

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

**Urease de *Helicobacter pylori* e hiperfosforilação da proteína Tau:
implicações para a Doença de Alzheimer**

Natalia Callai da Silva

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Biociências da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como um requisito parcial para a obtenção do
título Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Fernanda Stanisçuaski

Co-orientadora: Dra. Célia Regina Carlini

Porto Alegre, Julho de 2017

Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia, Instituto de Biociências da UFRGS e no Instituto do Cérebro da PUCRS, com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Membros da Banca Examinadora

Prof. Dra. Fernanda Stanisçuaski

Departamento de Biologia Molecular
e Biotecnologia, Instituto de Biociências – UFRGS

Prof. Dr. Fábio Klamt

Departamento de Bioquímica – UFRGS

Dr. Samuel Greggio

Centro de Pesquisa Pré-Clinica - Inscer - PUCRS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Fernanda, por ter aceito me guiar nessa etapa. Obrigada pelas boas conversas e ideias que sempre está disposta a compartilhar.

Agradeço a Célia, pela oportunidade de estagiar no Laprotox/LaNeurotox, pelo incentivo e apoio em perseguir novos rumos e novas investigações. Sua dedicação e capacidade de nos instigar a seguir adiante, frente a adversidades, a “olhar com outros olhos” e questionar sempre, é um grande exemplo para todos nós. Obrigada!

Agradeço aos colegas Adrielle, Augusto e Deiber, pela grande ajuda e parceria nesses 3 anos e pouco de Laprotox. O “grupo HPU” segue adiante! Obrigada pelas risadas, conversas, ensinamentos, paciência e disponibilidade que sempre tiveram! À Ângela, que junto comigo, encarou seus “medos” e embarcou junto nos experimentos, me ensinando muito, compartilhando risadas e também alguns momentos de tensão...

Agradeço aos colegas e amigos dos laboratórios Laprotox e LaNeurotox, por tornarem o dia-a-dia mais tranquilo, pelos cafés e bolos compartilhados, almoços no RU, jantinhas, etc. Sem a companhia de todos, o trabalho seria lento e faltaria “pique” para seguir adiante.

Aos amigos, longe ou perto, mas que estão sempre ao lado do coração. Obrigada por compartilharem as dores e as alegrias, sabendo sempre como oferecer uma palavra ou gesto de conforto, ou mandar uns “menes” para me oferecer uma escapada do estress.

Agradeço a minha família, que independente da hora e lugar, estão sempre prontos para uma palavra de incentivo, um gesto de carinho, umas (muitas) risadas e muita cumplicidade. Jaime, Rosana e Vitória, apesar de estarmos longe uns dos outros, a vida é muito mais colorida e divertida quando estamos juntos! Amo vocês, e sinto saudades todos os dias!

Agradeço ao Henrique, um grande incentivador dos meus sonhos! Obrigada pelo companheirismo sem fim, apoio incondicional e todo o amor que compartilhamos! Adoro estar com você.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE – Barreira hematoencefálica,

CNTX – Canatoxina,

DA – Doença de Alzheimer,

GSK-3 β - Glicogênio sintase quinase 3- β ,

HPU – Urease de *Helicobacter pylori*,

pTau205 – proteína tau fosforilada no sítio Thr 205,

SNC – Sistema nervoso central,

tTau – proteína tau total.

USA - *urea segregation agar*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A DA e a proteína tau hiperfosforilada,

Figura 2: Aspecto típico da *H. pylori*,

Figura 3: Estrutura das ureases,

Figura 4: Colonização por *H. pylori* e seu papel na inflamação gástrica,

Figura 5: Estrutura do plasmídeo pGEM-T Easy, contendo o operon da urease de *H. pylori*,

Figura 6: HPU purificada após a cromatografia de gel-filtração em Superdex S200,

Figura 7: *Western blotting* da proteína tau total,

Figura 8: Injeção intraperitoneal de urease de *Helicobacter pylori* (HPU) não induz alteração nos níveis de tau total,

Figura 9: *Western blotting* da proteína tau fosforilada no sítio Thr205,

Figura 10: Injeção intraperitoneal de urease de *Helicobacter pylori* (HPU) induz fosforilação da proteína tau no cérebro de ratos,

Figura 11: Avaliação da barreira hematoencefálica de ratos tratados com a HPU por via intraperitoneal.

SUMÁRIO

RESUMO	8
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 Doença de Alzheimer.....	10
1.2 Proteína Tau	10
1.3 <i>Helicobacter pylori</i>	12
1.4 Urease de <i>Helicobacter pylori</i> (HPU)	14
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVO	18
3.1 Objetivos Gerais	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Manipulação bacteriana	19
4.1.1 Construção.....	19
4.1.2 Linhagem, transformação e cultivo bacteriano	19
4.2 Expressão e purificação de urease recombinante de <i>H. pylori</i>	20
4.2.1 Pré-inóculo.....	20
4.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos	20
4.3 Purificação da urease recombinante de <i>H. pylori</i>	20
4.3.1 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose	20
4.3.2 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q.....	21
4.3.3 Cromatografia de gel-filtração Superdex S200.....	21
4.4 Detecção de atividade ureásica	21
4.5 Ensaio <i>in vivo</i>	22
4.5.1 Animais e tratamentos.....	22
4.5.2 Preparação dos extratos celulares.....	22
4.7 <i>Western blotting</i>	23
4.8 Análise estatística	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	28
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) é considerada a desordem neurodegenerativa mais comum em pessoas com idade acima de 60 anos, caracterizada por demência aliada a déficit de memória. Tem como alterações histopatológicas características a formação de placas senis - pelos depósitos do peptídeo beta-amilóide (A β), e os emaranhados neurofibrilares - constituídos pela deposição da proteína Tau hiperfosforilada. A função da proteína Tau, associada a microtúbulos nos axônios neuronais, é regulada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação, com mais de 80 sítios de fosforilação relatados. A literatura reportou que o filtrado de *Helicobacter pylori*, sem provocar a lise da bactéria, induz a hiperfosforilação da proteína Tau em diferentes sítios, *in vivo* e *in vitro*. Como não houve resposta inflamatória cerebral significativa, levantou-se a hipótese de que exotoxinas produzidas pela bactéria, capazes de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), induziram diretamente a fosforilação da tau. A espiroqueta gram-negativa *Helicobacter pylori* é um patógeno gástrico responsável pela gastrite crônica, úlcera péptica e duodenal, e câncer gástrico, infectando aproximadamente 60% da população mundial. Essa bactéria produz grandes quantidades de urease (HPU), enzima considerada um importante fator de virulência da bactéria, tendo nosso grupo já demonstrado a capacidade da HPU de induzir a ativação de neutrófilos humanos, protegendo-os contra apoptose e contribuindo para promoção de dano tecidual. O presente trabalho buscou investigar possíveis alterações promovidas por HPU em sítios de fosforilação da proteína Tau. Em ensaios realizados *in vivo*, ratos machos Wistar de 30 dias receberam diariamente uma dose intraperitoneal de 5 μ g dessa proteína durante 7 dias, sendo sacrificados no oitavo dia, e seus cérebros armazenado a -80 °C para posterior análise. No grupo controle foi administrado somente o veículo (solução salina estéril). O esquema de tratamento foi concebido para mimetizar uma infecção crônica por *H. pylori* em indivíduos jovens. Ensaios de *Western blotting* foram realizados, utilizando anticorpos anti-tTau e anti-pTau205, específicos para identificação da proteína Tau total do tecido e Tau fosforilada do sítio Thr205, respectivamente. Foi avaliado também a presença de HPU no tecido cerebral, utilizando anticorpo anti-ureB, específico para identificação da cadeia B da HPU. Os resultados indicam que a HPU aumentou significativamente a fosforilação da Tau no sítio Thr205, entretanto não houve detecção da HPU no tecido cerebral, sugerindo não haver danos a BHE. Esse achado reforça uma associação entre infecção por *H. pylori* e Doença de Alzheimer, indicada em estudos

epidemiológicos, e sugere uma contribuição da HPU na patogênese dessa doença neurodegenerativa.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Alzheimer

Com a progressiva melhora das condições para o bem-estar e saúde humana, e consequente aumento da expectativa de vida das pessoas, a humanidade vêm sofrendo uma grande transição demográfica. A sociedade está deixando de ser formada basicamente por jovens e adultos, e sim, em face do contexto atual, por pessoas cada vez mais idosas, com idade superior a 65 anos. É importante ressaltar, no entanto, que a maior expectativa de vida condiz com um maior número de pessoas acometidas por patologias relacionadas ao envelhecimento da população, como as doenças neurodegenerativas.

