

ANÁLISE DA UTILIZAÇÃO DOS EXAMES DE ADA REALIZADOS, NO ESTADO DO CEARÁ, NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2005 A SETEMBRO DE 2009

ÍTALO JOSÉ MESQUITA CAVALCANTE
NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR
MARCUS RAIMUNDO VALE

Farmacêuticos-bioquímicos, Laboratório de Farmacologia-Bioquímica, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará. Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo, 60430-270, Fortaleza, CE.

Autor responsável: M.R.Vale. E-mail: mvale@ufc.br

INTRODUÇÃO

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

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

A adenosina desaminase (adenosina aminohidrolase; ADA; E.C. 3.5.4.4), é uma enzima amplamente distribuída nos tecidos animais e em microorganismos. A ADA em humanos é expressa por duas isoenzimas presentes em três isoformas: ADA1, ADA1-CD26 e ADA2. (UNGERER et al, 1992; WEYDEN & KELLEY, 1976).

A ADA1 é uma proteína monomérica com massa molecular de aproximadamente 36 kDa, codificada no cromossomo 20, na região da banda 20q13.11 (PETERSEN et al, 1987; PHILLIP et al, 1980; UNGERER et al, 1992), que se apresenta na forma livre ou ligada ao CD26, sendo amplamente distribuída nos tecidos.

A ADA2 é uma isoenzima que coexiste com a ADA1 apenas em monócitos e macrófagos, com massa molecular de aproximadamente 100 kDa, codificada por um gene diferente (GAKIS, 1996; UNGERER et al, 1992; WEYDEN

& KELLEY, 1976). A ADA2 é uma ferramenta importante para o diagnóstico de doenças inflamatórias e infecciosas como tuberculose, febre tifóide, hepatite viral e AIDS (GAKIS et al, 1989).

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

Desde 1978, a atividade da ADA vem sendo mostrada estar aumentada nos exsudatos pleurais tuberculosos e a detecção de sua atividade tem sido usada no diagnóstico de tuberculose pleural, apresentando uma sensibilidade de 99% e especificidade de 93%. Altos níveis de atividade de ADA, também podem ser encontrados em líquido pleural decorrentes de outros processos ou lesões, especialmente pneumonia, empiema, linfoma, neoplasia e lúpus eritematoso sistêmico (VALDÉS et al, 1996).

A confirmação da tuberculose peritoneal é difícil e demorada devido à necessidade da confirmação histológica dos granulomas caseosos ou pela confirmação bacteriológica através da coloração de Ziehl-Nielsen (coloração de BAAR) ou cultura. Levando em conta que o resultado da cultura demora pelo menos 4 semanas e a coloração de BARR apresenta uma baixa sensibilidade, a confirmação necessita ser feita, frequentemente, por meio de procedimentos invasivos, como a laparoscopia (INADOMI et al, 2001). O início do tratamento empírico associado a uma atividade de ADA elevada no líquido peritoneal tem apre-

sentado bons resultados enquanto o paciente aguarda o resultado dos exames de cultura ou biopsia (RIQUELME et al, 2006).

A determinação dos níveis de ADA no líquido pericárdico é bastante útil para o diagnóstico diferencial de efusão pericárdica de várias origens, apresentando um valor de "cut off" de 40 U/L para o diagnóstico de pericardite tuberculosa, com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 97% (KOH et al, 1994).

Os laboratórios clínicos realizam, atualmente, apenas a determinação da atividade de ADA total (ADA1+ADA2). O método de Guisti (1974) é um método que determina a atividade da ADA através da reação entre a enzima presente no espécime biológico a ser analisado e a adenosina (principal substrato da enzima). Este método baseia-se na quantidade de amônia estequiometricamente liberada na reação, sendo esses níveis medidos através da reação de Berthelot (1859). O método de Guisti (1974) é o método mais aceito e mais utilizado no Brasil (BRASIL, 2002).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise descritiva retrospectiva do perfil de atividade de ADA nas dosagens realizadas em fluidos biológicos de pacientes com suspeita de tuberculose extra-pulmonar no estado do Ceará no período de janeiro de 2005 a setembro de 2009

MATERIAL E MÉTODOS

O laboratório de farmacologia-bioquímica vem realizando a dosagem de ADA para laboratórios clínicos da rede particular de assistência à saúde, para o Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC/UFC) e para a Santa Casa de Misericórdia de Sobral, atendendo a pacientes provenientes de todas as regiões do Estado do Ceará.

