

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA

**Purificação e caracterização dos efeitos biológicos da urease
recombinante de *Helicobacter pylori***

Fabio Rafael Wasem Lopes

Trabalho apresentado como um
dos requisitos para a obtenção
do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas – Ênfase
Molecular, Celular e Funcional.

Orientadora: Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientadores: Farmacêutico German Enrique Wassermann
Dr. Deiber Olivera Severo

Porto Alegre, novembro de 2006

BIO
BIO
389

UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica e no Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul da UFRGS e financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e (CNPq), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dra. Célia Carlini, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Proteínas Tóxicas e pela excelente orientação que me deu.

Durante o período em que estive envolvido nas atividades do laboratório, tive o privilégio de conhecer as pessoas muito especiais que ali trabalham. Agradeço especialmente ao German e ao Deiber pela sabedoria e experiência que me guiaram em muitas situações, mas não só por isso, pelas risadas, pelo coleguismo e pela amizade.

Agradeço a amizade dos demais colegas, Rafael, Fernanda, Melissa, Juliana, Ângela P, Ângela M., Ane, Marta e Tinoko, que tornam o laboratório um lugar mais feliz.

Agradeço também a minha família, pelo apoio incondicional e pelo amor que me dão.

ÍNDICE

RESUMO.....	6
1. Introdução.....	7
1.1 <i>Helicobacter pylori</i>	7
1.2 A urease de <i>Helicobacter pylori</i>	8
1.3 Estrutura e função de Ureases.....	10
1.4 Ureases como toxinas protéicas.....	12
1.5 Efeitos biológicos da canatoxina.....	13
1.6 Eicosanóides.....	18
1.7 Objetivos.....	20
2. Materiais e Métodos.....	21
2.1 Manipulação bacteriana.....	21
2.1.1 Linhagem bacteriana.....	21
2.1.2 Cultivo bacteriano.....	21
2.1.3 Transformação bacteriana.....	21
2.1.4 Vetor plasmidial.....	21
2.1.5 Seleção de recombinantes.....	22
2.2 Expressão da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	22
2.2.1 Pré-inóculo e indução.....	22
2.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos.....	23
2.3 Purificação da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	23
2.3.1 Fracionamento por precipitação com sulfato de amônio.....	23
2.3.2 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose.....	24
2.3.3 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q.....	24
2.3.4 Cromatografia de exclusão molecular.....	24
2.4 Medida do conteúdo protéico e atividade enzimática.....	25
2.4.1 Conteúdo Protéico.....	25
2.4.2 Detecção de atividade ureásica.....	25
2.5 Ensaios em modelos <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	25
2.5.1 Ensaio de agregação plaquetária.....	25

2.5.2 Ensaio de edema de pata em camundongos.....	26
2.5.3 Análise estatística.....	26
3. Resultados.....	27
3.1 Purificação da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	27
3.2 Agregação plaquetária.....	30
3.3 Edema de pata em camundongos.....	31
3.4 Efeito de inibidores da síntese de eicosanóides em edema de pata.....	32
4. Discussão.....	32
5. Perspectivas.....	34
6. Referências bibliográficas.....	35

RESUMO

Ureases são enzimas níquel dependentes, que catalisam hidrólise de uréia a amônia e dióxido de carbono, e são amplamente distribuídas em plantas, fungos e bactérias. A Canatoxina, uma isoforma de urease encontrada em sementes de *Canavalia ensiformis*, possui efeitos biológicos independentes da atividade ureolítica. Alguns desses efeitos também foram descritos para a urease de *Bacillus pasteurii*, como agregação plaquetária e interferência com o metabolismo de eicosanóides. *Helicobacter pylori* é uma bactéria produtora de urease e conhecido agente etiológico de patologias como: gastrite crônica, úlceras e câncer gástrico e duodenal. Considerando a importância dessa enzima para a bactéria *H. pylori* e baseado em estudos prévios dos efeitos biológicos de ureases bacterianas e vegetais, este trabalho tem como objetivo a purificação da urease recombinante de *H. pylori* e a caracterização de alguns de seus efeitos biológicos, com ênfase nos efeitos pró-inflamatórios e de agregação plaquetária. A bactéria *Escherichia coli* SE5000 foi transformada com o plasmídeo pHP8080 contendo o operon da urease de *H. pylori* 26695. A expressão da urease ocorreu por 18 horas, a 37°C e 180 rpm em meio de cultura LB. A purificação foi realizada com quatro procedimentos: 1) Fracionamento com sulfato de amônio; 2) Cromatografia de troca iônica Q-sepharose; 3) Cromatografia de troca iônica Source 15-Q, 4) Gel filtração em coluna Superose 6 HR. A urease de *H. pylori* induziu agregação plaquetária com $EC_{50}=200\mu\text{g/ml}$. O efeito pró-inflamatório foi analisado em testes de edema de pata em camundongos e a urease induziu um efeito dose-dependente, com um pico em 6 horas e aumento de até 0,4 mm na espessura da pata, sendo esse efeito parcialmente revertido por inibidores da síntese de leucotrienos (dexametasona e esculetina). Esses resultados estabelecem novos parâmetros para estudos de ureases já conhecidas e sugerem novas abordagens para o esclarecimento do papel dessa enzima nas patologias geradas por *H. pylori*.

1. Introdução

1.1 *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori é uma espiroqueta, gram negativa, microaerófila, com 2.5 a 5.0 µm de comprimento e 0.5 a 1.0 µm de largura, que possui de 4 a 6 flagelos com aproximadamente 30 µm de comprimento (Goodwin *et al*, 1990). Em 1982, Marshall e Warren isolaram pela primeira vez esse microrganismo, conduzindo a microbiologia gástrica à uma nova era (Marshall e Warren, 1984). A partir de 1984, tornou-se cada vez mais forte a associação de *H. pylori* com patologias gástricas e duodenais.

Atualmente, *H. pylori* é reconhecida como o agente patológico de gastrite crônica, úlcera péptica e possivelmente no desenvolvimento de câncer gástrico e duodenal (NIH Consensus Conference, 1994). Estima-se que esse microrganismo pode ser encontrado em cerca de 50% da população mundial, e em países subdesenvolvidos, pode chegar de 70% a 90% de ocorrência.

A histopatologia da infecção por *H. pylori* caracteriza-se pela associação exclusiva dessa bactéria às células da mucosa gástrica, mas não ao epitélio do intestino delgado ou em metaplasia intestinal. A infecção é acompanhada por infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares no epitélio, o que não é associado especificamente com modificações metaplásicas e formação de granuloma (Dixon, M. F; 1995). A intensidade da inflamação pode ser altamente variável, desde uma infiltração mínima da lâmina própria com arquitetura glandular intacta até uma inflamação severa, com formação de micro abscessos (Genta & Graham, 1994). Em geral há degeneração das células epiteliais, com depleção de mucina, vacuolização citoplasmática e desorganização de glândulas da mucosa.

Sugere-se que a transmissão desse microrganismo possa ocorrer a partir de três rotas. A primeira e menos comum está relacionada ao contato de pacientes com instrumentos

endoscópicos contaminados (Akamatsu *et al.*, 1996), podendo ser evitada com a esterilização dos instrumentos (Kato *et al.*, 1993; Tytgat, 1995). A transmissão fecal-oral é talvez a mais importante. Apesar de *H. pylori* ter sido isolado das fezes de crianças infectadas (Thomas *et al.*, 1992), o isolamento desse microrganismo das fezes não é comum, o que sugere que deva ocorrer descamação gástrica intermitente. Água contaminada por material fecal pode ser também uma fonte importante de transmissão (Klein *et al.*, 1991). Por último, a via de transmissão oral-oral foi identificada em alguns casos na África, onde em algumas tribos, as mães pré-mastigam o alimento dos filhos (Megraud, 1995).

Muitos fatores de virulência estão envolvidos no mecanismo patológico da infecção por *H. pylori*, incluindo várias enzimas (urease, catalase, lipase e algumas proteases) e toxinas, como a citotoxina vacuolizante, codificada pelo gene *vacA*, e a proteína imunogênica Cag A, codificada pelo gene *cagA*, que estão localizados na ilha de patogenicidade (PAI). A PAI contém também diversos outros genes responsáveis pela virulência, expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-8) em células epiteliais, e expressão de um conjunto de proteínas formadoras de um sistema de secreção do tipo IV (T4SS) para o transporte da proteína CagA para células eucarióticas (Censini *et al.* 1996; Figueiredo *et al.* 2005)

1.2 A urease de *Helicobacter pylori*

Ureases (urea amidohidrolase; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes (Dixon, N.E. *et al.*, 1975) que catalisam a hidrólise de uréia a amônia e ácido carbâmico. A urease é uma enzima altamente expressa por *H. pylori*, podendo compor de 10% a 15% das proteínas totais dessa bactéria. A urease nativa de *H. pylori* possui massa molecular de aproximadamente 540 kDa, é uma metaloenzima níquel dependente e hexamérica. O monômero é composto por duas cadeias polipeptídicas (UreA [30kDa] e UreB [62kDa]) em

proporção 1:1 (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990). A afinidade dessa enzima pelo substrato uréia, com um $K_m \sim 0.3$ mM, a torna cataliticamente eficiente até mesmo nas concentrações submillimolares de uréia presentes nos fluidos humanos (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990).

