Urease de *Helicobacter pylori* e suas subunidades: papel na ativação e agregação plaquetária

Adriele Scopel Guerra

Trabalho apresentado como um dos requisitos para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular - UFRGS

Orientadora: Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Co-orientador: Dr. Deiber Olivera Severo

Porto Alegre, Maio de 2013
Este trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).
Membros da Banca Examinadora

Profª. Drª Ana Maria Battastini
Departamento de Bioquímica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Profª. Drª Adriana Seixas
Departamento de Ciências Básicas da Saúde
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA

Prof. Dr. Charley Christian Staats
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular - PPGBCM
Departamento de Biotecnologia,
Instituto de Biociências,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Profª. Célia Carlini pela oportunidade, mais uma vez, de estar no Laprotox e por todo o trabalho de orientação.

Agradeço ao meu Co-orientador Deiber Olivera Severo, por ter me aguentado todo esse tempo sob tua orientação, com toda a minha teimosia, mesmo às vezes eu tendo vontade de te matar, eu sei que tu também às vezes querias me matar.

Agradeço também aos meus colegas de Laprotox: Augusto, Anne, Angéla Piovesan, Ângela Menegassi, Arlete, Diogo, Fernanda, Fernanda Lopes, Karine, Letícia, Mônica, Mayara, Melissa, Rafael, Rodrigo, Valquiria, Vanessa, Tinoko, Vanessa por pelos momentos de descontração na hora do café, pelas companhias no almoço e tudo mais.

Agradeço a minha família que sempre me deu apoio incondicional, por estarem sempre por perto, mesmo morando longe, pelos telefonas intermináveis e pelas inúmeras vistas de final de semana. Mãe, pai, mano, obrigada por tudo amo vocês de mais! Agradeço aos meus avós, que sempre me incentivaram a estudar, e a seguir em frente.

Por fim, e não menos importante agradeço ao João meu namorado e companheiro de todas as horas que sempre esteve ao meu lado, mesmo que precisava vir ao campus do vale no domingo no fim da tarde. Por sempre estar disposto a me ouvir quando tudo dava errado e por rir quando o Word acabava com a minha paciência, só assim eu não jogava o note pela janela... Te amo!
ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO .......................................................................................................................... 7
  1.1 HELICOBACTER PYLORI ............................................................................................................. 7
  1.2 UREASE DE HELICOBACTER PYLORI (HPU) ........................................................................ 10
  1.3 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA INDUZIDA POR UREASES ....................................................... 13
  1.4 PLAQUETAS: ATIVAÇÃO E AGREGAÇÃO .............................................................................. 16
  1.5 OBJETIVOS .......................................................................................................................... 19

2 MATERIAIS E MÉTODOS .......................................................................................................... 20
  2.1 UREASE DE HELICOBACTER PYLORI .................................................................................... 20
    2.1.1 Manipulação bacteriana ..................................................................................................... 20
    2.1.2 Expressão da HPU ............................................................................................................. 21
    2.1.3 Purificação ......................................................................................................................... 22
  2.2 SUBUNIDADES DA UREASE DE H. PYLORI ........................................................................... 23
    2.2.1 Manipulação Bacteriana .................................................................................................. 23
    2.2.2 Confirmação da transformação ......................................................................................... 24
    2.2.3 Indução das células para expressão das proteínas ............................................................ 25
    2.2.4 Purificação das subunidades recombinantes UreA e UreB ............................................... 25
  2.3 MEDIDA DE CONTEÚDO PROTEICO E ATIVIDADE ENZIMÁTICA ........................................ 26
    2.3.1 Conteúdo Protéico ............................................................................................................ 26
    2.3.2 Deteção de atividade ureidônica ....................................................................................... 27
  2.4 ENSAIO DE AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA ............................................................................ 27
  2.5 WESTERN BLOT .................................................................................................................. 29
  2.6 ALINHAMENTOS DE SEQUÊNCIA E ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA ............................. 30
  2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA ......................................................................................................... 30

3 RESULTADOS ............................................................................................................................ 31
  3.1 TRANSFORMAÇÃO DE GÊNICA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS ........................................ 31
    3.1.1 Transformação e Purificação de HPU ................................................................................. 31
    3.1.2 Transformação, Expressão e Purificação da UreA e UreB ................................................. 34
  3.2 INTERAÇÃO COM PLAQUETAS ............................................................................................... 37
    3.2.1 Interação de UreA com Plaquetas ................................................................................... 37
    3.2.2 Interação de UreB com Plaquetas ................................................................................... 39
  3.3 VIAS DE SINALIZAÇÃO RECRUTADAS POR UREB EM PLAQUETAS ................................ 41
  3.4 INTERAÇÃO DA HPU COM PLAQUETAS ............................................................................ 45
    3.4.1 Alignamentos ................................................................................................................. 45
    3.4.2 Interação da HPU receptor de colágeno ............................................................................ 48
  3.5 OLIGOMERIZAÇÃO DA UreB .................................................................................................. 49

4 DISCUSSÃO .............................................................................................................................. 52

5 PRÓXIMOS PASSOS ................................................................................................................. 57

6 REFÊRENCIAS .......................................................................................................................... 58
RESUMO