A doença de Alzheimer (DA) se destaca como patologia neurodegenerativa, caracterizada por demência aliada a déficit de memória, alterações de comportamento e incapacidade de realizar atividades rotineiras. Descrita em 1906, por observações do médico alemão Alois Alzheimer, é a principal causa de demência após os 60 anos de idade, sendo a desordem neurodegenerativa mais comum (Forman *et al.*, 2004; Querfurth and LaFerla, 2010). A DA acomete de 8 a 15% da população com mais de 65 anos de idade, correspondendo a mais de 35 milhões de pessoas, correspondendo a aproximadamente 60% dos casos de demência na população idosa (Philipson *et al.*, 2010; Querfurth and LaFerla, 2010).

Por se tratar de uma doença multifatorial, fatores genéticos, moleculares e ambientais estão envolvidos no seu desenvolvimento e progressão. As alterações histopatológicas originalmente descritas para a DA são a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares no tecido cerebral. As placas senis extracelulares são formadas por depósitos do peptídeo beta-amilóide (A β) e os emaranhados neurofibrilares são compostos por deposição da proteína tau hiperfosforilada (Selkoe, 2001).

1.2 Proteína Tau

A tau é uma proteína associada a microtúbulos, resultante do *splicing* alternativo de um gene localizado no cromossomo 17, denominado MAPT – *Microtubule-associated tau protein* (Goedert *et al.*, 1989). O cérebro humano adulto possui seis isoformas da proteína tau, que variam de 45 a 65 kDa, enquanto apenas uma isoforma está presente

durante os estágios fetais. Proteínas tau nativas são detectadas em trio (entre 55 a 74 kDa) em ensaios de identificação proteica por *Western blotting*. Quando fosforiladas, passam a ser detectadas em trio (entre 55 e 69 kDa), e uma banda minoritária de 74 kDa (Buée et al., 2000). A tau está envolvida na estabilização de microtúbulos, garantindo a organização funcional dos neurônios. A hiperfosforilação dessa proteína faz com que ela se desligue dos microtúbulos, promovendo a desestabilização destes, e deposição no corpo celular e dendritos de neurônios, na forma de emaranhados neurofibrilares (Golde, 2007; Ittner and Gotz, 2011), como ilustra a Figura 1

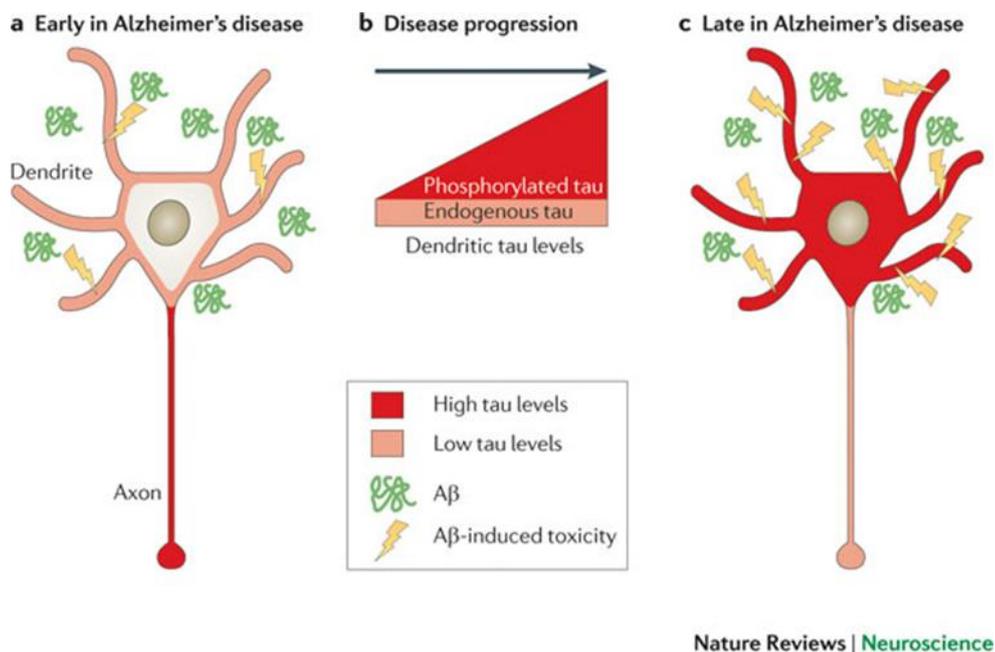


Figura 1: A DA e a proteína tau hiperfosforilada. Na DA a proteína tau se redireciona dos axônios para o corpo celular e dendritos devido ao seu desprendimento dos microtúbulos (Adaptado de Ittner e Gotz, 2011).

A regulação da tau a nível pós traducional ocorre através de mecanismos de fosforilação e desfosforilação, sendo que mais de 80 possíveis sítios de fosforilação ocorrem na proteína. Eles são compostos principalmente por resíduos de serina ou treonina, seguido de prolina. Diversas quinases e fosfatases têm a proteína tau como substrato, regulando o seu estado de fosforilação. Dentre estas, a glicogênio sintase quinase 3-β (GSK-3β) é a principal quinase com função de manter a estabilidade da tau. No entanto, quando ativada essa quinase também pode promover hiperfosforilação da tau, levando a formação de emaranhados neurofibrilares (Lovestone *et al.*, 1994).

1.3 *Helicobacter pylori*

A espiroqueta *H. pylori* é uma bactéria Gram negativa, microaerófila, com aproximadamente 3 µm de comprimento e 1 µm de diâmetro, com até 6 flagelos com cerca de 30 µm de comprimento em uma de suas extremidades (Figura 2) (Goodwin et al., 1990). Essa bactéria associa-se exclusivamente às células da mucosa gástrica de humanos (Yochiyama & Nakazawa, 2000), tendo sido isolada pela primeira vez em 1982 pelos australianos Barry J. Marshall e John R. Warren (Marshall & Warren, 1984).

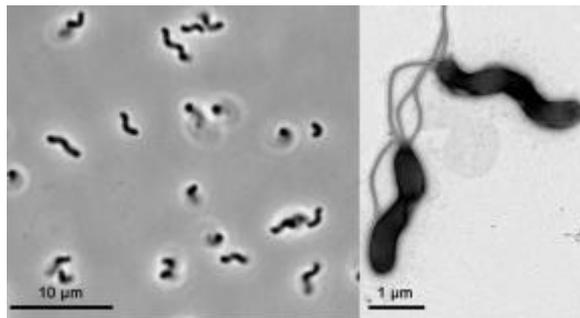


Figura 2: Aspecto típico da *H. pylori* (Sycuro et al., 2012)

Atualmente, o *H. pylori* é reconhecido como agente etiológico de gastrite crônica, úlcera péptica e duodenal, e câncer gástrico (IARC, 1994). Entretanto, como a infecção por *H. pylori* tende a persistir durante toda a vida do seu hospedeiro, muitos são os casos assintomáticos. Estimativas apontam que essa bactéria infecte aproximadamente 60% da população mundial (Carter et al., 2011). Em países subdesenvolvidos, onde condições sanitárias e econômicas são precárias, incluindo algumas regiões do Brasil, prevalências de 80% são relatadas (Wang e Peura, 2011).

A infecção por essa bactéria ocorre com colonização da mucosa gástrica, e é acompanhada pela infiltração de células do sistema imunitário circulantes, recrutadas ao sítio de infecção. A infiltração do tecido gástrico por neutrófilos é uma característica indicativa de doenças inflamatórias agudas ou crônicas causadas pela persistência de *H. pylori* na mucosa gástrica (D'Elios, Amedei et al., 2007; Elliott e Wallace, 1998), podendo levar a formação de tumores (Mantovani, Allavena et al., 2008). A intensidade da inflamação é variável, podendo ocorrer desde de uma inflamação mínima na lâmina própria, sem comprometer a estrutura da mucosa, até uma inflamação severa, com formação de micro abscessos (Genta e Graham, 1994). A intensidade dos danos à mucosa

está relacionada ao grau de infiltração de neutrófilos, que atuam na defesa contra agentes infecciosos (D'Elios, Amedei *et al.*, 2007; Elliott & Wallace, 1998).