Estudo

Foi realizado um estudo do tipo transversal retrospectivo, utilizando os dados armazenados no banco de dados do laboratório de Farmacologia-Bioquímica (UFC).

Coleta de dados

Os dados foram agrupados de acordo com o tipo de fluido corporal (líquidos ascítico, pericárdico, pleural, líquido, soro e outros – líquido sinovial, lavado brônquico e urina), sexo dos pacientes e resultados da atividade da ADA. Os dados foram processados utilizando o *software* Microsoft Excel 2007, e os dados foram analisados utilizando os *softwares* GraphPad Prism versão 5.00 e SPSS versão 17.0.

Crítérios de exclusão

Foram excluídos da análise os exames que apresentaram ausência de algum dado (sexo do paciente, tipo de fluido corporal e/ou valor da atividade enzimática).

Os dados referentes às características clínicas, nosológicas, idade e diagnóstico final foram omitidos do estudo em decorrência da ausência destas informações em uma parcela significativa das amostras.

Análise dos dados

A atividade enzimática foi classificada em *normal* ou *alterada* de acordo com o valor de corte (*cut off*) presente literatura, conforme listado na tabela 1.

Tabela 1. Valores de corte para a enzima adenosina desaminase nos fluidos corpóreos humanos.

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

Os resultados foram expressos como medida simples, para a quantificação das amostras, como medida percentual para a caracterização das amostras, ou como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), para avaliação da atividade da ADA. Para comparação dos dados paramétricos foi utilizado o teste "t" não pareado (comparando sexo masculino com feminino ou atividade normal com alterada). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Comitê de ética

Este projeto obedeceu aos princípios éticos presentes na resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) 196/96 e foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará (COMEPE) sob o protocolo COMEPE/UFC nº 173/08.

RESULTADOS

No período de janeiro de 2005 a setembro de 2009, foram realizadas 2.300 dosagens de ADA em diversos fluidos corpóreos, sendo excluídas das análises 109 amostras conforme os critérios de exclusão, totalizando 2.191 amostras analisadas.

O líquido pleural é o fluido corporal mais frequentemente analisado em relação à dosagem de ADA, representando um total de 48,1% das análises, seguido pelos líquidos ascítico (26,5%), líquido (19,6%), pericárdico (2,1%) e soro (1,8%), conforme observado na figura 1.

No período analisado, houve uma leve predominância de amostras de indivíduos do sexo masculino nos líquidos ascítico, pleural, líquido e em “outros” fluidos (figura 2), sendo possível observar uma grande quantidade

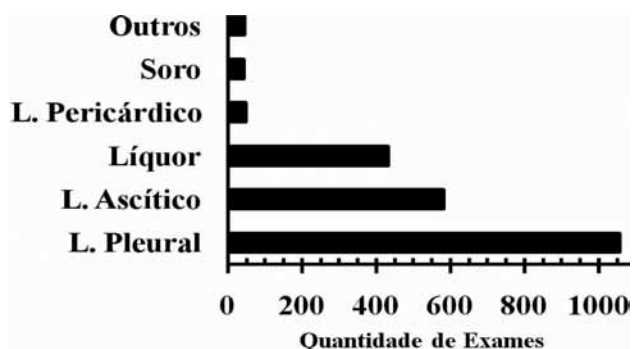


Figura 1. Dosagens de ADA realizadas: Os resultados expressam a quantidade total de dosagens de ADA realizadas distribuídas em função do tipo de fluido corporal.