*Helicobacter pylori* é uma bactéria Gram negativa que coloniza o epitélio gástrico humano. É considerada um fator de risco associado a úlceras gástricas e duodenais assim como câncer gástrico, através de mecanismos ainda não completamente esclarecidos. Estudos recentes mostram a existência de uma correlação entre a infecção por *H. pylori* e doenças cardiovasculares, através da ativação de células pró-inflamatórias. A urease de *H. pylori* (HPU) é considerada um fator de virulência, visto que sua atividade catalítica cria um microambiente, de pH mais elevado, possibilitando a sobrevivência do patógeno no estômago. A HPU é capaz de ativar plaquetas de coelho através da indução da secreção de seus grânulos densos e liberação de ADP, culminando na agregação plaquetária. Esse fenômeno ocorre com ativação da via da 12-lipoxigenase, via esta também utilizada pelo colágeno, um importante agonista intrínseco desse sistema. Nesse trabalho demostramos que a subunidade UreA, com doses até 10 vezes maior que a HPU, não é capaz de agregar plaquetas de coelho, ao passo que reduz a agregação induzida por colágeno e ADP de forma dose dependente. Já a subunidade UreB induz agregação plaquetária de forma semelhante a HPU e ao colágeno, sugerindo que pode ser o dominio da HPU responsável por induzir agregação plaquetária. Da mesma forma que a UreA, a UreB reduz a agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP. Verificamos também a participação da glicoproteína VI (GPVI), importante receptor de colágeno na plaqueta, sendo que quando há o bloqueio desse receptor a HPU não é capaz de agregar plaquetas. Nossos resultados sugerem que a agregação plaquetária por HPU compartilha pelo menos parte da rota de agregação com o colágeno. A GPVI parece estar envolvida na ativação de plaquetas por HPU. Essa propriedade farmacológica recém-descrita da HPU reforça a hipótese que essa proteína possa estar envolvida nas patologias indiretamente causadas por *H. pylori*. 
1 INTRODUÇÃO

1.1 Helicobacter pylori

_Helicobacter pylori_ é uma espiroqueta, Gram negativa, microaerófila, com 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, que possui de 4 a 6 flagelos com aproximadamente 30 µm de comprimento (Goodwin _et al_., 1990). Essa bactéria infecta a mucosa estomacal de humanos (Yoshiyama & Nakazawa 2000), e foi isolada pela primeira vez em 1982 por Marshall e Warren (Marshall e Warren, 1984).

Atualmente, _H. pylori_ é reconhecido como um agente etiológico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal (NIH Consensus Conference, 1994). Essa bactéria é encontrada na mucosa estomacal onde, por sua alta motilidade, penetra a fina camada de muco e adere às células do epitélio gástrico, impossibilitando que as mesmas sejam lavadas pelo estômago. A infecção por _H. pylori_ tende a persistir por toda a vida do hospedeiro, por isso não é surpresa que essa bactéria tenham evoluído juntamente com populações humanas (Covacci _et al._, 1999). Estima-se que mais da metade da população mundial está infectada por esse patógeno, sendo que em países com baixas condições sanitárias e econômicas, a infecção por _H. pylori_ pode atingir 90% da população (Hopkins 1996, Fischbach 2005).

O câncer gástrico é o segundo maior causador de mortes no mundo (WHO, 2008) e, em sendo _H. pylori_ o principal responsável pelo desenvolvimento desse tipo de câncer, esse patógeno causa um alto impacto na saúde mundial. Apenas 20% dos indivíduos infectados apresentam sintomas clínicos, sendo essa baixa casuísta atribuída a variações de virulência entre as cepas de _H. pylori_ (Yamaoka, 2010; Peek,
2010), determinada pela presença ou ausência de fatores de virulência, além dos hábitos alimentares do indivíduo.

A 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, sem associação específica com modificações metaplásicas e formação de granuloma (Dixon, 1995). A intensidade da inflamação pode ser altamente variável, desde uma infiltração mínima da lâmina própria, mantendo a arquitetura glandular intacta, até uma inflamação severa, com formação de microabscessos (Genta & Graham, 1994). Em geral há degeneração das células epiteliais, com depleção de mucina, vacuolização citoplasmática e desorganização de glândulas da mucosa. O grau dos danos na mucosa correlaciona-se com o grau de infiltração de neutrófilos (D'Elios, Amedei *et al.*, 2007). Esses agem como a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos, e a infiltração do tecido gástrico por neutrófilos é uma marca característica das doenças inflamatórias agudas e crônicas causadas pela persistência de *H. pylori* na mucosa gástrica (Elliott and Wallace 1998), prolongando a inflamação e podendo levar a formação de tumores (Mantovani, Allavena *et al.*, 2008).

Acredita-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). 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. 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 patogênico da infecção por *H. pylori*, incluindo várias enzimas (urease, catalase, lipase e algumas proteases) e toxinas. A citotoxina vacuolizante, codificada pelo gene *vacA*, é capaz de induzir vacuolização citoplasmática, o que aciona mecanismos de apoptose, inflamação e modulação de funções das células T (Yamaoka, 2010). A proteína imunogênica CagA é codificada pelo gene *cagA*, localizado na ilha de patogenicidade cagPAI. Mais de 32 genes responsáveis pela virulência estão localizados na cagPAI, entre estes os que codificam a 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, além de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-8) nas células epiteliais gástricas (Censini et al. 1996; Figueiredo et al. 2005). Cepas contendo a cagPAI são mais virulentas e estão fortemente associadas ao desenvolvimento de doenças mais severas (Parsonnet et al., 1997).