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a infecção por *H. pylori* está relacionada com diversas patologias extra gastrointestinais, tais como cardiopatia isquêmica (Singh *et al.*, 2002), doenças cerebrovasculares (Grau *et al.*, 2001) e vasculares (Gasbarrini *et al.*, 1999), patologias estas também associadas com a doença de Alzheimer (de la Torre, 2006).

Outra correlação com a DA se dá pela alta incidência de *H. pylori* nesses pacientes (Roubaud-Baudron *et al.*, 2012; Kountouras *et al.*, 2006), bem como pela presença de anticorpos anti-*H.pylori* no fluido cefalorraquidiano destes (Kountouras *et al.*, 2009; Malaguarnera M., *et al.*, 2004). Além disso, Wang e colaboradores, 2015, reportaram que um filtrado de *H. pylori*, obtido sem lise da bactéria, foi capaz de induzir hiperfosforilação da tau em ratos, tanto em *in vivo* como *in vitro*, marcada pelo aumento da fosforilação em três sítios específicos da tau, Thr 205, Thr 231 e Ser 404. O filtrado de *H. pylori* também causou ativação da quinase GSK-3 β em células de neuroblastoma de camundongo (N2a). Entretanto, esse mesmo filtrado não induziu resposta inflamatória cerebral significativa. Com base nesses dados os autores sugeriram que a taupatia induzida por *H. pylori* teria como base exotoxinas produzidas pela bactéria, capazes de penetrar a barreira hematoencefálica e induzir diretamente a fosforilação da tau (Wang *et al.*, 2015).

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da infecção por *H. pylori*, incluindo diversas enzimas e proteínas tóxicas, como urease, catalase e proteases, além de proteína citotóxica CagA e da proteína vacuolizante VacA. A CagA é internalizada pela célula gástrica através de um sistema de secreção do tipo IV, sendo então fosforilada. A CagA fosforilada então causa danos a junção intracelular e mudanças na transdução de sinais intracelulares, alterando o crescimento e motilidade das células (Censini *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2013). A proteína VacA induz vacuolização citoplasmática nas células do epitélio gástrico, desregulando as vias de tráfego intracelular, e acionando mecanismos de apoptose e inflamação, e modulando funções de linfócitos T (Yamaoka, 2010).

1.4 Urease de *Helicobacter pylori* (HPU)

Ureases (ureia amidohidrolase; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes que catalisam a hidrólise da ureia a amônia e dióxido de carbono (Zerner, 1991), sendo produzidas por bactérias, fungos e plantas. Independente de sua origem, ureases são altamente conservadas, com cerca de 60% de identidade na sequência de aminoácidos. Enquanto que ureases de plantas e fungos possuem unidades funcionais compostas por apenas um tipo de cadeia polipeptídica (de aproximadamente 90 kDa), as ureases bacterianas possuem unidades funcionais compostas de duas ou três cadeias polipeptídicas diferentes (Mobley et al., 1995; Sirko and Brodzik, 2000) (Figura 3).

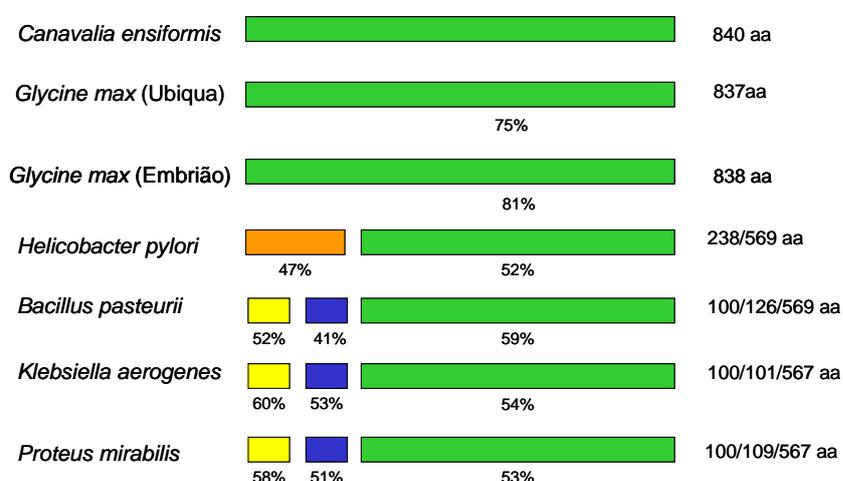


Figura 3: Estrutura das ureases. Enzimas vegetais, como a de *C. ensiformis*, possuem apenas uma subunidade, enquanto que ureases bacterianas possuem duas (*H. pylori*) ou três (*B. pasteurii*, *K. aerogenes*, *P. mirabilis*). O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A percentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de *C. ensiformis* está indicada abaixo das barras (adaptada de Oliveira-Severo et al., 2006).

Estudos do nosso grupo revelaram o potencial entomotóxico, antifúngico e neurotóxico das ureases, sendo essas propriedades independentes da atividade ureolítica (Stanisçuaski & Carlini, 2012; Postal et al., 2012; Carlini & Ligabue-Braun, 2016). A canatoxina (CNTX), proteína isolada a partir do extrato bruto de sementes de *Canavalia ensiformis* (Carlini & Guimarães, 1981), foi caracterizada como uma isoforma de urease (Follmer et al., 2001) e demonstrou atividade neurotóxica em mamíferos, se injetada intraperitonealmente (ip) ou por outras vias, promovendo convulsões tônicas que antecedem a morte dos animais. Propriedades biológicas independentes da ureólise, como as das ureases de *C. ensiformis*, foram descritas também para duas isoformas da urease

de soja (*Glycine max*), urease de algodão, urease de *Bacillus pasteurii* e urease de *Helicobacter pylori* (HPU) (Carlini & Ligabue-Braun, 2016). Propriedades neurotóxicas foram reportadas para HPU a partir da injeção de extrato dessa bactéria, bem como da urease purificada em ratos, provocando hipotermia, convulsão e morte (Baik *et al.*, 2005), exatamente os mesmos sintomas observados para animais tratados intraperitonealmente com CNTX (Carlini & Guimarães, 1984).

A HPU é altamente expressa por essa bactéria, constituindo de 10% a 15% do total de proteínas. Sua unidade funcional é composta por duas cadeias polipeptídicas (UreA [30 kDa] e UreB [62 kDa]) em proporção 1:1, com organização quaternária dodecamérica e massa molecular de aproximadamente 1,1 MDa (Ha *et al.*, 2001). A HPU é considerada um importante fator de virulência, permitindo a sobrevivência da bactéria na mucosa gástrica através da formação de microclima neutro em um ambiente extremamente ácido (Figura 4). Além disso, é um marcador amplamente utilizado para diagnóstico da infecção por *H. pylori* (Krogfelt *et al.*, 2005). Embora inibidores da atividade enzimática da urease terem sido utilizados para tratamento das patologias causadas por *H. pylori*, o uso destes foi descontinuado após muitos pacientes apresentarem reações adversas. No caso do inibidor ácido acetohidroxâmico, seu uso clínico pode causar depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, e em doses elevadas mostrou ser teratogênico (Bailie *et al.*, 1986).

Estudos prévios do nosso grupo mostraram que a HPU possui propriedades biológicas independentes de sua ação enzimática, sendo capaz de induzir exocitose e agregação plaquetária, acompanhadas de ativação da rota dos eicosanoides pela via da 12-lipoxigenase (Wassermann *et al.*, 2010). A HPU também ativa neutrófilos humanos *in vitro*, protegendo-os contra apoptose e induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Ensaio *in vivo* demonstraram ainda que a HPU induz inflamação no modelo de edema de pata em camundongo, caracterizada por uma grande infiltração de neutrófilos (Uberti *et al.*, 2013).

