{13}$ por ADP; $P2Y_4$ por UTP; $P2Y_6$ por UDP; e $P2Y_{14}$ por UDP-glicose (KUKULSKI; LÉVESQUE; SÉVIGNY, 2011).

Quando o ATP se liga a receptores P2X, o canal iônico é aberto resultando no fluxo de cátions por milissegundos. Estes receptores são expressos em células neurais e não-neurais, podendo atuar na contração da musculatura lisa e na imunomodulação. Portanto, eles vêm sendo estudados com potencial terapêutico em diversas desordens, como dor, inflamação, infecção e câncer (BURNSTOCK; KENNEDY, 2011).

Inibidores do receptor $P2Y_{12}$ já são utilizados na clínica como antiagregantes plaquetários, reduzindo a mortalidade e a morbidade em pacientes com doenças cardiovasculares. Outros receptores P2Y também vêm sendo estudados em testes pré-clínicos, como em casos de fibrose cística, diabetes e doença aterosclerótica (ERLINGE, 2011).

2.3 Ectoenzimas

2.3.1 Ectonucleotidases

As ectoenzimas que hidrolisam nucleotídeos extracelulares são chamadas de ectonucleotidases. As ectonucleotidases que degradam rapidamente o ATP em adenosina são divididas em 4 famílias: as nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases); as ectonucleotídeo pirofosfatases/fosfodiesterases (NPPs); as fosfatases alcalinas (APs); e as ecto-5'-nucleotidases (E-5'-NT). Estas estão envolvidas na degradação de ATP em ADP, AMP e adenosina (BURNSTOCK, 2006; BURNSTOCK, 2014).

A cascata de ectonucleotidases, iniciada por NTPDases, é terminada pela E-5'-NT com a hidrólise de AMP e formação de adenosina. Desta forma, as enzimas E-5'-NT e a adenosina desaminase (E-ADA), ectoenzima que converte adenosina em iosina, regulam as concentrações de adenosina no plasma e no meio extracelular (ROBSON; SÉVIGNY; ZIMMERMANN, 2006).

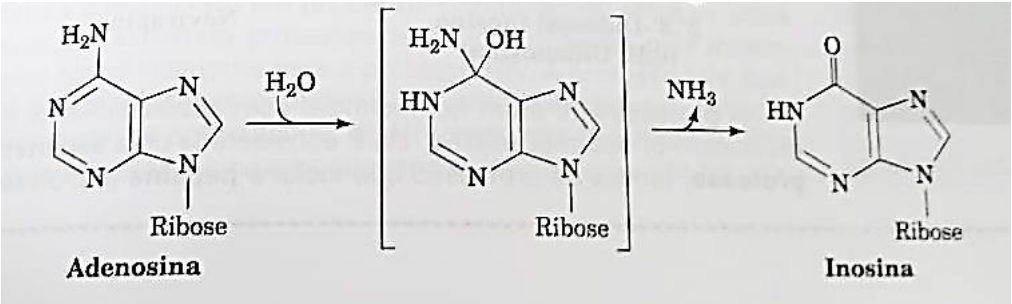
2.3.2 E-ADA

A E-ADA é uma enzima essencial da via catabólica das purinas, catalisando irreversivelmente a conversão de adenosina em inosina e amônia, podendo ser posteriormente degradada ao ácido úrico (GRACIA et al., 2013).

Também chamada de adenosina desaminase/aminohidrolase, pode reagir especificamente com adenosina (Figura 5) ou com análogos do nucleosídeo de adenina, encontrando-se amplamente distribuída nos tecidos animais (GIUSTI, 1974). Esta enzima foi identificada em nematódeos, insetos, peixes, seres humanos e outros mamíferos, encontrando-se amplamente distribuída nos tecidos animais (GIUSTI, 1974; BURNSTOCK; VERKHRATSKY, 2012).

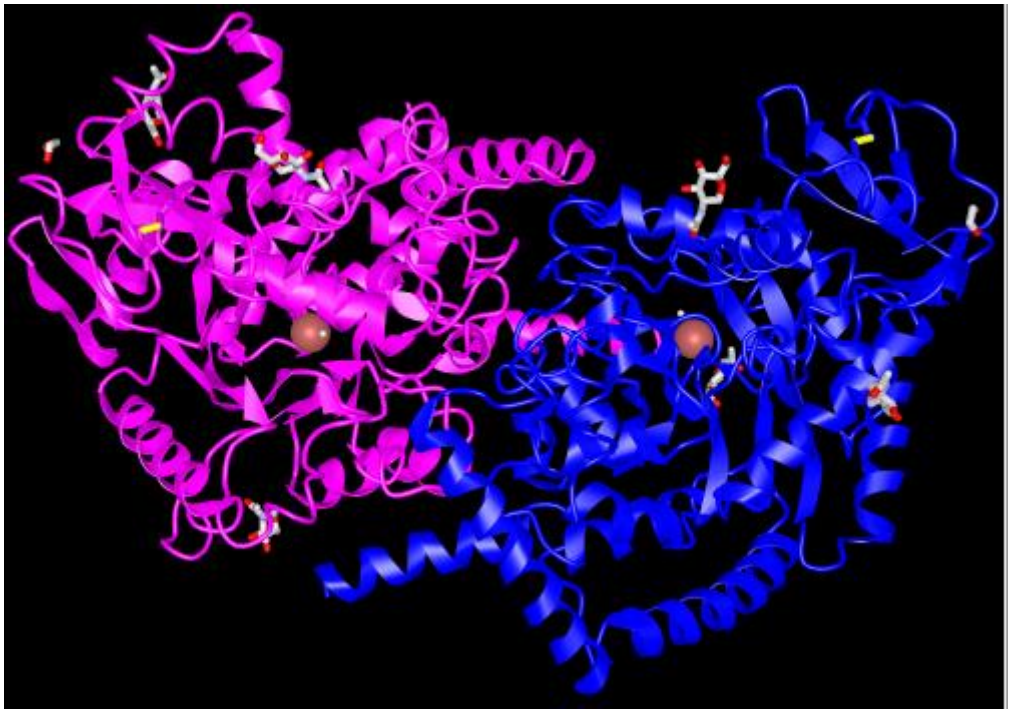
A E-ADA consiste em uma proteína de 35 kDa ligante de zinco (Figura 6), podendo também formar um dímero com a dipeptidil peptidase IV (DPPIV ou CD26), gerando um complexo de 280 kDa (Figura 7). Em humanos, duas isoformas foram identificadas, a ADA1 e a ADA2. (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005).

Figura 5 – Reação catalisada pela E-ADA.



Fonte: Voet, Voet e Pratt (2014).

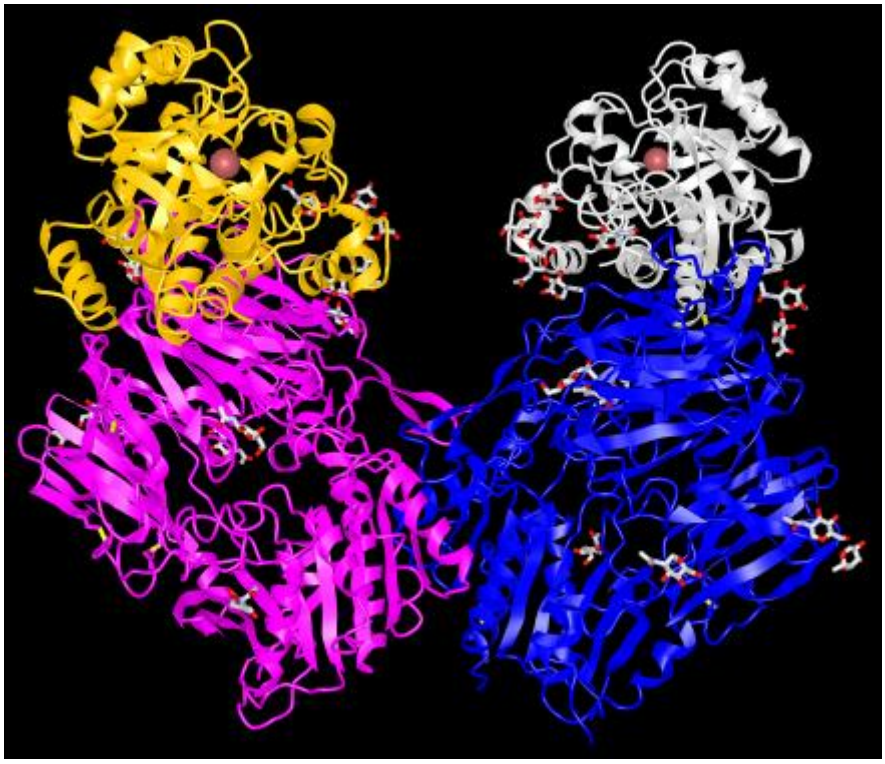
Figura 6 – Estrutura por raio x da ADA2 humana.



*As esferas de coloração marrom correspondem ao zinco presente no sítio ativo da enzima.
Fonte: Adaptado de Zavialov (2010).

As duas isoformas da E-ADA humana pertencem a família das hidrolases dependentes de zinco e são fortemente inibidas por desoxicoformicina e eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil)-adenina (EHNA). A ADA1 influencia na função dos linfócitos e algumas mutações herdadas relacionadas a esta enzima resultam em imunodeficiência severa, já a ADA2 desempenha importante papel no desenvolvimento de tecidos, visto que pertence à família de fatores de crescimento da adenosina desaminase (ZAVIALOV et al., 2010).

Figura 7 – Estrutura por raio x da E-ADA bovina em complexo com DPPIV humana.



*As unidades representadas em rosa e azul correspondem à DPPIV humana, enquanto que as unidades amarela e branca correspondem à E-ADA bovina. Já as esferas de coloração marrom correspondem ao zinco presente no sítio ativo da E-ADA. Fonte: Adaptado de Weihofen et al. (2004).

Os maiores níveis de E-ADA em humanos são encontrados nos tecidos linfoides (ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000). Em linfócitos de sangue periférico humano, a E-ADA é encontrada predominantemente em linfócitos T, sendo que a atividade enzimática nos tecidos linfoides periféricos está correlacionada com a porcentagem de linfócitos T em cada indivíduo (BARTON; GOLDSCHNEIDER, 1979).

2.4 Linfócitos

Os linfócitos são células esféricas, com diâmetro entre 6 e 8 µm, que reconhecem moléculas estranhas presentes em vários agentes infecciosos e os combatem através de resposta humoral e resposta citotóxica celular. Possuem também a cromatina disposta em grumos grosseiros e o citoplasma escasso (JUNQUEIRA, 2013).

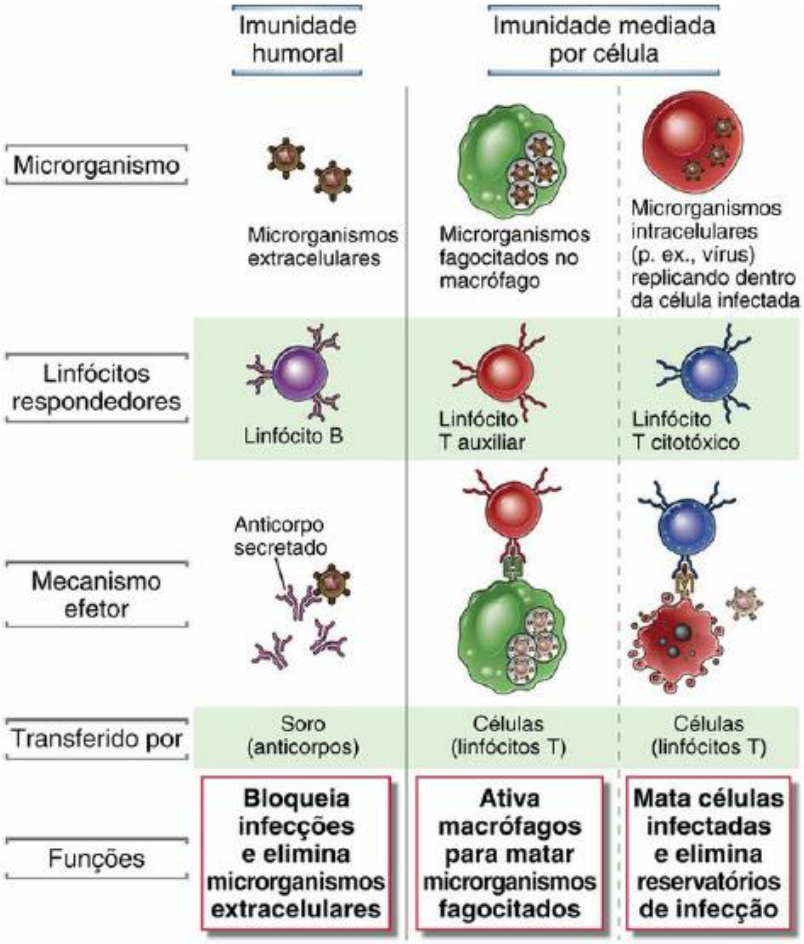
A população de linfócitos é composta por aproximadamente 15% de linfócitos B, 80% de linfócitos T e 5% de células "*null*", que correspondem às células sem marcadores de superfície (células-tronco e células "*natural killer*" (NK)) (GARTNER; HIATT, 2011).