Estudos epidemiológicos mostram que a infecção por *H. pylori* aparece também 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). Recentemente Papagiannakis et al. revisaram o papel da infecção por *H. pylori* em doenças hematológicas como trombocitopenia imune primária, anemia por deficiência de ferro, linfoma gástrico (MALT), leucemia infantil e risco de hemorragia em pacientes com problemas de coagulação, indicando que existe uma correlação entre a infecção por esse patógeno e doenças hematológicas. Os dados atualmente disponíveis ligando *H. pylori* a doenças cardiovasculares são ainda conflitantes (Christodoulou et al., 2011) e merecem maior atenção.
1.2 Urease de *Helicobacter pylori* (HPU)

Ureases (uréia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono (Zerner, 1991), a uma taxa 10\(^{14}\) vezes mais rápida que a reação não catalisada (Andrews et al., 1984; Mobley et al., 1995). Ureases bacterianas, ao contrário das ureases vegetais e fúngicas, são multímeros formados por 2 ou 3 complexos de subunidades (Mobley et al., 1995; Sirko & Brodzik, 2000). As ureases bacterianas, vegetais e fúngicas possuem estrutura terciária e mecanismo catalítico semelhantes, mostrando que elas descendem de uma mesma proteína ancestral comum (Mobley et al., 1995, Sirko & Brodzik, 2000; Ligabue-Braun et al., 2013). A Figura 1 ilustra as diferenças entre ureases vegetais e bacterianas, quanto às suas subunidades.

![Figura 1](attachment: figura1.png)

**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.

Na bactéria *H. pylori*, a urease é uma enzima bastante abundante, podendo compor de 10% a 15% das proteínas totais dessas células. Possui massa molecular de aproximadamente 1080 kDa, e uma organização quaternária dodecamérica de
heterodímeros, compostos de uma subunidade menor UreA, com 27kDa e uma subunidade maior UreB, com 61kDa (Ha et al., 2001; Dunn et al., 1990; Hu & Mobley, 1990), como apresentado na Figura 2.


Foram descritos pelo menos sete genes envolvidos na produção da urease de *H. pylori*. Os genes *ureA* e *ureB* codificam as duas subunidades que compõem a enzima, enquanto que os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH* 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).

Em bactérias, estas enzimas estão envolvidas em vários processos patogênicos (Mobley *et al.*, 1995). 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). 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. 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). 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 de estar envolvida na elevação do pH e formação de micro-clima adequado para a colonização pelo micro-organismo, nosso grupo vem demonstrando que a HPU possui outras atividades biológicas que podem potencialmente contribuir para a patogênese das infecções causadas pela bactéria. Em particular, reportamos que a HPU é capaz de ativar plaquetas (Wasserman *et al.*, 2010) e apresenta potente atividade pró-inflamatória, induzindo quimiotaxia e proteção contra apoptose de neutrófilos humanos, recrutando a via da 5-lipoxigenase nesses leucócitos (Uberti *et al.*, 2013).

Estudos têm avaliado a contribuição das subunidades da HPU para a patogênese, indicando que a UreB pode ser a responsável pelo mecanismo de virulência, através da
interação da UreB com receptor CD74 de células T (Beswick et al., 2006) e interação com Th17 (Zhang et al., 2011). Além disso, Bai e colaboradores em 2009 descreveram a interação do anticorpo específico para UreB com a glicoproteína IIIa de plaquetas, e sua importância na trombocitopenia púrpura.

1.3 Agregação plaquetária induzida por ureases

Nosso grupo descreveu, pela primeira vez em 2001, que ureases apresentam propriedades biológicas independentes da atividade ureolítica, entre essas a capacidade de ativar plaquetas e induzir agregação plaquetária (Follmer et al., 2001). Primeiramente descrito para a cananoxina, uma isoforma de urease de Canavalia ensiformis (Carlini et al., 1985), e depois para a urease embrião-específica de soja (Glycine max) (Follmer et al., 2004), a urease da bactéria de solo Bacillus pasteurii (Olivera-Severo et al., 2006), e finalmente para a urease de Helicobacter pylori (Wassermann et al., 2010), demonstramos que mesmo diferindo em suas estruturas quaternárias, todos essas ureases ativam plaquetas. A agregação plaquetária induzida pelas ureases é independente da atividade ureolítica da proteína, visto que quando exposta a p-hidroxi-mercuri-benzoato, um inibidor irreversível da atividade enzimática, a proteína ainda induz agregação plaquetária.

Plaquetas sanguíneas se revelaram um excelente modelo para se estudar a ação secretagoga das ureases (Carlini et al., 1985; Ghazaleh et al., 1997; Follmer et al., 2004a; Olivera-Severo et al., 2006, Wassermann et al., 2010). As ureases são capazes de ativar plaquetas em concentrações de $10^{-6}$ a $10^{-8}$ M, induzindo a exocitose dos grânulos densos, sendo que o ADP liberado causa, subsequentemente, a agregação
plaquetária. 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), e detecção do metabólito 12-HETE formado pelas plaquetas ativadas (Wassermann et al., 2010). A resposta das plaquetas a ureases, inclusive a HPU, não envolve o fator de agregação plaquetária (PAF,1-O-alquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina), porém requer abertura de canais de cálcio voltamge-dependente (Wassermann et al., 2010), e ocorre sem a ativação de fosfolipase C ou produção de inositol trifosfato (IP₃) (Ghazaleh et al., 1997).

Na presença da HPU, as plaquetas se aderem umas às outras (agregação), sem evidência de lise celular, sendo que a proteína parece se ligar apenas nas plaquetas, e não aos eritrócitos. A rota de ativação de resposta das plaquetas a urease de *H. pylori* também envolve a 12-lipoxigenase plaquetária e canais de cálcio sensíveis a D-metoxi-verapamil (Wassermann et al., 2010). Esta ativação é inibida por dexametasona (inibidor de fosfolipase A2) e esculetina (inibidor de lipoxigenase), sendo potencializada na presença de indometacina (inibidor de ciclooxigenases). A Tabela 1 ilustra esses achados.
**Tabela 1.** Envolvimento de fosfolipase A2 e eicosanóides na agregação plaquetária induzida por HPU.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Tratamento</th>
<th>Agregação Plaquetária</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td></td>
<td>% Média ± DP</td>
</tr>
<tr>
<td>Nenhum</td>
<td>100,00 ± 10.24</td>
</tr>
<tr>
<td>Dexametasona</td>
<td>62,64 ± 6.06</td>
</tr>
<tr>
<td>(50μM)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Esculetina</td>
<td>55,00 ± 6.06</td>
</tr>
<tr>
<td>(500μM)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Indometacina</td>
<td>160,74 ± 12.74</td>
</tr>
<tr>
<td>(150μM)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>313,26 ± 3,78</td>
</tr>
<tr>
<td>(300μM)</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