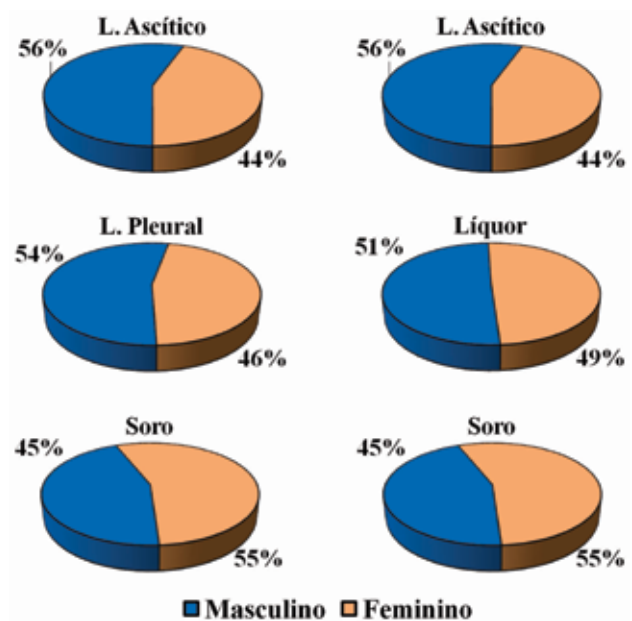


Figura 2. Líquidos corporais analisados.

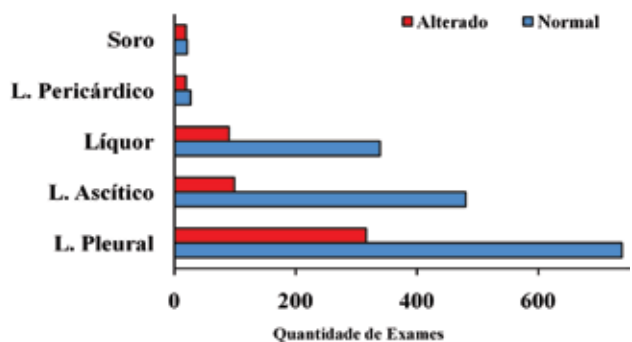


Figura 3. Quantidade de amostras analisadas em função da atividade normal x alterada.

de amostras que apresentavam uma atividade de ADA dentro dos valores considerados normais (figura 3).

Os resultados da figura 3 expressam a quantidade total de fluidos corporais analisados, distribuídos em função da atividade enzimática da ADA (normal x alterada), utilizando os valores de *cut off* presentes na literatura.

Quando comparamos a atividade enzimática da ADA nos fluidos biológicos analisados, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa entre as atividades normais (figura 4A) ou alteradas (figura 4B) quando comparamos entre o sexo masculino e feminino. Observamos que os fluidos corporais analisados apresentam uma atividade normal estatisticamente diferente da atividade alterada (figura 4C). Não foi realizada análise estatística comparando os diferentes fluidos corporais entre si devido os mesmos apresentarem diferentes valores de *cut off*, o que implica uma diferença entre suas atividades.