As subpopulações de linfócitos T são definidas por moléculas marcadoras específicas em sua superfície celular, compreendendo os linfócitos T auxiliares (ou "*helper*", $CD4^+$), os linfócitos T citotóxicos (ou "*killer*", $CD8^+$), os linfócitos T reguladores (T_{reg}) e as células da memória imunológica (OVALLE; NAHIRNEY; 2014).

Os linfócitos T precisam passar pelo córtex do timo para tornarem-se imunologicamente competentes, enquanto que as células NK não necessitam desta interação com o timo para que possam desempenhar suas funções (GARTNER; HIATT, 2011). Os linfócitos T auxiliares estão envolvidos principalmente no combate às infecções por patógenos. Já os linfócitos B quando ativados, por antígenos ou por citocinas, se diferenciam em plasmócitos, que sintetizam e secretam imunoglobulinas (OVALLE; NAHIRNEY; 2014).

Os linfócitos B efetores secretam os anticorpos visando prevenir as infecções e eliminar os micro-organismos extracelulares, constituindo a resposta imunológica humoral. Na imunidade mediada por célula, os linfócitos T auxiliares ativam macrófagos visando eliminar os microrganismos fagocitados ou os linfócitos T citotóxicos destroem diretamente as células infectadas (Figura 8) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Figura 8 – Imunidade humoral e imunidade mediada por célula.



Fonte: Abbas, Lichtman e Pillai (2015).

2.5 Funções da E-ADA nos linfócitos

A função da E-ADA na porção extracelular da membrana plasmática vem sendo objeto de vários estudos, visto que a mesma pode ser encontrada em monócitos, linfócitos B e linfócitos T (GINÉS et al., 2002). A E-ADA está localizada na superfície celular de linfócitos, apresentando *cluster* de diferenciação próprio (CD26) devido a sua ligação com a DPPIV (BOURS et al., 2006).

A DPPIV ou CD26 consiste em uma glicoproteína de superfície celular com atividade de dipeptidil peptidase IV conhecida em seu domínio extracelular, estando presente em vários tipos celulares como linfócitos T e células epiteliais do fígado, rim e intestino (DONG et al., 1996). Nos linfócitos T, sua associação com a E-ADA desencadeia sinais co-estimulatórios intracelulares (GINÉS et al., 2002).

Além disso, a E-ADA desempenha importante função na remoção catalítica da adenosina no meio extracelular, podendo também participar da regulação de respostas inflamatórias e imunes em tumores (DONG et al., 1996). Sendo assim, a função dos linfócitos pode ser afetada pelos níveis de adenosina, que atua como importante molécula sinalizadora (BOURS et al., 2006).

A deficiência na E-ADA por mutações em humanos manifesta-se primariamente com linfopenia severa e imunodeficiência, ocasionando morte aos seis meses de vida caso não tratada. É sugerido que o acúmulo de substrato da E-ADA desencadeia consequências metabólicas que podem induzir a apoptose e a morte de linfócitos. Assim, os níveis elevados de adenosina poderiam desencadear uma exagerada sinalização nos receptores P1 (acoplados a proteína G), que podem por sua vez regular o cAMP intracelular e os níveis de cálcio, levando a apoptose. Da mesma forma, níveis elevados de 2'-desoxiadenosina podem prejudicar os linfócitos, visto que a mesma pode atuar como inibidor da enzima S-adenosilhomocisteína hidrolase (necessária para reações celulares essenciais de transmetilação) e pode ainda ser fosforilada tornando-se trifosfato de desoxiadenosina (dATP), também induzindo a apoptose (HOVI et al., 1976; BARTON; GOLDSCHNEIDER, 1979; ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000).

Foram observados diferentes níveis de atividade da E-ADA nas células do sistema imune em diferentes estágios de maturação, sugerindo que esta enzima está relacionada com a diferenciação de linfócitos B e T. Acredita-se que a E-ADA media interações específicas entre os linfócitos (B e T) e outros linfócitos, e entre linfócitos e células do estroma (FRANCO et al., 1998).

A co-estimulação mediada pela E-ADA promove uma elevada produção de células T durante a fase efetora e uma aumentada geração de células T de memória após a fase efetora. Além disso, esta atividade enzimática promove um aumento na geração de células T_{reg}, inclusive em culturas de células obtidas de pacientes infectados com o vírus HIV (MARTINEZ-NAVIO et al., 2011).

A atividade da E-ADA já foi investigada em soro de pacientes com leucemia linfocítica crônica (GHADERI et al., 2016), em subpopulações de linfócitos sanguíneos de cordão umbilical humanos (AMBROGI et al., 1982), em linfócitos de ratos adultos tratados com ácido cafeico (ANWAR et al., 2013), em linfócitos do fluido pleural de pacientes com diagnóstico de tuberculose (ARNOLD et al., 2015), em soro e linfócitos de sangue periférico de pacientes com miastenia gravis (CHIBA et al., 1990), em soro

e linfócitos periféricos de pacientes com doença de Parkinson idiopática (CHIBA et al., 1995), em linfócitos de pacientes com febre tifoide (GALANTI et al., 1981), em linfócitos periféricos sanguíneos de pacientes com câncer gástrico (KOJIMA et al., 1985), dentre outros.

2.6 Plaquetas

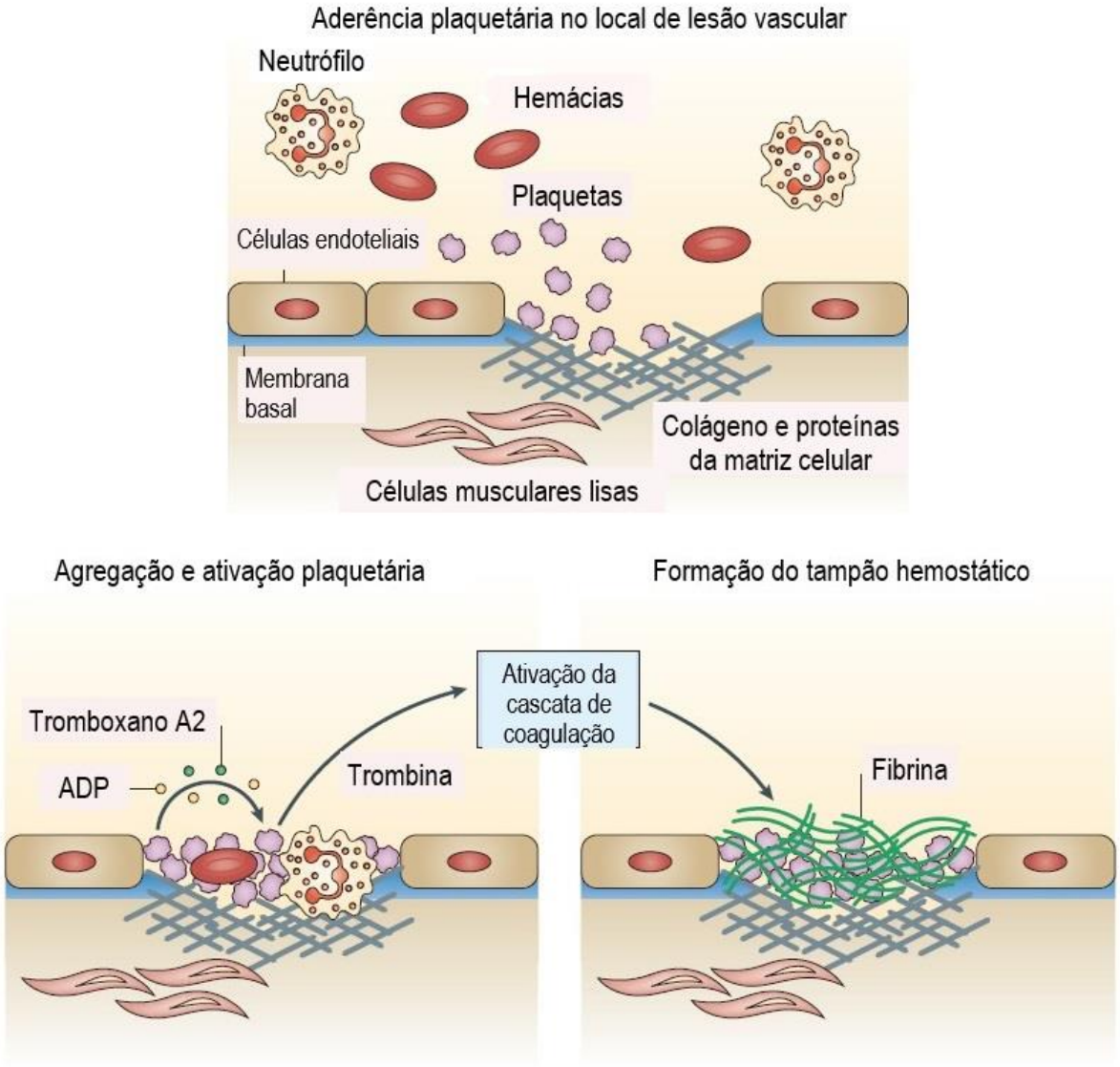
As plaquetas consistem em corpúsculos anucleados, com diâmetro entre 2 a 4 µm e formato discoide. São derivadas dos megacariócitos, células gigantes provenientes da medula óssea, e promovem a coagulação do sangue e ajudam na reparação do endotélio vascular para evitar perda de sangue (JUNQUEIRA, 2013).

Durante uma injúria vascular (Figura 9), proteínas da membrana basal e colágeno são expostos, permitindo que as plaquetas fiquem aderidas ao substrato. Estas plaquetas aderidas irão então se agregar e liberar mediadores da ativação plaquetária, como ADP e tromboxano A2. Após esta ativação, as plaquetas produzem trombina, catalisando o início da cascata de coagulação e gerando deposição de fibrina no local, que forma uma espécie de tampão e evita a perda de sangue (SEMPLE; ITALIANO JR; FREEDMAN, 2011).

As plaquetas funcionam exclusivamente sem núcleos, porém sua importância e sua complexidade não são menores por isso. Sua interação com diferentes tipos celulares, como células endoteliais e leucócitos, faz com que desempenhe papel direto e indireto na hemostasia e na imunidade (LI; ZARBOCK; HIDALGO, 2017).

Plaquetas ativadas podem expressar e secretar um *cluster* de diferenciação (CD40L), podendo ativar o endotélio e modular uma variedade dos processos celulares. Com isso, uma intensa resposta pró-inflamatória aumenta a formação de trombos, porém reduz sua estabilidade levando ao desenvolvimento de embolia. Ainda, essas plaquetas ativadas podem promover aterogênese por meio da inibição da migração de células T_{reg} ao local do trombo, evitando a resposta anti-inflamatória que o estabilizaria (Figura 10) (SEMPLE; ITALIANO JR; FREEDMAN, 2011).

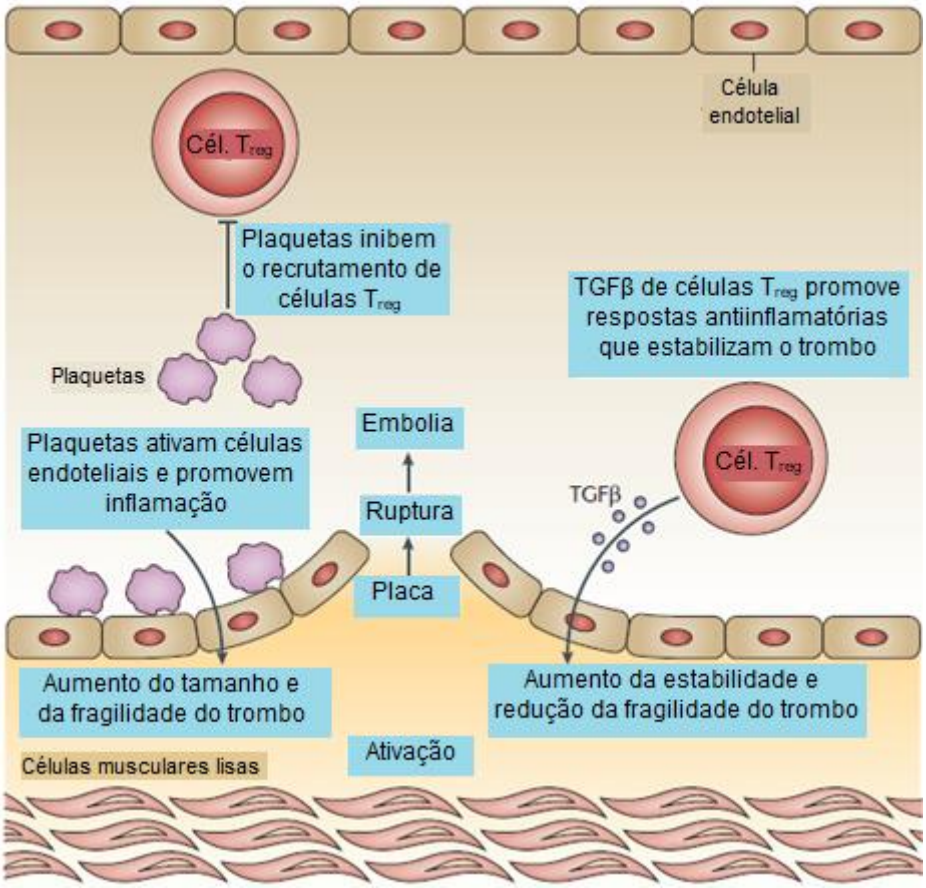
Figura 9 – Função plaquetária na hemostasia.



