

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOFÍSICA E
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**

**Urease de *Helicobacter pylori*: mecanismos da ativação
plaquetária e a rota de lipoxigenases**

Augusto Frantz Uberti

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

**UFRGS - BIBLIOTECA
INST. BIOCÊNCIAS**

**Orientadora: Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador: Dr. Deiber Olivera Severo**

Porto Alegre, novembro de 2008

Visto,
Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica e no Centro de Biotecnologia 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, Profa. Dra. Célia Carlini, por me dar a oportunidade de trabalhar no excelente Laboratório de Proteínas Tóxicas, e pela atenção e orientação durante o período da graduação.

Gostaria de agradecer especialmente ao Deiber, pelo conhecimento, experiência e aprendizado durante dois anos de bancada juntos. E também pelas risadas, amizade e companheirismo.

Agradeço aos demais membros do Laprotox, igualmente especiais: Marina, Tinoco, Carol, Ângela, Anne, Mel, Mônica, Vanessa, Ju, Karine, Rodrigo, Evelyn, Rafael, Fernanda, Arlete, Alexis, Diogo, German e Prof. Joe Polacco.

Obrigado ao Prof. Guido Lenz, por permitir a utilização do microscópio de fluorescência localizado em seu laboratório, e pelas linhagens de glioma, gentilmente cedidas. Agradeço também a Alessandra Tamajusuku, que auxiliou nos ensaios.

Agradeço a minha família, pelo suporte, apoio e amor em qualquer situação.

ÍNDICE

Resumo.....	6
1. Introdução.....	7
1.1 Estrutura e função de ureases.....	7
1.2 Ureases como toxinas protéicas.....	9
1.3 Efeitos biológicos da canatoxina.....	10
1.4 Eicosanóides.....	14
1.5 Plaquetas e agregação plaquetária.....	15
1.6 <i>Helicobacter pylori</i>	17
1.7 A urease de <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.8 Objetivos.....	23
2. Materiais e Métodos.....	24
2.1 Manipulação bacteriana.....	24
2.1.1 Linhagem bacteriana.....	24
2.1.2 Cultivo bacteriano.....	24
2.1.3 Transformação bacteriana.....	24
2.1.4 Vetor plasmidial.....	24
2.2 Expressão da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	25
2.2.1 Pré-inóculo.....	25
2.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos.....	25
2.3 Purificação da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	26
2.3.1 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose.....	26
2.3.2 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q.....	26
2.3.3 Cromatografia de exclusão molecular.....	27
2.4 Detecção de 12-HETE.....	27
2.5 Medida de conteúdo protéico e atividade enzimática.....	28
2.5.1 Conteúdo protéico.....	28
2.5.2 Detecção de atividade ureásica.....	28
2.6 Ensaio de agregação plaquetária.....	28
2.7 Ensaio de adesão de HPU em membranas de plaquetas.....	29
2.8 Tratamento de células de glioma humano.....	30
2.9 Análise estatística.....	31

3. Resultados.....	32
3.1 Rota de ativação de plaquetas por HPU.....	32
3.2 Detecção de 12-HETE em plaquetas agregadas por HPU.....	34
3.3 Adesão da urease de <i>H. pylori</i> a membranas de plaquetas.....	35
3.4 Investigação de HPU como proteína formadora de poros em células de glioma humano.....	36
4. Discussão.....	37
5. Perspectivas.....	39
6. Referências bibliográficas.....	39

RESUMO

Ureases, enzimas níquel dependentes que catalisam a reação de hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono, apresentam ampla distribuição em plantas, fungos e bactérias. Em plantas e fungos, as ureases são hexâmeros ou trímeros compostos por subunidades monoméricas. Em bactérias, as subunidades são heterodímeros ou heterotrímeros que se alinham na cadeia polipeptídica única das ureases vegetais, com as quais têm 50-60% de identidade de seqüência. A espiroqueta *Helicobacter pylori* é o agente etiológico de úlceras gástricas e, possivelmente, está envolvida no desenvolvimento de cânceres gástricos. O fato da urease de *Helicobacter pylori* ativar, em plaquetas sangüíneas, a rota de sinalização do ácido araquidônico, produzindo ácido 12-hidroxi(peroxi)-eicosatetraenóico pela ação da 12-lipoxigenase, sugere que esses importantes mediadores lipídicos podem contribuir para o processo inflamatório decorrente da infecção pelo *H.pylori*.

1. Introdução

1.1. Estrutura e função de Ureases

Ureases (uréia amidohidrolase; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes (Dixon *et al*, 1975) que catalisam a hidrólise de uréia a amônia e ácido carbâmico. 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, 1995; Sirko & Brodzik, 2000). A figura 1 ilustra as diferenças entre ureases vegetais e bacterianas, quanto às suas subunidades.

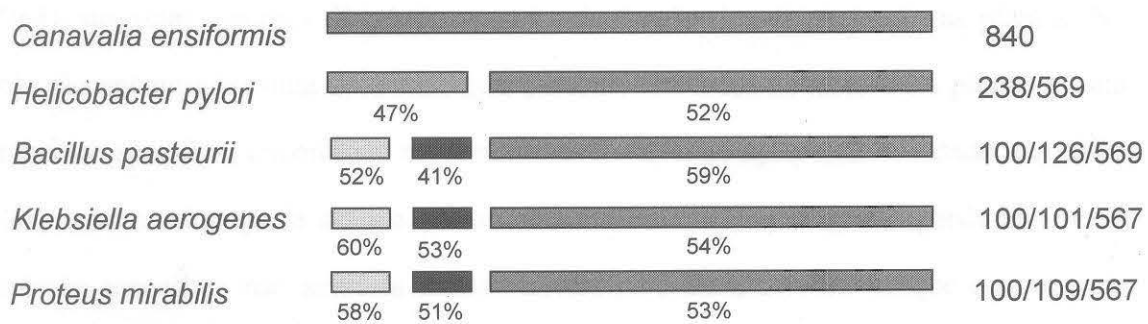


Figura 1. Estrutura das ureases: Ureases vegetais, como a de *Canavalia ensiformis*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem dois (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*). O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado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

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, ou com o uso de inibidores de urease ou por remoção do níquel, observa-se um acúmulo de uréia ou um comprometimento do emprego de uréia como fonte de nitrogênio (Polacco & Holland, 1993).

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 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).

1.2 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), e fungicida (Becker-Ritt *et al.*, 2007), o que reforça a hipótese de que as ureases estariam envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas (Carlini & Polacco, 2008).

Vários peptídeos internos da canatoxina já foram seqüenciados, obtidos por hidrólise triptica ou por endoproteínase Lys-C, revelando um alto grau de homologia com a seqüência primária da urease de *C. ensiformis*. A composição percentual de aminoácidos também é indicativa de uma grande semelhança entre as duas proteínas.

A partir dessa evidência a canatoxina foi caracterizada como uma variante da urease de *C. ensiformis*, apresentando-se em sua forma nativa como um dímero não covalente de cadeias de 95 kDa (Follmer *et al.* 2001). As duas isoformas de urease de *C. ensiformis* podem ser separadas por cromatografia de afinidade em metal imobilizado, sendo que a canatoxina apresenta maior afeição por metais (Zn^{++} e Co^{++}) do que a urease, permitindo 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 30-40% 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 outro domínio, níquel e tiol independentes, que seria responsável pelos seus outros efeitos biológicos (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2004a)

1.3 Efeitos biológicos da canatoxina

Estudos anteriores do grupo mostraram que 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 (DL_{50} 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 efeito 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, por exemplo, secreção de grânulos plaquetários e agregação plaquetária (Carlini *et al.*, 1985), secreção de dopamina e serotonina em sinaptossomas 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 *et al.*, 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, por exemplo, ácido nordihidroguaiarético e esculetina, e não por inibidores de cicloxigenases, como aspirina e indometacina (Benjamim *et al.*, 1992; Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991a,b; Ribeiro-Dasilva *et al.*, 1989b). A canatoxina também é capaz de afetar fluxos de Ca^{2+} através de membranas. Em vesículas do retículo sarcoplasmático, a canatoxina produz um efeito inibitório sobre o acúmulo de Ca^{2+} , que é resultante da atividade enzimática da $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+}$ -ATPase. 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). Ghazaleh *et al.*, 1997, demonstraram ainda que, em plaquetas ativadas por canatoxina, ocorre um influxo de cálcio do meio externo através de canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes, bloqueados por verapamil, e que não há geração de fosfatidilinositol-trifosfato (IP_3) ou liberação dos pools citoplasmáticos de Ca^{2+} .