Foram descritos pelo menos sete genes envolvidos na produção da urease. Os genes *ureA* e *B* codificam as duas subunidades que compõem a enzima, enquanto que os genes *ureE*, *F*, *G*, *H* codificam proteínas acessórias responsáveis pela incorporação do níquel no centro ativo da urease. O gene *ureI* codifica uma proteína que funciona como um canal na membrana externa, atuando na internalização da uréia. Além desses genes, uma proteína transportadora de níquel é expressa a partir do gene *nixA* (Mobley *et al.*, 1995).

A urease de *H. pylori* é considerada um fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador para diagnóstico utilizado amplamente (Krogfelt *et al.*, 2005). Mutantes de *H. pylori* urease negativos são incapazes de colonizar leitões gnotobióticos e tampouco camundongos “*nude*”. (Eaton *et al.*, 1991; Tsuda *et al.*, 1994). Supõe-se que a principal função dessa enzima está relacionada com a formação de um microclima neutro para o microrganismo no lúmen gástrico, possibilitando sobrevivência das bactérias em ambientes de pH desfavorável. Apesar de inibidores de urease terem sido utilizados no tratamento de algumas destas patologias, seu uso foi descontinuado pelo fato de muitos pacientes apresentarem reações colaterais adversas. O uso clínico de ácido acetohidroxâmico, um inibidor de urease, causa depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, além de ser teratogênico em doses elevadas.

Além desse efeito neutralizador da acidez gástrica, a urease de *H. pylori* está envolvida na ativação de fagócitos e na produção de citocinas inflamatórias (Harris *et al.*, 1996). *H. pylori* induz em macrófagos *in vitro* aumento da óxido nítrico sintase induzível

(iNOS) (Wilson *et al.*, 1996), resultando em uma grande liberação de óxido nítrico, o qual está associado à ativação de células do sistema imune no tecido lesado. A degradação de uréia e, conseqüentemente, a liberação de amônia resulta em danos celulares (Barer *et al.* 1988) e contribui na indução de vacuolização das células epiteliais gástricas, em conjunto com a toxina VacA. Esses dados sugerem que a urease seja importante também no desenvolvimento de lesões gástricas, e não só na manutenção da bactéria em pH desfavorável.

1.3. Estrutura e função de Ureases

As ureases de fungos e vegetais possuem unidades funcionais compostas por uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 90kDa. Já as ureases bacterianas possuem unidades funcionais compostas por duas ou três cadeias polipeptídicas diferentes, que são homólogas às cadeias únicas das proteínas vegetais ou fúngicas (Mobley, H. L., 1995; Sirko A. & Brodzik R., 2000). A figura 1 ilustra as diferenças entre ureases vegetais e bacterianas, quanto às suas subunidades.

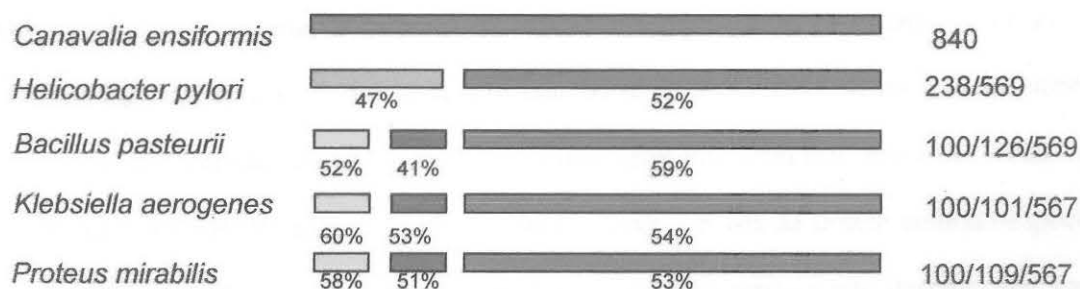


Figura 1. Estrutura das ureases: Ureases vegetais, como a de *Canavalia ensiformis*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem duas (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*). O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A porcentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de *C. ensiformis* está indicada abaixo das barras.

Ureases estão amplamente distribuídas entre fungos, bactérias e plantas. Em bactérias, estas enzimas estão envolvidas em vários processos patogênicos, como, por exemplo, em casos de infecção por *Proteus mirabilis*, na formação de cálculos urinários, incrustação de catéter, pielonefrites, e até coma hepático. Em plantas, essas enzimas estão amplamente distribuídas, no entanto pouco se conhece sobre sua função fisiológica. Uma possível função para urease em plantas superiores seria a biodisponibilização de nitrogênio (Polacco & Holland, 1993). Constatou-se que, em plantas e culturas de tecidos vegetais desprovidos de urease, quer induzidos geneticamente, com o uso de inibidores de urease ou por remoção do níquel (Polacco & Holland, 1993), observa-se um acúmulo de uréia ou um comprometimento do emprego de uréia como fonte de nitrogênio.

O fato de a uréia ser uma forma de excreção de nitrogênio apenas em animais, ou seja, não é um metabólito majoritário nos vegetais onde esta enzima é abundante, constitui um entrave na argumentação de que a urease tenha como função a biodisponibilidade de nitrogênio.

Com a descoberta de duas isoenzimas de urease na soja (Polacco & Holland, 1984), surgiram algumas dúvidas a respeito da função dessas enzimas nas plantas. Na soja são encontradas uma urease ubíqua, presente em todos os tecidos da planta, e uma embrião-específica, encontrada na semente madura, onde apresenta atividade ureolítica 1000 vezes maior que a ubíqua (Polacco & Holland, 1984). Como a perda da urease embrião-específica não acarreta danos visíveis na planta, acredita-se que esta enzima não desempenha função fisiológica ligada ao metabolismo de nitrogênio na planta. O fato do embrião em desenvolvimento produzir altas quantidades de uma enzima que praticamente não tem contato com o seu substrato, sugere que esta urease esteja envolvida em algum outro tipo de função, como por exemplo, a defesa da planta (Polacco & Holland, 1993).

1.4 Ureases como toxinas protéicas

A canatoxina é uma proteína tóxica encontrada nas sementes de *Canavalia ensiformis*, letal para ratos e camundongos por via intraperitoneal (Carlini & Guimarães, 1981). Essa toxina possui também atividade inseticida (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Stanisçuaski *et al.*, 2005), o que reforça a hipótese de que as ureases estariam envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas.

Vários peptídeos internos da canatoxina já foram seqüenciados, obtidos por hidrólise triptíca ou por endoproteínase Lys-C, sendo que todos eles revelaram um alto grau de homologia com a seqüência primária de urease da *C. ensiformis*. A homologia da canatoxina com a urease revelou-se maior na porção N-terminal desta, sendo que peptídeos que se alinharam com a porção C-terminal da urease, mostraram substituição de vários aminoácidos, algumas não conservativas. Também a composição percentual de aminoácidos é indicativa de uma grande semelhança das duas proteínas.

A partir dessa evidência a canatoxina foi caracterizada como uma variante da urease de *C. ensiformis*, sendo um dímero de cadeias de 95 kDa (Follmer *et al.* 2001). As duas isoformas de urease podem ser separadas a partir do extrato bruto de *C. ensiformis*, sendo que a canatoxina apresenta maior afinidade por metais (Zn^{++} e Co^{++}) em cromatografia de afinidade em metal imobilizado, o que permitiu o estabelecimento de protocolos de purificação para a obtenção das isoformas altamente purificadas (Follmer *et al.* 2004).

Apesar da alta homologia, a canatoxina purificada apresenta apenas 20-30% da atividade ureolítica da urease de *C. ensiformis*. Postula-se que as ureases dessa planta possuem domínios protéicos distintos, os quais são responsáveis por atividades biológicas

diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre uréia, suscetível de inibição por agentes quelantes e oxidantes; e pelo menos mais um outro domínio, níquel e tiol independentes, que seria responsável pelos seus efeitos biológicos (Follmer *et al*, 2001; Follmer *et al*, 2004a)

1.5 Efeitos biológicos da canatoxina

A canatoxina apresenta uma série de efeitos biológicos que parecem estar relacionados com a capacidade da proteína em ativar os sistemas secretórios de diversos tipos celulares. Tal efeito secretagogo da canatoxina envolve mediação por metabólitos do ácido araquidônico via lipoxigenases. A tabela 1 expõe alguns dos efeitos da canatoxina.

A canatoxina, quando administrada intraperitonealmente em ratos e camundongos (DL₅₀ de 0.4-0.6 e 2-3 mg/kg respectivamente), induz alterações respiratórias, convulsões e morte (Carlini & Guimarães, 1981; Carlini *et al*, 1984). Em doses subconvulsivantes, a canatoxina promove um aumento dos níveis plasmáticos de gonadotrofinas (Ribeiro-daSilva *et al.*, 1989), de insulina, de modo dose e sexo dependente em ratos (Ribeiro-daSilva & Prado, 1993), e apresenta também efeitos pró-inflamatório (Benjamin *et al.*, 1992).