Fonte: Adaptado de Semple, Italiano Jr. e Freedman (2011).

Alguns fatores plaquetários específicos que possuem propriedades de aumento ou estabilização da barreira endotelial incluem esfingosina-1-fosfato, angiopoietina-1, serotonina, epinefrina, adenosina, ATP e ácido lisofosfatídico (MIDDLETON; WEYRICH; ZIMMERMAN, 2016).

Figura 10 – Papel das plaquetas ativadas na formação de placas aterogênicas.



*TGFβ, fator de transformação do crescimento beta.

Fonte: Adaptado de Semple, Italiano Jr. e Freedman (2011).

2.7 Funções da E-ADA nas plaquetas

Mudanças no metabolismo de nucleotídeos e nucleosídeos de adenina na superfície das plaquetas podem estar envolvidas com a ativação plaquetária, como observado em pacientes com câncer de mama. Além disso, é importante ressaltar que a atividade dessas enzimas que hidrolisam estes nucleotídeos e nucleosídeos é consideravelmente menor nas plaquetas do que nas células endoteliais e leucócitos. No entanto, as atividades combinadas destas células podem desempenhar um importante papel na regulação local dos níveis sanguíneos desses nucleotídeos e nucleosídeos (ARAÚJO et al., 2005).

A adenosina apresenta atividades anti-inflamatórias (KOUPENOVA et al., 2017), incluindo inibição da mudança de forma das plaquetas e inibição da ativação

plaquetária, por meio da ativação dos receptores A_2, que elevam a concentração de cAMP no interior das plaquetas. A agregação plaquetária é inibida pela adenosina, mesmo apresentando baixos níveis sanguíneos (0,02 a 0,3 µmol/L), ao se ligar a receptores A_2, ocasionando redução dos níveis citosólicos de Ca^{2+}. Deste modo, o uso terapêutico da adenosina vem sendo estudado, com o desenvolvimento de fármacos antitrombóticos, como o dipiridamol (BAKKER et al., 1994).

Os mecanismos por trás da atividade antiplaquetária também resultam da interação adenosina-receptor A_2 relacionados com aumento dos níveis de cAMP com inibição da expressão de P-selectina, liberação do ligante solúvel CD40 e regulação negativa da via de sinalização do ADP e dos receptores de colágeno (IYU et al., 2011; FUENTES et al., 2014).

A atividade da E-ADA já foi estudada em plaquetas de pacientes com artrite reumatoide (BECKER et al., 2010), de pacientes diabéticos tratados com extrato de *Syzygium cumini* (BONA et al., 2010), de pacientes com isquemia cardíaca (BAGATINI et al., 2011), de ratos hipertensos (CARDOSO et al., 2012), de ratos adultos tratados com ácido cafeico (ANWAR et al., 2013), de pacientes com câncer de próstata (BATTISTI et al., 2013), de indivíduos com Síndrome de Down (FERREIRA et al., 2015), de pacientes com anemia falciforme (CASTILHOS et al., 2016), de gestantes com diabetes, hipertensão e HIV (LEAL et al., 2016), dentre outros.

2.8 Cinética enzimática

As enzimas são diferentes dos catalisadores químicos comuns devido à velocidade, às condições, à especificidade e ao controle de reação. A atividade enzimática é limitada a substratos e reações específicas dependendo das propriedades físicas e químicas do sítio ativo (VOET; VOET; PRATT, 2014).

O sítio ativo consiste em um bolsão da enzima no qual as reações são catalisadas, já a molécula que se liga a este sítio e sobre o qual a enzima age é denominada substrato. A abordagem mais utilizada para compreensão do mecanismo das enzimas corresponde à determinação da velocidade da reação e como a mesma pode modificar-se com a alteração de outros parâmetros experimentais (NELSON; COX, 2014).

O estado estacionário ocorre quando a velocidade com a qual o complexo enzima-substrato (ES) se forma é compensada pela velocidade na qual ES é decomposto. A Equação de Michaelis-Menten consiste na equação básica da cinética enzimática. Na concentração de substrato em que [S] = K_m, a equação velocidade inicial $(V_0) = \frac{\text{velocidade máxima } (V_{max}) \times [S]}{K_m + [S]}$ torna-se $V_0 = \frac{V_{max}}{2}$. Deste modo, K_m corresponde a concentração de substrato na qual a velocidade da reação corresponde à metade da V_{max} (VOET; VOET; PRATT, 2014).

O *plot* de Michaelis-Menten é dado pela concentração de substrato [S] *versus* a velocidade [v], sendo o mais utilizado em cinética enzimática para determinação do K_m e da V_{max}. O *plot* de Lineweaver-Burke, ou duplo-recíproco, é obtido com um rearranjo da equação de Michaelis-Menten, no qual: $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]}$. Já o *plot* de Eadie-Hofstee consiste em outra forma linear da mesma equação, descrita por: $v = V_{max} - K_m \times \frac{v}{[S]}$ (FUJII, 2014).

A equação de Lineweaver-Burke resulta em uma distribuição de pontos desigual e enfatiza os pontos com menores concentrações de substrato, podendo ocasionar maior chance de erro experimental. Por outro lado, a equação de Eadie-Hofstee proporciona melhor distribuição dos pontos (WILSON; WALKER, 2001).

Para estudar o efeito das condições ambientais de ensaio é necessário conduzi-lo em condições de V_{max}, na qual toda a enzima está ligada ao substrato. Assim, condições externas como a influência da temperatura e do pH podem ser observadas no ensaio enzimático (WEINER, 2011).

O estudo da cinética enzimática possui grande importância prática, visto que algumas doenças podem ser causadas por uma deficiência/ausência de uma ou mais enzimas, ou pela atividade excessiva de outras. Assim, a determinação da atividade enzimática em diferentes células e tecidos pode ser importante no diagnóstico de certas doenças (NELSON; COX, 2014).

Apesar da caracterização da atividade enzimática da E-ADA em soro humano ter sido proposta por Giusti (1974) e por Guisti e Gakis (1971), não há na literatura estudos apresentando a caracterização detalhada da atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas isolados, mesmo com vários trabalhos que apenas quantificaram sua atividade nestas células específicas.

O presente estudo propôs então a padronização da faixa de linearidade de tempo e concentração de proteína, da temperatura, do pH, da concentração de substrato e especificidade, além da influência do zinco, na atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas isolados de sangue periférico de humanos na ausência de processos patológicos envolvidos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Caracterizar a atividade da adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas humanos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a viabilidade das células mononucleares ricas em linfócitos (*peripheral blood mononuclear cells*; PBMC) isoladas de sangue periférico humano em um período de até 24h;
- Padronizar condições como o intervalo de tempo de incubação e concentração de proteína em que há linearidade na atividade da adenosina desaminase nos linfócitos e nas plaquetas isolados de sangue periférico humano;
- Caracterizar as propriedades bioquímicas da adenosina desaminase relacionadas à temperatura, pH, especificidade por substratos, influência dos íons zinco, cálcio e magnésio sobre a atividade da adenosina desaminase nos linfócitos e plaquetas;
- Determinar as constantes cinéticas, como a constante de Michaelis e Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}) para adenosina desaminase, com a adenosina como substrato, nos linfócitos e plaquetas;
- Determinar a presença da adenosina desaminase na superfície dos linfócitos por meio da citometria de fluxo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada (Anexo I) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS (CAAE: 89595518.3.0000.0021).

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi entregue aos participantes no primeiro contato com a pesquisadora, para que os mesmos conhecessem os objetivos do estudo e decidissem sua participação. No TCLE (Anexo II), foi solicitado ao participante ler cuidadosamente o termo e perguntar à pesquisadora responsável qualquer dúvida que tiver. Além disso, a pesquisadora inclui o telefone e o email no TCLE para possibilitar o contato dos participantes com a mesma em caso de dúvidas futuras, bem como telefone e email do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS.

No TCLE, solicitou-se ao participante sua autorização para coleta de sangue venoso periférico, sendo que a pesquisadora garantia que seu nome e identidade fossem mantidos em sigilo. Além disso, é ressaltado que o participante não receberia compensação financeira pela participação na pesquisa, sendo sua participação voluntária. No entanto, também é destacado que o participante poderia escolher não fazer parte do estudo, ou que poderia desistir a qualquer momento, lembrando que sua recusa em participar do estudo não traria qualquer tipo de punição ou represália.

Estando de acordo com o termo, os participantes da pesquisa assinaram e ficaram com uma via do TCLE, assim como a pesquisadora responsável.

A Declaração de Uso de Material Biológico e Dados Coletados (Anexo III) foi preenchida e assinada pela pesquisadora responsável.

4.2 Seleção de amostragem

Os critérios de inclusão compreenderam:

- Adultos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, não portadores de doenças crônicas, e que não apresentavam processo infeccioso ou inflamatório agudo em curso no momento da coleta sanguínea, vinculados ao InBio/UFMS (docentes, discentes e técnicos).

Os critérios de exclusão foram:

- Adultos maiores de 18 anos, de ambos os sexos, portadores de doenças crônicas (por exemplo, hipertensão arterial e diabetes mellitus) ou doenças autoimunes; menores de 18 anos de idade; fumantes; etilistas; e gestantes.

Utilizou-se um número amostral (n) entre quatro e seis para cada ensaio enzimático realizado.

4.3 Coleta e processamento do material biológico

O material biológico (sangue venoso periférico) foi coletado em um espaço reservado (sala pertencente ao Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio na UFMS) para garantir maior privacidade ao participante. Nesta sala encontravam-se disponíveis todos os materiais necessários para realização da coleta e descarte adequado de perfurocortantes, de acordo com as normas de biossegurança.

As amostras coletadas foram identificadas apenas com numeração, assegurando a confidencialidade e a privacidade do participante. O material biológico coletado foi processado, armazenado, analisado e descartado no próprio laboratório, após as análises, seguindo as normas de biossegurança. O material e os dados obtidos serviram exclusivamente a finalidade prevista e conforme o consentimento do participante.

4.4 Separação do PBMC rico em linfócitos e do plasma rico em plaquetas

O PBMC rico em linfócitos foi separado de sangue total coletado com EDTA e separado por gradientes de densidade de Ficoll-Hypaque como descritos por Boyum (1968).

Já o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado conforme descrito por Lunkes et al. (2004) com pequenas modificações (JAQUES et al., 2011).

4.5 Quantificação da atividade enzimática da E-ADA

Para a quantificação enzimática da enzima E-ADA em linfócitos e plaquetas foi utilizada a metodologia descrita por Guisti e Gakis (1971) e Giusti (1974).

No tubo branco amostra foi adicionado 500 µL de substrato (inicialmente, adenosina 20 mM), e no tubo amostra 500 µL de substrato e 25 µL da amostra. Como padrão foi realizada uma curva padrão com sulfato de amônio (300 µM). Os tubos foram então incubados, sendo realizado o teste variando o tempo de incubação (15 a 120 minutos).

Foi realizada também uma curva de atividade enzimática em função da concentração de proteína na amostra (0,04 a 0,8 mg/mL). Para testes com variação de pH foram utilizados os tampões acetato de sódio (pH 4.0, 5.0 e 6.0), fosfato de sódio (pH 7.0 e 7.4) e carbonato/bicarbonato de sódio (pH 8.0 e 9.0), todos na concentração de 50 mM.

Foi utilizado o substrato adenosina (A9251 – *Sigma-Aldrich*) para determinação da constante de Michaelis e Menten (Km) e velocidade máxima (Vmax). A temperatura da incubação foi variada e testada em 25ºC, 37ºC, 45ºC e 60ºC.

Para ensaio de especificidade, foram utilizados os substratos adenosina, desoxiadenosina (D7400 – *Sigma-Aldrich*) e guanosina (G6752 – *Sigma-Aldrich*). Foi avaliada também a influência do zinco (Zn^{2+}), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e EDTA, todos na concentração de 5 mM. Como inibidor foi utilizado o cloridrato de EHNA 0,1 mM (1261 – *TOCRIS Bioscience*).

Ao final do tempo de incubação, foram adicionados 1,5 mL de solução fenol/nitroprussiato (fenol 106 mM e nitroprussiato 0,17 mM) e 1,5 mL de hipoclorito alcalino a todos os tubos. Somente ao tubo branco amostra foi adicionado 25 µL da amostra. Depois os tubos foram novamente incubados por 30 minutos a 37ºC.