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 pouch", mediada pela liberação de fatores quimiotáticos de macrófagos (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, em doses de 50 μg e 100 μg de canatoxina por pata. Este fenômeno parece ser mediado por metabólitos da lipoxigenase, provavelmente leucotrienos, que causam infiltração celular intensa no local da inflamação (Benjamin *et al.*, 1992).

A urease de *C. ensiformis* apresenta efeitos biológicos em comum com a canatoxina, como a ativação de plaquetas, interação com glicoconjugados polisialilados

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 μM de *p*-hidroximercuribenzoato perde totalmente a atividade ureolítica, mas mantém inalterada a sua atividade tóxica em camundongos, ainda induz agregação plaquetária, interage com glicolípídeos da membrana de hemácias 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* (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

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-mercuribenzoate	5 μM	0.5 μM
Acetohydroxamic acid	3 μM	3 μM
Metal content (per 95 kDa)	Nickel-1 mol/mol Zinc-1 mol/mol	Nickel-2 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 μg	1–2 μg
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 μg (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)	EC ₅₀ —2–3 μg (<i>p</i> -OHMB treated-100% active)

1.4 Eicosanóides

Os eicosanóides são autacóides derivados do ácido araquidônico por rotas metabólicas distintas, entre as quais a via das ciclooxigenases 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 hidroperóxidos de ácidos graxos (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 vários estados patológicos (Goetzl *et al.*, 1995).

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).

Os leucotrienos são considerados mediadores de distúrbios anafiláticos e inflamatórios (Engels & Nijkamp, 1998). Existem muitos indícios de que produtos da ação 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).

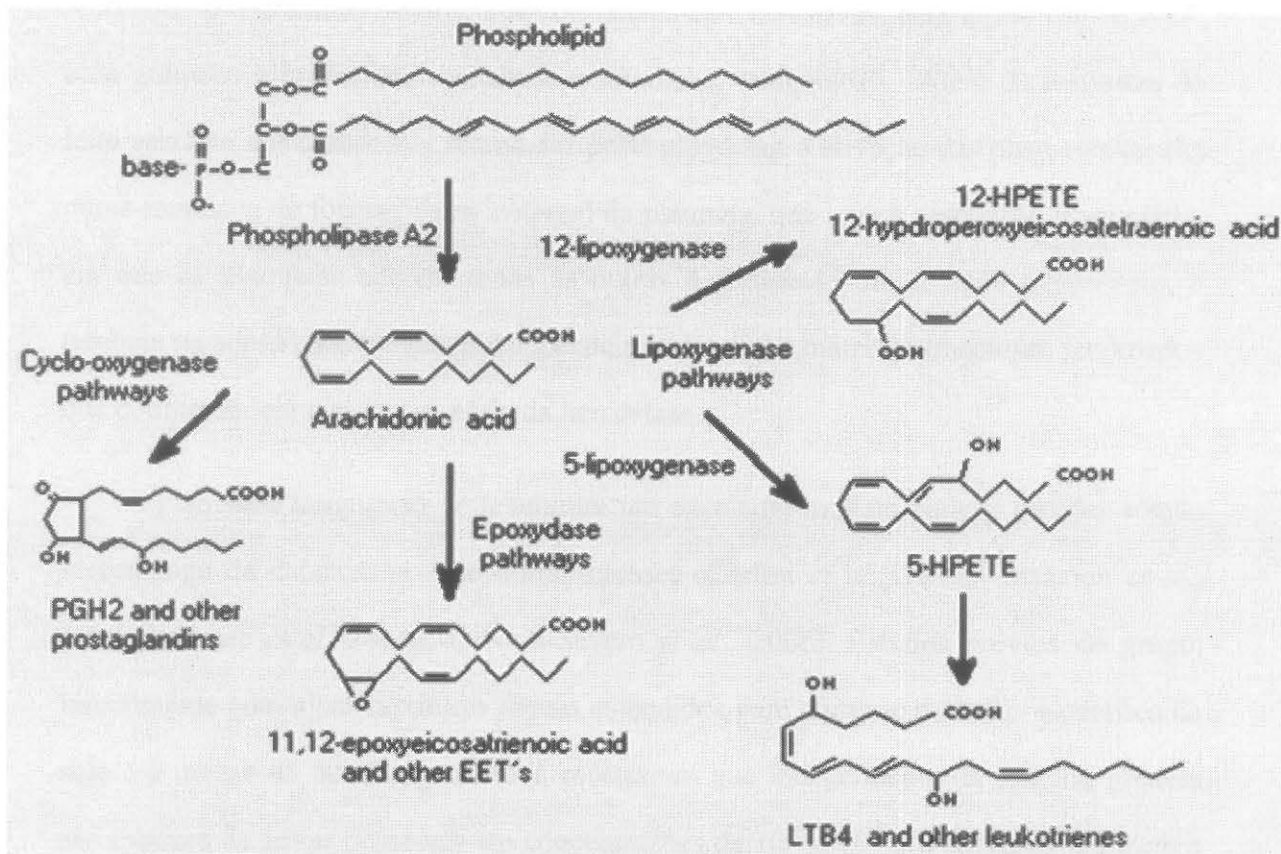


Figura 2: Principais vias do metabolismo dos eicosanóides. A liberação de ácido araquidônico, constituinte minoritário dos fosfolípídios de membranas, ocorre por hidrólise catalisada por fosfolipases tipo A2. Uma vez liberado, o ácido araquidônico será substrato para diferentes rotas metabólicas, particulares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

1.5. Plaquetas e agregação plaquetária

Plaquetas são microcélulas anucleadas com diâmetro aproximado de 2 – 3 μm que circulam em torno de 10 dias no sangue. No homem, a concentração plasmática normal de plaquetas é de 150 – 400 X $10^9/\text{L}$. Em resposta a agonistas fisiológicos tais como colágeno, trombina, ADP ou PAF (*platelet activating factor*), as plaquetas

secretam seus grânulos densos, que contêm aminas vasoativas, bem como Ca^{2+} e ATP, e/ou grânulos alfa, contendo enzimas e fatores de coagulação. Além de respostas do leito vascular aos compostos secretados pelas plaquetas, a ativação das plaquetas resulta numa mudança de forma (*shape change*) da plaqueta, que leva à agregação plaquetária, em que as plaquetas aderem umas às outras e formando um tampão plaquetário, e também na adesão das plaquetas à superfície endotelial e matriz extracelular, fenômenos que compreendem a etapa primária da hemostase.

Plaquetas sanguíneas se revelaram um excelente modelo para se estudar a ação secretagoga da canatoxina e de outras ureases (Carlini *et al.*, 1995; Ghazaleh *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2004a; Olivera-Severo *et al.*, 2006). Estudos prévios do grupo, inicialmente com a canatoxina, e depois estendidos para a urease embrião-específica da soja e a urease de *Bacillus pasteurii*, mostraram que independente da origem, ureases são capazes de ativar plaquetas em concentrações de 10^{-6} a 10^{-8} M. Ureases induzem a exocitose dos grânulos densos, sendo que o ADP liberado causa subsequente a agregação plaquetária, facilmente medida por variação da transmitância de luz em suspensões das plaquetas. A participação de metabólitos do ácido araquidônico da rota da 12-lipoxigenase, na ativação plaquetária induzida por ureases, foi inferida a partir do efeito de diferentes compostos que são inibidores de enzimas dessa rota (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991b; Olivera-Severo *et al.*, 2006).