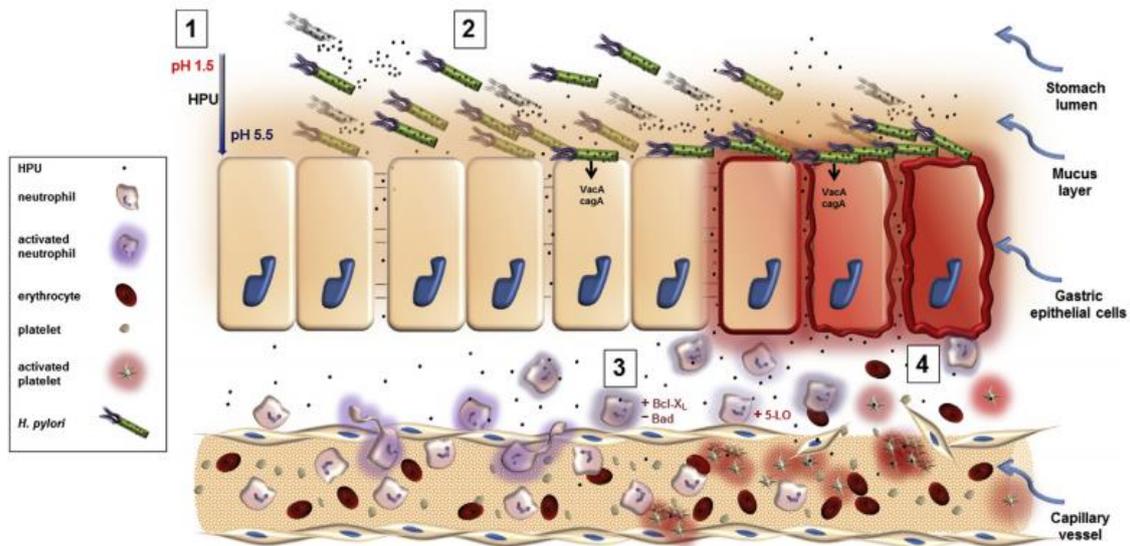


Figura 4: Colonização por *H. pylori* e seu papel na inflamação gástrica. O início da infecção se dá quando a bactéria penetra a mucosa gástrica e alcaliza o pH do meio através da ação da urease, criando assim um microclima, e permitindo a colonização (1); a bactéria então adere-se a superfície das células epiteliais gástricas, e através de um sistema de secreção tipo VI injeta citotoxinas, como as proteínas CagA e VacA. Com a autólise da bactéria, a urease é liberada ao meio, e atua sobre junções intercelulares, comprometendo a função de barreira das células epiteliais gástricas (2); a urease difunde-se e chega ao leito vascular, ativando plaquetas e neutrófilos, ampliando a resposta inflamatória local, podendo causar efeitos extra-gástricos (3); neutrófilos ativados causam dano tecidual por estresse oxidativo, liberando espécies reativas de oxigênio (4) (retirado de Uberti *et al.*, 2013).

Sabe-se também que a urease de *H. pylori* danifica junções oclusivas e a função de barreira do epitélio gástrico, por um mecanismo que também envolve aumento da fosforilação de proteínas, no caso, da cadeia leve de miosina (Wroblewski *et al.*, 2009). Esse achado levanta a hipótese de que a HPU possa estar envolvida em quadros inflamatórios em que ocorrem alterações da barreira hematoencefálica e comprometimento do SNC, como na taupatia da DA.

2 JUSTIFICATIVA

Por ser uma doença multifatorial, bem como por sua esporadicidade, fatores ambientais provavelmente têm um papel importante na patogenicidade da DA. Existem evidências que sugerem associação entre infecção por *H. pylori*, bactéria que infecta mais da metade da população mundial, e um aumento do risco de desenvolvimento da DA.

Pela prevalência crescente e grau de incapacitação gerada pela DA, é de interesse de saúde pública a investigação do papel da *H. pylori* na etiologia dessa taupatia. Neste contexto, pelo papel crucial da urease como fator de virulência da bactéria, e pela possibilidade de envolvimento dessa proteína em outras patologias extra-gástricas, torna-se importante avaliar a toxicidade da HPU sobre células do sistema nervoso central em modelos *in vivo*.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a possível participação da urease de *H. pylori* (HPU) nos mecanismos de regulação da fosforilação da proteína tau *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a HPU, quando administrada intraperitonealmente em ratos, interfere nos níveis totais da proteína tau;
- Verificar se a HPU, quando administrada intraperitonealmente em ratos, interfere no grau de fosforilação no sítio Thr-205 da tau;
- Verificar se a HPU pode ultrapassar a barreira hematoencefálica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Manipulação bacteriana

4.1.1 Construção

Para a expressão da urease recombinante, foi utilizado o plasmídeo pGEM-T Easy (Promega) contendo o operon da urease de *H. pylori* (gentilmente cedido pela Dra. Barbara Zambelli - Università di Bologna, Itália). A figura 5 mostra a estrutura do plasmídeo pGEM-T Easy recombinante.

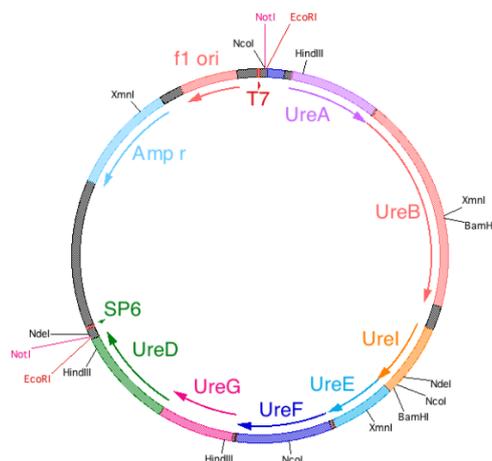


Figura 5: Estrutura do plasmídeo pGEM-T Easy, contendo o operon da urease de *H. pylori*

4.1.2 Linhagem, transformação e cultivo bacteriano

Células da linhagem BL21 (DE3)-RIL de *Escherichia coli* foram utilizadas para a expressão da urease recombinante de *H. pylori*. O meio de cultura utilizado para o cultivo de *E. coli* foi o LB (Luria-Bertani) em pH 7,0, sendo composto de triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e NaCl (10 g/L). Para meio sólido foi adicionado 1,5% m/v de ágar.

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* (USA) (4 g/L de triptona, 4 g/L de extrato de levedura, 340 mg/L de fosfato de sódio monobásico, 1 g/L de fosfato de sódio bibásico, 1 g/L de gelatina, 15 g/L de ágar, 90 mg/L de glicose, 60 mg/L de ureia e 35 mg/L de fenol red) (Hu et al., 1993), após uma hora de recuperação em meio LB a 37°C. Plaqueadas neste meio, colônias produtoras de HPU são identificadas por uma coloração rosada.

4.2 Expressão e purificação de urease recombinante de *H. pylori*

4.2.1 Pré-inóculo

Colônias mantidas em nitrogênio líquido foram inoculadas em meio de cultura LB com cloranfenicol (40 µg/ml) e ampicilina (100 µg/ml). Este pré-inóculo foi cultivado *overnight* (16 horas) a 37 °C, sob agitação (180 rpm) e adicionado, a uma proporção 1:100, em LB estéril contendo antibióticos (cloranfenicol 40 µg/ml; ampicilina 100 µg/ml) e mantidos sob as mesmas condições de agitação e temperatura, até atingir OD 0,6. Foi realizada, então, a indução da expressão pela adição de IPTG (500 µM), NiCl₂ (500 µM), e ampicilina (100 µg/mL), sob as mesmas condições de agitação usadas anteriormente, a 25 °C, *overnight*.

4.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos

Após o período de indução da expressão, o cultivo celular foi centrifugado para coleta das células (10.000 x g, a 4 °C, 20 minutos). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado com as células foi suspenso em tampão 20 mM tampão fosfato de sódio, pH 7.0 (tampão de extração).

As células suspensas foram lisadas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos (40 kHz) de 1 minuto, com intervalos de 3 minutos, em banho de gelo. Esse homogenado foi posteriormente centrifugado em 15.000 x g, 4 °C, 20 minutos. O material insolúvel foi descartado e o sobrenadante, após filtração em 0.22 µm e diálise contra tampão fosfato pH 7,0, foi denominado extrato bruto.

4.3 Purificação da urease recombinante de *H. pylori*

O método utilizado neste trabalho teve como base o protocolo original desenvolvido por Wassermann *et al.*, 2010 e foi adaptado ao longo desse trabalho.