Em ensaios *in vitro*, a canatoxina apresenta uma potente atividade secretagoga quando administrada em doses nanomolares em diversos tipos de células, induzindo secreção de grânulos plaquetários e agregação plaquetária (Carlini *et al*, 1985), secreção de dopamina e serotonina em sinaptosomas de cérebro total de rato (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991b), liberação de histamina em mastócitos (Grassi-Kassisse & Ribeiro-DaSilva, 1992), secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas (Barja-Fidalgo, 1991), e liberação de enzimas lisossomais em macrófagos (Ghazaleh, 1992).

TABELA 1. Efeito secretagogo da canat oxina: modulação por inibidores de lipoxigenase .

MODELO	EFEITO	DE ₅₀	INIBIDOR	DOSE	INIBIÇÃO	Ref
Plaquetas, coelho	agregação	300 nM	NDGA	520 µM	50	(a)
			ETYA	19 µM	50	
			BW755C	50 µM	50	
	secreção: serotonina	300 nM	NDGA	500 µM	75	(b)
			Esculetina	100 µM	87	
Sinaptossomas, rato	secreção: serotonina	500 nM	NDGA	200 µM	90	(b)
			Esculetina	100 µM	90	
	secreção: dopamina	2 µM	NDGA	200 µM	42	
Ihotas pancreáticas, rato	secreção de insulina	500 nM	NDGA	200 µM	76	(b,c)
			Esculetina	100 µM	36	
Mastócitos: rato	secreção de histamina	500 nM	não testado			(d)
macrófagos, camundongo	secreção: enzimas	200 nM	NDGA	150 µM	não inibe	(e)
Rato, <i>in vivo</i>	hipoglicemia	0,4 mg/Kg	NDGA	125 mg/Kg	100	(f)
			Esculetina	125 mg/Kg	100	
Rato, <i>in vivo</i>	hiperinsulinemia	0,4 mg/Kg	NDGA	125 mg/Kg	100	(g)
Rato, <i>in vivo</i>	hipoxia	0,4 mg/Kg	NDGA	125 mg/Kg	72	(h)
			Esculetina	125 mg/Kg	50	
Rato, <i>in vivo</i>	Edema de pata	0,4 mg/Kg	NDGA	125 mg/Kg	66	(i)
			Esculetina	125 mg/Kg	50	
Rato, <i>in vivo</i>	convulsões	0,4 mg/Kg	NDGA	125 mg/Kg	75	(h)

(a) (Carlini *et al.*, 1985); (b) (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a); (c) (Barja-Fidalgo *et al.*, 1991b); (d) (Grassi-Kassisse & Ribeiro-daSilva, 1992); (e) (Ghazaleh *et al.*, 1992); (f) (Ribeiro-daSilva *et al.*, 1986); (g) (Ribeiro-daSilva & Prado, 1993); (h) (Ribeiro-daSilva *et al.*, 1992); (i) (Benjamin *et al.*, 1992; Ribeiro-daSilva *et al.*, 1992).

A maioria dos efeitos descritos para a canatoxina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, envolve mediação por metabólitos do ácido araquidônico via lipoxigenases, já que esses efeitos são bloqueados por inibidores de lipoxigenase (ácido nordihidroguaiaretico e esculetina), e não por inibidores de cicloxigenases (Benjamim *et al*, 1992; Carlini *et al*, 1985; Barja-Fidalgo *et al*, 1991; Ribeiro-Dasilva *et al*, 1989). A canatoxina também apresenta um efeito inibitório sobre a acumulo de Ca^{2+} em vesículas do retículo sarcoplasmático, resultante da atividade enzimática de uma $Ca^{2+} Mg^{2+}$ -ATPase presente. A toxina parece desacoplar o transporte de cálcio, através da membrana, da atividade hidrolítica da enzima sobre o ATP, um dado relevante para o entendimento das propriedades secretagogas desta proteína (Alves *et al.*, 1992).

O efeito pró-inflamatório atribuído a essa toxina, foi caracterizado pela indução de migração de neutrófilos e monócitos nas cavidades peritoneal e pleural, além de apresentar ação no modelo "*air poche*", mediada pela liberação de fatores quimiotáticos de macrófagos peritoneais (Barja-Fidalgo *et al.*, 1992). Em ensaio de edema de pata em ratos, a inflamação é dose dependente com pico máximo após 6 horas da injeção intraplantar e com redução total em 48 horas, em doses de 50 μ g e 100 μ g de canatoxina por pata. Este fenômeno parece ser mediado por metabólitos da lipoxigenase, provavelmente leucotrienos, atuando na infiltração celular intensa no local da inflamação (Benjamin *et al.*, 1992).

A urease de *C. ensiformis* apresenta alguns efeitos biológicos em comum com a canatoxina, como a ativação de plaquetas, interação com glicoconjugados de membrana e atividade inseticida, porém não é tóxica quando administrada intraperitonealmente em ratos e camundongos (Follmer *et al*, 2001; Follmer *et al*, 2004b).

Outros estudos mostraram que as várias atividades biológicas descritas para a canatoxina não são dependentes da atividade ureolítica da molécula. Assim, a canatoxina tratada com 200 μ M de *p*-hidroximercuribenzoato perde totalmente a atividade ureolítica, mas mantém inalterada a sua atividade tóxica em camundongos, ainda induz agregação plaquetária, produz hemaglutinação indireta e mantém sua atividade inseticida. As mesmas observações foram feitas para a urease tratada com *p*-hidroximercuribenzoato (Follmer *et al.*, 2001). A Tabela 2 resume os dados comparativos disponíveis para as ureases de *C. ensiformis*.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas e biológicas da canatoxina e a urease clássica de *C. ensiformis*. Dados adaptados de Follmer et al (2001).

	Canatoxin	Urease
<i>Physicochemical properties</i>		
Molecular mass		
SDS-PAGE	95–100 kDa	90–97 kDa
Native form	Dimer	Hexamer
Urease activity		
K_m (pH 6.5–8.5)	2–5 mM	3–8 mM
V_{max} (pH 6.5–8.5)	4–10 U/mg	15–45 U/mg
Inhibitors, IC50		
<i>p</i> -Hydroxi-mercúribenzoate	5 μ M	0.5 μ M
Acetohydroxamic acid	3 μ M	3 μ M
Metal content (per 95 kDa)		
	Nickel-1 mol/mol	Nickel-2 mol/mol
	Zinc-1 mol/mol	Zinc-not detected
<i>Biological properties</i>		
Toxicity		
Mouse, i.p.	LD ₅₀ –2 mg/kg (<i>p</i> -OHMB treated, 100% active)	Not toxic with 10 LD50
<i>C. maculatus</i> , ingested	100% death–0.25% (w/w)	Not determined
<i>R. prolixus</i> , ingested	LD ₅₀ –0.4–0.8 mg/kg	LD ₅₀ –0.4–0.8 mg/kg
Indirect hemagglutination		
End-point (10 ⁶ rabbit cells)	1–2 μ g	1–2 μ g
Inhibitors	Gangliosides-fetuin (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)	Gangliosides-fetuin (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)
Platelet aggregation (rabbit)	EC ₅₀ –2–3 μ g (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)	EC ₅₀ –2–3 μ g (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)

1.6 Eicosanóides

Os eicosanóides são autacóides derivados do ácido araquidônico por rotas metabólicas distintas, entre as quais a via das cicloxigenases e a via das lipoxigenases (figura 2), hoje reconhecidos como segundo mensageiros envolvidos na transdução de sinais numa vasta gama de fenômenos fisiológicos e patológicos. Ainda não está completamente elucidado o papel fisiológico dos metabólitos derivados da via de lipoxigenase, como leucotrienos, lipoxinas e ácidos graxos hidroperóxidos (Goodman *et al.*, 2001).

O ácido araquidônico, atuando diretamente ou na forma de seus metabólitos, eicosanóides, regula uma série de funções celulares (Sakata *et al.*, 1987; Sumida *et al.*, 1993). Além disso, modificações no metabolismo do ácido araquidônico estão envolvidas em muitas alterações patológicas (Goetzl *et al.*, 1995).

Existem muito indícios de que os produtos de lipoxigenases, como os leucotrienos, estariam envolvidos nos processos secretórios de diferentes tipos celulares (Snider *et al.*, 1984; Metz, 1985b; Metz *et al.*, 1983a; Metz *et al.*, 1983b; Metz *et al.*, 1983c); Sasakawa *et al.*, 1984; Piomelli *et al.*, 1987; Naor *et al.*, 1985). Os leucotrienos também são considerados mediadores de distúrbios anafiláticos e inflamatórios (Engels, F. and Nijkamp, F.P.; Pharmacological inhibition of leukotriene actions. (1998) Pharm. World Sci. 20, 60-65.).

Os produtos de ciclooxigenases estão envolvidos na patogênese de várias doenças inflamatórias, como aterosclerose devido ao potencial inflamatório de PGE₂ e tromboxana A₂, (Linton *et al.*, 2004) bem como seu envolvimento na patogênese da aterosclerose e no desenvolvimento de problemas vasculares decorrentes da diabetes (Natarajan & Nadle, 2004).