A urease da bactéria *Helicobacter pylori* também ativa plaquetas sanguíneas, induzindo agregação plaquetária, recrutando a rota dos eicosanóides através da via da lipoxigenase (Wassermann, 2007).

1.6 *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 (Marshall e Warren, 1984). A partir de 1984, tornou-se cada vez mais evidente a associação de *H. pylori* com patologias gástricas e duodenais.

Atualmente, *H. pylori* é reconhecido como o agente patológico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal (NIH Consensus Conference, 1994). Estima-se que esse microrganismo possa ser encontrado em cerca de 50% da população mundial, e em países subdesenvolvidos, ocorrências de 70% a 90% são relatadas.

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 (Katoh *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 certas 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 localizadas 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) que transporta a proteína CagA para o interior de células eucarióticas (Censini *et al.* 1996; Figueiredo *et al.* 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que a infecção por *H. pylori* parece também estar associada a patologias não relacionadas ao trato gastrointestinal, como a púrpura trombocitopênica idiopática, doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (Mendall *et al.*, 1994; Pellicano *et al.*, 1999; Atherton, 2005; Jin *et al.*, 2007).

1.7 A urease de *Helicobacter pylori*

A urease é uma enzima bastante abundante em *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 nas concentrações submilimolares de uréia presentes nos fluidos humanos (Dunn *et al.*, 1990; Hu & Mobley, 1990).

A figura 3 ilustra a estrutura cristalográfica do monômero funcional da urease de *H. pylori*, composto de uma subunidade A e uma subunidade B (Ha *et al.*, 2001)

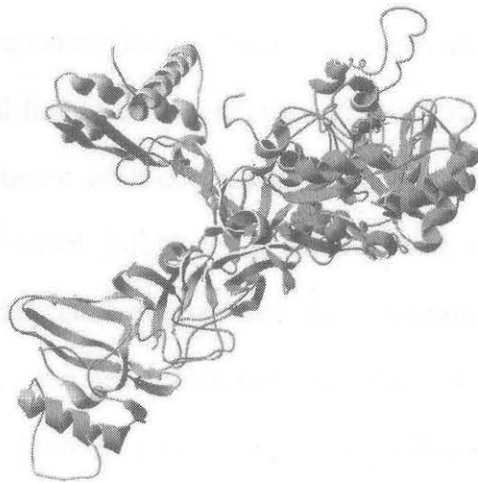


Figura 3: Estrutura cristalográfica do monômero funcional da urease de *H. pylori* (PDB: 1E9Y).

A subunidade A aparece em laranja e a subunidade B em verde. Os dois átomos de níquel do sítio ativo da urease, localizado na subunidade B, estão representados como esferas vermelhas.

Foram descritos pelo menos sete genes envolvidos na produção da urease de *H. pylori*. 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 da espiroqueta, atuando na internalização da uréia. Além desses genes, uma proteína transportadora de níquel é expressa a partir do gene *nixA* (McGee *et al.*, 1999; Mobley *et al.*, 1995).

O operon da urease de *H. pylori*, contendo os genes estruturais da proteína e genes de proteínas acessórias responsáveis pela montagem do seu metalocentro, foi clonado e expresso em *E. coli*, sendo que a enzima recombinante obtida apresentou atividade ureolítica semelhante ao tipo selvagem (Hu & Mobley, 1993).

A urease de *H. pylori* é considerada um fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador utilizado amplamente para fins diagnósticos (Krogfelt *et al.*, 2005). Mutantes de *H. pylori* urease negativos são incapazes de colonizar o estômago de 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 no lúmen gástrico, possibilitando sobrevivência das bactérias em ambientes de pH desfavorável. Inibidores de urease foram utilizados no tratamento de algumas destas patologias, contudo, 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 (Bailie *et al.*, 1986)

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). Extratos aquosos de *H. pylori* induzem em macrófagos *in vitro* um aumento da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Wilson *et al.*, 1996), resultando em grande liberação de óxido nítrico, o qual está associado à ativação de células do sistema imune no tecido lesado. A hidrólise de uréia, que difunde do leito capilar, pela urease e a conseqüente liberação de amônia resulta em danos celulares (Barer *et al.* 1988) e contribui para a 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.

As ureases de *B. pasteurii* (Olivera-Severo *et al.* 2006) bem como a urease de *H. pylori* (HPU) (Wassermann, 2007), induzem agregação plaquetária em concentrações submicromolares. Plaquetas participam da resposta inflamatória como um local de armazenamento de substâncias vasoativas e mediadores inflamatórios, bem como a geração de peróxidos e radicais hidroxil, que podem induzir perturbações microcirculatórias (Elizalde *et al.* 1977; Kalia *et al.* 2003). A figura 4 mostra dados da agregação plaquetária induzida por HPU, e que a ativação de plaquetas é acompanhada pela secreção de ATP a partir dos grânulos densos das plaquetas.

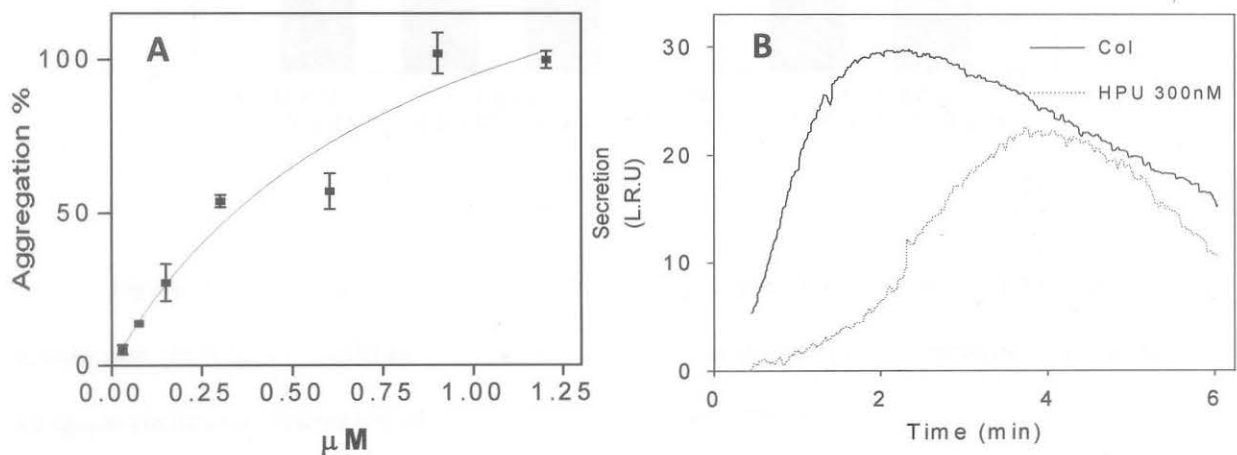


Figura 4: Ativação plaquetária induzida pela urease de *H. pylori*. A) Curva dose-efeito da agregação de plaquetas de coelho induzida por HPU. B) Medida da secreção de ATP (por luminescência) de plaquetas de coelho estimuladas por 300 nM HPU e por colágeno. Retirada de Wassermann, 2007.

Com o uso de inibidores específicos, Wassermann (2007) demonstrou ainda que a agregação de plaquetas induzida por HPU provavelmente envolve metabólitos do

ácido araquidônico através da via da 12-lipoxigenase, que é a isoforma da enzima presente em plaquetas (Nugteren, 1982). A figura 5 ilustra esses resultados.