A reação catalisada pela E-ADA é interrompida ao fim do período de incubação com a adição da solução fenol/nitroprussiato. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente (620 nm), medindo-se a amônia produzida na reação, sendo expressa em nmol de NH_3/min/mg de proteína.

4.6 Quantificação de proteína

A quantificação de proteína foi realizada de acordo a metodologia descrita por Bradford (1976) utilizando-se soro-albumina bovina como padrão.

4.7 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando-se Azul de *Trypan* de acordo a metodologia descrita por Strober (2001).

4.8 Citometria de fluxo

Para análise por citometria de fluxo, foram utilizadas três amostras de PBMC separadas de sangue periférico. Cada amostra de linfócitos foi lavada com tampão de bloqueio e centrifugada a 1200 rpm por seis minutos e dividida em três tubos de ensaio (tubo 1 – controle de células; tubo 2 – controle isotipo; tubo 3 – anticorpo), cada um contendo 100 µL. Ao tubo controle de células, foram adicionados 60 µL de tampão de bloqueio. Ao tubo controle isotipo, foram adicionados 6 µL de isotipo e 54 µL de tampão de bloqueio. Ao tubo anticorpo, foram adicionados 6 µL de anticorpo monoclonal anti-CD26 humano FITC (BD Biosciences) e 54 µL de tampão de bloqueio. Todos os tubos permaneceram protegidos da luz em incubação por 30 minutos em temperatura ambiente.

Após a incubação foram realizadas duas lavagens com tampão fosfato (pH 7.0), em todos os tubos, com centrifugação a 1200 rpm por seis minutos a cada lavagem. Ao final das lavagens as células em todos os tubos foram ressuspendidas em 300 µL de tampão fosfato (pH 7.0). Foi utilizado o citômetro de fluxo BD Accuri™ e os resultados foram analisados no software específico do equipamento.

4.9 Análise estatística

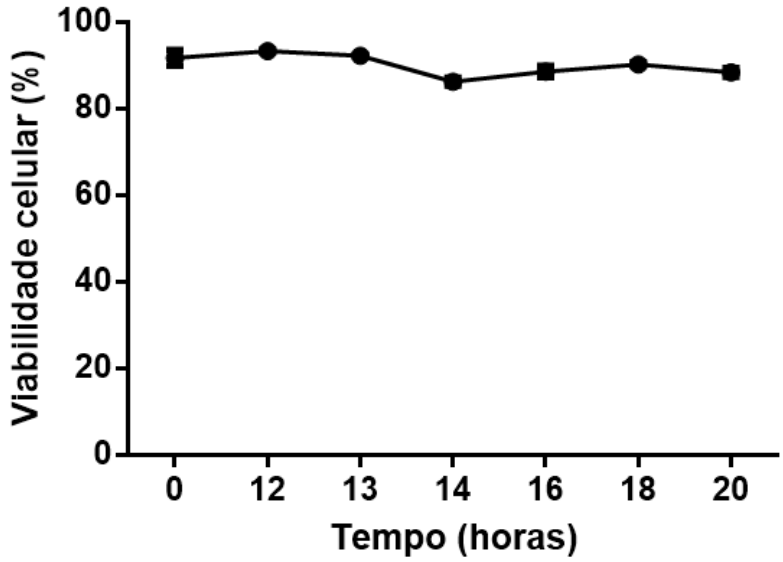
Todas as variáveis foram testadas para normalidade de distribuição e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos *in vitro* foram analisados através do teste t de *Student* ou análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida pelo test *post hoc* de *Tukey*. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.

Para análise da linearidade das curvas de tempo e de proteína foi utilizada a Correlação de *Pearson*. Os parâmetros cinéticos foram calculados através do *software* GraphPad Prism.

5. RESULTADOS

A viabilidade média dos linfócitos isolados (Figura 11) foi 93,4% após 12 horas, 86,3% após 14 horas, 88,6% após 16 horas, 90,3% após 18 horas e 88,4% após 20 horas.

Figura 11 – Viabilidade celular dos linfócitos isolados de sangue venoso periférico em um período de 20 horas (n=3).



Para os primeiros ensaios de atividade da E-ADA foi utilizada como substrato a adenosina 20 mM, conforme preconizado por Guisti e Gakis (1971), até que as condições ideais fossem determinadas.

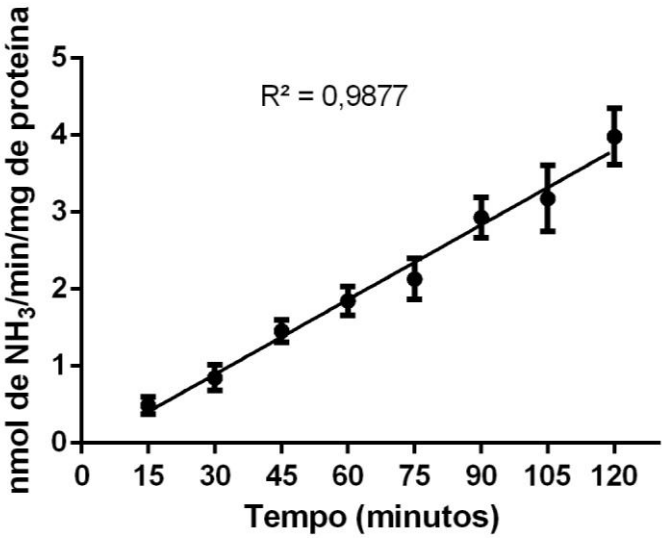
A atividade enzimática foi linear de 15 a 120 minutos de incubação nos linfócitos, enquanto que nas plaquetas a atividade foi linear de 15 a 105 minutos (Figura 12). Deste modo, foram escolhidos os tempos de incubação de 120 minutos e 105 minutos para linfócitos e plaquetas, respectivamente, nos quais a atividade enzimática encontrava-se mais elevada.

A atividade enzimática se manteve linear na faixa de 2,5 a 12,5 µg de proteína, correspondente a 0,1 a 0,5 mg/mL, nos linfócitos; enquanto que nas plaquetas manteve-se na faixa de 7,5 a 20 µg, equivalente a 0,3 a 0,8 mg/mL (Figura 13). Para realização dos experimentos seguintes os conteúdos de proteína das amostras foram

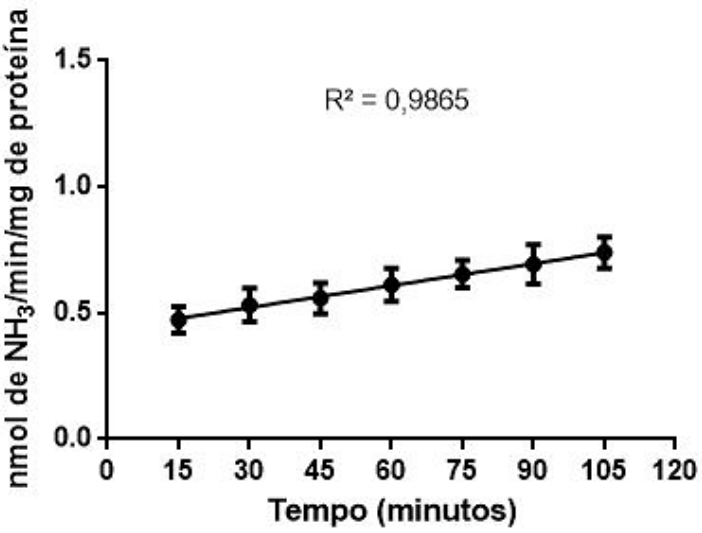
adequados para valores próximos a 12,5 e 20 µg de proteína para linfócitos e plaquetas, respectivamente.

Figura 12 – Efeito do tempo na atividade da E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



B

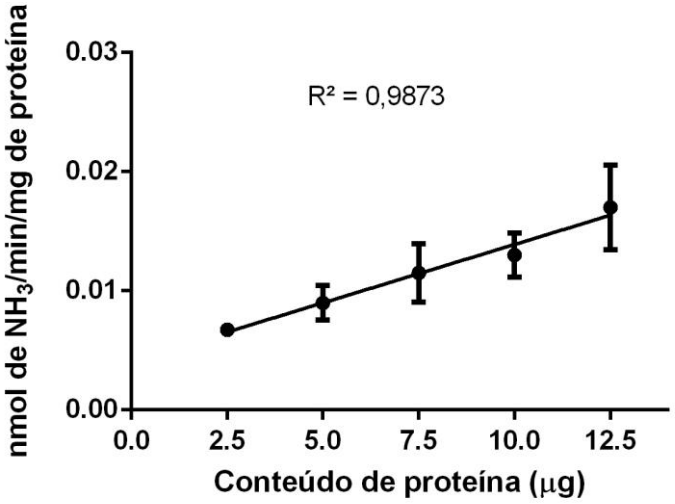


Os níveis de atividade enzimática relativa permaneceram mais elevados e lineares na faixa de pH entre 6.0 a 7.4 (Figura 14). Portanto, para os ensaios seguintes foi escolhido o tampão acetato de sódio (50 mM) pH 6.0 para linfócitos e o tampão fosfato de sódio (50 mM) pH 7.0 para plaquetas.

Para estudo dos parâmetros cinéticos, as concentrações de adenosina utilizadas foram de 0,1 a 20 mM para linfócitos e de 0,001 a 5 mM para plaquetas. Os valores de K_m aparente e V_{max} foram 0,103±0,051 mM e 0,025±0,001 nmol de NH_3/min/mg de proteína nos linfócitos, e 0,0017± 0,00045 mM e 0,004±0,0001 nmol de NH_3/min/mg de proteína nas plaquetas (Figura 15). Para os próximos ensaios foram escolhidas as concentrações de adenosina 10 mM e 1 mM para linfócitos e plaquetas, respectivamente.

Figura 13 – Efeito do conteúdo de proteína na atividade da E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



B

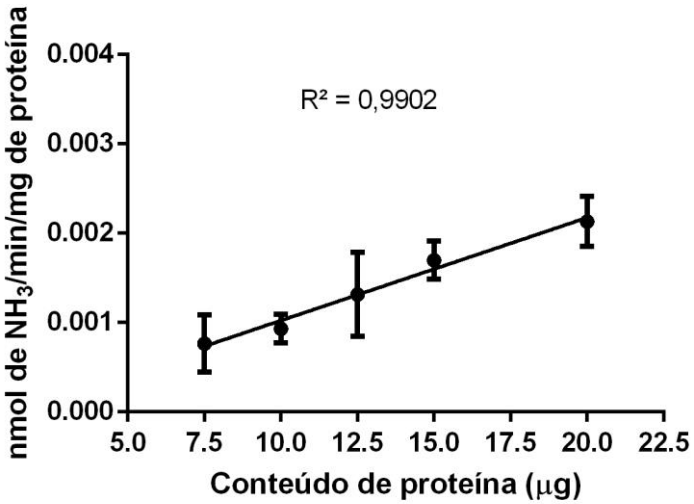
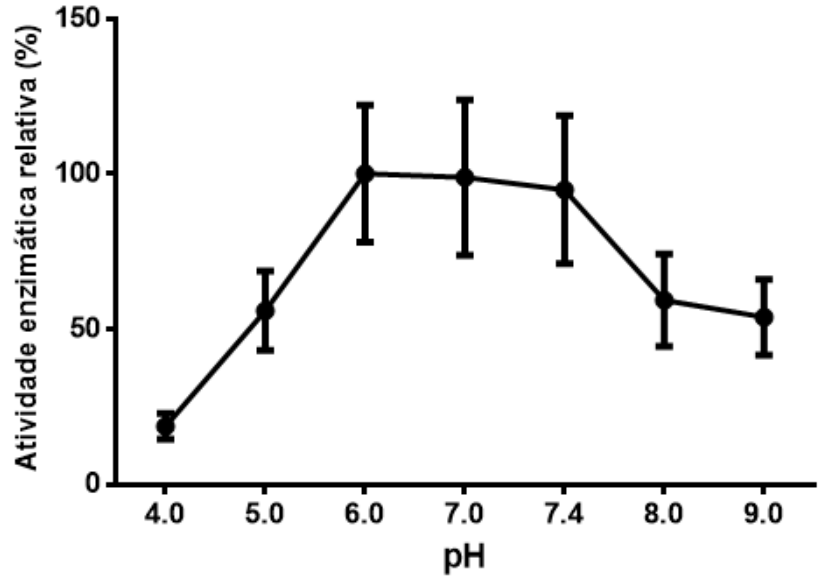
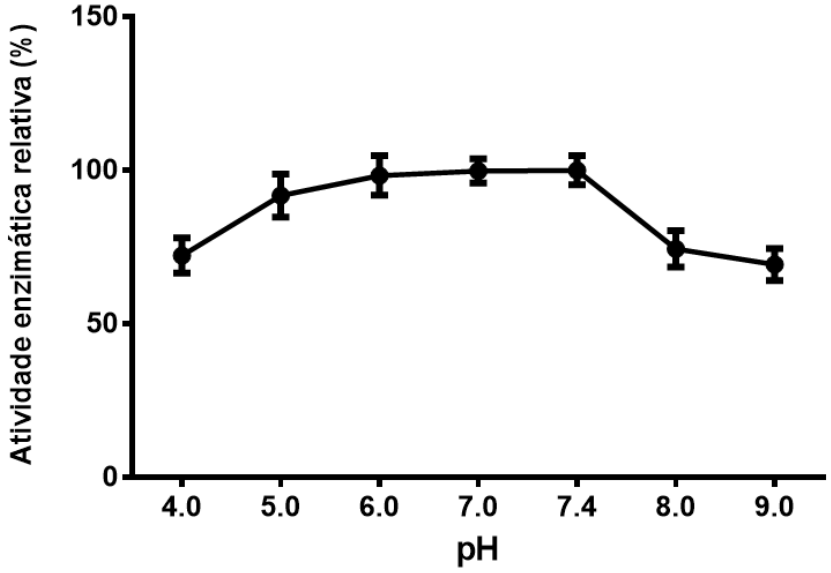


