



Urease de *Helicobacter pylori* e sua interação com receptores de membranas plaquetárias

Scopel-Guerra A.¹, Uberti, A.F.¹, Olivera-Severo, D.³, Carlini, C.R.^{1,2}

¹ Programa de Pós graduação em Biologia Molecular e Celular, Centro de Biotecnologia;

² Departamento de Biofísica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil;

³ Instituto de Medicina Molecular de Veneza, Pádua, Itália.

1. Introdução

Ureases (EC 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. Ureases bacterianas são compostas de múltiplos de duas ou três subunidades. As similaridades entre as ureases de bactérias e plantas sugere que elas descendem de um mesmo ancestral. Têm mesma estrutura terciária e mecanismo catalítico semelhante. *Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa que parasita o epitélio gástrico humano, e é considerada um fator de risco associado a úlceras gástricas e duodenais por mecanismos que ainda não são bem compreendidos. Estudos mostram, ainda, uma correlação entre a infecção com *H. pylori* e doenças cardiovasculares. A urease produzida por *H. pylori* (HPU) é considerada um fator de virulência, pois sua atividade ureolítica aumenta o pH do meio possibilitando a colonização do epitélio gástrico. Nosso grupo mostrou que HPU induz agregação plaquetária de maneira independente da atividade ureolítica, induzindo a secreção de ADP plaquetária pela via de lipoxigenase. Essa urease ainda induz edema de pata em camundongos envolvendo metabólitos da via do ácido araquidônico. Outros resultados sugerem que a HPU recruta a mesma cascata de sinalização utilizada pelo colágeno na agregação plaquetária incluindo a ativação da 12-lipoxigenase ligando-se ao receptor de colágeno.

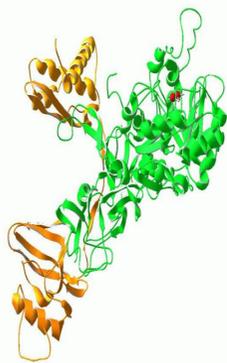
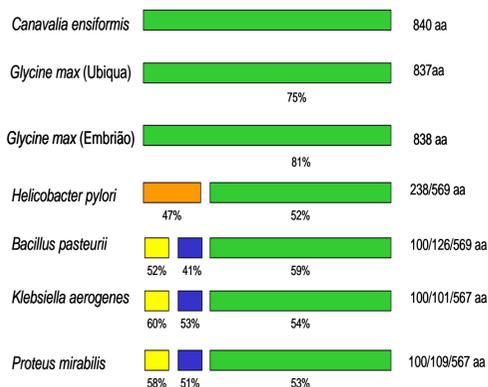


Figura 1. Estrutura da urease de *Helicobacter pylori*: Ureases vegetais como as de *Canavalia ensiformis* tem uma única subunidade enquanto as bacterianas têm duas (*Helicobacter pylori*) ou três (*Klebsiella aerogenes*) subunidades. O número de resíduos de aminoácidos de cada subunidade está indicado. O percentual de identidade do fragmento de *C. ensiformis* é mostrado sob proteínas bacterianas.

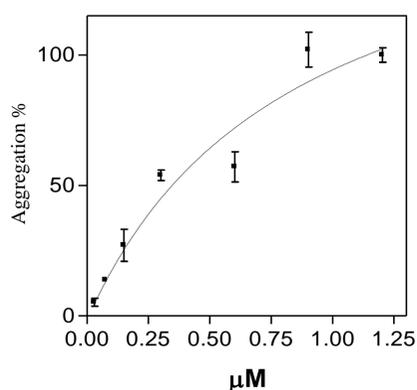


Figura 2. Agregação de plaquetas de coelho induzidas por urease recombinante de *Helicobacter pylori* (HPU): Plasma de coelho rico em plaquetas em placas multiwell foi exposto a concentrações crescentes de HPU ou 5 μM ADP (100% agregação). Resultados expressos como porcentagem de agregação máxima para 4 replicatas.

Treatamento Plaquetário	% agregação plaquetária mean ± sd
Nenhum	100.00 ± 10.24
Dexametasona (50 mM)	62.64* ± 6.06
Esculetina (500 mM)	55.00** ± 6.06
Indometacina (150 mM)	160.74*** ± 12.74
(300 mM)	313.26*** ± 3.78

Tabela 1. Envolvimento da fosfolipase A2 e eicosanóides na agregação plaquetária induzida por HPU. Plasma de coelhos rico em plaquetas (PRP) suspenso em placas multiwell incubadas por 2 min em temperatura ambiente na ausência ou presença das drogas nas concentrações indicadas. A agregação foi induzida como adição de HPU (300nM). Resultados com desvio calculado de 4 replicatas em cada condição. Valores de $p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ou $p < 0,001^{***}$ foram consideradas estatisticamente significantes.