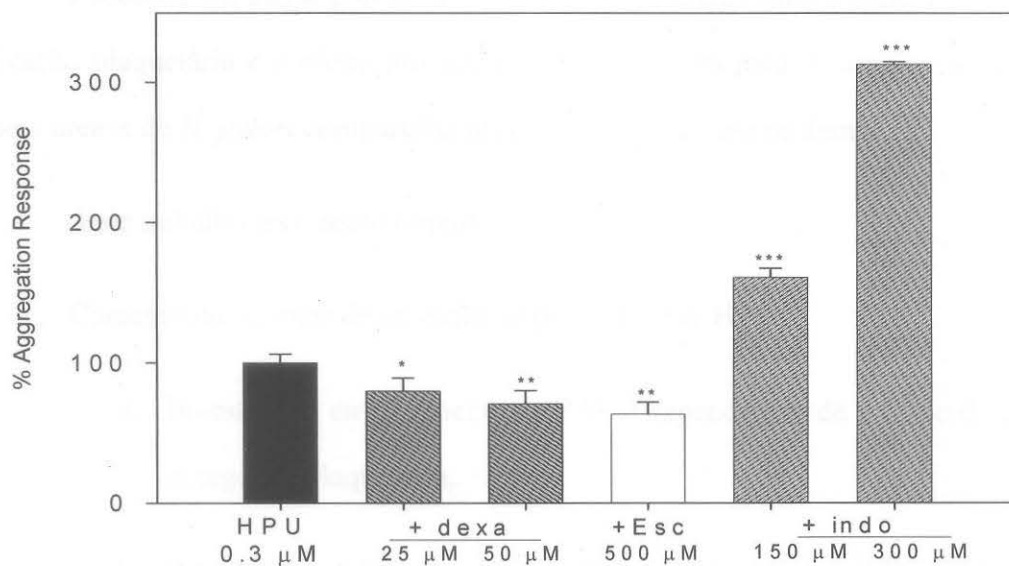


Figura 5. Envolvimento da fosfolipase A2 (inibida por dexametasona – dexam), da 12-lipoxigenase (inibida por esculetina – esc) e da ciclooxigenase (inibida por indometacina – indo) na agregação plaquetária induzida por HPU (retirada de Wassermann, 2007).

1.8 Objetivos

Baseados em dados prévios do nosso grupo, considerando o efeito secretagogo, a ativação plaquetária e o efeito pró-inflamatório descritos para a canatoxina, propomos que a urease de *H. pylori* compartilha propriedades com essa proteína.

Este trabalho teve como objetivos:

1. Caracterizar as rotas de ativação de plaquetas por HPU;
 - a. Investigar o envolvimento de PAF e dependência de influxo de cálcio na agregação plaquetária;
 - b. Investigar a ativação do metabolismo de eicosanóides, identificando metabólitos de 12-lipoxigenase plaquetária;
2. Verificar a capacidade de adesão da urease de *H. pylori* a membranas de plaquetas;
3. Investigar a urease de *H. pylori* como possível proteína formadora de poros em linhagens de gliomas.

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 ftsB5301 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) em 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 & Russel (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.

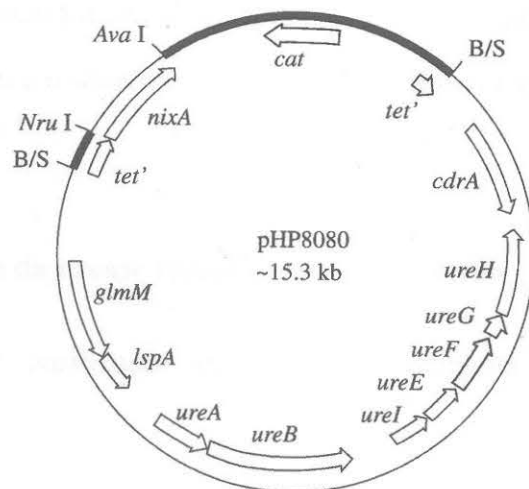


Figura 6: Estrutura do plasmídeo pHP8080, contendo o operon da urease de *H. pylori* linhagem 26695 (*ureABIEFGH*), o gene codificante para proteína transportadora de níquel (*nixA*) e marca de resistência para cloranfenicol (*cat*). Adaptado de McGee *et al*, 1999.

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

2.2.1 Pré-inóculo

Bactérias congeladas em nitrogênio líquido foram inoculadas em meio de cultura LB com cloranfenicol (20µg/ml). Este pré-inóculo foi cultivado *overnight* (~16 horas) a 37°C, e adicionados 5 ml, na proporção 1:100 v/v, em LB contendo cloranfenicol e Ni₂Cl (1µM). 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

O cultivo foi centrifugado em Sorvall-Plus RC5b, a 15000rpm, 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 ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos de 2 minutos, em banho de

gelo. Esse homogeneizado foi centrifugado a 15000 rpm, durante 20 minutos, o material insolúvel foi descartado e o sobrenadante denominado como Extrato bruto.

2.3 Purificação da urease recombinante de *H. pylori*

O método de purificação da HPU recombinante foi desenvolvido por Wassermann, 2007.

2.3.1 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose

O Extrato bruto foi submetido a cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (Amersham Biosciences), 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: 1ª eluição – Tampão de extração contendo 100 mM NaCl; 2ª eluição - Tampão de extração com 200mM NaCl; 3ª eluição - Tampão de extração com 300mM NaCl; 4ª eluição - Tampão de extração com 1M NaCl.

2.3.2 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q

A fração rica em atividade ureolítica oriunda da 2ª eluição da cromatografia em Q-Sepharose foi dialisada, para a eliminação do NaCl, e submetida a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna Source 15-Q (Amersham Biosciences), esta adaptada em sistema de FPLC (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão de extração pH 7,5, e o sistema foi programado para gerar um gradiente contínuo de 25% a 75% de 250 mM NaCl em 20mL de tampão de extração, para eluição da amostra. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram realizados ensaios de determinação de atividade ureolítica.

2.3.3 Cromatografia de exclusão molecular

A fração rica em urease, obtida na cromatografia de troca iônica Source 15-Q, foi concentrada em cartucho Centricon/Centriprep e então submetida a cromatografia de gel filtração em coluna Superose 6 (GE Healthcare) equilibrada com tampão de extração, em sistema de FPLC (Pharmacia), obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

2.4 Detecção de 12-HETE

Uma suspensão de PRP de coelho, num volume de 2mL (ver item 2.6) pré-incubada por 2 min. com 300nM de HPU foi submetida a agitação em vórtex de bancada, conforme descrito anteriormente. Plaquetas na ausência de HPU foram submetidas a agitação em vórtex, como controle negativo. As suspensões de plaquetas foram lisadas por centrifugação a 10000 g em metanol a frio. O sobrenadante recuperado foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna C-18 (CLC-ODS(M), Shimadzu) em sistema HPLC (Shimadzu). O material adsorvido à coluna foi eluído utilizando os tampões A (água:acetonitrila:ácido acético, 75:25:0,1) e B (metanol:acetonitrila:ácido acético, 60:40:0,1), em um gradiente de 50% a 90% de tampão B, com um fluxo de 1ml/min, monitorando-se a eluição por absorvância a 235nm. Como padrão foi utilizado ácido 12-hidroxi(peroxi)eicosatetraeínico autêntico (Cayman Biochemicals), cromatografado nas mesmas condições. Adaptado de Coffey *et al.*, 2004.

2.5 Medida de conteúdo protéico e atividade enzimática

2.5.1 Conteúdo Protéico

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada a partir da absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 280nm, utilizando cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm, ou através do método colorimétrico do Coomassie Blue, conforme Bradford, 1976.

2.5.2 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.

2.6. 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 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 (Born & Cross, 1963) usando um lumi-agregômetro (Chrono-Log Co. Havertown, Pa.) e registrados por 3 minutos. A agregação plaquetária também foi avaliada utilizando-se

leitor de microplacas SpectraMax (Molecular Devices, USA) como descrito em Olivera-Severo *et al.*, 2006a. Foram adicionados 100µL da suspensão de plaquetas em placa de 96 poços de fundo plano. HPU, inibidores e solução tampão (tampão de extração) foram adicionados para o volume final de 150µL. Após a adição de HPU, a placa foi incubada por 2 minutos a 37°C antes do início da agitação e leituras foram acompanhadas a cada 11 segundos em comprimento de onda de 650nm, durante 20 minutos. A mudança da turbidez foi medida em unidades de absorbância e os resultados expressos como a área sob a curva de agregação. Para os testes com inibidores, estes foram pré-incubados por 15 min. a 37°C com as plaquetas, antes da adição de HPU nas placas. O agonista fisiológico PAF (“platelet-aggregating factor”: 1-Oalkyl-2-acetyl-sn-glycero-phosphocholine) e seu antagonista Web 2170 (Bepafant; 5-(2-chloro-phenyl)-3,4-dihydro-10-methyl-3-[(4-morphol-inyl) carbonyl]-2H, 7H-cyclopenta (4,5) thieno [3,2-f] [1,2,4 triazolo-[4,3-a] [1,4] diazepine]) foram gentilmente cedidos pelo Dr. João Baptista Calixto, Depto. Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil. Verapamil (cloridrato de verapamil) foi adquirido do Laboratório Sandoz.