(Adaptado de Wassermann et al., 2010)

A agregação plaquetária induzida por HPU é dependente da secreção de ADP (Wassermann et al., 2010), que é armazenado junto com serotonina e ATP nos grânulos densos (Figura 3), e essa secreção requer sinalização através da 12-lipoxigenase plaquetária, como descrito para a resposta de plaquetas a outras ureases (Carlini et al., 1985, Barja-Fidalgo et al., 1991, Olivera-Severo et al., 2006). Assim como nas outras ureases a atividade de indução da agregação plaquetária não depende da atividade ureolítica da enzima. Em 2004, Coffey e colaboradores demonstraram que o colágeno e seus peptídeos derivados são capazes de acionar a rota da 12-lipoxigenase em plaquetas. Esses resultados sugerem que a urease e o colágeno possam utilizar a mesma cascata de sinalização para induzir a agregação.
Figura 3. Ativação de plaquetas de coelho induzida pela urease de *H. pylori*. A) Curva dose-efeito da agregação plaquetária induzida por HPU. B) Medida da secreção de ATP (por luminescência) de plaquetas estimuladas por 300 nM HPU e por colágeno. (Adaptada de Wassermann *et al.*, 2010.)

1.4 Plaquetas: ativação e agregação

Plaquetas são células sanguíneas especializadas do sistema imune inato que desempenham um papel central em processos fisiológicos e patológicos, inflamação, metástase tumoral, cicatrização e defesa a patógenos. “Inicialmente as plaquetas eram vistas como espectadoras na hemostasia, agora é evidente que as plaquetas de fato são mediadoras-chave da trombose, assim como da inflamação” (Bhatt *et al.*, 2003).

Quando ativadas sofrem mudanças na organização das proteínas do citoesqueleto, resultando numa mudança de forma (*shape-change*) com extensiva formação de pseudópodos e reorganização da membrana externa da célula (Fox *et al.*, 1993). Os grânulos se centralizam e se fundem com a membrana plasmática e, por exocitose, ocorre secreção do conteúdo de seus grânulos. Alguns desses produtos, como o difosfato de adenosina (ADP), potencializam a secreção e estimulam células próximas a secretarem os seus grânulos (Jurk & Kehrel, 2005). O conteúdo dos grânulos
plaquetários modulam funções da plaqueta e sua interação com células sanguíneas e do epitélio vascular. O pool de cálcio intracelular das plaquetas, armazenado em um sistema de túbulos, é mobilizado durante sua ativação, sendo esse cálcio o principal gatilho na ativação, atração e agregação plaquetária (Nesbitt et al., 2003). Além disso, proteínas como a P-selectina, secretada durante a ativação, são mediadoras da interação das plaquetas com neutrófilos e monócitos (Singbartl et al., 2001).

As plaquetas têm capacidade de aderir ao colágeno, principal componente da matriz subendotelial, através de receptores específicos como a glicoproteína VI (GPVI) e a glicoproteína Ia/Ila (GPIa/Ila) (Clemetson & Clemetson, 2001). A GPVI desempenha um importante papel na sinalização induzida por colágeno, além de ser o receptor majoritário de colágeno nessa célula.

A GPVI é um membro da família das imunoglobulinas, estando associada ao receptor Fc cadeia γ (Polgar et al., 1997; Kehrel et al., 1998; Clemetson et al., 1999 Jandrot-Perrus et al., 2000). A GPVI é expressa na superfície das plaquetas como um complexo não-covalente, com uma subunidade sinalizadora, a cadeia γ comum dos imunoreceptores (Jandrot-Perrus et al., 2000; Gibbins et al., 1997). A GPVI participa na adesão das plaquetas ao subendotélio e é responsável pela ativação plaquetária induzida por colágeno, resultando em agregação mediada por difosfato de adenosina (ADP) e por tromboxano A2, e oferecendo uma superfície procoagulante para a formação de trombina (Moroi et al., 1989; Nieswandt et al., 2001; Nieswandt & Watson, 2003). A Figura 4 ilustra a estrutura da GPVI e sua associação com a membrana plaquetária.
1.5 Objetivos

Uma das temáticas em estudo no nosso grupo busca estabelecer as relações estrutura versus função de ureases, caracterizando-as como proteínas multifuncionais. Nesse trabalho em particular, procuramos identificar a região da HPU responsável pela ativação e agregação plaquetária.

Assim, esse trabalho teve como objetivos:

1. Produzir e purificar as subunidades UreA e UreB da HPU;

2. Caracterizar a interação da subunidade UreA com plaquetas de coelho, e efeitos dessa na agregação plaquetária induzida por ADP e colágeno;

3. Caracterizar a interação da subunidade UreB com plaquetas de coelho, e o efeito dessa na agregação plaquetária por ADP e colágeno;

4. Comparar a agregação induzida por HPU com aquela induzida por fragmento agregante;

5. Testar o efeito de inibidores da agregação plaquetária induzida por HPU na resposta ao fragmento agregante da HPU;

6. Avaliar a interação entre a HPU e a glicoproteína VI plaquetária, identificando uma etapa comum na sinalização do colágeno e da HPU, que resulta na utilização da rota da 12-lipoxigenase.
2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Urease de *Helicobacter pylori*

2.1.1 Manipulação bacteriana

2.1.1.1 Linhagem bacteriana


2.1.1.1.1 Transformação gênica

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) (4g/L de triptona, 4g/L de extrato de levedura, 340mg/L de fosfato de sódio monobásico, 1g/L de fosfato de sódio bibásico, 1g/L de gelatina, 5g/L de ágar, 90mg/L de glicose, 60mg/L de ureia e 35mg/L de fenol red) (Hu *et al.*, 1993), após uma hora de recuperação em meio LB a 37°C.