4.3.1 Cromatografia de troca iônica Q-Sepharose

O Extrato bruto foi submetido a cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (GE Healthcare), em um cromatógrafo ÄKTA Purifier (GE Healthcare), tendo sido a resina previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,0. A eluição foi realizada em gradiente contínuo de 25-75% de 20 mM tampão fosfato de sódio, 500 mM NaCl pH 7,0. A fração rica em atividade ureolítica oriunda da cromatografia de troca

iônica em Q-Sepharose foi dialisada, para a retirada do NaCl, e concentrada em membrana de corte 30 kDa (Amicon, Millipore).

4.3.2 Cromatografia de troca iônica Source 15-Q

A amostra concentrada da Q-Sepharose foi submetida a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna Source 15-Q (Amersham Biosciences), adaptada em sistema ÄKTA (GE Healthcare), previamente equilibrada com tampão de extração pH 7,5. O sistema foi programado para gerar gradiente contínuo de NaCl de 25-75% a partir da solução 500 mM no tampão de extração, em um volume total de 20 mL, para eluição da amostra. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram feitos ensaios de determinação de atividade ureolítica.

4.3.3 Cromatografia de gel-filtração Superdex S200

A fração rica em atividade ureásica proveniente da cromatografia de troca iônica Source 15-Q foi concentrada em uma membrana de corte 30 kDa (Amicon, Millipore) e então submetida a cromatografia de gel filtração em coluna Superdex S200 (GE Healthcare), equilibrada com 20 mM tampão fosfato de sódio, 150 mM NaCl pH 7,5 e acoplada a sistema ÄKTA (GE Healthcare), obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

4.4 Detecção de atividade ureásica

Alíquotas de amostras de todas as etapas da purificação foram incubadas com 0,1 M de ureia, a 37 °C, em tampão PBS pH 7,0 (tampão fosfato 20 mM, 150 mM NaCl pH 7,0). A amônia liberada pela urease foi quantificada colorimetricamente pelo método de fenol-hipoclorito (Weatherburn MW, 1967), com uma curva padrão de sulfato de amônio de 15 a 350 nM. Uma unidade enzimática de urease foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de amônia por minuto, em pH 7,0 a 37 °C.

4.5 Ensaaios *in vivo*

4.5.1 Animais e tratamentos

A manutenção dos animais e os procedimentos experimentais foram conduzidos em parceria com a Prof. Dra. Célia Carlini no LaNeurotox, InsCer/PUC-RS, seguindo estritamente procedimentos aprovados pela CEUA/PUCRS, parecer 14/00414.

Foram utilizados 24 ratos machos Wistar, de 30 dias, mantidos sob ciclo claro/escuro 12h/12h, temperatura ambiente 22 ± 2 °C, alimentados *ad libitum* e com livre acesso a água, sob os cuidados do Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE-PUCRS). Considerando que a infecção por *H. pylori* perdura durante toda a vida do hospedeiro, com o primeiro contato ocorrendo ainda na infância, selecionamos animais jovens e saudáveis para mimetizar uma infecção crônica pela bactéria e investigar o seu papel na fosforilação da tau em estágios iniciais da vida adulta. Os animais foram separados em dois grupos ($n=4$), e os experimentos foram repetidos três vezes, nas mesmas condições. Animais do grupo controle receberam solução salina estéril administrada intraperitonealmente. Animais do grupo tratado receberam doses diárias de 5 µg de HPU, administradas intraperitonealmente. As injeções de 200 µL foram administradas no quadrante inferior do abdomen, intercalando os lados direito e esquerdo, durante sete dias. No oitavo dia, os animais foram anestesiados com solução cetamina 5%, xilazina 2% e eutanasiados por decapitação, com guilhotina especial para roedores.

4.5.2 Preparação dos extratos celulares

Os cérebros dos animais de cada grupo foram dissecados, separados e foi coletada uma fração medial do tecido, contendo hipocampo e lobo temporal do cérebro de cada animal. Os tecidos de cada animal foram homogeneizados individualmente em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 1 mM inibidor de protease, 1 mM Na_3VO_4) com auxílio de pistilo para microtubo Eppendorf. Posteriormente, os homogenados foram centrifugados (12.000 x *g*, 10 minutos, a 4 °C). As frações sobrenadantes foram coletadas e armazenadas a -80 °C para posterior uso.

4.6 Quantificação proteica

A quantificação proteica das amostras de urease foi realizada a partir da absorção no ultravioleta em comprimento de onda 280 nm, utilizando cubetas de quartzo com passo

óptico de 1 cm. Para os lisados celulares, o conteúdo proteico foi medido através do método de Bradford, 1976 (Bradford, 1976).

4.7 Western blotting

Os lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol) por fervura em “banho-maria” por 5 minutos. As amostras (25 µg de proteína total) foram resolvidas em SDS-PAGE 10%. Marcadores de massa molecular (“PageRuler”, Thermo-Scientific) foram utilizados para estimativa das massas moleculares das proteínas de interesse. As proteínas foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare) com porosidade de 0,22 µm. As membranas foram então bloqueadas com Tween-PBS (tampão fosfato pH 7,4, 0,1% Tween-20) contendo 5% BSA, e como sondas foram usados os seguintes anticorpos primários: monoclonal anti-Tau5 (Invitrogen), produzido em rato, na diluição 1:1.000; policlonal anti-pTau205 (Invitrogen), produzido em coelho, na diluição 1:1.000; e anti-ureβ (cadeia beta da HPU) (Santa Cruz Biotech), produzido em coelho, na diluição 1:10.000. Após extensiva lavagem com Tween-PBS, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com anticorpos secundários IgG anti-rato e anti-coelho conjugados à peroxidase, na proporção 1:15.000 por uma hora. Proteínas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência, utilizando-se o substrato Luminata Forte Western HRP (Millipore), em câmara escura de 1 a 45 minutos, e a fluorescência foi registrada em filme fotográfico. As imagens das bandas fluorescentes foram quantificadas por densitometria usando QuantityOne Software (BioRad).

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados por teste t Student, utilizando o programa GraphPad Prism 6, e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das adaptações realizadas no método de Wassermann *et al.*, 2010, obtivemos uma melhora na qualidade e no rendimento da urease purificada. As principais mudanças incluíram a troca de vetor de expressão, que carrega como inserto todo o operon da urease de *H. pylori*, composto pelos dois genes estruturais *ureA* e *ureB* e mais os genes de 5 proteínas acessórias, para o sistema pGEM-T Easy, e a expressão em *E. coli* linhagem BL21(DE3)-RIL. A otimização desse novo protocolo também incluiu uma segunda cromatografia de troca iônica, que permitiu uma separação melhor da proteína, resultando em uma urease altamente purificada (Figura 6). Essa urease, foi então utilizada nos experimentos *in vivo*, em uma dose de 5 µg/animal/dia. Esse esquema foi concebido para mimetizar uma infecção crônica por *H. pylori* em indivíduos jovens.

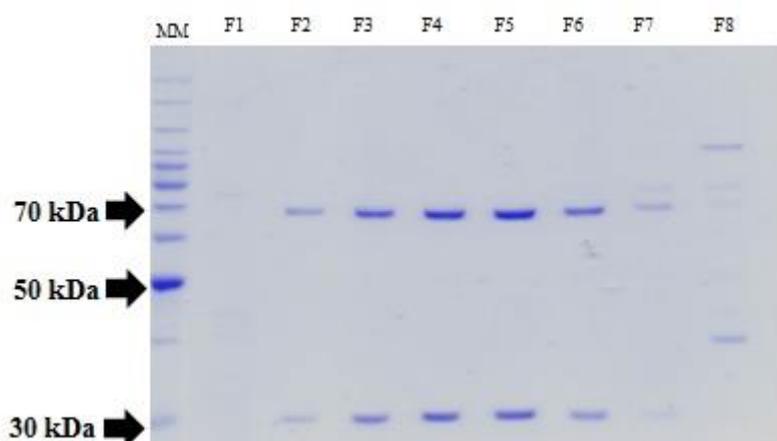


Figura 6: HPU purificada após a cromatografia de gel-filtração em Superdex S200. Frações (F1 a F8) foram resolvidas em SDS-PAGE 10%. As frações F2 a F6 continham urease altamente purificada, mostrando somente as subunidades da HPU (cadeia A, 62 kDa; cadeia B, 30 kDa). Foram aplicados 25 µg de proteína por poço, e o gel foi corado com Coomassie Blue. (MM), marcadores de massa molecular (“PageRuler”, Thermo-Scientific).