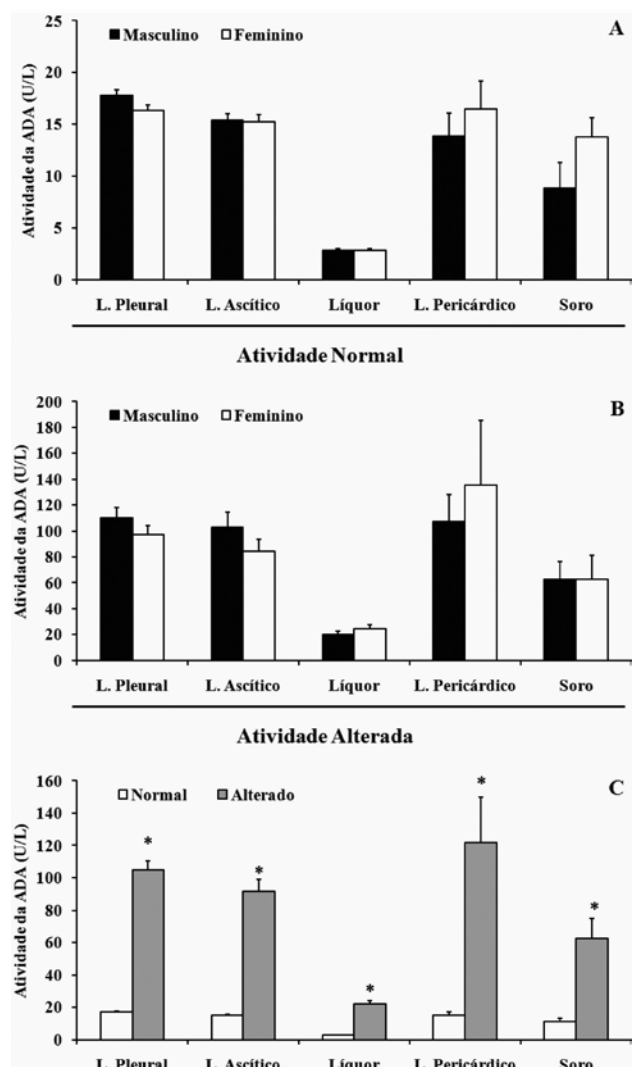


Figura 4. Atividade de ADA normal x alterada em função do fluido corporal. (A) Atividade de ADA normal x sexo. (B) Atividade de ADA alterada x sexo. (C) Atividade de ADA normal x alterada. * $p < 0,001$ vs normal (Teste “t” não pareado).

Os resultados expressam a média \pm E.P.M da atividade enzimática da ADA normal e alterada nos fluidos biológicos.

As atividades normais dos líquidos pleural, ascítico, pericárdico, líquido e soro, apresentaram, respectivamente, uma média de 2,3; 2,6; 2,6; 3,2 e 2,2 vezes menor que seu valor de *cut off*, bem como as respectivas atividades alteradas apresentaram uma média de 2,6; 2,3; 3; 2,5 e 2,5 vezes maior que o valor definido para o *cut off*.

DISCUSSÃO

A dosagem de ADA é um importante exame bioquímico que pode ser realizado para auxiliar no diagnóstico de tuberculose extrapulmonar. No estado do Ceará, no período de 2005 a 2008 (4 anos), foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) 1.527 casos de tuberculose extrapulmonar, correspondendo a uma média anual de 381,75 casos. No período de janeiro de 2005 a setembro de 2009 (4,75 anos), foram realizados 2.300 dosagens de ADA em diversos fluidos biológicos, correspondendo a uma média anual de 484,21 dosagens.

A principal dificuldade na realização destas análises residiu na omissão de informações, numa parcela significativa das amostras, sobre suas características, como dados clínicos, nosológicos, idade e diagnóstico final.

Considerando os valores normais e alterados, observa-se uma razão de aproximadamente 1 caso de tuberculose extrapulmonar notificado para cada 1,27 exame realizado. Essa quantidade de exames realizados ainda é muito baixa, considerando a importância do resultado da dosagem de ADA como um parâmetro complementar ao diagnóstico, aliado ao baixo custo e rápida execução. Essa baixa taxa de solicitação do exame de ADA pode, em parte, ser explicada pelo diminuto conhecimento do valor diagnóstico deste exame por parte de profissionais da saúde.

A maior quantidade de exames de ADA realizados no líquido pleural e a maior quantidade de exames realizados em amostras de pacientes do sexo masculino, pode estar relacionado à pleura ser a principal localização da tuberculose extrapulmonar (LOPES et al, 2006), bem como haver uma maior prevalência da doença em pacientes do sexo masculino (SEISCENTO et al, 2009).

Observamos que a média da atividade normal difere bastante da média da atividade alterada, o que facilita a correta diferenciação do estado normal-alterado das amostras quando fora da região de zona cinzenta, e ambas médias encontram-se distantes dos valores de *cut off*.

O sexo do paciente parece não apresentar influência na atividade da ADA, achado compatível com os encontrados na literatura (MORISSON & NEVES, 2008; SILVA JÚNIOR et al, 2006).

