

INTRODUÇÃO

Trichomonas vaginalis é o protozoário flagelado causador da tricomonose, a doença sexualmente transmissível não-viral mais comum no mundo¹ relacionada ao aumento da susceptibilidade ao HIV², predisposição ao câncer cervical³ e é causa de complicações durante gestação e parto⁴. Considerando o impacto da tricomonose na saúde pública e a complexidade da interação parasito-hospedeiro, é importante investigar os aspectos bioquímicos de *T. vaginalis*.

A nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 que hidrolisa ATP e ADP extracelular, e a ecto-5'-nucleotidase que hidrolisa AMP, já foram caracterizadas em *T. vaginalis*^{5,6}. Uma vez que células em situações fisiológicas ou de estresse podem liberar nucleotídeos e/ou nucleosídeos no espaço extracelular, essas enzimas podem estar envolvidas em uma possível sinalização purinérgica na tricomonose.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a atividade da adenosina deaminase (ADA), a qual participa do metabolismo de purinas deaminando adenosina a inosina⁷, em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) O isolado clínico TVVP60 e o isolado ATCC 30238 de *T. vaginalis* foram cultivados em meio Trypticase- Extrato de levedo- Maltose (TYM) pH 6,0 (Diamond, 1957) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino inativado, a 37 °C. **2)** Os parasitos foram lavados com tampão fosfato acrescido de EDTA e EGTA. **3)** A quantificação protéica total foi realizada (Bradford, 1976)⁸. **4)** Uma alíquota da suspensão de parasitos intactos foi incubada no meio reacional contendo 50mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,5) de modo a garantir a concentração de proteína desejada. **5)** A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato (3,0 mM), e interrompida pela adição dos testes em solução de fenol-nitroprussiato de sódio. **6)** A viabilidade dos trofozoítos foi avaliada por motilidade e exclusão com Trypan Blue. **7)** A correção da deaminação não-enzimática do substrato foi realizada por adição de trofozoítos intactos após a interrupção da reação. **8)** A quantificação de amônia foi realizada (Giusti, 1974)⁹. **9)** A atividade da ADA foi avaliada na presença do inibidor EHNA, dos cátions Ca²⁺ e Mg²⁺ e do inibidor da ecto-5'-nucleotidase, AMPCP. **10)** A expressão de genes relacionados à ADA *ada(125)* e *ada(231)* foi realizada por uma RT-PCR semi-quantitativa. **11)** As seqüências de proteína de ADA obtidas da função BLASTP via GenBank foram alinhadas com o programa ClustalX e a árvore filogenética foi desenhada com o programa MEGA 4.0 usando o método estatístico de Neighbor-Joining com distância proporcional (*p*). **12)** As análises estatísticas foram conduzidas por teste de t Student ou ANOVA com *P* < 0,05.

CONCLUSÕES

- Considerando a viabilidade dos trofozoítos e a atividade enzimática apresentada, os resultados apontam para uma ecto-ADA, localizada na superfície dos parasitos.
- Possivelmente trata-se da isoenzima ADA 1 visto que a na presença de EHNA, inibidor potente da isoenzima ADA 1, a atividade decresce significativamente.
- A inibição da atividade da ADA na presença de AMPCP sugere fortemente uma associação em cascata da ecto-5'-nucleotidase com a ADA.
- Duas sequencias de genes relacionadas à ADA foram expressas nos trofozoítos
- A árvore filogenética mostrou quatro clados terminais bem resolvidos confirmando a presença de dois ortólogos de ADA em *T. vaginalis* no segundo clado, com outras espécies de protozoário.
- A ocorrência de uma ecto-ADA em *T. vaginalis* pode representar importantes implicações no sistema purinérgico na resposta imune à tricomonose regulando os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos.

RESULTADOS

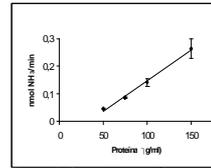


Figura 1. Curva de proteína para a atividade de ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. A concentração de proteína escolhida para ensaios subsequentes foi a de 100 µg/mL.

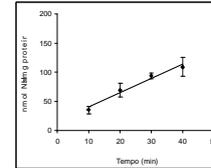


Figura 2. Curva de tempo para a atividade de ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. O tempo escolhido para ensaios subsequentes foi de 20 minutos.

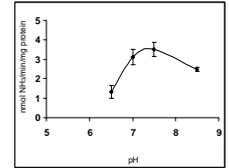


Figura 3. Curva de pH para a atividade de ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. O pH dos ensaios subsequentes foi de 7,5.

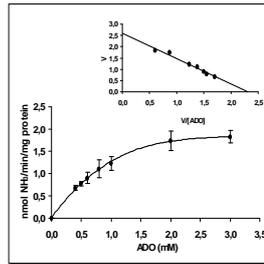


Figura 4. Curva do substrato adenosina para a atividade de ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis*.

$$V_{\max} = 2,61 \pm 0,054 \text{ nmol NH}_3/\text{min/mg proteína}$$

$$K_M = 1,13 \pm 0,07 \text{ mM}$$

Tabela 1. Especificidade a substratos da ADA de *T. vaginalis*.