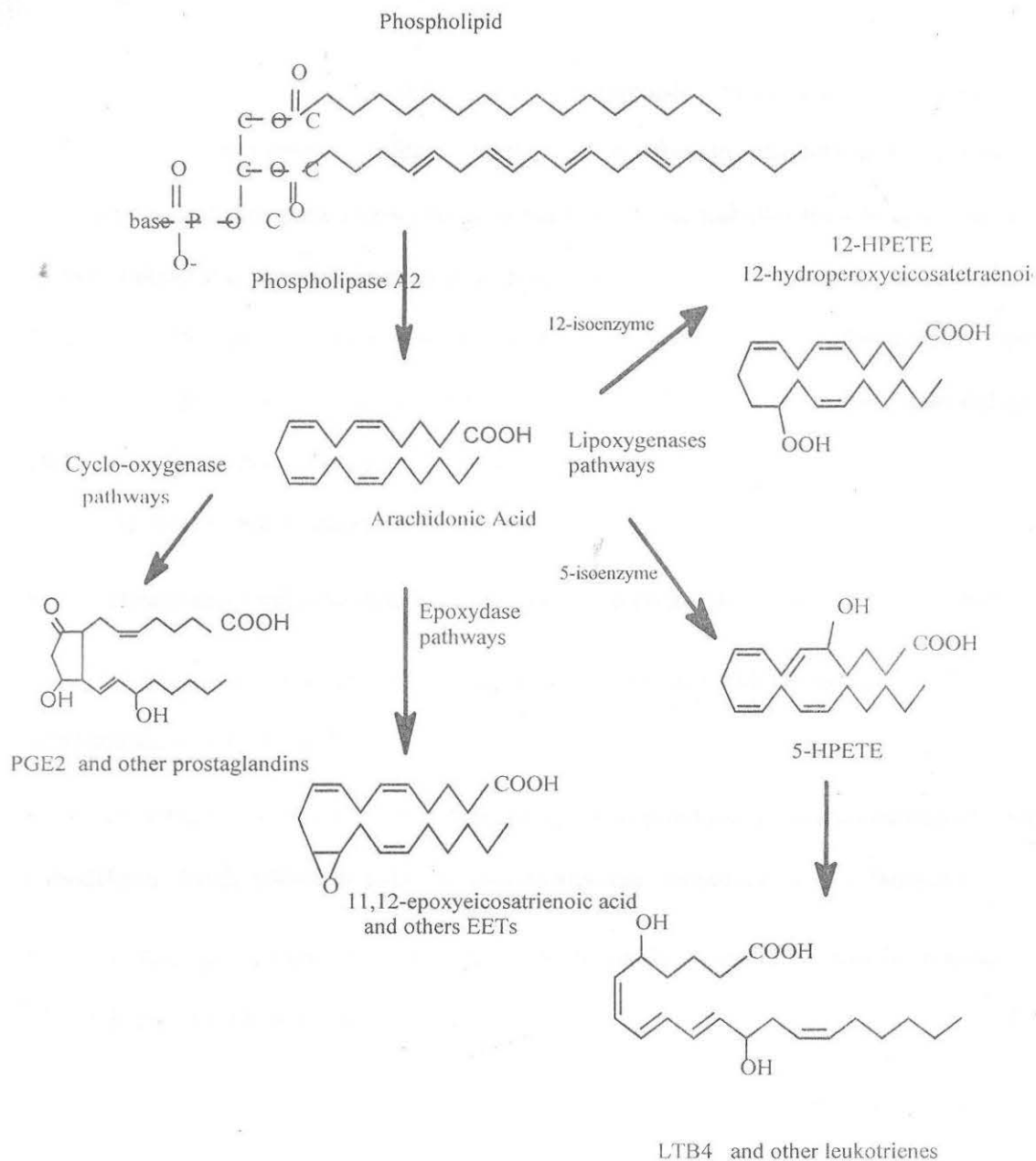


Figura 2: Principais vias do metabolismo dos eicosanóides. A liberação de ácido araquidônico, constituinte minoritário dos fosfolípidios de membranas, ocorre por hidrólise catalisada por fosfolipases tipo A2. Uma vez liberado, o ácido araquidônico será substrato para diferentes rotas metabólicas, particulares para cada tipo celular. Através da via da cicloxigenase formam-se prostaglandinas e tromboxanas, enquanto que a ação das diferentes lipoxigenases levará á formação dos hidroperóxidos correspondentes. Adaptado de Stanley-Samuelson & Ogg, 1994.

1.7 Objetivos

Considerando estudos anteriores das propriedades biológicas das ureases de *C. ensiformis*, principalmente o efeito secretagogo, a ativação plaquetária e o efeito pró-inflamatório descritos para a canatoxina, nossa hipótese de trabalho foi a de que a urease de *H. pylori* poderia apresentar também essas propriedades.

Este trabalho teve como objetivo a purificação da urease de *H. pylori* e a investigação comparativa de possíveis efeitos biológicos dessa enzima *in vivo* e *ex vivo*, com ênfase no efeito pró-inflamatório e na agregação plaquetária.

As etapas para a realização do proposto envolveram:

- Desenvolver um protocolo para purificação da urease de *H. pylori* recombinante;
- Investigar a capacidade da urease de *H. pylori* em induzir agregação plaquetária, comparando-a com a canatoxina;
- Investigar se a urease de *H. pylori* apresenta propriedades pró-inflamatórias utilizando o modelo *in vivo* de edema de pata em camundongo em comparação com a canatoxina;
- Testar vias metabólicas envolvidas nos efeitos da urease de *H. pylori* na indução de edema de pata em camundongo.

2. Materiais e Métodos

2.1 Manipulação bacteriana

2.1.1 Linhagem bacteriana

A linhagem *E. coli* SE5000 [F⁻ araD193 Δ(argF lac)U169 rpsL150 relA1 ffbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR recA56] foi utilizada como vetor de expressão da urease recombinante de *H. pylori* (gentilmente cedida pelo Prof^o.Dr. Harry L.T. Mobley - University of Michigan Medical School)

2.1.2 Cultivo bacteriano

O meio de cultura utilizado para o cultivo de *E. coli* foi o LB (Luria-Bertani) com pH 7.0, sendo composto de triptona (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e NaCl (10g/L). Para meio sólido, era adicionado 15g de ágar por litro de meio.

2.1.3 Transformação bacteriana

A preparação de células competentes para transformação seguiu o protocolo adaptado de SAMBROOK & RUSSELL (2001). As transformações foram feitas por choque térmico e as células transformadas foram plaqueadas em *urea segregation agar* (Hu *et al*, 1992) após uma hora de recuperação em meio LB a 37°C.

2.1.4 Vetor plasmidial

Foi utilizado o plasmídeo pHP8080 (cedido gentilmente pelo Dr. Harry L.T. Mobley - University of Michigan Medical School). A figura 3 mostra a estrutura do plasmídeo pHP8080.

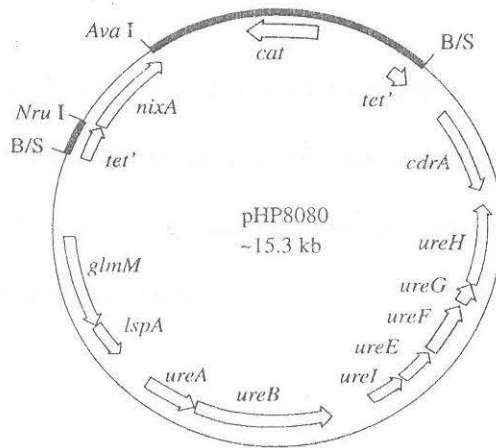


Figura 3: Estrutura do plasmídeo pHP8080, contendo o operon da urease de *H. pylori* linhagem 26695 (*ureABIEFGH*), o gene codificante para proteína transportadora de níquel (*nixA*) e marca de resistência para cloranfenicol (*cat*). Adaptado de McGee *et al*, 1999.

2.1.5 Seleção de recombinantes

A seleção de recombinantes se deu através do plaqueamento em *urea segregation agar* (Hu *et al*, 1992), onde se pode identificar as colônias produtoras de urease pelo aumento de pH o qual modifica a coloração do meio para vermelha pela presença do marcador vermelho de cresol.

2.2 Expressão e purificação da urease recombinante de *H. pylori*

2.2.1 Pré-inóculo e indução

Colônias isoladas do *urea segregation agar* foram inoculadas em meio de cultura LB com cloranfenicol (20µg/ml). Este pré-inóculo foi crescido *overnight* (O/N, ~16 horas) a 37°C, e adicionados em proporção 1:100 em LB contendo cloranfenicol e Ni₂Cl (1µM) foram inoculados com 5 mL do pré-inóculo. O cultivo foi incubado a 37°C por cerca de 16 horas sob agitação.

2.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos

Após o desenvolvimento das cepas o cultivo foi centrifugado em Sorvall-Plus RC5b, a 5000G, a 4°C, durante 10 minutos. O material sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em tampão 20mM NaPB, 5mM β -mercaptoetanol, 1mM EDTA pH 7.0 (tampão de extração).