CONCLUSÕES

A determinação da atividade da ADA pode auxiliar no diagnóstico de tuberculose extrapulmonar, sendo um exame de fácil execução e baixo custo. Entretanto, observamos sua pouca utilização como ferramenta clínica. A partir dos dados coletados, podemos observar uma maior solicitação de exames nas amostras de líquido pleural e em pacientes do sexo masculino, bem como observamos que a média das atividades normais e alteradas diferem bastante dos valores determinados de *cut of* para cada fluido. Não foi possível constatar diferença estatística das atividades nos fluidos quando avaliado em função do sexo.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e a Patrícia Sãmara de Sousa pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTHELOT, M. *Répertoire chimie puré appliquée*, v. 1, p. 284, 1859.
- BOUMA, M. G.; VAN DEN WILDENBERG; F. A. J. M.; BUURMAN, W. A. Adenosine inhibits cytokine release and expression of adhesion molecules by activated human endothelial cells. *J. Physiol.*, v.270, p.522-529, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. In: _____. *Guia de vigilância epidemiológica: Influenza/variola*. 5. ed. Brasília, DF, 2002. v. 2, p. 824-846.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação: SINAN. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet /tuberculose/ bases/tubercbrnet.def>>. Acesso em: 5 out. 2009.
- CASTELO FILHO, A.; KRITSKI, A.L.; BARRETO, A.W.; LEMOS, A.C.M.; et al. II Consenso Brasileiro de Tuberculose – Diretrizes Brasileiras para Tuberculose 2004. *J. Bras. Pneumol.*, v. 30, p. s2 – s56, 2004.
- CRONSTEIN, N. B.; LEVIN, R. I.; BELANOFF, J.; WEISSMANN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, v.78, p.760-770, 1986.
- CRONSTEIN, N. B.; ROSENSTEIN, E. D.; KRAMER, B.; WEISSMAN, G.; HIRSCHHORN, R. Adenosine physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils. *J. Immunol.*, v. 135, p. 1366-1371, 1985.
- FERES, M.C.; MARTINO, M.C.; MALDIJIAN, S.; BATISTA, F.; et al. Laboratory validation of an automated assay for the determination of adenosine deaminase activity in pleural fluid and cerebrospinal fluid. *J. Bras. Pneumol.*, v. 34, p.1033-1039, 2008.