Substrato (3,0 mM)	Atividade da ADA (nmol NH ₃ /min/mg proteína)
2-deóxi-adenosina	2,9 ± 0,5
Adenosina	1,9 ± 0,6
Guanosina	Zero
2-deóxi-guanosina	Zero

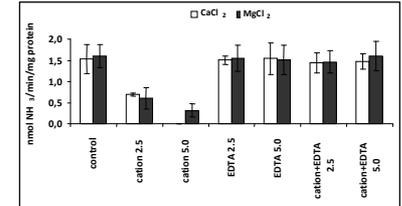


Figura 5. Efeito de cátions sobre a atividade de ADA de trofozoítos intactos de *T. vaginalis*. Dados representam média ± desvio padrão de, pelo menos, quatro experimentos. CaCl₂, MgCl₂ and EDTA foram usados a 2.5 e 5.0mM.

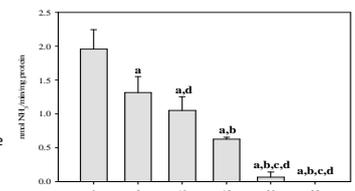


Figura 6. Atividade da ADA em trofozoítos intactos de *T. vaginalis* na presença do inibidor EHNA. Estatística: análise de variância de uma via (ANOVA one-way) seguido de teste Tukey. Diferenças significativas: ^a com o controle; ^b com 5mM; ^c com 10mM; ^d com 15mM (*P*<0,05).

Tabela 2. Inibição da ecto-5'-nucleotidase por AMPCP e determinação da atividade da ADA de trofozoítos intactos de *T. vaginalis*.

Atividade da ADA (nmol NH ₃ /min/mg proteína)	Inibição da atividade da ADA (%)	
	Controle	AMCP
ATCC 30238	0,63 ± 0,1	zero
TV-VP60	1,3 ± 0,53	zero

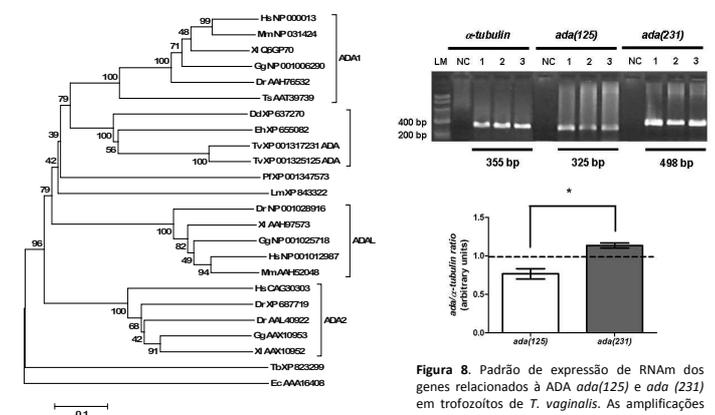


Figura 7. Árvore filogenética de membros da família da ADA. O grupo filogenético foi constituído por (Tv) *T. vaginalis*, (Hs) *Homo sapiens*, (Mm) *Mus musculus*, (Gg) *Gallus gallus*, (Xi) *Xenopus laevis*, (Dr) *Danio rerio*, (Dd) *Dicyostelium discoideum*, (Eh) *Entamoeba histolytica*, (Lm) *Leishmania major*, (Pf) *Plasmodium falciparum*, (Ts) *Trichinella spiralis*, (Tb) *Trypanosoma brucei*, seqüências ortólogas de ADA1, ADAL and ADA2.

Figura 8. Padrão de expressão de RNAm dos genes relacionados à ADA *ada(125)* e *ada(231)* em trofozoítos de *T. vaginalis*. As amplificações resultaram em produto único. Os resultados foram expressos em densitometria óptica (O.D.) dos genes relacionados à ADA versus a expressão de α-tubulina.

Referências bibliográficas

1. WHO - World Health Organization. Overview and Estimates, Geneva, Switzerland, 2001.
2. Sorvillo L. et al. Emerg Infect Dis. 7: 927-32, 2001.
3. Viikki et al. Acta Obstet Gynecol Scand. 79: 576-9, 2000.
4. Sutcliffe S. et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 15: 939-45, 2006.
5. Matos JA. et al. Int. J. Parasitol. 31: 770-775, 2001.
6. Tasca T. et al. Parasitology. 131: 71-78, 2005.
7. Franco R. et al. Prog. Neurobiol. 52: 283-294, 1997.
8. Bradford M.M. Anal. Biochem. 72: 218-254, 1976.
9. Vale M.R., et al. Braz. J. Biol. 65: 371-376, 2005.