Figura 14 – Efeito do pH na atividade relativa da E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



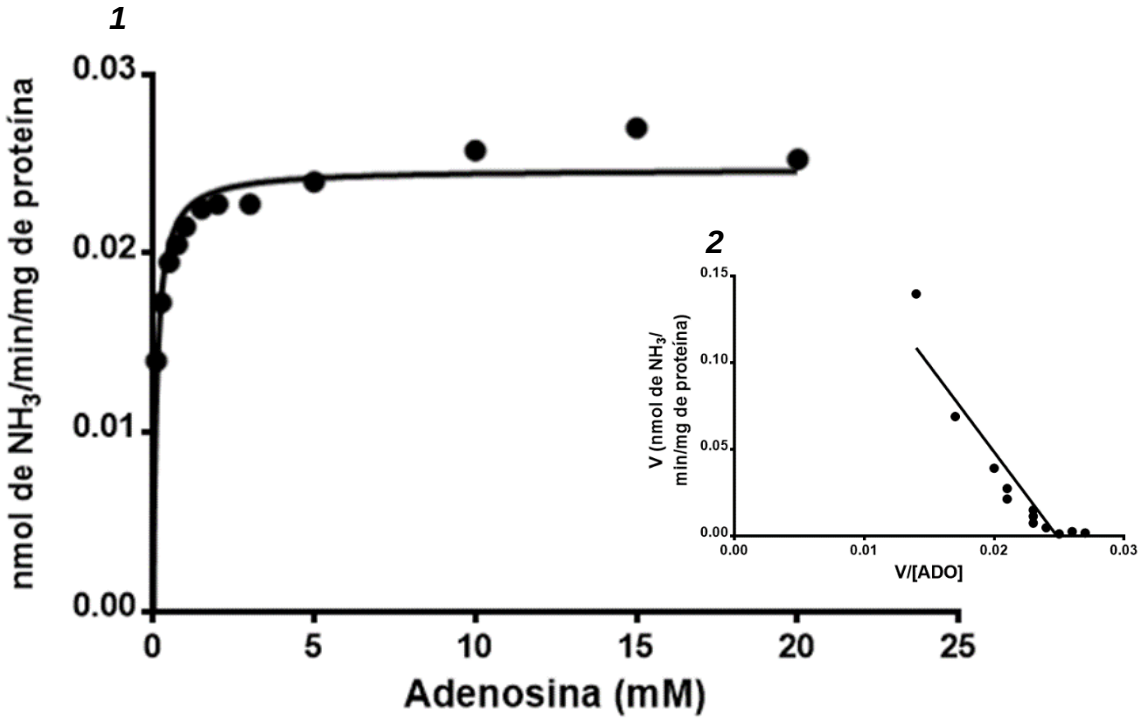
B



Foi avaliado ainda o efeito da temperatura em 25ºC, 37ºC, 45ºC e 60ºC (Figura 16). A atividade enzimática relativa aumentou tanto em linfócitos como em plaquetas até a temperatura de 60ºC. No entanto, a temperatura de 37ºC continuou sendo utilizada nos testes posteriores, por ser a temperatura mais estável aos sistemas biológicos, procurando evitar a desnaturação proteica provocada por temperaturas mais elevadas.

Figura 15 – Efeito do substrato pela equação de Michaelis-Menten para determinação do K_m e da V_{max} (***1***) e *plot* de Eadie-Hofstee (***2***) para E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



B

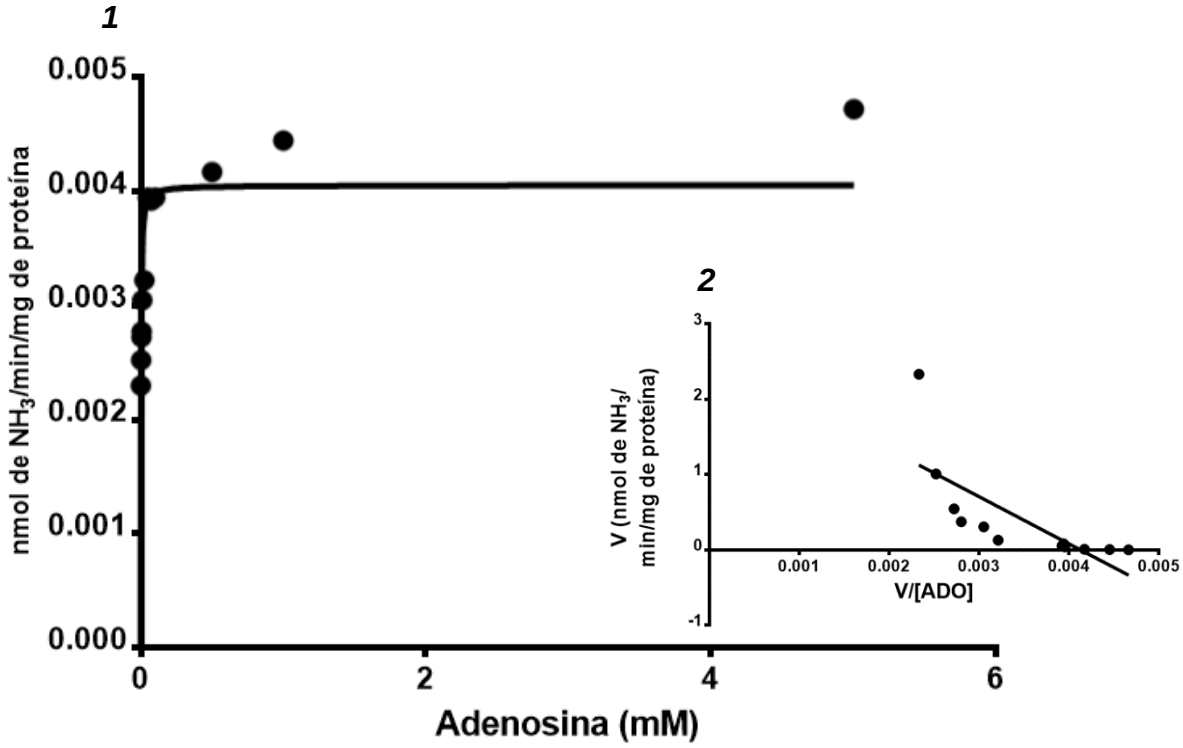
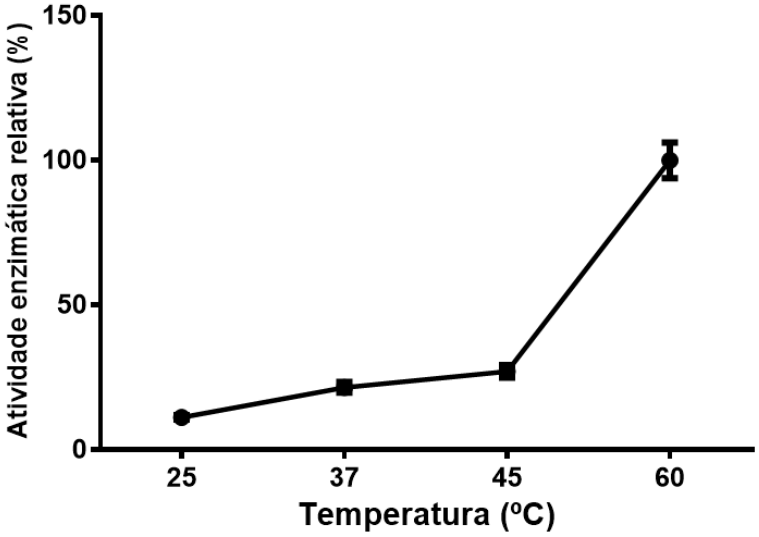
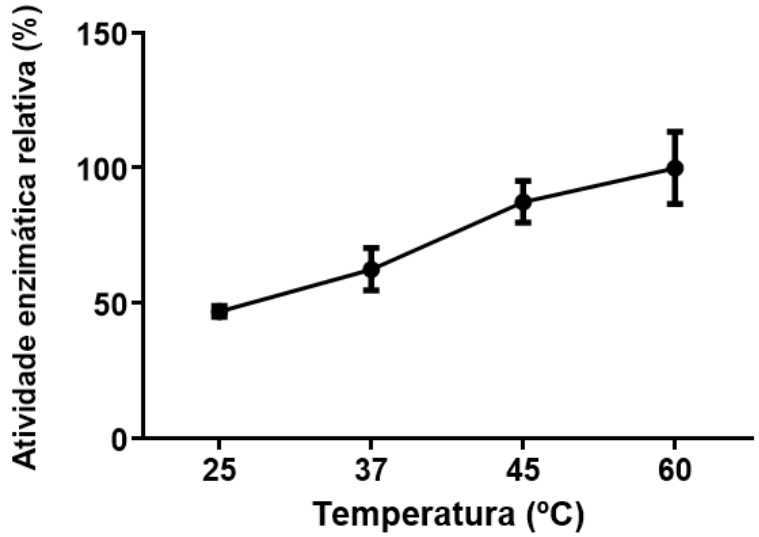


Figura 16 – Efeito da temperatura na atividade relativa da E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



B



Quanto ao efeito dos íons sobre a atividade enzimática nos linfócitos e nas plaquetas, o $ZnCl_2$ foi capaz de inibir significantemente a E-ADA. No entanto, o EDTA (quando incubado junto ao $ZnCl_2$) foi capaz de prevenir o efeito do zinco sobre a enzima, apenas nos linfócitos. Já o $CaCl_2$ e $MgCl_2$ não influenciaram significativamente a atividade enzimática em ambas as células (Figura 17).

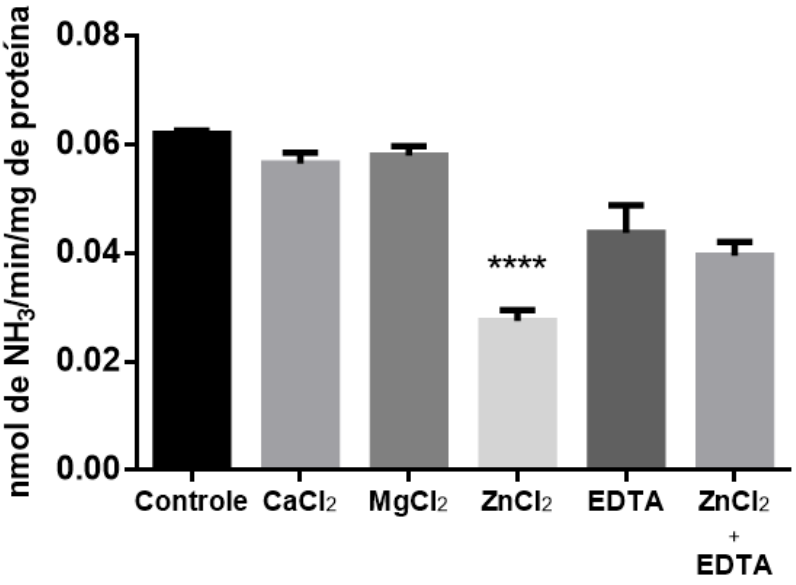
Quanto à especificidade (Tabela 1), nos linfócitos foi observada a preferência da E-ADA pela adenosina como substrato em relação à 2'-desoxiadenosina e

guanosina, enquanto que nas plaquetas observou-se preferência pela adenosina apenas quando comparada à guanosina. O EHNA inibiu significantemente a atividade da E-ADA tanto em linfócitos como nas plaquetas (Tabela 2).

Na citometria de fluxo de amostras de PBMC rico em linfócitos, observou-se que 53,8±6,8% de células no *gate* dos linfócitos foram marcadas com o anticorpo anti-CD26 (Figura 18).

Figura 17 – Efeito de íons na atividade da E-ADA em linfócitos (**A**; n=4) e plaquetas humanos (**B**; n=6).