2. Objetivos

Neste trabalho investigamos:

- ❖ a relevância do ADP na agregação induzida por HPU;
- ❖ a redundância das cascatas ativadas por HPU e colágeno em plaquetas;
- ❖ a participação do receptor plaquetário de colágeno (GPVI) como mediador das respostas induzidas por HPU nas plaquetas.

3. Material e Métodos

- ❖ HPU recombinante produzida em *E. coli* purificado através de duas cromatografias de troca iônica e uma gel filtração;
- ❖ A agregação plaquetária foi monitorada a cada 11 seg durante 20 minutos em um leitor de placas SpectraMax e monitorada por 8 min em um agregômetro;
- ❖ Para os experimentos usamos apirase de batata (seqüestrador de ADP), luciferina-luciferase (emite luz na presença de ATP), ADP (indutor de agregação) e colágeno tipo III (indutor de agregação) da Sigma Chem. Co.;
- ❖ E anticorpos anti-GPVI (reconhece o receptor na membrana da plaqueta) da Santa Cruz.

4. Resultados

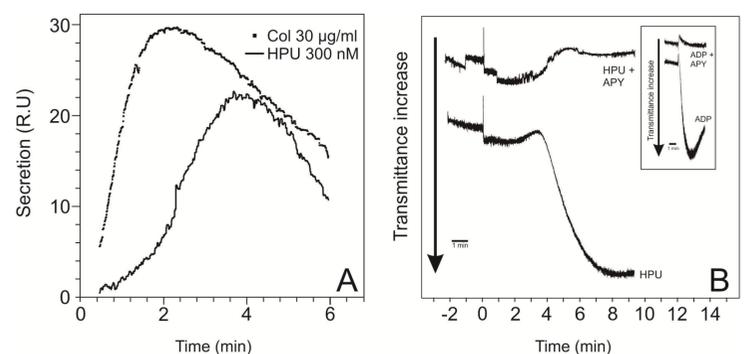


Figura 3. HPU induz secreção de ATP e agregação de plaquetas de coelho induzida por ADP: (A) Tempo de reação com secreção de plaquetas ativada por HPU (300 nM) ou colágeno (30 μg/mL) a secreção de ATP foi detectada pela luz emitida na presença de uma mistura de luciferina-luciferase. R.U. - unidades relativas de luz. (B) Agregação plaquetária induzida por HPU (300 nM) ou 5 μM ADP é completamente abolida na presença de 1 U/mL de apirase de batata. As plaquetas foram incubadas com apirase por 10 min em temperatura ambiente sem agitação, e depois a agregação foi induzida pela adição de HPU ou ADP (tempo zero) e a agregação foi monitorada turbidimetricamente por 8 min.

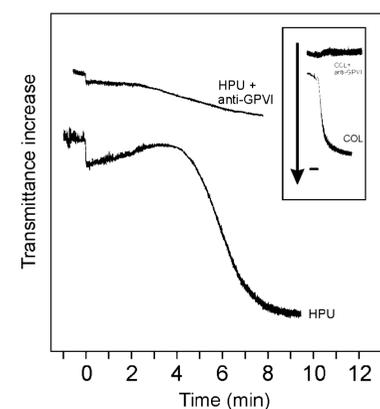


Figura 4. Envolvimento do GPVI na agregação plaquetária induzida por HPU: Agregação plaquetária induzida por HPU (300 nM) ou 20 μg/mL colágeno é completamente abolida na presença do anticorpo anti-GPVI. As plaquetas foram pré-incubadas com anti-GPVI (500 μg/mL) por 10 min em temperatura ambiente sem agitação; depois a agregação foi induzida pela adição de HPU ou colágeno (tempo zero) e foi monitorada turbidimetricamente por 8 min.

5. Discussão

Nossos resultados mostram que:

- ❖ agregação plaquetária induzida por HPU é dependente da secreção plaquetária de ADP e é inibida na presença de apirase;
- ❖ HPU interage com a glicoproteína VI de membrana plaquetária (GPVI);
- ❖ as propriedades farmacológicas independentes da atividade ureolítica da HPU reforçam a hipótese de que essa proteína pode desempenhar um importante papel na patogenicidade do *H. Pylori* incluindo a sua contribuição em doenças cardiovasculares.

6. Perspectivas

- ❖ Investigar outros receptores de membranas envolvidos na agregação induzida por HPU;
- ❖ Usar microscopia confocal para estudar a ligação da HPU com receptores de membrana com a adição de sondas fluorescentes.