2.7 Ensaio de adesão de HPU a membranas de plaquetas

Nos ensaios de adesão a membranas de plaquetas, 1ml de HPU na concentração de 4µM em tampão de extração foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) com a adição de 1mg do marcador diretamente na amostra e permaneceu em contato por 16 horas a 4°C. Em seguida, esta solução foi submetida à diálise contra tampão de amostra 20mM NaPB, 5mM β-mercaptoetanol, 1mM EDTA pH 7,5, e posteriormente submetida a uma cromatografia em coluna Fast-Desalting (Amersham Biosciences) para

retirada de todo o FITC que não interagiu com HPU. Em seguida, 4mL uma suspensão de plaquetas de coelhos (PRP, em presença de plasma) foi posta em contato com 300nM de HPU-FITC, e agitada gentilmente utilizando vórtex de bancada por 5 min. PRP sem HPU foi submetido às mesmas condições de ensaio, como controle negativo. Em seguida, a suspensão de plaquetas foi centrifugada e o precipitado lavado duas vezes com tampão de extração e finalmente suspensas em volume final de 200µL foram e colocadas em lâminas de vidro para observação direta ao microscópio de fluorescência (Zeiss – Axiovert-200).

2.8 Tratamento de células de glioma humano

Células de glioma humano da linhagem A172 (ATCC, Rockville, Maryland, EUA; gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Guido Lenz, Depto. Biofísica-UFRGS) foram cultivadas em frascos estéreis de 25cm² com meio de cultura DMEM, suplementado com soro fetal bovino 10% e 4,5g/L de glicose, contendo 2,5mg/ml de fungizone® e 100U/L de gentamicina. Para o ensaio, 10.000 células de glioma humano foram tratadas com 1,41µM de HPU, adicionada diretamente ao meio de cultura, por 2 horas a 37°C, em atmosfera úmida e com 5% de CO₂. Células incubadas com o tampão de extração de HPU foram utilizadas como controle negativo.

Utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss – Axiovert-200), a detecção de células lisadas ou com alteração na permeabilidade da membrana foi feita utilizando iodeto de propídeo (5µM)(Sigma), um fluoróforo que é excluído de células saudáveis, sendo capaz de penetrar em membranas não íntegras e ligar em ácidos nucleicos, tornando-se assim fluorescente e podendo ser observado (Macklis & Madison, 1990). Como controle positivo, as células foram tratadas com Triton X-100 0,001% por 2 horas e depois expostas ao iodeto de propídeo.

2.9 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 Rota de ativação de plaquetas por HPU

Buscando investigar envolvimento do influxo de cálcio na agregação plaquetária induzida por HPU, utilizou-se diferentes concentrações de verapamil, um bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependente.

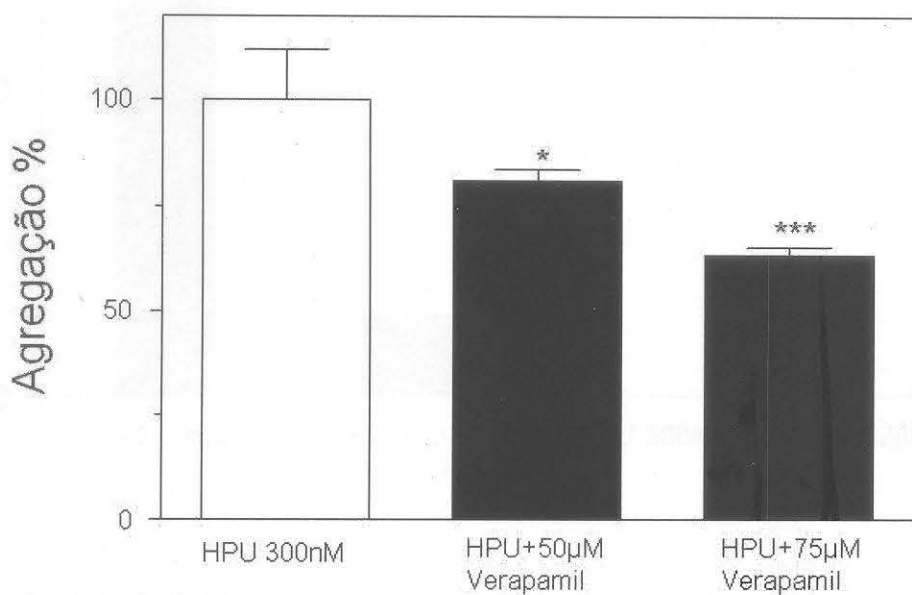


Figura 7. Efeito de verapamil na agregação induzida por HPU. PRP foi incubado por 15 min. na presença ou ausência de verapamil, nas concentrações indicadas, e a agregação foi iniciada com a adição de 300 nM HPU. A agregação foi monitorada em SpectraMax. Valores de $p < 0,05^*$ ou $p < 0,001^{***}$ foram considerados estatisticamente significativos.

A figura 8 apresenta a independência de PAF, conhecido ativador de plaquetas, na agregação plaquetária induzida por HPU.

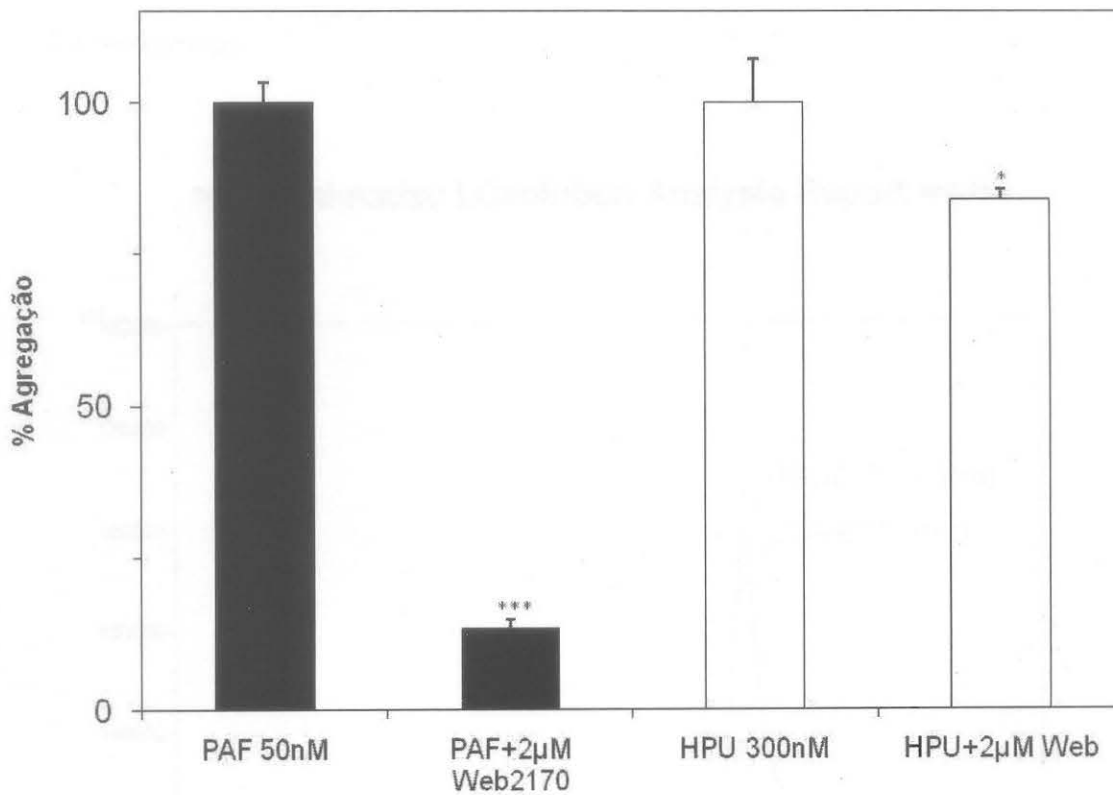


Figura 8. Efeito de Web2170, antagonista de PAF, na agregação induzida por HPU. Plaquetas foram incubadas por 15 min. a 37°C na presença ou ausência de Web2170 e a agregação foi iniciada com a adição de PAF ou HPU. A agregação foi monitorada a cada 11 segundos durante 20 min. em leitor de placas SpectraMax. Os resultados são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida pelo indutor, HPU ou PAF, para quatro replicatas. Valores de $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ou $p < 0,001^{***}$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.2 Detecção de 12-HETE em plaquetas agregadas por HPU

O cromatograma mostra que plaquetas agregadas por HPU produzem um metabólito que co-elui com 12-HETE, um derivado de ácido araquidônico na rota da 12-lipoxigenase.