Considerando os efeitos de filtrados celulares de *H. pylori* sobre a fosforilação da proteína tau reportados por Wang *et al.*, 2015, neste trabalho buscamos investigar a possível participação da HPU nesse processo. Para verificar um possível efeito da HPU sobre o conteúdo total de proteína tau no cérebro dos animais tratados, foram realizados ensaios de *Western blotting*, utilizando anticorpo monoclonal anti-Tau5 (Figura 7). Para isso, uma fração dos homogenados de cérebro dos animais de cada tratamento de um

mesmo dia de experimento foram reunidas, para representar uma média de cada grupo experimental. A quantificação por densitometria revelou não haver diferença significativa em relação ao nível de tau total entre os grupos controle e tratado (Figura 8). Esse dado corrobora os descritos por Wang *et al.*, 2015, em que não foi detectada mudanças nos níveis de tau total no grupo tratado com filtrado de *H. pylori*.

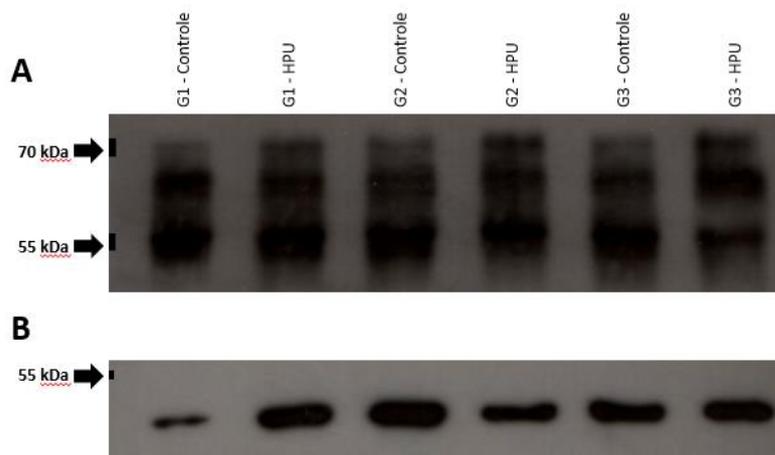


Figura 7: *Western blotting* da proteína tau total. Ratos Wistar machos de um mês receberam injeção intraperitoneal de HPU por 7 dias (5 µg/rato/dia), e o mesmo volume de solução salina estéril foi administrado no grupo controle. Ensaios de *Western blotting* foram realizados com homogenados dos cérebros dos animais de três experimentos independentes (G1, G2, G3), compostos de dois grupos cada (Controle e HPU) (A). Os níveis de proteína tau total detectados no *Western blotting* foram normalizados pelos níveis de actina (B).

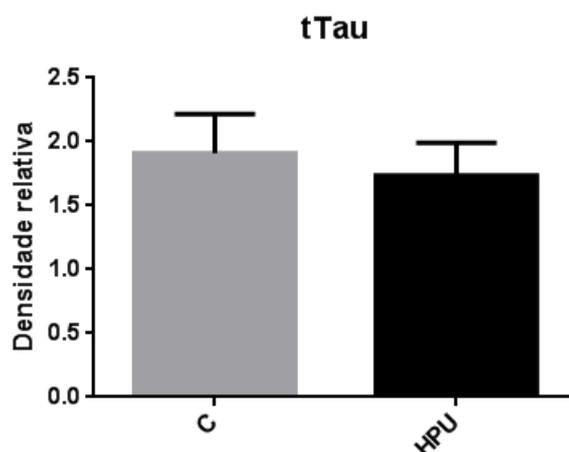


Figura 8: Injeção intraperitoneal de urease de *Helicobacter pylori* (HPU) não induz alteração nos níveis de tau total. Ratos Wistar machos de um mês receberam injeções intraperitoneais de HPU por 7 dias (5 µg/rato/dia), e o mesmo volume de solução salina estéril foi administrado no grupo controle (C). Análise densitométrica das bandas fosforiladas mostradas na figura 6. Os níveis de proteína tau total detectados no *Western blotting* foram normalizados pelos níveis de actina. Os dados mostrados são médias e desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

Para verificar a influência do tratamento dos animais com HPU sobre o sítio de fosforilação Thr205 da tau, foram realizados *Western blotting* dos homogenados dos cérebros, utilizando o anticorpo policlonal anti-ptau205 (Figura 9). A fosforilação na Thr205 foi a escolha inicial das investigações, uma vez os dados mostrados por Wang e colaboradores, 2015 em três diferentes sítios de fosforilação da tau (pT205, pT231 e pS404) sugerem que a fosforilação nesse sítio foi mais pronunciada em animais tratados com filtrado de *H. pylori*.

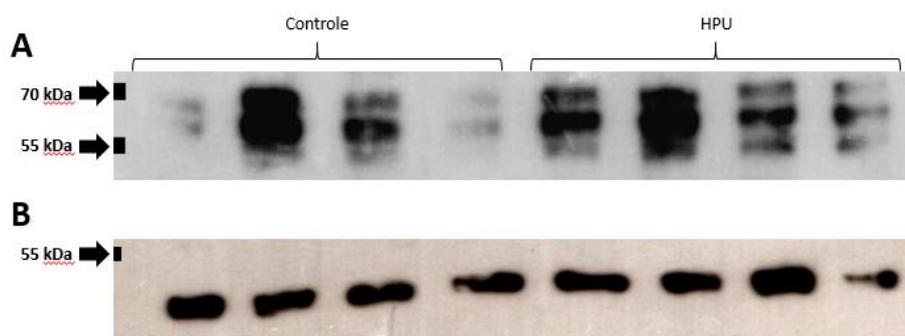


Figura 9: *Western blotting* da proteína tau fosforilada no sítio Thr205. Ratos Wistar machos receberam injeções intraperitoneais de HPU por 7 dias (5 µg/rato/dia), e o mesmo volume de solução salina estéril foi administrado no grupo controle. Os níveis de proteína tau fosforilada (A) nos homogenados de cérebros foram detectados por *Western blotting*. As quantidades de proteína transferidas para a membrana foram aferidas pelos níveis de actina (B). A figura mostra os resultados de 1 experimento, com quadruplicatas para cada condição. Resultados similares foram obtidos em outros dois experimentos, compostos por dois grupos de 4 animais para cada condição (Controle e HPU)

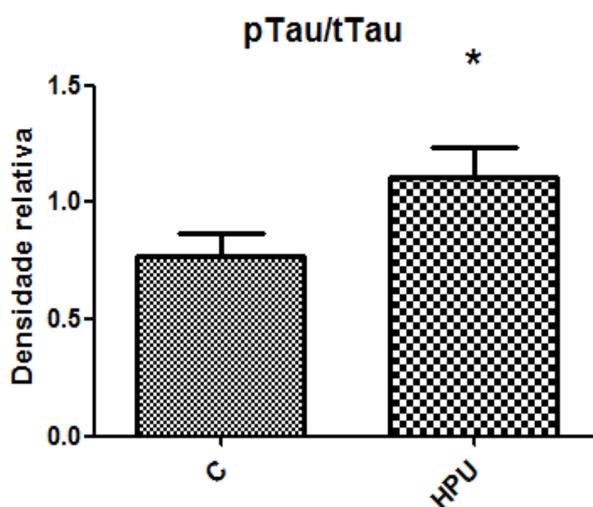


Figura 10: Injeção intraperitoneal de urease de *Helicobacter pylori* (HPU) induz fosforilação da proteína tau no cérebro de ratos. Ratos Wistar machos de um mês receberam injeções intraperitoneais de HPU por 7 dias (5µg/rato/dia), e o mesmo volume de Solução salina foi administrado no grupo controle. Os níveis de pTau foram normalizados pelos níveis de Tau total. Os dados são mostrados como média e desvio padrão de três experimentos independentes, realizados em quadruplicata. * $p < 0,05$ vs. grupo controle.

Como mostram as Figuras 9 e 10, foi possível verificar um aumento significativo dos níveis de fosforilação em pelo menos uma das três das isoformas da Tau, nos animais tratados intraperitonealmente com HPU, quando comparados com o grupo controle, confirmando que ocorre uma hiperfosforilação significativa da tau no sítio Thr205, nos animais tratados com a urease de *H. pylori* purificada.