A



B

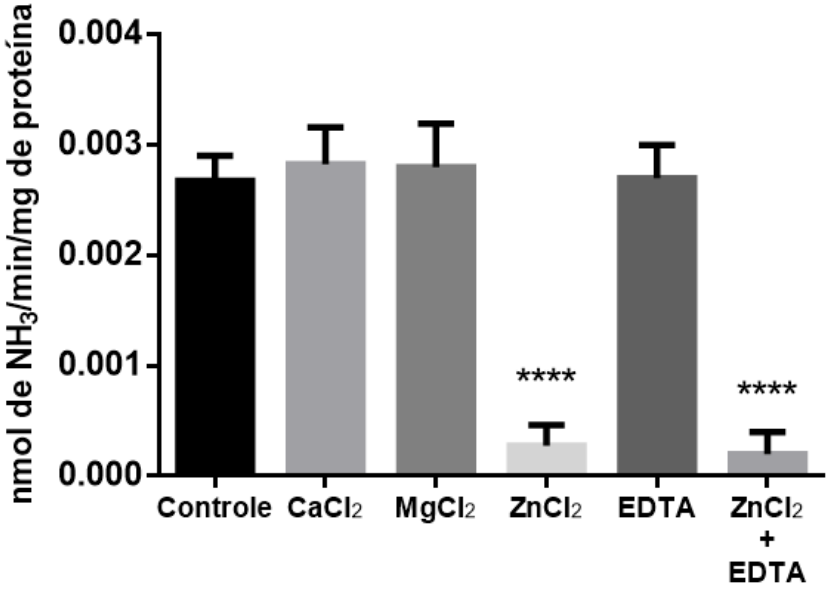


Tabela 1 – Especificidade por substrato pela E-ADA em linfócitos (10 mM; n=4) e plaquetas humanos (1 mM; n=6).

SUBSTRATO	LINFÓCITOS		PLAQUETAS	
	Atividade da E-ADA[1]	Atividade relativa (%)	Atividade da E-ADA[1]	Atividade relativa (%)
Adenosina	0,06354 ± 0,00504	100 ± 7,9	0,0056 ± 0,0010	100 ± 17,8
2'-desoxiadenosina	0,03636 ± 0,00299***	57,2 ± 4,7	0,0046 ± 0,0009	82,1 ± 16,01
Guanosina	0,00148 ± 0,00001***	2,3 ± 0,01	0,0019 ± 0,0001***	33,9 ± 1,7

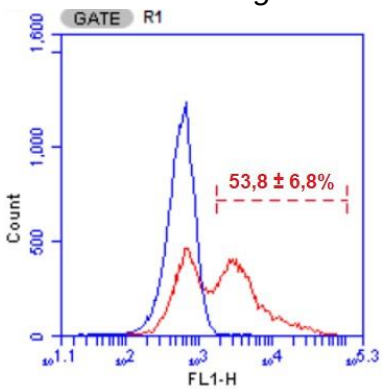
[1] Atividade enzimática expressa em nmol de NH_3/min/mg de proteína.
*** Diferença significativa em relação a adenosina (*one-way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de *Tukey*, $p < 0,01$).

Tabela 2 – Inibição da E-ADA em linfócitos (n=4) e plaquetas humanos (n=6) por EHNA.

GRUPO	LINFÓCITOS		PLAQUETAS	
	Atividade da E-ADA[1]	Atividade relativa (%)	Atividade da E-ADA[1]	Atividade relativa (%)
Controle	0,0583 ± 0,0046	100 ± 7,9	0,0057 ± 0,0011	100 ± 19,3
EHNA (0,1 mM)	0,0010 ± 0,0001***	1,7 ± 0,1	0,0003 ± 0,0001***	5,3 ± 1,7

[1] Atividade enzimática expressa em nmol de NH_3/min/mg de proteína.
*** Diferença significativa em relação ao controle (teste t de *Student*, $p < 0,0001$).

Figura 18 – Histograma da citometria de fluxo com marcação do anticorpo anti-CD26 humano FITC no *gate* de linfócitos de amostras de PBMC (n=3).



6. DISCUSSÃO

Para se quantificar a atividade de enzimas localizadas na face externa da membrana celular, é necessário garantir a integridade e a viabilidade celular para uma quantificação enzimática mais precisa, principalmente quando existem enzimas intracelulares que possuem a mesma atividade. A E-ADA está localizada na membrana plasmática com sítio catalítico voltado ao meio extracelular em várias células, como linfócitos e plaquetas (GIUSTI, 1974; ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005).

Como as demais enzimas do sistema purinérgico, a E-ADA está associada a diferentes processos biológicos como na regulação do sistema imune e na ativação e agregação plaquetária (MARTINEZ-NAVIO et al., 2011; IYU et al., 2011; FUENTES et al., 2014). Dessa maneira o estudo de enzimas como a E-ADA pode esclarecer questões sobre as alterações imunológicas presentes em diversas doenças, como imunodeficiências hereditárias ou adquiridas, câncer, trombose, isquemia cardíaca, doenças infecciosas e crônicas, dentre outros (GHADERI et al., 2016; ALDRICH; BLACKBURN; KELLEMS, 2000; BAGATINI et al., 2011; BATTISTI et al., 2013).

Um dos métodos de isolamento de linfócitos periféricos mais utilizados consiste na separação por gradiente de densidade (BOYUM, 1968; BROSSERON; MARCUS; MAY, 2015). Nossos resultados demonstram que os linfócitos mantiveram uma alta viabilidade mesmo 20 horas após a separação, possibilitando o uso destas células em ensaios posteriores, sem a necessidade de quantificação enzimática imediata após o isolamento.

Rosemberg e colaboradores (2008) caracterizaram a E-ADA em cérebro de *zebrafish* e obtiveram linearidade na atividade enzimática nos tempos de 105 minutos para a fração solúvel da enzima, e 180 minutos para a fração de membrana. Já o conteúdo de proteína apresentou-se linear entre 5 e 20 µg, semelhante ao que foi identificado no presente estudo.

Koizumi e colaboradores (1985) realizaram a caracterização da E-ADA em células epidérmicas humanas normais e de carcinoma, observando um pH ótimo em torno de 7.0. Singh e Sharma (2000) caracterizaram esta enzima em intestino de camundongos e obtiveram perfil de estabilidade do pH entre 6.5 e 9.0. Já Lindley e Pisoni (1993) identificaram o pH ótimo entre 7.0 e 8.0, em lisossomos de fibroblastos humanos. Considera-se que os resultados obtidos neste estudo (faixa de pH entre 6.0 e 7.4) estão em conformidade com que tem sido descrito na literatura.

O K_m aparente da E-ADA com o substrato adenosina foi investigado em outros tecidos e células, normalmente apresentando-se com valores baixos na mesma faixa identificada neste estudo, como identificado: em células leucêmicas humanas - 57-58 µM (MORISAKI; FUJII; MIWA, 1985); em lisossomos de fibroblastos humanos - 37 µM (LINDLEY; PISONI, 1993); em intestino de camundongos - 23 µM (SINGH; SHARMA, 2000); em fígado humano e de galinha - 0.046 mM e 0.023 mM, respectivamente (IWAKI-EGAWA; WATANABE, 2002); em hemolinfa do molusco *Biomphalaria glabrata* - 734 µM (VALE et al., 2005); e na enzima em fração solúvel e fração de membrana de cérebro de peixe *zebrafish* - 0.22 e 0.19 mM, respectivamente (ROSEMBERG et al., 2008).

A concentração fisiológica de adenosina no plasma humano é de aproximadamente 0,1µM (GERMAN; KREDICH, 1984), o que sugere que a atividade da E-ADA em condições normais é quase nula. A adenosina no meio extracelular desempenha papel importante nos linfócitos devido às suas ações anti-inflamatórias (BURNSTOCK, 2006), e nas plaquetas por provocar inibição da ativação e agregação plaquetária (KOUPENOVA et al., 2017).

Por meio da citometria de fluxo, foi possível confirmar a presença indireta da E-ADA nos linfócitos do PBMC ao se utilizar o anticorpo anti-CD26 humano, visto que a associação da enzima com CD26 formando um dímero já foi descrita anteriormente na literatura (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005).

A atividade aumentada da E-ADA em temperaturas mais elevadas já foi descrita anteriormente, porém a temperatura de 37ºC é comumente usada nos ensaios enzimáticos devido ao risco de desnaturação proteica (ROSEMBERG et al., 2008). Vale e colaboradores (2005) observaram uma maior atividade da E-ADA com 37ºC e perda da atividade quando incubada a 50ºC. No entanto, Koizumi et al. (1985) relataram que, em células epidérmicas humanas normais e de carcinoma, uma isoforma maior da E-ADA se mostrou estável até 65ºC.

O zinco desempenha importante papel na desaminação da adenosina por estar localizado no sítio ativo da E-ADA, porém também demonstrou-se que o zinco e outros cátions divalentes podem interagir com outros resíduos de aminoácidos, provocando inibição competitiva da atividade enzimática. Sugere-se que o zinco possa interagir com resíduos de aminoácidos, localizados no sítio ativo ou próximos dele, formando uma ligação metálica semelhante à encontrada na estrutura do “dedo de zinco”, que ocuparia uma porção do sítio ativo e impediria a ligação completa com o substrato

(COOPER et al., 1997). O “dedo de zinco” compreende cerca de 30 resíduos de aminoácidos que formam uma alça alongada unida na base por um único zinco, coordenado a quatro destes resíduos (quatro cisteínas ou duas cisteínas e duas histidinas) (NELSON; COX, 2014).

Deste modo, assim como observado nos linfócitos neste estudo, o zinco reduziu significantemente a atividade da E-ADA em outras pesquisas, como em Rosemberg et al. (2008), e quando associado ao EDTA esta atividade foi restaurada. Sugere-se que esta prevenção do efeito inibitório do zinco se dê às propriedades quelantes do EDTA. A reversão do efeito inibitório do zinco pelo EDTA, na mesma concentração de 5 mM, não foi observada nas plaquetas. Contudo, já foi descrito previamente que a adição de EDTA saturado (ou seja, em concentrações mais elevadas que as condições do ensaio) restaura a inibição enzimática por metais (COOPER et al., 1997).

Iwaki-Egawa e Watanabe (2002) caracterizaram a E-ADA purificada de fígado humano e de galinha, e os resultados mostraram que a enzima possui preferência pela adenosina sobre a desoxiadenosina, apresentando o mesmo perfil dos resultados obtidos com os linfócitos no presente estudo. No entanto, Koizumi e colaboradores (1985) não observaram diferenças significativas na especificidade entre adenosina e 2’-desoxiadenosina pela E-ADA, como ocorreu com as amostras de plaquetas deste estudo, apresentando diferença significativa apenas quando comparada à guanosina.

Rosemberg e colaboradores (2008) identificaram que a fração solúvel da E-ADA utilizada apresentou preferência pela 2’-desoxiadenosina sobre a adenosina, enquanto que a fração de membrana apresentou preferência pela adenosina. Este dado corrobora com os resultados obtidos neste estudo, pois a enzima também encontra-se na membrana plasmática tanto nos linfócitos como nas plaquetas.

O composto EHNA possui características tanto do substrato adenosina quanto de outros inibidores não-nucleosídicos, ligando-se fortemente ao sítio ativo da enzima por várias ligações de hidrogênio e interações de *van der Waals* (KINOSHITA; TADA; NAKANISHI, 2008). Visto que o EHNA é descrito como inibidor específico da ADA1 (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005) e apresentou inibição significativa nos linfócitos e nas plaquetas, supõe-se que esta seja a isoforma predominante nestas células. Este inibidor na mesma concentração de 0,1 mM foi utilizado em outros estudos apresentando efeito apenas sobre a ADA1, como descrito por Iwaki-Egawa e Watanabe (2002).

7. CONCLUSÃO

- O PBMC rico em linfócitos apresentou viabilidade por longo tempo, com 88,4% de células com membrana íntegra após 20 horas;
- Com a citometria de fluxo foi possível determinar indiretamente a presença da E-ADA na superfície dos linfócitos, dos quais 53,8±6,8% foram marcados com o anticorpo anti-CD26;
- Nos linfócitos, a atividade enzimática da E-ADA foi linear de 15 a 120 minutos de incubação, com 2,5 a 12,5 µg de conteúdo de proteína e entre a faixa de pH 6.0 a 7.4. O K_m aparente e V_{max} foram 0.103 ± 0.051 mM e 0.025 ± 0.001 nmol de NH_3/min/mg de proteína, respectivamente;
- Nas plaquetas, a atividade enzimática da E-ADA foi linear de 15 a 105 minutos de incubação, com 7,5 a 20 µg de conteúdo de proteína e entre a faixa de pH 6.0 a 7.4. O K_m aparente foi 0,0017 ± 0,00045 mM e a V_{max} foi 0.004 ± 0.0001 nmol de NH_3/min/mg de proteína;
- O zinco (5 mM) exerceu inibição na atividade enzimática em ambas as células, porém o efeito preventivo do EDTA foi observado apenas nos linfócitos;
- A E-ADA nos linfócitos apresentou preferência pela adenosina como substrato em relação à 2'-desoxiadenosina e guanosina, enquanto que nas plaquetas observou-se preferência pela adenosina apenas quando comparada à guanosina;
- O EHNA inibiu significantemente a atividade da E-ADA (>90%) tanto em linfócitos como nas plaquetas, demonstrando a predominância da isoforma ADA1 nestas células.
- Espera-se que as características cinéticas descritas possam melhorar as condições para quantificação da atividade da E-ADA em linfócitos e plaquetas humanos em estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALDRICH, M. B.; BLACKBURN, M. R.; KELLEMS, R. E. The Importance of Adenosine Deaminase for Lymphocyte Development and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 272, p. 311–315, 2000.