2.1.1.1.2 Vetor plasmidial

O plasmídeo pH8080 (McGee *et al.*, 1999), contendo o operon da urease de *H. pylori*, foi cedido gentilmente pelo Dr. Harry L.T. Mobley – University of Michigan Medical School, USA. A figura 5 mostra a estrutura do plasmídeo pH8080.

### 2.1.1.3 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, foi adicionado 1,5% m/v de ágar.

### 2.1.2 Expressão da HPU

#### 2.1.2.1 Pré-inóculo

De acordo com Wassermann *et al.*, 2010. Brevemente, bactérias congeladas em nitrogênio líquido foram inoculadas em 5mL de meio de cultura LB com cloranfenicol (40 µg/ml). Este pré-inóculo foi cultivado) a 37 ºC, na proporção 1:100 v/v, em 500mL de meio LB contendo cloranfenicol (40 µg/mL) e NiCl₂ (1µM). O cultivo foi incubado a 37 ºC por *overnight* (~16 horas) sob agitação.
2.1.2.2 Preparação de extratos brutos a partir dos cultivos

O cultivo foi centrifugado em Sorvall-Plus RC5b, a 23000 x g, a 4 ºC, durante 10 minutos. O sobrenadante foi despejado e o sedimento suspenso em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 7 (NaPB) e centrifugado novamente sob as mesmas condições. As células foram então ressuspensas em 35 mL de NaPB e lisadas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos de 30 segundos, em banho de gelo. Esse homogeneizado foi centrifugado a 27000 x g, durante 20 minutos, sendo descartado o sedimento. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido à diálise em NaPB para retirada do material com baixa massa molecular, usando membrana de diálise com corte de 12-14 kDa (Spectra/por Molecular Porus Membrane Tubing, Spectrum Labs.com US) e depois filtrado com filtro para seringa 0,22 μm (TPP, Switzerland).

2.1.3 Purificação

O método de purificação da HPU recombinante foi desenvolvido por Wassermann et al., 2010 e adaptado ao longo desse trabalho.

2.1.3.1 Cromatografia de troca iônica HiPrep 26/30 Q-Sepharose

O Extrato bruto foi submetido à cromatografia de troca iônica HiPrep 26/30 Q-Sepharose (GE Healthcare), em um cromatógrafo Ákta Purifier 9 (GE Helcare); sendo a resina previamente equilibrada em 20 mM de fosfato de sódio pH 7 e eluída em gradiente contínuo de 0 a 50% de 20mM de fosfato de sódio e 500 mM de cloreto de sódio pH 7.
2.1.3.2 Cromatografia de exclusão molecular Superdex 200

A fração rica em urease, obtida na cromatografia de troca iônica, foi submetida a cromatografia de gel filtração em coluna Hi-Load 26/600 Superdex 200 (GE Healthcare) previamente equilibrada com 20 mM fosfato de sódio, 350 mM cloreto de sódio, pH 7,5, em cromatógrafo Äkta Purifier 9 (GE Healthcare), obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

2.1.3.3 Cromatografia de exclusão molecular Superose 6

As frações ricas em HPU, resultantes da cromatografia anterior, foram reunidas e em seguida submetidas a uma nova cromatografia de gel filtração em coluna Superose 6 10/300 (GE Healthcare) equilibrada em 20 mM de fosfato de sódio pH 7,5, em sistema Äkta Purifier 9 (GE Healthcare), para análise do perfil oligomérico da HPU após a purificação.

2.2 Subunidades da Urease de *H. pylori*

2.2.1 Manipulação Bacteriana

2.2.1.1 Linhagem Bacteriana

A linhagem *E. coli* BL21 DE3 RIL [argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA)] foi utilizada para a transformação com os vetores pET101, contendo o o ORF da UreA (1018pb) ou da UreB (2036pb) (gentilmente cedidos pelo Dr. Cesare Montecucco, da Università Degli Studi di Padova, Italia), com marca de resistência a ampicilina e cloranfenicol, e cauda de polihistidina, para expressão das subunidades recombinantes da urease de *H. pylori*. 
2.2.1.2 Transformação gênica

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 meio de cultura LB contendo 100 μg/mL de ampicilina e 40 μg/mL de cloranfenicol, após uma hora de recuperação em meio SOC (0,5% extrato de levedura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glicose) a 37 ºC.

2.2.2 Confirmação da transformação

A confirmação da transformação foi realizada através de uma PCR de colônia. Brevemente: foram escolhidas 5 colônias de cada placa, essas foram incubadas em meio de cultura LB usando como antibióticos, 40 μg/mL de cloranfenicol e 100 μg/mL de ampicilina, overnight (~16 h) a 37 ºC. Dessa cultura, 10 μl foram adicionados a 40 μL água destilada, fervidos por 5 min e centrífugados por 1 min a 1200 xg. O sobrenadante foi utilizado para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com 35 ciclos de 15 min sendo: 3 min a 94 ºC de desnaturação inicial, 30 s a 94ºC de desnaturação, 30 s a 57 ºC de anelamento, 60 s a 72 ºC de extenção e 10 min A 72 ºC de extenção final. Foram utilizados os primers comerciais T7 e T7 Term (Promega). O produto da PCR foi submetido a 40 min de eletroforese em gel de agarose 1,2% para confirmação da clonagem. O gel foi analisado no fotodocumentador Discover (Bio-Rad) utilizando o software Quantity-One 1D Analysis Software (Bio-Rad). As colônias que tiveram o plasmídeo corretamente transformado foram estocadas em tubos crioógênicos (TPP, Switzerland) contendo 500 μL de cultura em 15% de glicerol, para armazenagem em nitrogênio líquido.
2.2.3 Teste de verificação de expressão das proteínas