Em seguida, foi testada para a HPU a hipótese de Wang *et al.*, 2015, de que exotoxinas presentes no filtrado de *H. pylori* atuariam promovendo a fosforilação da tau diretamente. Assim experimentos foram feitos para verificar se a HPU poderia atravessar a barreira hematoencefálica dos ratos, após administração por via intraperitoneal. Como mencionado anteriormente, as condições experimentais do tratamento *in vivo* dos ratos com HPU foram escolhidas para simular um possível “extravasamento” da HPU a partir de uma infecção gástrica crônica por *H. pylori*.

Para avaliarmos a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) para a HPU, os mesmos homogenizados de cérebro dos animais mostrados na Figura 7 foram analisados por *Western blotting*, utilizando-se o anticorpo primário anti-ureβ, específico para detectar a cadeia B da HPU. Conforme mostra a Figura 11, não foi possível detectar a presença de HPU no tecido cerebral dos ratos, sugerindo que não houve danos à integridade da BHE, nas condições avaliadas.

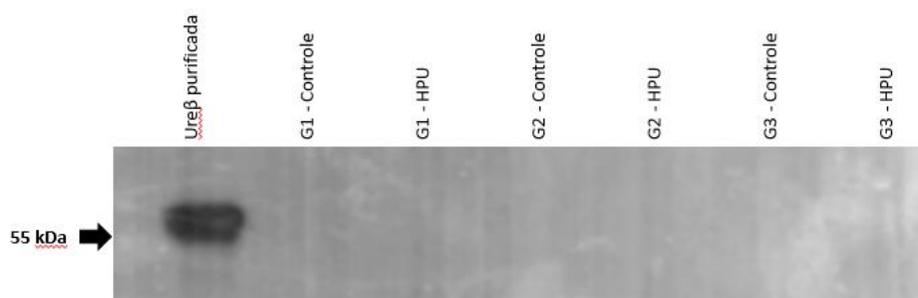


Figura 11: Avaliação da barreira hematoencefálica de ratos tratados com a HPU por via intraperitoneal. Ratos Wistar machos receberam injeções intraperitoneais de HPU por 7 dias (5 µg/rato/dia), e o mesmo volume de solução salina estéril foi administrado no grupo controle. Ensaios de *Western blotting* utilizando anticorpos contra a subunidade B da HPU (62 kDa) foram realizados para homogenizados de cérebro de três experimentos independentes (grupos Controle e HPU). No poço com UreB purificada foram aplicados 25 µg de proteína.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A neurotoxicidade da HPU administrada em ratos por via intraperitoneal foi brevemente descrita por Baik *et al.*, 2005. No entanto, as informações disponíveis para o efeito neurotóxico da HPU, que causa hipotermia, convulsão e morte em ratos após injeção intraperitoneal, não permitem explicar os achados nesse trabalho, ou sua correlação com a taupatia da DA.

No presente estudo, apesar do indício de que a HPU administrada por via intraperitoneal não atravessaria a BHE, ainda é prematuro chegar a essa conclusão. Uma possível explicação para o resultado negativo mostrado na Figura 11 é que o teste de *Western blotting* não teve sensibilidade suficiente para detectar pequenas quantidades de HPU eventualmente presente nas amostras. Nas condições experimentais utilizadas, os animais receberam no total 35 µg de HPU ao longo de 7 dias. Se toda essa quantidade de HPU atingisse e se acumulasse no cérebro dos animais, certamente teria sido detectado imunoreatividade no experimento de *Western blotting*. Essa situação parece pouco provável, considerando a massa molecular de 1,1 MDa da HPU, ainda que haja abertura da BHE.

No artigo de Baik *et al.*, 2005, foi medido um aumento de 20 vezes dos níveis séricos de amônia nos animais tratados intraperitonealmente com o filtrado de *H. pylori*, refletindo a ação enzimática da HPU. Sabe-se que hiperamonemia é uma condição que pode levar à alterações da barreira hematoencefálica em humanos (Skowronska e Albrecht, 2012). Finalmente, há que se considerar um grau baixo mas persistente de aumento nos níveis séricos de amônia, reflexo direto da ação enzimática da HPU na infecção por *H. pylori*, possa ser o fator que desencadeia a hiperfosforilação de tau. Ainda que uma pesquisa na literatura médica associando “hiperamonemia” e “(hiper)fosforilação de tau” tenha sido negativa, há estudos de metabolômica que identificam hiperamonemia em modelos animais da Doença de Alzheimer (González-Domínguez et al., 2015). Face a essas considerações, mais estudos são ainda necessários para se chegar à uma conclusão sobre a possibilidade da HPU atravessar a BHE se administrada por via intraperitoneal.

Independente do fato da BHE dos ratos se manter intacta ou não após o tratamento com HPU, as rotas de sinalização ativadas pela urease que possam vir a interferir na fosforilação da Tau deverão ser investigadas. Dados anteriores do nosso grupo evidenciaram que a HPU é capaz de modular as vias de sinalização envolvendo eicosanoides da via das lipoxigenases e de alterar níveis intracelulares de cálcio (Wassermann *et al.*, 2010, Uberti *et al.*, 2013). Eicosanoides estão reconhecidamente envolvidos em neuroinflamação (Tassoni, *et al.*, 2008), condição que também existe na DA (Hanzel *et al.*, 2014). Pacientes com sintomas clínicos de AD apresentaram níveis elevados do eicosanóide prostaglandina E₂ no fluido cerebrospinal (Montine *et al.*, 1999). Wang *et al.*, 2015 verificaram também ativação da quinase GSK-3 β , que pode ser a causa da hiperfosforilação de tau, no tecido cerebral dos animais que receberam injeções contendo o filtrado de *H. pylori*.

Uma das muitas possibilidades de sequência desse TCC seria investigar se a HPU também ativaria essa quinase, e/ou modularia as vias de eicosanoides no tecido cerebral. Outra possibilidade de continuação, ainda baseado nos resultados de Wang *et al.*, 2015, seria testar se a HPU purificada reproduz o efeito causado pelo filtrado de *H. pylori* de também induzir *in vitro* a hiperfosforilação da tau, observado pelos autores em células da linhagem neuroblastoma N2a de camundongos, sem alteração da viabilidade celular. Testes com a HPU *in vitro* com cultura primárias de neurônios hipocâmpais de ratos também poderão fornecer resultados importantes para comparação com os dados obtidos *in vivo* neste trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baik S.C., Kang H.L., Seo J.H., Park E.S., Rhee K.H., Cho M.J. 2005. ***Helicobacter pylori* urease induces mouse death.** J. Bacteriol. Virol., 35: 175-181.
2. Bailie N.C., Osborne C.A., Leininger J.R., Fletcher T.F., Johnston S.D., Ogburn P.N., Griffith D.P. 1986. **Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles.** Am J Vet Res, 47:2604-11.
3. Bradford M.M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical Biochemistry, 72:248-254.
4. Buée L., Bussière T., Buée-Scherrer V., Delacourte A., Hof P.R. 2000. Tau isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. Brain Res Rev, 33: 95-130.
5. 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.
6. 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.
7. Carlini C.R., Ligabue-Braun R. 2016. **Ureases as multifunctional toxic proteins: A review.** Toxicon, 113: 90-109.
8. Carter F.P., Frankson T., Pintard J., Edgecombe B. 2011. **Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in adults in the Bahamas.** Wes Indian Med, 90: 340-8.
9. Censini S., Lange C., Xiang Z. 1996. **Cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease associated virulence factors.** Proc Natl Acad Sci, 93: 14648-53.
10. De la Torre J.C. 2006. **How do heart disease and stroke become risk factors for Alzheimer's disease?** Neurol Res, 28: 637-44
11. D'Elios M.M., Amedei A., Cappon A., Del Prete G., de Bernard M. 2007. **The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) as an immune modulating agent.** FEMS Immunol Med Microbiol, 50:157-164.