==== Shimadzu LCsolution Analysis Report ====

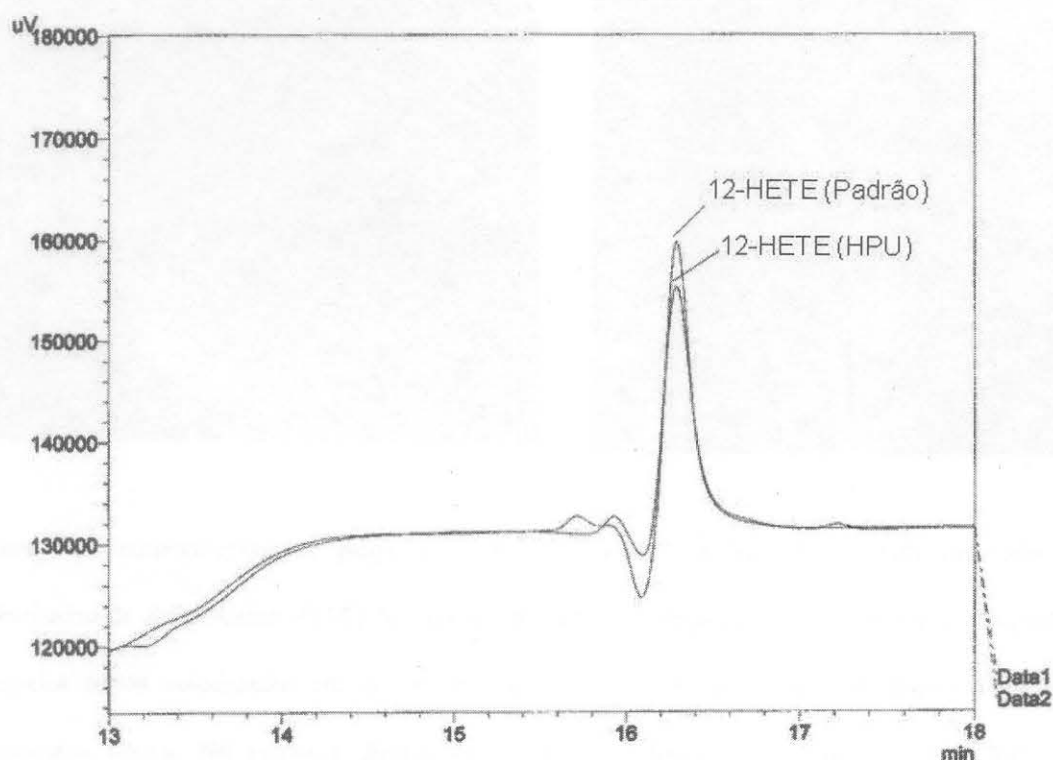


Figura 9. Perfil cromatográfico de 12-HETE autêntico e de um metabólito extraído de plaquetas ativadas por HPU em cromatografia de fase reversa em coluna C-18 (CLC-ODS (M)), em sistema HPLC (Shimadzu). O pico de 12-HETE (Cayman Biochemicals) é eluído em aproximadamente 16 minutos nas condições descritas por Coffey *et al.*, 2004.

3.3 Adesão da urease de *H. pylori* a membranas de plaquetas

A figura 10 mostra resultados com HPU marcada com FITC que sugerem uma interação específica de HPU com “receptores” de membranas em plaquetas.

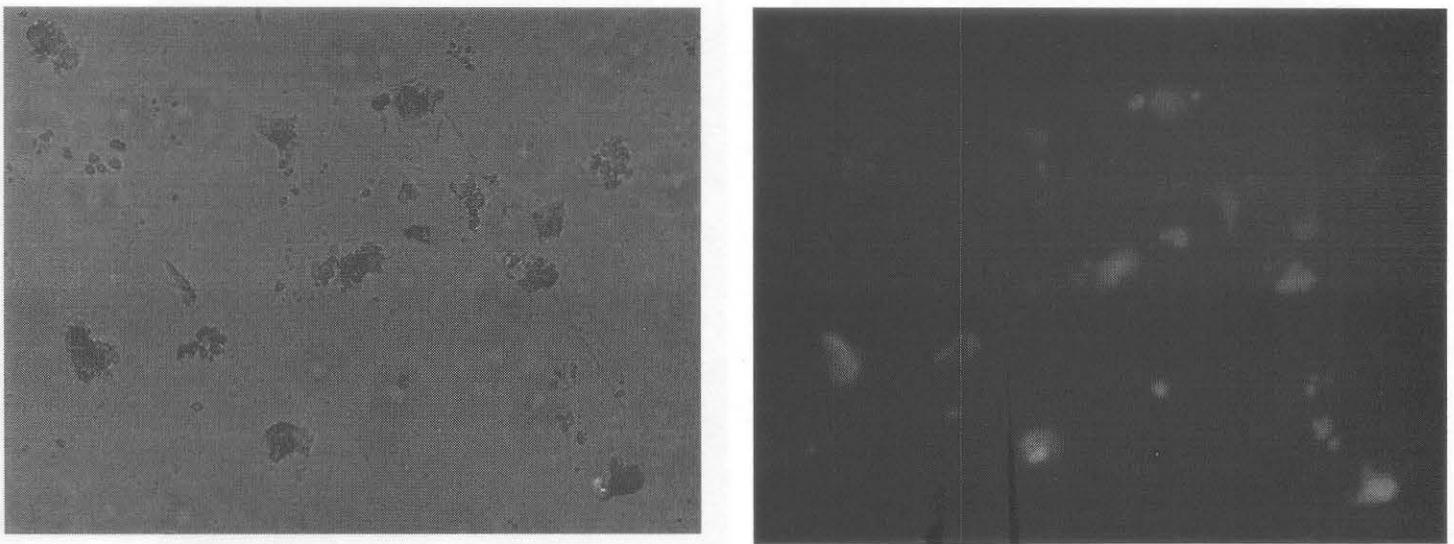


Figura 10. Fotomicrografia de plaquetas agregadas por HPU a 300nM. A HPU marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi usada para induzir agregação das plaquetas e em seguida os agregados foram visualizados em um microscópio (Zeiss – Axiovert-200). No painel á esquerda, microscopia óptica. No painel à direita, microscopia de fluorescência, utilizando um filtro para fluoresceína. Aumento 400 x.

Observar na figura que as hemácias residuais visíveis no campo à esquerda, não fluorescem (comparar à direita), evidenciando que a HPU-FITC ligou-se apenas aos agregados de plaquetas.

3.4 Investigação de HPU como proteína formadora de poros em células de glioma humano

A figura 11 mostra micrografias de células de glioma humano incubadas com HPU ou Triton X-100 por 2 horas.