Dez μL de uma suspenção contendo células transformadas com UreA ou UreB, congeladas em nitrogênio líquido, foram inoculadas a 37 ºC em 2 mL meio de cultura LB com 100 μg/ml de cloranfenicol e 100 μg/ml de ampicilina até atingirem a OD₆₀₀ de 0,6, quando foram induzidas, à expressão de UreA ou UreB, com 0,5 mM IPTG overnight a 37 ºC. As células foram então centrifugadas a 2000 xg por 1 min, e ao precipitado foi adicionado 200 μL de tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol). Após fervura por 10 min, um volume de amostra foi aplicada em um gel 12% de acrilamida, por 60 min a 30 mA a 4 ºC, para a confirmação da expressão.

2.2.4 Purificação das subunidades recombinantes UreA e UreB

O procedimento de purificação foi o mesmo para as duas proteínas. As células induzidas foram centrifugadas em Sorvall-Plus RC5b, a 12000 xg, a 4 ºC, durante 20 min. O material sobrenadante foi desprezado, as células no sedimento suspensas em tampão de lise (NaPB 20mM, NaCl 500mM, imidazol 5mM, PMSF 1mM e benzanidina 1 mM em pH 7,5) e então lisadas com ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 20 ciclos de 30 s. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 17000 xg por 20 min, e o sobrenadante foi filtrado (0,22μm, TPP, Switzerland). Esses sobrenadantes foram denominados EBureA e EBureB, conforme a célula de origem, e então submetidos ao(s) próximo(s) passos de purificação.
2.2.4.1 Cromatografia de afinidade em metal imobilizado

Os extratos brutos, EBUreA e EBuReB, contendo as proteínas recombinantes fusionadas a cauda polihistidína, foram submetidos à cromatografia de afinidade em resina Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) com NiCl₂ imobilizado, e equilibrada em tampão de equilíbrio (NaPB 20 mM, NaCl 500 mM, imidazol 5 mM em pH 7,5). Após a etapa de adsorção dos extratos na coluna, a resina foi lavada com tampão de equilíbrio para retirar o material não retido, e em seguida eluída com gradiente descontínuo de Imidazol: 1ª Eluição – Tampão de equilíbrio com 50 mM de imidazol e 2ª Eluição – Tampão de equilíbrio com 300 mM de imidazol. Após a eluição as frações ricas em UreA e UreB foram submetidas a filtração em membrana de 50kDa (Amicon, Milipore).

2.3 Medida de conteúdo proteico e atividade enzimática

2.3.1 Conteúdo Protéico

A determinação do conteúdo protéico das amostras foi realizada a partir da absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 280 nm, utilizando cubetas de quartzo com passo óptico de 1 cm, ou através do método colorimétrico do Coomassie Blue, conforme Bradford, 1976. Os coeficientes de extinção molar das subunidades UreA e UreB foram calculados com ProtParam Tool (Expasy http://expasy.org/).

2.3.2 Detecção de atividade ureásica

Alíquotas de amostras de todas as etapas de purificação, tanto da HPU como da UreA e UreB, foram incubadas com 10 mM de uréia, a 37°C, em tampão PBS pH 7,5
(tampão fosfato 20 mM, 150 mM NaCl pH 7,5). 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 nmol de amônio livre. Uma unidade enzimática de urease foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de amônio por minuto, em pH 7,5 a 37 °C.

### 2.4 Ensaio de agregação plaquetária

Seguiu-se a metodologia descrita em Olivera-Sever et al., 2006. 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 centrífugadas a 200 xg, por 20 min a 18°C. A agregação plaquetária e o “shape-change” foram monitorados por turbidimetria, usando Lummi-agregômetro (Chrono-Log Co. Havertown, Pa.), com registro por 10 min, ou por SpectraMax M3 por 20 min; o intervalo entre as leituras foi mínimo permitido pelo software, SotfMax Pro 5, variando de acordo com o número de poços utilizados em cada experimento. Diferentes protocolos experimentais foram utilizados para investigar o efeito de indutores e inibidores de agregação plaquetária, apresentados de forma esquemática abaixo:
(2) UreA/UreB
Agonistas
5 min T.A. ▼ 2 min 37 °C
Início da leitura no M3
Agitação
Tempo zero
20 min:
Final da leitura no M3

(3) Inibidores
UreB
5 min T.A. ▼ 5 min T.A.
Início da leitura no M3
Agitação
Tempo zero
20 min:
Final da leitura no M3

(4) Inibidores
Agonistas
5 min T.A. ▼ 2 min 37 °C
Início da leitura no M3
Agitação
Tempo zero
20 min:
Final da leitura no M3

(5) Inibidores
5 min T.A. ▼ 2 min 37 °C
Início da leitura no M3
Agitação
Tempo zero
20 min:
Final da leitura no M3