AMBROGI, F. et al. Adenosine deaminase activity in human cord blood lymphocyte subpopulations. **Cellular imunology**, v. 73, p. 404-409, 1982.

ANWAR, J. et al. Caffeic acid treatment alters the extracellular adenine nucleotide hydrolysis in platelets and lymphocytes of adult rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 459–466, 2013.

ARAÚJO, M. C. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from breast cancer patients. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 421– 426, 2005.

ARNOLD, D. T. et al. Pleural Fluid Adenosine Deaminase (Pfada) in the Diagnosis of Tuberculous Effusions in a Low Incidence Population. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, 2015.

BAGATINI, M. D. et al. Enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in patients with ischemic heart disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 159–164, 2011.

BAKKER, W. W. et al. Platelets and ectonucleotidases. **Platelets**, v. 5, n. 3, p. 121-129, 1994.

BARTON, R. W.; GOLDSCHNEIDER, I. Nucleotide-metabolizing enzymes and lymphocyte differentiation. **Molecular & Celular Biochemistry**, v. 28, p. 135-147, 1979.

BATTISTI, V. et al. Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (E-NPP) and adenosine deaminase (ADA) activities in prostate cancer patients: Influence of Gleason score, treatment and bone metastasis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, p. 203–208, 2013.

BECKER, L. V. et al. Activities of enzymes that hydrolyze adenine nucleotides in platelets from patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Biochemistry**, v. 43, p. 1096–1100, 2010.

BONA, K. S. et al. *Syzygium cumini* Extract Decrease Adenosine Deaminase, 5'Nucleotidase Activities and Oxidative Damage in Platelets of Diabetic Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 26, p. 729-738, 2010.

BOURS, M. J. L. et al. Adenosine 5′-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358–404, 2006.

BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. Supplementum., v. 97, p. 77-89, 1968.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROSSERON, F.; MARCUS, K.; MAY, C. Isolating peripheral lymphocytes by density gradient centrifugation and magnetic cell sorting. **Methods in Molecular Biology**, v. 1295, p. 33-42, 2015.

BURNSTOCK, G. Purinergic receptors. **Journal of Theorical Biology**, v. 62, p. 491-503, 1976.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. S172–S181, 2006.

BURNSTOCK, G. Dual control of vascular tone and remodelling by ATP released from nerves and endothelial cells. **Pharmacological Reports**, v. 60, p. 12-20, 2008.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling: from discovery to current developments. **Experimental Physiology**, v. 99.1, p 16–34, 2014.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling and Endothelium. **Current Vascular Pharmacology**, v. 14, n. 2, 2016.

BURNSTOCK, G. Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 1-55, 2017.

BURNSTOCK, G.; BROWN, C. M. An introduction to purinergic receptors. In: BURNSTOCK, G. (Ed.). **Purinergic receptors.** London: Chapmam and Hall, 1981. Cap. 1.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X Receptors in Health and Disease. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 11.

BURNSTOCK, G. VERKHRATSKY, A. **Purinergic Signalling and the Nervous System**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012.

BYNOE, M. S. et al. Adenosine receptor signaling: a key to opening the blood–brain door. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 12, n. 20, 2015.

CARDOSO, A. M. et al. Exercise training prevents ecto-nucleotidases alterations in platelets of hypertensive rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 371, p. 147–156, 2012.

CASTILHOS, L. G. et al. Altered E-NTPDase/E-ADA activities and CD39 expression in platelets of sickle cell anemia patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 79, p. 241–246, 2016.

CHIBA, S. et al. High serum adenosine deaminase activity and its correlation with lymphocyte subsets in myasthenia gravis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 100, 1990.

CHIBA, S. et al. A correlation study between serum adenosine deaminase activities and peripheral lymphocyte subsets in Parkinson's disease. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 132, p. 170-173, 1995.

CHO, B. H. et al. Adenosine deaminase activity in cerebrospinal fluid and serum for the diagnosis of tuberculous meningitis. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 115, n. 9, p. 1831-1836, 2013.

COOPER, B. F. et al. The role of divalent cations in structure and function of murine adenosine deaminase. **Protein Science**, v. 6, n. 5, p. 1031-1037, 1997.

CORRIDEN, R.; INSEL, P. A. New insights regarding the regulation of chemotaxis by nucleotides, adenosine and their receptors. **Purinergic signaling**, v. 8, p. 587-598, 2012.

COUTINHO-SILVA, R.; OJCIUS, D. M. Role of extracellular nucleotides in the immune response against intracellular bacteria and protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 14, p. 1271–1277, 2012.

DEAGLIO, S.; ROBSON, S. C. Ectonucleotidases as Regulators of Purinergic Signaling in Thrombosis, Inflammation, and Immunity In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 10.

DONG, R. et al. Characterization of adenosine deaminase binding to human CD26 on T cells and its biologic role in immune response. **Journal of Immunology**, v. 156, n. 4, p. 1349-1355, 1996.

ERLINGE, D. P2Y Receptors in Health and Disease In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 13.

FERREIRA, M. et al. Evaluation of extracellular adenine nucleotides hydrolysis in platelets and biomarkers of oxidative stress in Down syndrome individuals. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 74, p. 200–205, 2015.

FREDHOLM, B. B.; JOHANSSON, S.; WANG, Y. Adenosine and the Regulation of Metabolism and Body Temperature. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 3.

FRANCO, R. et al. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. **Immunological Reviews**, v. 161, p. 27-42, 1998.

FUENTES, E. et al. Inhibition of Platelet Activation and Thrombus Formation by Adenosine and Inosine: Studies on Their Relative Contribution and Molecular Modeling. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

FUJII, J. Catalytic Proteins – Enzymes. In: BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Medical Biochemistry**. 4. ed. Saunders – Elsevier, 2014. Cap. 6.

GAKIS, C. et al. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects. A hypothesis on the significance of ADA2. **Panminerva Medica**, v. 31, n. 3, p. 107-113, 1989.

GALANTI, B. et al. Increased Lymphocyte Adenosine Deaminase in Typhoid Fever. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47-50, 1981.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Histologia essencial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. 342 p.

GERMAN, D. C.; KREDICH, N. M. A radioenzymatic assay for plasma adenosine. **Analytical Biochemistry**, v. 142, n. 2, p. 536-541, 1984.

GESSI, S. et al. Adenosine Receptors in Health and Disease. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 2.

GHADERI B. et al. Adenosine Deaminase Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia and Healthy Subjects. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 9, n. 3, 2016.

GINÉS, S. et al. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase–CD26 interaction. **Biochemical Journal**, v. 361, p. 203-209, 2002;

GIUSTI, G. Adenosine Deaminase. In: Bergmeyer, H. U., **Methods of Enzymatic Analysis**. 2nd Edition, Academic Press, New York, 1092-1099, 1974.

GIUSTI, G.; GAKIS, C. Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues. **Enzyme**, v. 12, p. 417-425, 1971.

GRACIA, E. et al. The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. **The FASEB Journal**, v. 27, 2013.

HALL, J. G. Adenosine deaminase activity in lymphoid cells during antibody production. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 41, p. 93–97, 1963.

HOVI, T. et al. Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation. **Clininal and experimental immunology**, v. 23, p. 395-403, 1976.

IWAKI-EGAWA, S.; WATANABE, Y. Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, n. 2, p. 173-182, 2002.

IYU, D. et al. Adenosine Derived From ADP Can Contribute to Inhibition of Platelet Aggregation in the Presence of a P2Y12 Antagonist. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, 2011.

JACOBSON, K. A. et al. Allosteric Modulation of Purine and Pyrimidine Receptors. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. p. 187-213.

JAQUES, J. A. S. et al. Effects of curcumin on the activities of the enzymes that hydrolyse adenine nucleotides in platelets from cigarette smoke-exposed rats. **Cell, Biochemistry & Function**, v. 29, p. 630-635, 2011.

JONZON, B.; NILSSON, J.; FREDHOLM, B. B. Adenosine Receptor-Mediated Changes in Cyclic AMP Production and DNA Synthesis in Cultured Arterial Smooth Muscle Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 124, p. 451-456, 1985.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nature Reviews – Immunology**, v. 11, n. 3, p. 201-212, 2011.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia básica**: texto e atlas. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KINOSHITA, T.; TADA, T.; NAKANISHI, I. Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 1, p. 53-57, 2008.

KOIZUMI, H. et al. Characterization of Adenosine Deaminase from Normal Human Epidermis and Squamous Cell Carcinoma of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 84, p. 199-202, 1985.

KOJIMA, O. et al. Alteration of Adenosine Deaminase Levels in Peripheral Blood Lymphocytes of Patients with Gastric Cancer. **Japanese Journal of Surgery**, v. 15, n. 2, p. 130-133, 1985.

KOUPENOVA, M. et al. Thrombosis and platelets: an update. **European Heart Journal**, v. 38, p. 785–791, 2017.

KUKULSKI, F.; LÉVESQUE, S. A.; SÉVIGNY, J. Impact of Ectoenzymes on P2 and P1 Receptor Signaling. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 9.

LANE, J. R.; JAAKOLA, V.; IJZERMAN, A. P. The Structure of the Adenosine Receptors: Implications for Drug Discovery. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. Cap. 1.

LEAL, C. A. et al. Platelet aggregation and serum adenosine deaminase (ADA) activity in pregnancy associated with diabetes, hypertension and HIV. **Cell, Biochemistry & Function**, v. 34, n. 5, p. 343-350, 2016.

LI, J. L.; ZARBOCK, A.; HIDALGO, A. Platelets as autonomous drones for hemostatic and immune surveillance. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 8, p. 2193–2204, 2017.

LINDEN, J. Regulation of Leukocyte Function by Adenosine Receptors. In: JACOBSON, K. A.; LINDEN, J. (Ed.) **Pharmacology of purine and pyrimidine receptors**. Elsevier Inc., 2011. p. 95-107.

LINDLEY, E. R.; PISONI, R. L. Demonstration of adenosine deaminase activity in human fibroblast lysosomes. **Biochemical Journal**, v. 290, p. 457-462, 1993.

LUNKES, G. I. et al. NTPDase and 5'-nucleotidase activities in rats with alloxan-induced diabetes. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 65, p. 1-6, 2004.

MARTINEZ-NAVIO, J. M. et al. Adenosine deaminase potentiates the generation of effector, memory, and regulatory CD4 T cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, p. 127–136, 2011.

MEIER, J; COLEMAN, M. S.; HUTTON, J. J. Adenosine deaminase activity in peripheral blood cells of patients with haematological malignancies. **British Journal of Cancer**, v. 33, p. 312–319, 1976.

MIDDLETON, E. A.; WEYRICH, A. S.; ZIMMERMAN, G. A. Platelets in pulmonar imune responses and inflammatory lung diseases. **Physiological Reviews**, v. 96, p. 1211–1259, 2016.

MORISAKI, T.; FUJII, H.; MIWA, S. Adenosine deaminase (ADA) in leukemia: Clinical value of plasma ADA activity and characterization of leukemic cell ADA. **American Journal of Hematology**, v. 19, p. 37-45, 1985.

NAKAMACHI, Y. et al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis & Rheumatology**, v. 48, n. 3, p. 668-674, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **NETTER: Histologia Essencial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 409–430, 2006.

ROSEMBERG, D. B. et al. Kinetic characterization of adenosine deaminase activity in zebrafish (Danio rerio) brain. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 151, n. 1, p. 96-101, 2008.

SÁNCHEZ, R. A. et al. Enzymatic activity of serum adenosine deaminase in different liver disorders. **Anales de Medicina Interna**, v. 6, n. 6, p. 300-304, 1989.

SEMPLE, J. W.; ITALIANO JR., J. E.; FREEDMAN, J. Platelets and the immune continuum. **Nature Review – Immunology**, v. 11, n. 4, p. 264-274, 2011.

SINGH, L.; SHARMA, R. Purification and characterization of intestinal adenosine deaminase from mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 204, p. 127–134, 2000.

SOUZA, V. C. et al. Purinergic system ecto-enzymes participate in the thromboregulation of patients with indeterminate form of Chagas disease. **Purinergic Signalling**, v. 8, n. 4, p. 753-762, 2012.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, New York, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.