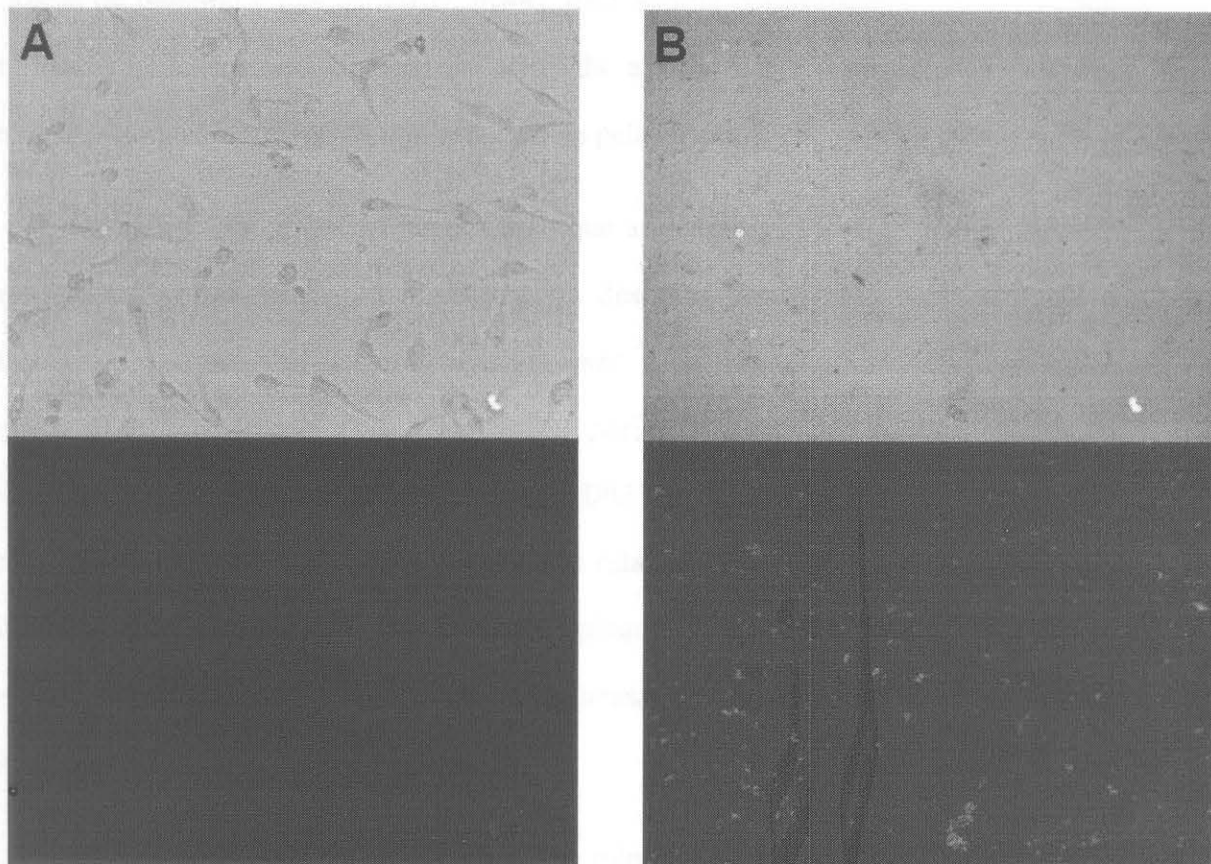


Figura 11. Células de glioma humano A172 após 2 horas de exposição a 1,41 μ M HPU ou Triton X-100 0,001%. Em A) Células tratadas com 1,41 μ M de HPU por 2 horas. Em B) Controle positivo, células tratadas com Triton X-100 por 2 horas. Painéis superiores: microscopia óptica. Painéis inferiores: os mesmos campos observados com microscopia de fluorescência, após tratamento com iodeto de propídeo, excitação em 515-560 nm usando filtro rodamina. Aumento 400 x.

Observar que em A, as células estão íntegras enquanto que em B, as células foram lisadas pelo detergente.

4. Discussão

As ureases são proteínas muito conservadas em relação à estrutura e atividade catalítica. A canatoxina, uma das isoformas de urease da *C. ensiformis*, apresenta diversas atividades farmacológicas independentes da atividade enzimática. Nossa hipótese de trabalho é que para o *H. pylori*, esta enzima possivelmente está envolvida em outros processos da patogênese além da alcalinização do ambiente gástrico, necessário para colonização da mucosa gástrica pela bactéria.

Os dados aqui apresentados mostram que a urease de *H. pylori*, em modelos *in vitro*, possui propriedades semelhantes às já descritas para outras ureases, como a canatoxina, a urease de *Canavalia ensiformis*, e a urease de *Bacillus pasteurii*. Verapamil, um bloqueador de canais de cálcio voltagem-dependentes, diminuiu consideravelmente a agregação induzida por HPU (Figura 7). A inibição da agregação de plaquetas tratadas com verapamil indica que esta resposta é dependente de influxo de cálcio do meio externo para o citoplasma das plaquetas. Essa observação coincide com resultados obtidos para a canatoxina em plaquetas, como descrito por Ghazaleh *et al.*, 1997.

Para complementar os estudos sobre as rotas de sinalização recrutadas por HPU para induzir agregação plaquetária, pré-tratamentos com Web2170 (antagonista de PAF) foram realizados. O resultado da figura 8 indica que a agregação plaquetária induzida por HPU é independente da síntese de PAF, um fosfolípido conhecido por seu potente efeito indutor de agregação e secreção em plaquetas. A resposta de plaquetas à canatoxina também foi descrita como sendo independente de PAF (Carlini *et al.*, 1985).

Estudos prévios do grupo (Wassermann, 2007) sugeriram que o efeito indutor de agregação plaquetária da urease de *H. pylori* seria mediado por eicosanóides da via de lipoxigenases. Tal inferência resultou do fato que inibidores específicos da 12-

lipoxigenase plaquetária, como ácido nordihidroguaiarético e esculetina, reduzem significativamente a resposta das plaquetas à HPU. Nesse trabalho, comprovamos que, de fato, o 12-HETE é produzido por plaquetas agregadas ativadas por HPU (Figura 9). O 12-HETE é um conhecido sinalizador de respostas inflamatórias celulares, como ativação de citocinas pró-inflamatórias e indução de apoptose em células do epitélio gástrico. Foi observada a mesma indução de metabólitos de lipoxigenases com plaquetas induzidas por colágeno, um ativador plaquetário fisiológico (Chen *et al.* 2008).

A urease de *H. pylori* parece interagir e ligar-se com membranas de plaquetas agregadas (Figura 10), indicando uma “especificidade” de ligação desta enzima com “receptores” presentes em plaquetas e ausentes em hemácias.

Os resultados apresentados na figura 11 corroboram dados prévios do nosso grupo, de que a urease de *H. pylori* realmente induz agregação de plaquetas, e não um efeito lítico que poderia também resultar na diminuição de turbidez da suspensão de plaquetas, como registrado no agregômetro. A concentração de HPU utilizada no ensaio com gliomas foi aproximadamente cinco vezes maior que a utilizada para agregar plaquetas. HPU não interfere na permeabilidade de membranas de células de glioma, comprovando a proposta de indução de secreção, e não de formação de poros. Estudos anteriores com canatoxina ativando plaquetas, sinaptossomas e células beta pancreáticas haviam demonstrado não haver extravasamento da lactato desidrogenase citoplasmática, indicando não ter havido lise celular.

Estudos epidemiológicos recentes mostram uma correlação positiva entre portadores de infecção com *H. pylori* e doenças cardiovasculares tromboembólicas (Atherton, 2005; Jin *et al.*, 2007). A propriedade da urease de *H. pylori* de agregar plaquetas pode ter um papel relevante no desenvolvimento dessas patologias (Pellicano *et al.*, 1999; Olivera-Severo *et al.*, 2006b).

A demonstração, nesse trabalho, da ativação da rota da lipoxigenase em plaquetas agregadas por HPU representa um passo importante na elucidação do papel desta enzima na virulência e patogenicidade de *H. pylori*.