+ ADP/UreB
2.5 Western Blot

Lisados celulares foram desnaturados em tampão de amostra (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol) e aquecidos em banho-maria fervente por 1 min. As amostras foram resolvidas em 12% SDS-PAGE, a 30 mA por 60 min a 4 ºC. As proteínas, resolvidas por SDS-PAGE, foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) a 300 mA por 60 min. Marcadores de massa molecular “Rainbow” (GE Healthcare Amersham) foram utilizados para estimar as massas moleculares. As membranas foram bloqueadas com TTBS (20 mM Tris HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Tween-20, 2,5% caseína) contendo 1% BSA. As membranas foram submetidas à 3 lavagens com TTBS. Como sondas foram usados os seguintes anticorpos policlonais específicos para as subunidades da HPU, desenvolvidos em coelho, na diluição de 1:10.000: anti-ureaseβ (sc-22742, Santa Cruz Bitechtechnology) e anti-ureaseα (sc-21016, Santa Cruz Bitechtechnology). Após 3 lavagens de 5 min com TTBS, as membranas de PVDF foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina (ZyMed, São Franciscisco, CA, 1:10000) e reveladas pela adição de 0,02% NBT, 0,03% BCIP 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0,05% Tween 20, pH 8,9

2.6 Alinhamentos de sequência e estrutura cristalográfica

Os alinhamentos das sequências da HPU e colágeno foram feitos em colaboração com o MSc. Rodrigo Ligabue Braun, e do Grupo de Bioinformática Estrutural, CBiot, UFRGS. As sequências foram obtidas na base de dados de proteínas

A representação estrutural do dodecâmero da HPU foi realizada por meio do visualizador molecular PyMol 1.3 (Schrödinger, LLC). A estrutura tridimensional da enzima foi obtida do RSCB Protein Data Bank (Berman et al., 2002), onde encontra-se depositada sob o código 1E9Z (Ha et al., 2001).

### 2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer utilizando o programa Instat GraphPad e os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.
3 RESULTADOS

3.1 Transformação de Gênica e Purificação de Proteínas

3.1.1 Transformação e Purificação de HPU

O vetor pHP8080 contendo o operon da HPU foi transformado em células de *E. coli* SE5000. Para a confirmação da expressão da HPU, as colônias foram inoculadas em meio seletivo, onde apenas colônias capazes de aumentar o pH do meio, verificado através da mudança de cor do meio USA de amarelo para rosa, foram selecionadas. Após a seleção em meio USA, as colônias foram estocadas em 15% de glicerol e congeladas em nitrogênio líquido. A Figura 6 a seguir mostra colônias positivas e negativas para HPU.

![Figura 6. Colônias de E. coli SE5000 em meio USA.](image)

Placas de petri contendo meio seletivo para urease foram inoculadas com as colônias transformadas, e incubadas a 37 °C overnight. As colônias com halos rosa, em consequência da alcalinização do meio promovido pela expressão de HPU, foram selecionadas para estoque.

Após a seleção, foi feita a purificação da HPU, que foi otimizada ao longo desse trabalho a partir do método descrito por Wassermann. As Figuras 7 e 8 ilustram os
perfis cromatográficos das duas cromatografias que fazem parte da purificação de HPU.
O primeiro passo de purificação é uma cromatografia é uma troca aniónica, como descrito em métodos item 2.1.3.1, em que a HPU é eluída com 206 mM de NaCl.

Figura 7. Perfil de eluição da HPU em cromatografia de troca iônica. Em cromatógrafo Ákta acoplado à coluna cromatográfica Q-Sepharose (GE HealthCare), a proteína foi eluída em 402,65 mL e 206 mM de NaCl, como mostra a seta.

Essa fração rica em HPU da coluna Q-Sepharose é então submetida a duas cromatografias de gel filtração. Da primeira cromatografia de gel filtração, em coluna Hi Load™ Superdex 200 se obtém o perfil mostrado na Figura 8. Na segunda cromatografia de gel filtração, em coluna Superose 6 10/300 GL, é obtido um pico proteíco majoritário (Figura 9) e confirmação do estado oligomérico da HPU, que se comporta com um hexâmero, como descrito em 2001 por Ha et al..
Figura 8. Perfil cromatográfico da HPU em cromatografia de gel filtração S200. Em sistema Äkta utilizamos coluna Superdex S200 Hi-Load (GE HealthCare) a proteína foi eluída em 147 mL, como mostra a seta.

Figura 9. Perfil oligomérico da HPU. Em A temos o perfil cromatográfico da HPU realizado em cromatógrafo Äkta, utilizando a coluna cromatografia Superose 6 10/300 GL, obervamos que a HPU é eluída em 12,11 mL conforme indicado pela seta. Em B, gel de poliacrilamida 12%, em 1 o padrão de massa molecular (GE Healthcare Amersham) e em 2 as duas bandas correspondentes a HPU, uma de 27 Kda e outra de 61 Kda. Gel corado com Coomasie, 5µg de proteína por poço.
3.1.2 Transformação, Expressão e Purificação da UreA e UreB

Os vetores pET101 contendo UreA e UreB foram inseridos em células de *E. coli* BL21 DE3, e em seguida foi realizada a confirmação da clonagem através de um PCR de colônia em gel de agarose 1,2%, mostrado os produtos da PCR no tamanho esperado de 1018pb para UreA e 2036pb para UreB(Figura 10).

Figura 10. Confirmação da transformação bacteriana em Gel de agarose 1,2 %. No primeiro e último poços, padrões de pares de bases. Nos poços 2 a 6, produto de PCR das células clonadas com o vetor contendo o gene da UreA (1018pb). Nos poços 7 a 11, produto de PCR das células clonadas com o vetor contendo o gene da UreB (2016pb). Revelado com brometo de etídeo.