- FISCHER, D.; VAN DER WEYDEN, M.; SNYDERMAN, R.; KELLEY, W. N. A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. *J. Clin. Invest.*, v. 58, p. 399-407, 1976.
- GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. *Eur. Respir. J.*, v.9, p. 632-633, 1996.
- GAKIS, C.; CALIA, G.; NAITANA, A.; PIRINO, D; SERRU, G. Serum adenosine deaminase activity in HIV positive subjects- A hypothesis on the significance of ADA2. *Panminerva Med.*, v. 31, p. 107-113, 1989.
- GIUSTI, G. Adenosine deaminase. In:_____. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 1974.
- GREVER, M. R.; SIAW, M. F. E.; COLEMAN, M. S.; WHISLER, R. L.; BARCERZAC, S. P. Inhibition of K and NK lymphocyte cytotoxicity by an inhibitor of adenosine deaminase and deoxy-adenosine. *J. Immunol.*, v. 129, p. 365-369, 1982.
- HASKO, G.; CRONSTEIN, B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.*, v. 25, p. 33-39, 2004.
- INADOMI, J.M.; KAPUR, S.; KINKHABWALA, M. The laparoscopic evaluation of ascites. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, v. 11, p. 79-91, 2001.
- KOH, K.K.; KIM, E.J.; CHO, C.H.; CHOI, M.J.; et al. Adenosine deaminase and carcinoembryonic antigen in pericardial effusion diagnosis, especially in suspected tuberculous pericarditis *Circulation*, v. 89, p. 2728-2735, 1994.
- KRUMP, E.; LEMAY, G.; BORGEAT, P. Adenosine A2 receptor-induced inhibition of leukotriene B4 synthesis in whole blood ex-vivo. *J. Pharmacol.*, v. 117, p. 1639-1644, 1996.
- LAMSAL, M.; GAUTAM, N.; BHATTA, N.; MAJHI, S.; et al. Diagnostic utility of adenosine deaminase (ADA) activity in pleural fluid and serum of tuberculous and non-tuberculous respiratory disease patients. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, v. 38, p. 363-369, 2007.
- LOPES, A.J.; CAPONE, D.; MOGAMI, R.; TESSAROLLO, B.; et al. Tuberculosis extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. *Pulmão RJ*, v. 15, p.253-261, 2006.
- MARONE, G.; FINDLEY, S. R.; LICHTENSTEIN, L. M. Adenosine receptor of human basophiles: modulation of histamine release. *J. Immunol.*, v. 123, p.1473, 1979.
- MORISSON, P.; NEVES, D.D. Avaliação da adenosina desaminase no diagnóstico da tuberculose pleural: uma metanálise brasileira. *J. Bras. Pneumol.*, v. 34, p. 217-224, 2008.
- PETERSEN, M.B.; TRANEBJAERG, L.; TOMMERUP, N.; NYGAARD, P.; EDWARDS, H. New assignment of the adenosine deaminase gene locus to chromosome 20q13.11 by study of a patient with interstitial deletion 20q. *J. Med. Genet.*, v. 24, p. 93-96, 1987.
- PHILLIP, T.; FRAISSE, J.; HAMET, N.; LAURAS, B.; et al. Regional assignment of the ADA locus 20q13.2 qtr by gene dosage studies. *Cytogenet Cell Genet.*, v. 27, p. 187-189, 1980.
- RIQUELME, A.; CALVO, M.; SALECH, F.; VALDERRAMA, S.; et al. Value of Adenosine Deaminase (ADA) in Ascitic Fluid for the Diagnosis of Tuberculous Peritonitis – A Meta-analysis. *J. Clin. Gastroenterol.*, v. 40, p. 705-710, 2006.
- RODEN, D.M. Fármacos Antiarrítmicos. In: GILMAN, A.G.; HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2005. p. 703-729.
- RODWELL, V. W. Estrutura, função e replicação das macromoléculas informacionais. In: MURRAY, R. K.; GRANNER, D.K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. *Harper: bioquímica*. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- SEISCENTO, M.; VARGAS, F.S.; RUJULA, M.J.P.; BOMBARDA, S.; et al. Aspectos epidemiológicos da tuberculose pleural no estado de São Paulo (1998-2005). *J. Bras. Pneumol.*, v. 35, p. 548-554, 2009.
- SILVA JUNIOR, C.T.; CARDOSO, G.P.; SILVA, C.S.; ARAUJO, E.G. Influência do sexo dos doentes sobre a atividade da adenosina desaminase na tuberculose pleural. *Pulmão RJ*, v. 15, p. 157-160, 2006.
- TUON, F.F.; SILVA, V.I.; ALMEIDA, G.M.D.; ANTONANGELO, L. HO, Y.L. The usefulness of adenosine deaminase in the diagnosis of tuberculous pericarditis. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.*, v. 49, p. 165-170, 2007.
- UNGERER, J.P.J.; OOSTHUIZEN, H.M.; BISSBORT, S.H.; VERMAAK, W.J.H. Serum Adenosine Deaminase: Isoenzymes and Diagnostic Application. *Clinicalchemistry*, v. 38, p.1322-1326, 1992.
- VALDÉS, L.; JOSÉ, E.S.; ALVAREZ, D.; VALLE, J.M. Adenosine deaminase (ADA) isoenzyme analysis in pleural effusions: diagnostic role, and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur. Respir. J.*, v. 9, p.747-751, 1996.
- WEYDEN, M. B.; KELLEY, W. N. Human adenosine deaminase. Distribution and properties. *J. Biol. Chem.*, v. 251, p. 5448-5456, 1976.