As células suspensas no tampão de extração foram lisadas, com a utilização de ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos de 5 minutos, sob banho de gelo. Em seguida esse material foi novamente centrifugado em Sorval Plus RC 5b, a 25000G, durante 20 minutos, o material insolúvel foi descartado e o sobrenadante denominado como Extrato Bruto.

2.3 Purificação da urease recombinante de *H. pylori*

2.3.1 Fracionamento por precipitação com Sulfato de Amônio

O extrato bruto obtido a partir do cultivo das células transformantes de *E. coli* SE5000 foi dialisado contra o tampão de extração. Após a mensuração do conteúdo protéico e da atividade ureolítica do extrato bruto, este foi submetido ao fracionamento por precipitação com sulfato de amônio, obtendo-se assim três frações: I – Precipitado de 0-30%; II – Precipitado de 30-60%; III – Sobrenadante de 60% de saturação.

As frações foram dialisadas para a retirada do sulfato de amônio e quantificadas quanto ao conteúdo protéico e atividade ureolítica.

2.3.2 Cromatografia de troca iônica Q-sepharose

A fração rica em atividade ureolítica foi submetida a cromatografia de troca iônica Q-sepharose, na proporção de 1mL de resina para cada 10mg de proteína; a resina foi equilibrada em tampão de extração. Após a adsorção da amostra à resina, esta foi lavada com o tampão de equilíbrio e então eluída com gradiente descontínuo: Os tampões de eluição foram: 1ª eluição – Tampão de extração mais 100 mM NaCl; 2ª eluição - Tampão de extração mais 200mM NaCl; 3ª eluição - Tampão de extração mais 300mM NaCl; 4ª eluição - Tampão de extração mais 1M NaCl.

2.3.3 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q

A fração rica em atividade ureolítica oriunda da cromatografia anterior foi dializada para a retirada do sal e submetida a uma nova cromatografia de troca iônica Source 15-Q, esta adaptada em um sistema de FPLC. A coluna foi equilibrada com tampão de extração pH 7.5, e o sistema foi programado para gerar um gradiente contínuo de NaCl ao longo da eluição da amostra. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram realizados ensaios de determinação de atividade ureolítica.

2.3.4 Cromatografia de exclusão molecular

A fração rica em urease na cromatografia de troca iônica Source 15-Q foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna Superose 6, equilibrada com tampão de extração, em FPLC-System, obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

2.4 Medida de conteúdo protéico e atividade enzimática

2.4.1 Conteúdo Protéico

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada a partir dos métodos de absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 280nm, utilizando cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm, e o método de Bradford (Bradford, 1976).

2.4.2 Detecção de atividade ureásica

Alíquotas de amostras de todas as etapas de purificação foram incubadas com 10mM de uréia, a 37°C, em tampão PBS 1X pH 7,0 (tampão fosfato 20mM, 150 mM NaCl pH 7,0). A amônia liberada pela urease foi quantificada colorimetricamente pelo método de fenol-hipoclorito (Weatherburn MW, 1967), utilizando-se uma curva padrão de sulfato de amônio na faixa de 15 a 250 nM. Uma unidade enzimática de urease foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1µmol de amônia por minuto, em pH 7,0 a 37°C.

2.5 Ensaios em modelos *in vivo* e *ex vivo*

2.5.1 Ensaio de agregação plaquetária

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado a partir de sangue de coelho coletado da artéria central auricular, na presença de citrato de sódio na concentração final de 0,313% (p/v) as amostras de sangue foram centrifugadas a 200 X G, por 20 minutos a temperatura ambiente para a obtenção de plasma rico em plaquetas. A agregação plaquetária e o "*shape change*" foram monitorados por turbidimetria usando Lummi-agregômetro (Chrono-Lcg Co. Havertown, Pa.) e registrada por 3 minutos. A agregação plaquetária também foi monitorada utilizando leitor de microplacas SpectraMax (Molecular Devices, USA). As amostras de

urease foram adicionadas em placas de 96 poços com fundo plano e completadas para o volume final de 50 μ L com solução salina. A agregação foi ativada com a adição de 100 μ L da suspensão de plaquetas. A placa foi incubada por 2 minutos a 37°C antes do início da agitação e leituras que foram acompanhadas a cada 11 segundos em comprimento de onda de 650nm, durante 20 minutos. A mudança da turbidez foi medida por unidades de absorbância e os resultados expressos como a área sob a curva de agregação.

2.5.2 Ensaio de edema de pata em camundongos

Grupos de 7-9 camundongos foram submetidos ao ensaio de edema de pata; onde na pata traseira direita foram aplicados com injeção sub-plantar 30 μ L de amostra em diferentes concentrações, diluídas em tampão e como controle negativo interno, no mesmo animal, pata esquerda traseira 30 μ L de tampão. A evolução do edema foi acompanhada durante 48 horas através da medida da pata com uso de micrômetro (Mitutoyo 0 – 25 mm x 0,002). Foram realizados ensaios com inibidores de fosfolipase A₂ (dexametasona) e lipoxigenase (esculetina). Em cada grupo foi administrados 0,5 mg/kg de cada inibidor 24 horas e uma hora, respectivamente, antes da injeção de 30 μ g da urease de *H. pylori*.

2.5.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA seguido por Turkey-Kramer utilizando o programa InStat Graf Pad e o valor de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1 Purificação da urease recombinante de *H. pylori*

O método de purificação foi desenvolvido com o objetivo de aumentar o rendimento da metodologia descrita por (Hu *et al*, 1992). A figura 4 representa o fluxograma de purificação da urease de *H. pylori*.

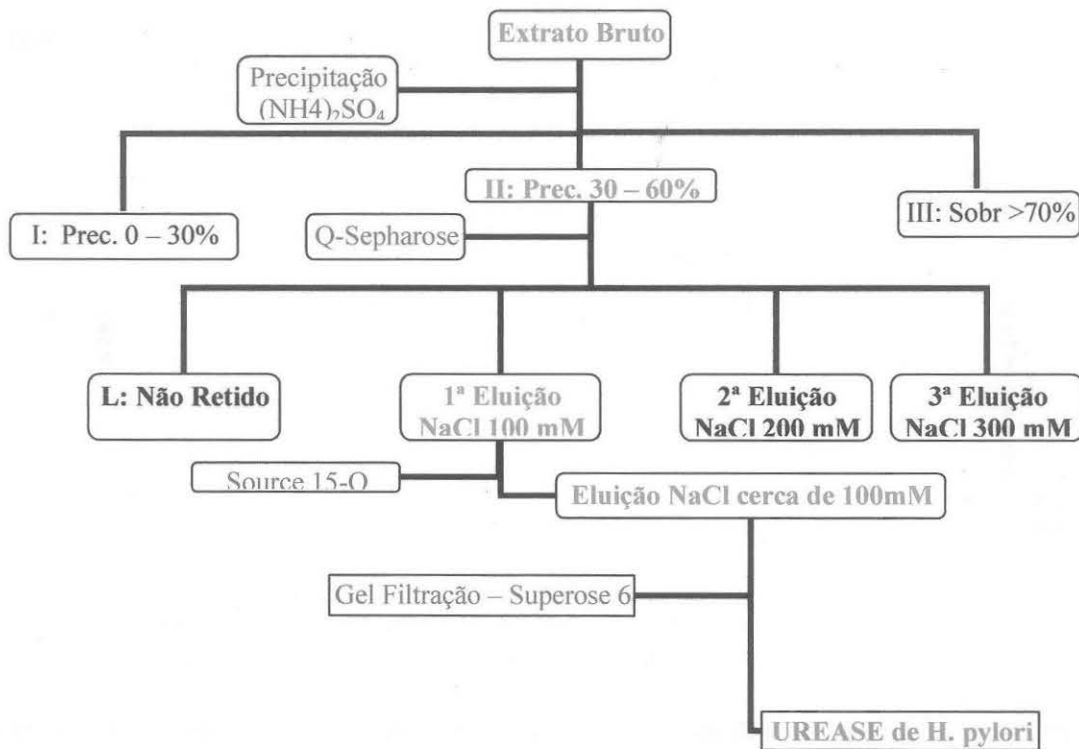


Figura 4: Fluxograma de purificação da urease de *H. pylori*. Em vermelho estão representadas as frações ricas em atividade ureolítica, em azul estão destacados os métodos utilizados.

Durante a purificação, a urease de *H. pylori* manteve-se solúvel sem a necessidade de nenhum tratamento em especial, essa enzima se mantém estável por cerca de duas semanas no tampão de extração e sob refrigeração, perdendo gradualmente sua atividade ao longo desse período.