12. Elliott S.N., Wallace J.L. 1998. **Neutrophil-mediated gastrointestinal injury.** Can J Gastroenterol, 12:559-568.
13. Follmer C., Barcellos G.B., Zingali R.B., Machado O.L., Alves E.W., Barja-Fidalgo C., Guimarães J.A., Carlini C.R. 2001. **Canatoxin, a toxic pretein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (ED 3.5.1.5): Biological effects of urease independent of its ureolytic activity.** Biochem J, 360: 217-224.
14. Forman M.S., Trojanowski J.Q., Lee V.M. 2004. **Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs.** Nat Med, 10: 1055-1061.
15. Gasbarrini A., Cremonini F., Armuzzi A., Ojetti V., Candelli M., Di Campli C., Sanz-Torre E., Pola R., Gasbarrini G., Pola P. 1999. **The role of *Helicobacter pylori* in cardiovascular and cerebrovascular diseases.** J Physiol Pharmacol, 50:735-42.
16. 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.** Gastroent Endosc, 40:342-345.
17. Goedert M. et al., 1989. **Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease.** Neuron. 3, 519-526
18. Golde T.E. 2007. **The pathogenesis of Alzheimer's disease and the role of A β 42.** CNS Spectr, 12: 4-6.
19. González-Domínguez R., García-Barrera T., Vitorica J., Gómez-Ariza J.L. 2015. **Metabolomic investigation of systemic manifestations associated with Alzheimer's disease in the APP/PS1 transgenic mouse model.** Mol Biosyst.,11: 2429-40.
20. Goodwin C.S, Armstrong J.A. 1990. **Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*).** European Journal of clinical Microbiology and Infectious Diseases, 9:1-13.
21. Grau A.J., Buggle F., Lichy C., Brandt T., Becher H., Rudi J. 2001. ***Helicobacter pylori* infection as an independent risk factor for cerebral ischemia of atherothrombotic origin.** J Neurol Sci, 186:1-5.

22. 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.
23. Hanzel C.E., Iulita M.F., Eyjolfsdottir H., Hjorth E., Schultzberg M., Eriksdotter M., Cuello A.C. 2014. **Analysis of matrix metallo-proteases and the plasminogen system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid.** J Alzh Dis, 40: 667-78.
24. 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..
25. Ittner L.M, Götz, J. 2011. **Amyloid β -peptide and tau- a toxic pas de deux in Alzheimer's disease.** Nat Rev Neurosci, 12: 65-72.
26. IARC –Working-Group. 1994. **Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*.** In: WHO, International Agency for Research on Cancer. Lyon, France.
27. Kountouras J., Tsolaki M., Gavalas E., Boziki M., Zavos C., Karatzoglou P., Chatzopoulos D., Venizelos I. 2006. **Relationship between *Helicobacter pylori* infection and Alzheimer disease.** Neurology, 66: 938-40
28. Kountouras J. Boziki M., Gavalas E., Zavos C., Deretzi G., Grigoriadis N., Tsolaki M., Chatzopoulos D., Katsinelos P., Tzilves D., Zabouri A., Michailidou I. 2009. **Increased cerebrospinal fluid *Helicobacter pylori* antibody in Alzheimer's disease.** International journal of Neuroscience, 119: 765-77.
29. Krogfelt K.A., Lehours P., Mégraud F. 2005. **Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.** Helicobacter,10:5-13.
30. Lovestone S., Reynolds C.H., Latimer D., Davis D.R., Anderton B.H., Gallo J.M., Hanger D., Mulot S., Marquardt B., Stabel S. 1994. **Alzheimer's disease-like phosphorylation of the microtubule-associated protein tau by glycogen synthase kinase-3 in transfected mammalian cells.** Curr Biol, 4: 1077-1086.
31. Malaguarnera M., Bella R., Alagona G., Ferri R., Carnemolla A., Pennisi G. 2004. ***Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: A possible link.** Eur J Intern Med. 15: 381-386.
32. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. 2008. **Cancer-related inflammation.** Nature, 454:436-444.
33. Marshall B.J., Warren J.R. 1984. **Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.** Lancet, 1:1311-5.

34. Mobley H.L., Island M.D., Hausinger R.P. 1995. **Molecular biology of microbial ureases.** Microbiol Rev, 59:451-480.
35. Montine T.J., Sidell K.R., Crews B.C., Markesbery W.R., Marnett L.J., Roberts L.J., Morrow J.D., 1999. **Elevated CSF prostaglandin E2 levels in patients with probable AD.** Neurology. 53: 1495-98.
36. Olivera-Severo D., Wassermann G.E., Carlini C.R. 2006. **Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease producing bacteria?** Braz Journal Med Biol Res, 39: 851-861.
37. Philipson O., Lord A., Gumucio A., O'Callaghan P., Lannfelt L., Nilsson L. N. 2010. **Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease.** FERBS J, 277:1389-409.
38. Postal M., Martinelli A.H., Becker-Ritt A.B., Ligabue-Braun R., Demartini D.R., Ribeiro S.F., Pasquali G., Gomes V.M., Carlini C.R. 2012. **Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides.** Peptides, 38: 22-32.
39. Querfurth H.W., LaFerla F.M. 2010. **Alzheimer's disease.** N Engl J Med, 362: 329-44.
40. Roubaud-Baudron C., Krolak-Salmon P., Quadrio I., Megraud F., Salles N. 2012. **Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results.** Neurobiology of Aging, 33: 1009.e11-1009.e19.
41. Sambrook J., Russell D.W. 2001. **Molecular Cloning.** 3^a ed. 3 vol. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
42. Selkoe D.J. 2001. **Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy.** Physiol Rev. 81:741-766
43. Singh R.K., McMahon A.D., Patel H., Packard C.J., Rathbone B.J., Samani N.J. 2002. **Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease.** Heart, 88:43-6.
44. Sirko A., Brodzik R. 2000. **Plant ureases: roles and regulation.** Acta Biochim Pol, 47:1189-95.
45. Skowrońska M., Albrecht J. 2012. **Alterations of blood brain barrier function in hyperammonemia: an overview.** Neurotox Res., 21: 236-44.
46. Staniçuaski F., Carlini C.R. 2012. **Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties.** Toxins, 4: 55-67.

47. Sycuro L.K., Wyckoff T.J., Biboy J., Born P., Pincus Z., Vollmer W., Salama N.R. 2012. **Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility, and colonization potential.** PLoS Pathog, 8 e1002603.
48. Tassoni D., Kaur G., Weisinger R.S., Sinclair A.J. 2008. **The role of eicosanoids in the brain.** Asia Pac J Clin Nutr, 17: 220-28.
49. Uberti A.F., Olivera-Severo D., Wassermann G.E., Scopel-Guerra A., Moraes J.A., Barcellos-de-Souza P., Barja-Fidalgo C., Carlini C.R. 2013. **Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease.** Toxicon, 69: 240-9.
50. Wang A.Y., Peura D.A. 2011. **The prevalence and incidence of *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease and upper gastrointestinal bleeding throughout the world.** Gastrointest Endosc Clin N Am, 21:613-35.
51. Wang H.L., Zeng J., Yang Y., Xiong Y., Zhang Z.H., Qiu M., Yan X., Sun X.Y., Tuo Q.Z., Liu R., Wang J.Z. 2015. ***Helicobacter pylori* filtrate induces Alzheimer-like tau hyperphosphorylation by activating glycogen synthase kinase-3 β .** J. Alzheimers Dis. 43: 153-65.
52. Wassermann G.E., Olivera-Severo D., Uberti A.F., Carlini C.R. 2010. ***Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway.** J. Cell. Mol. Med. 14(7):2025-2034.
53. Weatherburn M.W. 1967. **Phenol---hypochlorite reaction for determination of ammonia.** *Analytical Chemistry*, 39, 971---974.
54. Wroblewski L.E., Shen L., Ogden S., Romero-Gallo J., Lapierre L.A., Israel D.A., Turner J.R., Peek R.M., JR. 2009. ***Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation.** Gastroenterology, 136:236-46.
55. Wu J., Xu S., Zhu Y. 2013. ***Helicobacter pylori* CagA: a critical destroyer of the gastric epithelial barrier.** Dig Dis Sci, 58: 1830-7.
56. Yamaoka Y. 2010. **Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors.** Nat Rev Gastroent Hpatol, 7: 629-641.
57. Yoshiyama H., Nakazawa T. 2000. **Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus.** Microbes and Infection, 2:55-60.
58. Zerner B. 1991. **Recent advances in the chemistry on an old enzyme, urease.** Bioorg Chem, 19:116-131.