5. Perspectivas

Ainda há muito a ser estudado a respeito das propriedades biológicas da urease de *H. pylori*. Os próximos experimentos a serem realizados visam: investigar a interação de HPU com receptores específicos em plaquetas; estudar a ativação celular e cascatas de transdução de sinal em neutrófilos, macrófagos e plaquetas ativadas por HPU; estudar o efeito de HPU na linhagem AGS de células de epitélio gástrico.

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. Atherton, J.C. (2005). The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. *Annual Review of Pathology* 1, 63-96.
4. Bailie, N.C. *et al.* (1986). Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles. *American Journal of Veterinary Research* 47(12), 2604-11.

5. Barer MJ, Elliott TSJ, Berkeley JE, Thomas JE, Estham EJ. (1988). Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol*; 41:597.
6. Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., & Carlini, C.R. (1991a). Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology* 128, 675-679.
7. Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., & Carlini, C.R. (1991b). Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29, 453-460.
8. 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.
9. Bennett, J. & Wren, E.A. (1977). Interaction of para-nitrophenyl carbamate with urease. *Biochim.Biophys.Acta* 482, 421-426.
10. 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, 248-254.
11. Carlini C.R. & Polacco, J.C. (2008). Toxic properties of urease. *Crop Sci.* 48, 1665-1672.
12. Carlini, C.R., Gomes, C., Guimarães, 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.
13. Carlini, C.R. & Guimarães, J.A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon* 19, 667-675.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Chen F.L. *et al.* (2008). 12-Lipoxygenase induces apoptosis of human gastric cancer AGS cells via the ERK1/2 signal pathway. *Digestive Diseases and Sciences* 53, 181-7.
18. Chen, M. *et al.* (2005). Activation of 12-lipoxygenase in proinflammatory cytokine-mediated beta cell toxicity. *Diabetologia* 48, 486-5.
19. Coffey M.J. *et al.* (2004). Platelet 12-Lipoxygenase activation via glycoprotein VI involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circulation Research* 94, 1598-1605.
20. Dixon, M.F. (1995). Histological responses to *Helicobacter pylori* infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 9, 467-486.
21. 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.

22. 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.
23. 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.
24. Elizalde, J.I., Gomez, J., Panes, J., Lozano, M., Casadevall, M., Ramirez, J., Pizcueta, P., Marco, F., deRojas, F.D., Granger, D.N., Pique, J.M. (1977). Platelet activation in mice and human *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Invest.* 100, 996-1005.
25. Engels, F. & Nijkamp, F.P; Pharmacological inhibition of leukotriene actions. (1998) *Pharm. World Sci.* 20, 60-65.
26. 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.
27. Figueiredo, C., Machado, J. C. & Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter*, 10 (Suppl. 1), 14-20.
28. Fishbein, W.N. (1969). Urease catalysis .3. stoichiometry kinetics and inhibitory properties of a third substrate: dihydroxyurea. *J Biol Chem* 244, 1188-93.
29. 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.

30. 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.
31. 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 Sci.* 167, 241-246.
32. 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.
33. Ghazaleh, F.A., Araujo, C.F., Barja-Fidalgo, C., Carlini, C.R. (1992). Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25, 1033-1035.
34. Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E.C., Carlini, C.R. (1997) Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 362-367.
35. Goodman, A.G., Hardman, J.G., Limbird, L.E. (2001). The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. The McGraw-Hill Companies. 669-685.
36. 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.

37. Goodwin, C.S. & Armstrong, J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9, 1-13.
38. Grassi-Kassisse, D.M. & Ribeiro-daSilva, G. (1992). Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions* 37, 204-9.
39. Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., Oh, B.H. 2001. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature structural biology.* 8, 505- 509.
40. 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, 419-25.
41. Honn *et al.* (1994). 12(S)-HETE enhancement of prostate tumor cell invasion: selective role of PKCa. *Journal of the National Cancer Institute* 86, 1145-51.
42. 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.
43. Hu, L.T. & Mobley, H.L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58, 992-8.
44. Hu, L.T. & Mobley, H.L. (1993). Expression of catalytically active recombinant *Helicobacter pylori* urease at wild-type levels in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 61, 2563-69.
45. Jin SW, Her SH, Lee JM, Yoon HJ, Moon SJ, Kim PJ, Baek SH, Seung KB, Kim JH, Kang SB, Kim JH, Kim KY. (2007). The association between current

- Helicobacter pylori* infection and coronary artery disease. The Korean journal of internal medicine 22,152-6.
46. Kalia N. & Bardhan, K.D. (2003). Of blood and guts: Association between *Helicobacter pylori* and the gastric microcirculation. J. Gastroenter. Hepatol. 18, 1010-1017.
47. 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.
48. 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.
49. Krogfelt, K. A., Lehours, P. & Mégraud, F. (2005). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. Helicobacter, 10 (Suppl. 1), 5-13.
50. Macklis, J.D. & Madison R.D. (1990) Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. J. Neurosci. Methods 31, 43-46.
51. Marshall, B.J. & Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1, 1311-1315.
52. Maskrey, B.H. et al (2007). Activated platelets and monocytes generate four hydroxyphosphatidylethanolamines via lipoxygenase. Journal of Biological Chemistry 282(28), 20151-163.

53. 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.
54. Megraud, F. (1995). Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 (Suppl 2), 85-91.
55. Mendall M.A., Goggin, P.M., Molineaux, N., Levy, J., Toosy, T., Strachan, D., Camm, A.J., Northfield, T.C. (1994) Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease. *Br. Heart J.* 71: 437-9.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. 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.
60. Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol Rev.* Sep; 59 (3):451-80.

61. Moreno, J.J. (2008). New aspects of the role of hydroxyeicosatetraenoic acids in cell growth and cancer development. *Biochem. Pharmacol.*, in press. doi:10.1016/j.bcp.2008.07.033
62. 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.
63. National institute of Health – Consensus Conference. (1994). *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *JAMA*; 272:65-9.
64. Nugteren, D.H. (1982). Arachidonic Acid-12-Lipoxygenase from Bovine Platelets. *Meth. Enzymol.* 86, 49-54.
65. Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. (2006a) Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 851 - 861.
66. Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Carlini, C. R. (2006b) *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 452, 149 – 155.
67. Pellicano, R. (1999). *Helicobacter pylori*: from the stomach to the heart. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 11(11), 1335-7.
68. 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.

69. Polacco, J.C. & Holland, M.A. (1993). Roles of Urease in Plant-Cells. *Int Rev Cytol.* 145, 65-103.
70. Polacco, J.C. & Winkler, R.G. (1984). Soybean leaf urease: A seed enzyme? *Plant Physiol.* Vol. 74, 800-803.
71. 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.
72. Ribeiro-daSilva, G., Pires-barbosa, R., & Carlini, C.R. (1989a). Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 387-395.
73. Ribeiro-daSilva, G., Pires-Barbosa, R., Prado, J.F., Carlini, C.R. (1989b). Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 107-110
74. Ribeiro-daSilva, G. & Prado, J.F. (1993). Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon* 31, 1131-1136.
75. 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.
76. 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.
77. Sambrook, J. & Russell, D. W. *Molecular Cloning*. 3^a ed. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

78. 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.
79. Sirko, A., & Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol.* 47(4), 1189-95.
80. Snider, R.M., McKinney, M., Forray, C., & Richelson, E. (1984). Neurotransmitter receptors mediate cyclic-gmp formation by involvement of arachidonic-acid and lipoxygenase. *PNAS* 81, 3905-9.
81. 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.
82. Stanley-Samuelson, D.W. & Ogg, C.L. (1994). Prostaglandin biosynthesis by fat body from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 481-491.
83. 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.
84. 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.
85. Tytgat, G.N. (1995). Endoscopic transmission of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 9 Suppl 2, 105-110.
86. 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.

87. Wassermann, G.E. (2007). Ureases de plantas e de bactérias: estudos funcionais e propriedades biológicas independentes da atividade enzimática. Tese (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
88. Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal Chem 39, 971-8.
89. Wen, Y. *et al.* (2007). The role of 12/15-lipoxygenase in the expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in macrophages. Endocrinology 148(3), 1313-1322.
90. 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, 1524-33.