A figura 4 ilustra o perfil cromatográfico da urease de *H. pylori* em cromatografia de troca iônica Source 15-Q, onde a fração rica em atividade ureolítica é eluída com cerca de 100m

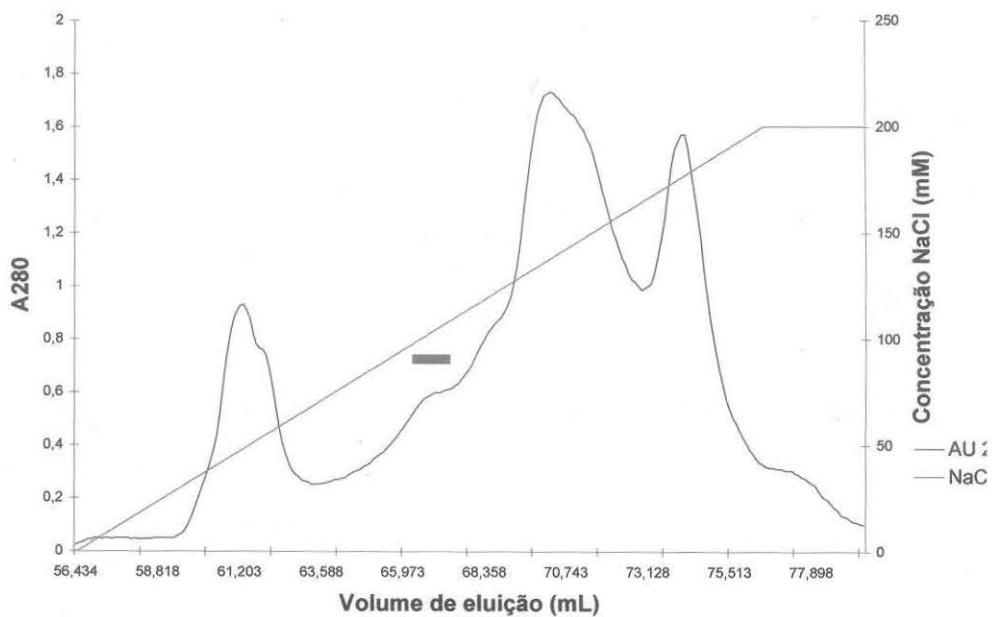


Figura 4: Perfil cromatográfico da urease de *H. pylori* em cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q.

— Representa a fração com atividade ureolítica.

A figura 5 ilustra o perfil cromatográfico da urease de *H. pylori* em cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 6.

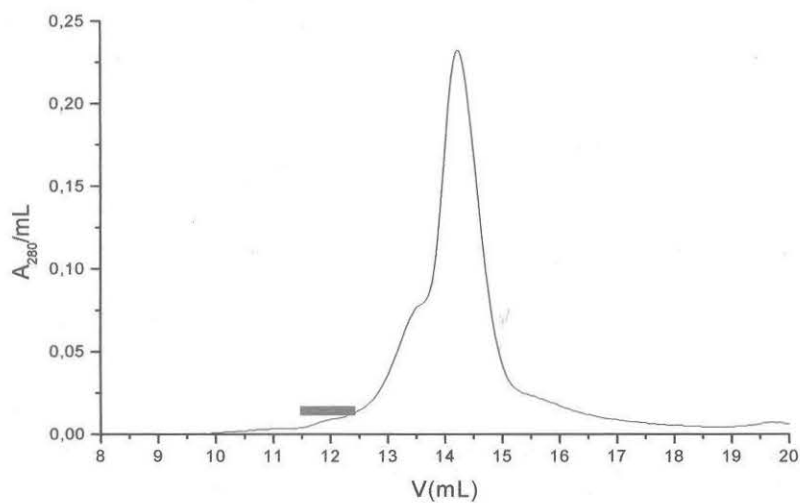


Figura 5: Perfil cromatográfico da urease de *H.pylori* em cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose-6. ■■■ Representa a fração com atividade ureolítica, o volume de eluição, conforme curva de calibração da coluna é de 540 kDa, equivalente ao hexâmero da urease de *H.pylori*.

3.2 Agregação plaquetária

A figura 6 apresenta uma curva dose resposta para a agregação plaquetária induzida por HPU em plasma rico em plaquetas de coelho com DE_{50} de aproximadamente $150 \mu\text{g/mL}$, com “*shape change*” e agregação semelhante a agregação induzida por colágeno e canatoxina.

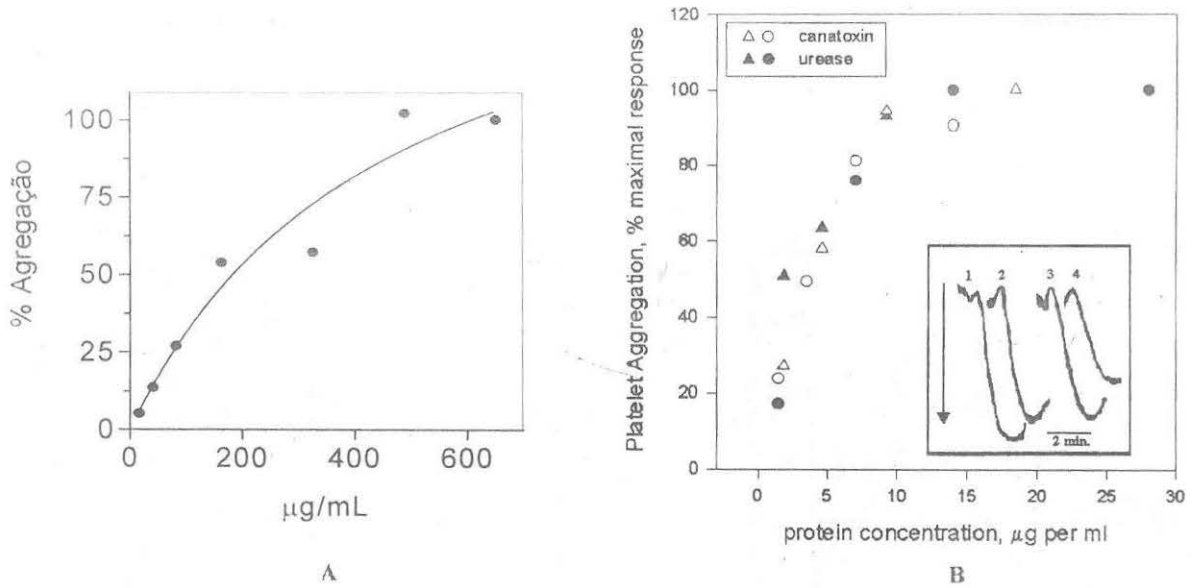


Figura 6: A) Curva dose resposta de agregação plaquetária induzida por urease recombinante de *H. pylori*.

Experimento representativo da média de quadruplicatas. B) Indução de agregação plaquetária por canatoxina e urease. Adaptado de Follmer *et al.*, 2001.

3.3 Edema de pata em camundongos

O potencial pró-inflamatório da urease de *H. pylori* foi testado através do ensaio de edema de pata em camundongos, com a injeção sub-plantar da amostra (0,5; 5; 30 e 45 μg). Como resultado obteve-se uma resposta com a formação de edema dependente da dose administrada, com pico entre 4 e 6 horas e redução completa em 24 horas (Figura 7 A), o que sugere que esta molécula tem potencial pró-inflamatório. Este resultado é semelhante ao edema induzido por canatoxina em ratos (figura 7 B).

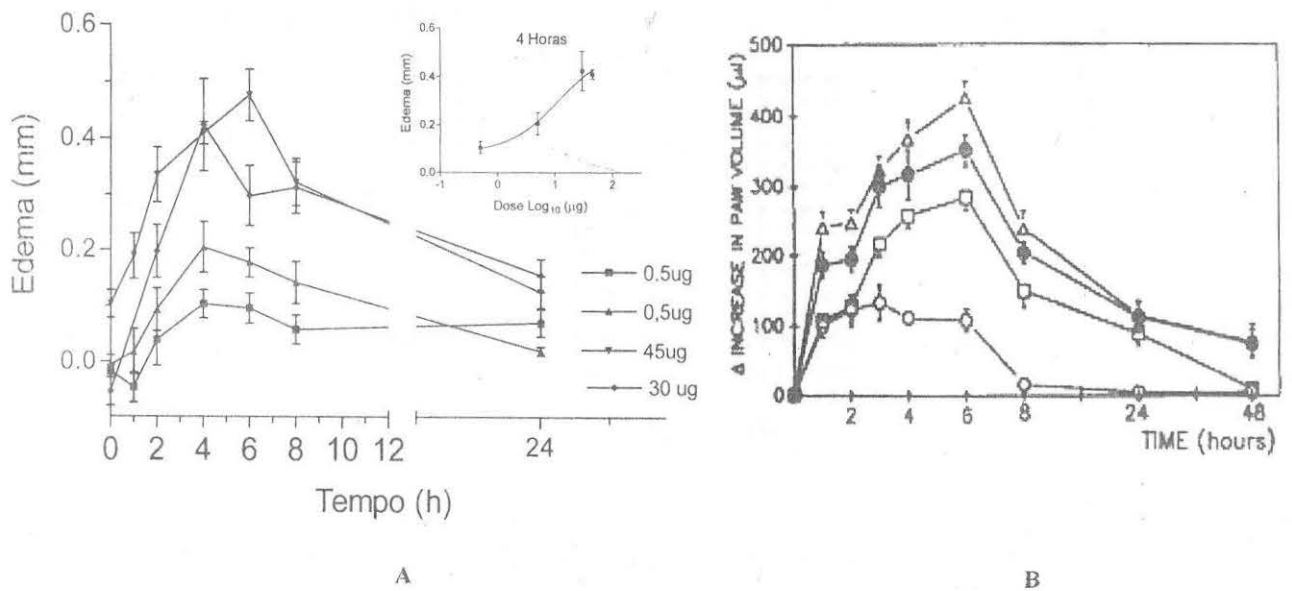


Figura 7. A) Curva dose-resposta do edema de pata induzido por HPU em camundongo. Grupos de nove camundongos foi utilizado em cada dose e a amostra foi injetada na pata direita num volume final de 30 μl . Como controle, a pata esquerda foi injetada com soro fisiológico. B) Adaptado de Benjamin C.F; Toxicon, 1992; Curva dose-resposta do edema de pata induzido por canatoxina em rato. As doses são 50 (O); 100 (\square); 200 (\bullet) and 300 (Δ) μg /pata.