VALE, M. R. I. et al. Characterization of adenosine deaminase (ADA) in hemolymph of Biomphalaria glabrata. **Brazilian Journal of Biology**, v. 65, n. 2, 2005.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**: a vida em nível molecular. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WEIHOFEN, W. A. et al. Crystal Structure of CD26/Dipeptidyl-peptidase IV in Complex with Adenosine Deaminase Reveals a Highly Amphiphilic Interface. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 41, p. 43330–43335, 2004.

WEINER, H. Enzimas: classificação, cinética e controle. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blucher, 2011. Cap. 10.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and techniques of practical biochemistry.** 5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2001.

WOSKI, S. A.; SCHMIDT, F. J. DNA e RNA: composição e estrutura. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blucher, 2011. Cap. 2.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673–694, 2008.

ZAVIALOV, A. V.; ENGSTRÖM, Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemical Journal**, v. 391, p. 51-57, 2005.

ZAVIALOV, A. V. et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 88, p. 279–290, 2010.

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL - UFMS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização da atividade da adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas humanos.

Pesquisador: Luciana Rocha Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89595518.3.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.690.707

Apresentação do Projeto:

Embora a caracterização da atividade enzimática da E-ADA em soro humano tenha sido proposta por Giusti (1974) e por Guisti e Gakis (1971), não há na literatura estudos apresentando a caracterização detalhada da atividade desta enzima em linfócitos e plaquetas isolados, apesar de vários dos trabalhos anteriormente citados quantificarem sua atividade nestas células específicas. Deste modo, evidenciou-se a necessidade de padronização das condições ótimas de tempo, temperatura e pH, além da influência do zinco e do inibidor desoxicoformicina, em linfócitos e plaquetas isolados de sangue periférico de humanos, na ausência de processos patológicos envolvidos.

*Método:

- Procedimento seleção participantes

A pesquisadora irá até os laboratórios de responsabilidade do InBio e convidará servidores e alunos vinculados aos mesmos para participar do estudo. Os servidores e alunos que aceitarem participar da pesquisa serão encaminhados a um espaço reservado (sala pertencente ao Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio na UFMS) para coleta do material biológico, na ausência de outros servidores ou discentes do laboratório, visando evitar qualquer constrangimento ou desconforto.

Será coletado amostra de sangue venoso periférico (aproximadamente 10mL de amostra), sendo que a pesquisadora garante que seu nome e identidade serão mantidos em sigilo.

Os critérios de inclusão:
- Adultos maiores de 18 anos de ambos os sexos, não portadores de doenças crônicas, e que não apresentem processo infeccioso ou inflamatório agudo em curso no momento da coleta sanguínea, vinculados aos laboratórios do InBio/UFMS (docentes, discentes e técnicos).
Os critérios de exclusão:
- Adultos maiores de 18 anos de ambos os sexos que sejam portadores de doenças crônicas (por exemplo, hipertensão arterial e diabetes mellitus) ou doenças autoimunes; menores de 18 anos de idade; fumantes; etilistas; e gestantes.

Coleta de material:
O material biológico (sangue venoso periférico - aproximadamente 10mL de amostra) será coletado pela pesquisadora Luciana Rocha Costa em um espaço reservado (sala pertencente ao Laboratório de Bioquímica Geral e de
Microrganismos do InBio na UFMS) para garantir maior privacidade ao participante. Nesta sala estarão disponíveis todos os materiais necessários para realização da coleta e descarte adequado de perfurocortantes, de acordo com as normas de biossegurança.
Para o procedimento de coleta de sangue, não é necessário que o participante esteja em jejum ou tenha algum tipo especial de preparação. Serão utilizados os seguintes materiais para o procedimento: seringa descartável de 20mL; álcool 70%; agulha descartável 25x7mm; luvas de procedimento; tubos de coleta EDTA e citrato (aproximadamente 5 mL serão transferidos para tubos contendo EDTA e 5 mL para tubos contendo citrato); garrote; e algodão.as amostras coletadas serão identificadas apenas com numeração.
O material biológico coletado será processado, armazenado e analisado no mesmo laboratório pela pesquisadora Luciana, e será descartado no próprio laboratório após as análises, seguindo as normas de biossegurança. O material e os dados obtidos servirão exclusivamente a finalidade prevista e conforme o consentimento do participante.

Procedimento de análise: Isolamento dos linfócitos periféricos e das plaquetas; Quantificação da atividade enzimática da E-ADA; Quantificação de proteína; Viabilidade celular.

Análise dos dados: Todas as variáveis serão testadas para normalidade de distribuição e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos in vitro serão analisados através do teste t de Student ou análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo test post hoc de Tukey ou pelos testes não-paramétricos equivalentes. Os resultados serão considerados significativos quando P 0,05.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Caracterizar a atividade da adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas humanos.

Objetivos específicos

*Analisar a viabilidade celular de linfócitos isolados de sangue periférico humano em um período de 24h;

*Padronizar as condições ótimas de tempo para a desaminação da adenosina e da desoxiadenosina nos linfócitos e nas plaquetas isoladas de sangue periférico humano;

*Determinar as propriedades bioquímicas da adenosina desaminase nos linfócitos e nas plaquetas isoladas de sangue periférico humano, tais como a temperatura ótima, o pH ótimo, e a influência do zinco, cálcio e magnésio, e do inibidor desoxicoformicina sobre a atividade enzimática;

*Determinar as constantes cinéticas, como a constante de Michaelis e Menten (Km) e a velocidade máxima (Vmax) para adenosina desaminase e seus substratos (adenosina e desoxiadenosina).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Esta pesquisa apresenta riscos mínimos para o participante, visto que toda e qualquer ação que exponha o participante da pesquisa pode gerar riscos. Pode haver constrangimento no momento da coleta sanguínea, desconforto com o procedimento (como mancha roxa ou dor leve no local da coleta) e ansiedade, como descrito no TCLE. Contudo, para prevenir qualquer desconforto e constrangimento, a coleta será realizada pela pesquisadora, que é enfermeira, com o cuidado necessário para preservar o participante. Caso alguma das situações citadas ocorra, a pesquisadora se compromete a prestar atendimento e suporte imediato.

Benefícios: Com esta caracterização da atividade da adenosina desaminase, estudos posteriores que visam a quantificação da atividade desta enzima em processos crônicos ou patológicos em seres humanos poderão seguir condições padronizadas, mais controladas e mais específicas para linfócitos e plaquetas isolados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Protocolo de pesquisa apresentado de maneira estruturada e com todos os elementos para apreciação ética.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Apresenta a autorização do local da pesquisa para a realização da mesma.
- Apresenta a autorização para o uso do laboratório no qual a pesquisa será realizada - coleta e analise dos dados.
- Apresenta a declaração de uso de material biológico.
- Apresenta o TCLE.
- Apresenta o orçamento detalhado do material que será utilizado.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências. Projeto apresentado contempla todas as questões éticas para sua realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1134019.pdf	12/05/2018 16:48:19		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2621023.pdf	12/05/2018 16:40:43	Luciana Rocha Costa	Aceito
Outros	CartaRespostaAoParecerConsubstanciadoDoCEP.pdf	12/05/2018 16:38:51	Luciana Rocha Costa	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaracaoUsoDeMaterialBiologico.pdf	12/05/2018 16:37:37	Luciana Rocha Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	12/05/2018 16:37:05	Luciana Rocha Costa	Aceito

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/05/2018 16:37:05	Luciana Rocha Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoUsoLaboratorio.pdf	12/05/2018 16:36:16	Luciana Rocha Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoInBioUFMS.pdf	12/05/2018 16:36:02	Luciana Rocha Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa.pdf	12/05/2018 16:35:29	Luciana Rocha Costa	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.pdf	12/05/2018 16:35:04	Luciana Rocha Costa	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

CAMPO GRANDE, 04 de Junho de 2018

Assinado por:
Geraldo Vicente Martins
(Coordenador)

ANEXO II - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa: Caracterização da atividade da adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas humanos. Este estudo está sendo conduzido pela pesquisadora Luciana Rocha Costa, no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte à pesquisadora responsável qualquer dúvida que você tiver.

O objetivo geral deste estudo compreende caracterizar a atividade da enzima adenosina desaminase em células sanguíneas (linfócitos e plaquetas) humanas. Com esta caracterização, estudos posteriores que visam a quantificação da atividade desta enzima em doenças em seres humanos poderão seguir condições padronizadas, mais controladas e mais específicas para as células estudadas. Os resultados da pesquisa serão apresentados como trabalho de conclusão do mestrado da pesquisadora pela UFMS e em revistas especializadas voltadas a comunidade científica.

Ao concordar em participar do estudo, será coletada uma amostra do seu sangue venoso periférico (aproximadamente 10mL), que será descartado no próprio laboratório após as análises, seguindo as normas de biossegurança. Além disso, a pesquisadora garante que seu nome e identidade serão mantidos em sigilo.

Para o procedimento de coleta de sangue, não é necessário que você esteja em jejum ou tenha algum tipo especial de preparação. Serão utilizados os seguintes materiais para o procedimento: seringa descartável de 20mL; álcool 70%; agulha descartável 25x7mm; luvas de procedimento; tubos de coleta EDTA e citrato (aproximadamente 5 mL serão transferidos para tubos contendo EDTA e 5 mL para tubos contendo citrato); garrote; e algodão.

No procedimento de coleta de sangue, a pesquisadora irá te instruir a respeito do procedimento, preparar o ambiente e os materiais a serem utilizados, e lavar as mãos. Após, a pesquisadora solicitará que você sente-se e apoie o braço sobre a mesa, de modo a mantê-lo confortável e facilitar a visualização das veias. Em seguida, a pesquisadora irá calçar as luvas, palpar e selecionar a veia a ser puncionada no antebraço, prender o garrote aproximadamente 5 cm acima do local da punção e pedir que você feche a mão. Será realizada então a antissepsia

da área com algodão embebido em álcool 70% no sentido do retorno venoso. A pesquisadora irá puncionar a veia segurando a agulha horizontalmente com a mão dominante e introduzindo a agulha com o bisel voltado para cima, mantendo um ângulo de aproximadamente 15º. Em seguida, a seringa será aspirada e, após a coleta da quantidade necessária de sangue, será solicitado que você abra a mão. O garrote será então desprendido e a agulha será removida suavemente, um algodão será colocado sobre o local da punção com leve pressão, a agulha será desconectada da seringa, e a amostra de sangue será colocada nos tubos, escorrendo pela parede dos mesmos, e agitando-os levemente. Logo após, a pesquisadora observará a hemostasia no local da punção, irá descartar seringa e agulha no descarte de material perfurocortantes, deixará o ambiente organizado e limpo, perguntará como você se sente, irá retirar as luvas e lavará as mãos.

A pesquisadora assegura sua confidencialidade e a privacidade. Deste modo, as amostras coletadas serão identificadas apenas com numeração. O material e os dados obtidos servirão exclusivamente a finalidade prevista e conforme seu consentimento. Os procedimentos e métodos utilizados incluirão separação de células do sangue coletado, análises enzimáticas seguindo as condições descritas por protocolos específicos, e análises estatísticas.

Esta pesquisa apresenta riscos mínimos para você, visto que toda e qualquer ação que o exponha pode gerar riscos. Pode haver constrangimento no momento da coleta sanguínea, desconforto com o procedimento (como mancha roxa ou dor leve no local da coleta) e ansiedade. Contudo, para prevenir qualquer desconforto e constrangimento, a coleta será realizada pela pesquisadora, que é enfermeira, com o cuidado necessário para preservar o participante. Caso alguma das situações citadas ocorra, a pesquisadora se compromete a prestar atendimento e suporte imediato.

Além disso, você poderá deixar a pesquisa a qualquer momento. A pesquisadora assegura ainda sua garantia de ressarcimento mediante a gastos não previstos e de indenização mediante a danos não previstos.

Você deve estar ciente de que não receberá compensação financeira pela participação. Em caso de dúvidas referentes ao estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora no telefone (67) 3345-3537 ou pelo email: lucianarocha_14@hotmail.com. E para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345-7187 ou no email cepconep.propp@ufms.br.

Assinatura do(a) participante da pesquisa

Assinatura da pesquisadora responsável

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento (em qualquer fase da pesquisa), lembrando que sua recusa em participar do estudo não trará qualquer tipo de penalização ou de represália.

Você receberá uma via assinada deste termo de consentimento.

Declaro que li e entendi este termo de consentimento, e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas, e que aceito participar deste estudo.

Campo Grande/MS, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante da pesquisa	Assinatura da pesquisadora responsável

ANEXO III - Declaração de Uso de Material Biológico e Dados Coletados

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS/CEP

DECLARAÇÃO DE USO DE MATERIAL BIOLÓGICO E DADOS COLETADOS

Declaramos, para os devidos fins, que o material biológico (sangue venoso periférico), os dados e as informações coletadas serão usados exclusivamente para os fins previstos no protocolo intitulado: "Caracterização da atividade da adenosina desaminase em linfócitos e plaquetas humanos" Destinação final: Este material será processado, armazenado, analisado e descartado no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos do InBio da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Campo Grande, 11 de maio de 2018.

Luciana Rocha Costa

Luciana Rocha Costa
Pesquisadora responsável