3.4 Efeito de inibidores da síntese de eicosanóides em edema de pata em camundongos induzido por HPU

O efeito dos inibidores dexametasona e esculetina foram investigados no modelo de edema de pata. A figura 8 ilustra o resultado obtido.

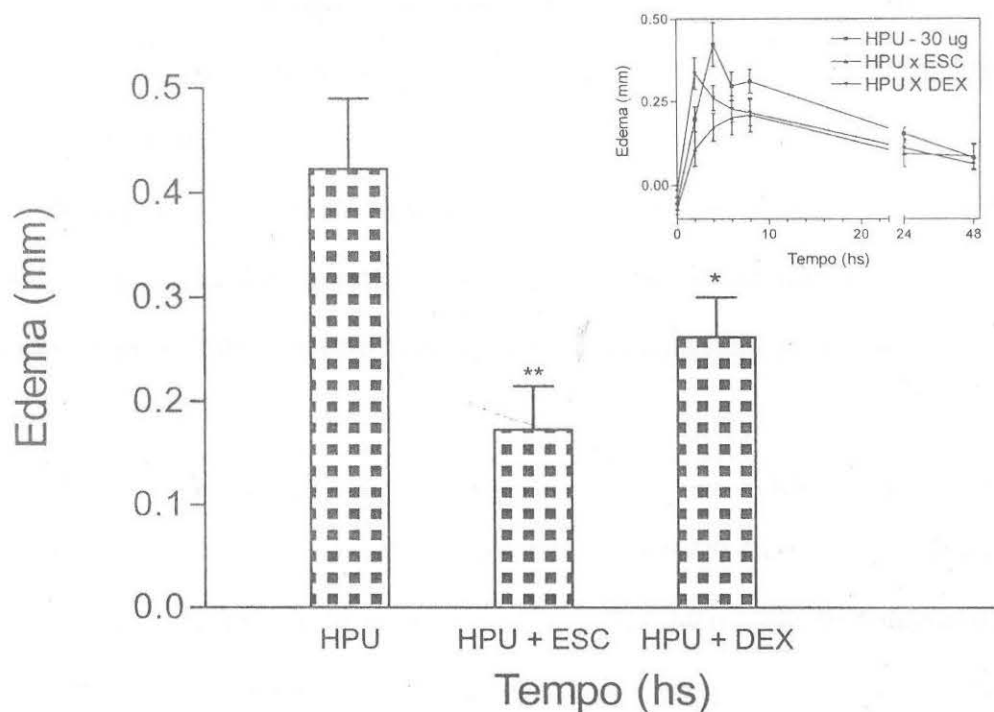


Figura 8: Efeito da dexametasona e esculetina no edema de pata em camundongos induzido por 30 μ g de urease de *H. pylori*. In set, curva representativa do experimento. Foram administrados 0,5 mg/kg dos inibidores em grupos de sete a nove camundongos. . * P<0.05; ** p < 0,01.

4. Discussão

As ureases apresentam estruturas e mecanismos de ação catalítica altamente conservados. Apesar disso, pouco se sabe sobre as funções fisiológicas das ureases na maioria dos organismos. A ampla distribuição das ureases em sementes de leguminosas e o

padrão de acumulação dessa enzima durante a maturação da semente, sugere uma função importante nas plantas (Polacco & Holland, 1993).

A canatoxina, uma das isoformas de urease da *C. ensiformis*, apresenta diversas atividades farmacológicas independentes da atividade enzimática. Como não há um consenso a respeito da função fisiológica das ureases, uma abordagem não enfocada na atividade enzimática pode vir a esclarecer a presença e a função dessa enzima em organismos evolutivamente distantes.

No caso de *H. pylori*, não se sabe ainda ao certo de que modo a urease está envolvida na patogênese. Uma análise que delimite o verdadeiro espectro de ação dessa enzima desde a colonização até o estabelecimento da doença é necessária para um entendimento aprofundado dessa patologia.

Os dados aqui apresentados sugerem possíveis novas funções para a urease de *H. pylori*, além da neutralização do pH no sítio de colonização da bactéria. A capacidade que a urease de *H. pylori* possui de ativar plaquetas (figura 6) é interessante ao demonstrar que essa enzima tem a capacidade de interagir isoladamente com outros sistemas celulares. Esse resultado pode indicar uma possível relação da enzima com a microcirculação gástrica e conseqüentemente com o desenvolvimento da infecção. A ativação plaquetária é um indicativo que a urease de *H. pylori* pode interagir também direta, ou indiretamente com células de defesa, com implicações no desenvolvimento da inflamação gástrica local, que acomete os portadores da doença.

Quanto ao efeito pró-inflamatório, o ensaio de edema de pata em camundongos apresentou resultado semelhante ao da canatoxina, com pico entre 4 e 6 horas após a administração. O resultado sugere que a urease de *H. pylori* possa atuar em conjunto com

outros fatores para indução de inflamação durante a infecção por *H. pylori*, que é caracterizada pela infiltração de células inflamatórias na lâmina própria gástrica.

À semelhança da canatoxina, o efeito pró-inflamatório e de agregação plaquetária da urease de *H. pylori* é mediado por eicosanóides da via de lipoxigenases. Essas propriedades em comum reforçam a hipótese de que a urease é um fator muito mais importante e ativo na patogênese da doença causada por *H. pylori* do que se supõe atualmente. Conhecendo melhor as funções fisiológicas das ureases, será possível a utilização de drogas com efeito antagonista à urease para o tratamento de doenças causadas por bactérias produtoras dessa enzima.

5. Perspectivas

É necessária uma investigação mais aprofundada das funções biológicas da urease de *H. pylori*. Com esse objetivo em mente, o projeto tem como perspectivas o estudo do efeito da urease de *H. pylori* em células do sistema imunológico, tais quais macrófagos, e neutrófilos, através de experimentos que avaliem o potencial quimiotático dessa molécula nesses sistemas.

A análise comparativa entre as ureases bacterianas têm muita importância para as conclusões finais do projeto, possibilitando a corroboração dos dados aqui obtidos. A possibilidade da existência de um padrão de atividades biológicas entre as ureases de diferentes fontes é fundamental para as conclusões finais acerca do projeto. Tendo isso em mente, está em andamento a purificação da urease de *P. mirabilis* para a posterior utilização em novos ensaios biológicos.

Como objetivos finais, a relação estrutura-atividade é muito importante para a identificação dos domínios envolvidos nas atividades biológicas, já que existem muitas

evidências que indicam que não há correlação da atividade enzimática com os efeitos biológicos associados a essas enzimas.

6. Referências bibliográficas

1. ALVES, E.W., FERREIRA, A.T., FERREIRA, C.T., & CARLINI, C.R. (1992). Effects of canatoxin on the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. *Toxicon* 30, 1411-1418.
2. AKAMATSU, T., TABATA, K., HIRONGA, M., KAWAKAMI, H., & UYEDA, M. (1996). Transmission of *Helicobacter pylori* infection via flexible fiberoptic endoscopy. *Am. J. Infect. Control* 24, 396-401.
3. BARER MJ, ELLIOTT TSJ, BERKELEY JE, THOMAS JE, ESTHAM EJ. (1988). Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol*; 41:597.
4. BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J.A., & CARLINI, C.R. (1991a). Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 128, 675-679.
5. BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J.A., & CARLINI, C.R. (1991b). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29, 453-460.
6. BENJAMIN, C.F., CARLINI, C.R., & BARJA-FIDALGO, C. (1992). Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon* 30, 879-885.
7. BENNETT, J. & WREN, E.A. (1977). Interaction of para-nitrophenyl carbamate with urease. *BBA* 482, 421-426.
8. BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 2 18-254.
9. CARLINI, C.R., GOMES, C., GUIMARAES, J.A., MARKUS, R.P., SATO, H., & TROLIN, G. (1984). Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh)* 54, 161-166.

10. CARLINI, C.R. & GUIMARAES, J.A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667-675.
11. CARLINI, C.R., GUIMARAES, J.A., & RIBEIRO, J.M. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84, 551-560.
12. CARLINI, C.R., OLIVEIRA, A.E., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., & WELLS, M.A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.* 90, 340-348.
13. CENSINI S, LANGE C, XIANG Z ET AL (1996). Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci*; 93: 14648-14653.
14. DIXON, M.F. (1995). Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 9, 467-486.
15. DIXON, N.E., GAZZOLA, C., BLAKELEY, R.L., & ZERNER, B. (1975). Jack-Bean Urease (Ec 3.5.1.5) - Metalloenzyme - Simple Biological Role for Nickel. *J Am Chem Soc* 97, 4131-4133.
16. DUNN, B.E., CAMPBELL, G.P., PEREZ-PEREZ, G.I., & BLASER, M.J. (1990). Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 265, 9464-9469.
17. EATON, K.A., BROOKS, C.L., MORGAN, D.R., & KRAKOWKA, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59, 2470-2475.
18. ENGELS, F. & NIJKAMP, F.P; PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF LEUKOTRIENE ACTIONS. (1998) *Pharm. World Sci.* 20, 60-65.
19. FERREIRA-DASILVA, C.T., GOMBAROVITS, M.E.C., MASUDA, H., OLIVEIRA, C.M., & CARLINI, C.R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44, 162-171.
20. FIGUEIREDO, C., MACHADO, J. C. & YAMAOKA, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 10 (Suppl. 1), 14-20.

21. FISHBEIN, W.N. (1969). Urease catalysis .3. stoichiometry kinetics and inhibitory properties of a third substrate: dihydroxyurea. *J Biol Chem* 244, 1188-93.

22. FOLLMER, C., BARCELLOS, G.B.S., ZINGALI, R.B., MACHADO, O.L.T., ALVES, E.W., BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J.A., & CARLINI, C.R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem J.* 360, 217-224.

23. FOLLMER C, REAL-GUERRA R, WASSERMAN GE, OLIVERA-SEVERO D, CARLINI CR. (2004a). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem.* 271, 1357-63.

24. FOLLMER C, WASSERMANN GE, CARLINI CR. (2004b) Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant Science* ; 167: 241-246.

25. GENTA, R.M. & GRAHAM, D.Y. (1994). Comparison of biopsy sites for the histopathologic diagnosis of *Helicobacter pylori*: a topographic study of *H. pylori* density and distribution. *Gastrointest. Endosc.* 40, 342-345.

26. GHAZALEH, F.A., ARAUJO, C.F., BARJA-Fidalgo, C., and Carlini,C.R. (1992). Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 1033-1035.

27. GOODMAN, A.G., HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. (2001). The pharmacological basis of therapeutics. 10^a ed. The McGraw-Hill Companies. 669-685.

28. GOETZL, E.J., AN, S., & SMITH, W.L. (1995). Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.* 9, 1051-1058.

29. GOODWIN, C.S. & ARMSTRONG, J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 1-13.

30. GRASSI-KASSISSE, D.M. & RIBEIRO-DASILVA, G. (1992). Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 37, 204-209.

31. HARRIS, P.R., MOBLEY, H.L., PEREZ-PEREZ, G.I., BLASER, M.J., & SMITH, P.D. (1996). *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 111, 419-425.
32. HU, L.T., FOXALL, P.A., RUSSELL, R., & MOBLEY, H.L. (1992). Purification of recombinant *Helicobacter pylori* urease apoenzyme encoded by ureA and ureB. *Infect. Immun.* 60, 2657-2666.
33. HU, L.T. & MOBLEY, H.L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58, 992-998.
34. KATOH, M., SAITO, D., NODA, T., YOSHIDA, S., OGURO, Y., YAZAKI, Y., SUGIMURA, T., & TERADA, M. (1993). *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual Hyamine washing. *Jpn. J. Cancer Res.* 84, 117-119.
35. KLEIN, P.D., GRAHAM, D.Y., GAILLOUR, A., OPEKUN, A.R., & SMITH, E.O. (1991). Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. *Lancet* 337, 1503-1506.
36. KROGFELT, K. A., LEHOURS, P. & MÉGRAUD, F. (2005). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 10 (Suppl. 1), 5-13.
37. MARSHALL, B.J. & WARREN, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1, 1311-1315.
38. MCGEE, D.J., MAY, C.A., GARNER, R.M., HIMPSL, J.M., MOBLEY, H.L. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol.* 181(8):2477-84.
39. MEGRAUD, F. (1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 Suppl 2, 85-91.
40. METZ, S.A. (1985). Glucose increases the synthesis of lipoxygenase-mediated metabolites of arachidonic acid in intact rat islets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 198-202.
41. METZ, S.A., FUJIMOTO, W.Y., & ROBERTSON, R.P. (1983a). A role for the lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in glucose- and glucagon-induced insulin secretion. *Life Sci.* 32, 903-910.

42. METZ, S.A., LITTLE, S., FUJIMOTO, W., & ROBERTSON, R.P. (1983b). Evidence for lipoxygenase mediation of arachidonic acid-stimulated insulin secretion. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukot. Res.* 12, 271-277.
43. METZ, S.A., VANROLLINS, M., STRIFE, R., FUJIMOTO, W., & ROBERTSON, R.P. (1983c). Lipoxygenase pathway in islet endocrine cells. Oxidative metabolism of arachidonic acid promotes insulin release. *J. Clin. Invest.* 71, 1191-1205.
44. MOBLEY H.L., ISLAND M.D., HAUSINGER R.P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* Sep;59 (3):451-80.
45. NAOR, Z., KIESEL, L., VANDERHOEK, J.Y., & CATT, K.J. (1985). Mechanism of action of gonadotropin releasing hormone: role of lipoxygenase products of arachidonic acid in luteinizing hormone release. *J. Steroid Biochem.* 23, 711-717.
46. NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH – CONSENSUS CONFERENCE. (1994). *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*; 272:65-9.
47. PIOMELLI, D., VOLTERRA, A., DALE, N., SIEGELBAUM, S.A., KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J.H., & BELARDETTI, F. (1987). Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of *Aplysia* sensory cells. *Nature* 328, 38-43.
48. POLACCO, J.C. & HOLLAND, M.A. (1993). Roles of Urease in Plant-Cells. *Int Rev Cytol - A Survey of Cell Biology*, Vol 145 145, 65-103.
49. POLACCO, J.C. & WINKLER, R.G. (1984). Soybean leaf urease: A seed enzyme? *Plant Physiol.* Vol. 74, 800-803
50. RIBEIRO-DASILVA, G., CARLINI, C.R., PIRES-BARBOSA, R., & GUIMARAES, J.A. (1986). Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean (*Canavalia ensiformis*) seeds. *Toxicon* 24, 775-782.
51. RIBEIRO-DASILVA, G., PIRES-BARBOSA, R., & CARLINI, C.R. (1989). Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 387-395.
52. RIBEIRO-DASILVA, G., PIRES-BARBOSA, R., PRADO, J.F., CARLINI, C.R. (1989). Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 107-110

53. RIBEIRO-DASILVA, G. & PRADO, J.F. (1993). Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon* 31, 1131-1136.
54. RIBEIRO-DASILVA, G., PRADO, J.F., COLLARES, C.B., & SISTE-CAMPOS, M. (1992). Further studies on the hypoxia produced by canatoxin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 849-852.
55. SAKATA, A., IDA, E., TOMINAGA, M., & ONOUE, K. (1987). Arachidonic acid acts as an intracellular activator of NADPH-oxidase in Fc gamma receptor-mediated superoxide generation in macrophages. *J. Immunol.* 138, 4353-4359.
56. SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning*. 3rd ed. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
57. SASAKAWA, N., YAMAMOTO, S., & KATO, R. (1984). Effects of inhibitors of arachidonic acid metabolism on calcium uptake and catecholamine release in cultured adrenal chromaffin cells. *Biochem. Pharmacol.* 33, 2733-2738.
58. SIRKO, A., & BRODZIK, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol.* 47(4):1189-95.
59. SNIDER, R.M., MCKINNEY, M., FORRAY, C., & RICHELSON, E. (1984). Neurotransmitter receptors mediate cyclic-gmp formation by involvement of arachidonic-acid and lipoxigenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 81, 3905-3909.
60. STANISÇUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C.T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M., CARLINI, C.R. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon* 45, 753-60.
61. STANLEY-SAMUELSON, D.W. AND OGG, C.L. (1994). Prostaglandin biosynthesis by fat body from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 481-491.
62. SUMIDA, C., GRABER, R., & NUNEZ, E. (1993). Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 48, 117-122.
63. THOMAS, J.E., GIBSON, G.R., DARBOE, M.K., DALE, A., & WEAVER, L.T. (1992). Isolation of *Helicobacter pylori* from human faeces. *Lancet* 340, 1194-1195.

64. TYTGAT, G.N. (1995). Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* *9 Suppl 2*, 105-110.
65. TSUDA, M., KARITA, M., MIZOTE, T., MORSHED, M.G., OKITA, K., & NAKAZAWA, T. (1994). Essential role of *Helicobacter pylori* urease in gastric colonization: definite proof using a urease-negative mutant constructed by gene replacement. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *6 Suppl 1*, S49-S52.
66. WEATHERBURN, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem* *39*, 971-&.
67. WILSON, K.T., RAMANUJAM, K.S., MOBLEY, H.L., MUSSELMAN, R.F., JAMES, S.P., & MELTZER, S.J. (1996). *Helicobacter pylori* stimulates inducible nitric oxide synthase expression and activity in a murine macrophage cell line. *Gastroenterology* *111*, 1524-1533.