O próximo passo foi a verificação da expressão dessas proteínas recombinantes através de SDS-Page e Western blot, como mostram as Figuras 11 e 12. Após as confirmações, realizamos as purificações. Enquanto a purificação da UreB na cromatografia de afinidade foi eficiente, observamos ainda a presença de contaminantes no caso da UreA, como mostra a Figura 11. Assim, a UreA foi ultrafiltrada em Amicon Ultra (GE) com corte de 50kDa para retirar os contaminantes.
Figura 11. Gel de purificação de UreA e UreB. Em 1 e 6, marcadores de peso molecular. As canaletas 2 e 7 correspondem aos extratos brutos. As canaletas de 2 a 5 mostram diferentes eluições da UreA, e as canaletas de 7 a 10 representam as diferentes eluições de UreB. As setas pretas indicam as bandas correspondentes a UreA (27kDa) e UreB (61kDa), respectivamente.

Figura 12. Western Blot de UreA e UreB. Em A, bandas da UreA (27KDa), sendo cada canaleta correspondente a um colônia de bactérias diferente. Em B, bandas da UreB (61kDa), sendo cada canaleta correspondente a uma colônia de bactérias diferente.
3.2 Interação com Plaquetas

3.2.1 Interação de UreA com Plaquetas

A fim de verificar qual região da HPU interage com plaquetas, testamos o efeito de cada subunidade em separado para os ensaios de agregação plaquetária. Testadas em concentrações variando de 30 nM até 3 μM (representando doses 10 vezes menor a 10 vezes maior do que a concentração agregante da HPU), a interação da subunidade UreA recombinante com plaquetas não resulta em agregação plaquetária (Figura 13), comparado com os controles positivos, colágeno e ADP.

![Figura 13](image)

Figura 13. UreA não é capaz de agregar plaquetas em doses até dez vezes maiores que a HPU. As plaquetas foram induzidas à agregação plaquetária por UreA e 5 μg de colágeno, segundo o protocolo experimental 2.4 item (1) (ver métodos). A agregação foi monitorada em leitor de placas SpectraMax a 37°C com leituras a cada 10 segundos por 20 min em 650nm. Os resultados são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por colágeno, para triplicatas. Os dados foram analisados

36
por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores de p <0,001***.

Por outro lado, quando as plaquetas foram pré-incubadas por 5 min com a UreA, observamos uma inibição parcial dose-dependente da agregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (Figura 14), confirmando que essa interage com as plaquetas, provavelmente com algum componente da superfície celular.

**Figura 14. UreA inibe parcialmente a agregação induzida por colágeno (painel A) e ADP (painel B).**

As plaquetas foram incubadas por 5 min a 37 ºC na presença de UreA em concentrações crescentes, sem agitação. Em seguida, a agregação foi induzida com 5 μg colágeno ou 10 μM de ADP, segundo o protocolo experimental 2.4 item (2), ver métodos. A agregação foi acompanhada no Lummi-agregometro (no inset, dose de 3 μM UreA) e em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 11 segundos durante 20 min a 650 nm. Os resultados são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por colágeno ou ADP, para triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores de p <0,001***.
3.2.2 Interação de UreB com Plaquetas

Testada em concentrações variando de 30 nM a 3 μM, a interação da subunidade UreB recombinante com plaquetas resulta em agregação plaquetária, com perfil dose-efeito semelhante à induzida por HPU (Figura 15), com um início retardado da resposta (em comparação ao ADP), após 2-3 min de contacto com as plaquetas (figura 16).

Figura 15. Curva dose-resposta de agregação plaquetária induzida por UreB ou HPU. A agregação plaquetária foi induzida com doses crescentes UreB, conforme o protocolo experimental 2.4 item (1), ver métodos. A agregação foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 8 segundos durante 20 min a 650 nm. A curva dose resposta de HPU foi modificada de Wassermann et al. 2010, para sobrepor os dados com a curva de UreB. Os resultados são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por UreB ou HPU, em 2 experimentos independentes em duplicata.

Na Figura 16 pode-se notar que a agregação plaquetária induzida por UreB tem duas ondas de agregação bem visíveis, sugerindo que existe um amplificador que atua sob a agregação a partir dos 200 s da cinética de agregação.
Figura 16. Curva de agregação plaquetária induzida por UreB. A agregação plaquetária foi induzida por doses crescentes de UreB, e comparadas com a resposta a 20 µM de ADP. Protocolo experimental 2.4 tipo (1). A agregação foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 8 segundos durante 20 min a 650 nm. Os traçados foram sobrepostos para facilitar a comparação.

No entanto, se as plaquetas são pré-incubadas com UreB sem agitação e, posteriormente, adiciona-se ao meio ADP ou colágeno, observa-se inibição parcial, dose-dependente para UreB, da resposta de agregação plaquetaria (Figura 17). Assim, a resposta das plaquetas à UreB depende das condições experimentais (protocolo 2.4), temperatura, agitação, tempo de exposição, presença de outros agentes ativos.
Figura 17. UreB inibe parcialmente a agregação induzida por colágeno (painel A) e ADP (painel B).

As plaquetas foram incubadas por 5 min a 37ºC na presença de UreB em concentrações crescentes, sem agitar, conforme protocolo experimental 2.4 item (2),ver métodos. Em seguida, a agregação foi induzida com 5 μg colágeno ou 10 μM de ADP. A agregação foi acompanhada no Lummi-agregometro (no inset, doses de 1,5 μM UreB) e em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 11 segundos durante 20 min a 650 nm. Os resultados são expressos como a porcentagem de agregação máxima produzida por colágeno ou ADP, para triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores de p<0,01**p <0,001***.

3.3 Vias de sinalização recrutadas por UreB em plaquetas

A partir de dados anteriores do nosso grupo, em que foi demostrado que a HPU agrega plaquetas recrutando rotas semelhantes às aquelas ativadas em resposta ao colágeno, investigamos as possíveis rotas de ativação/agregação plaquetária induzida pela UreB, utilizando como ferramentas a indometacina, a esculetina e a apirase. A indometacina é um inibidor não específico da ciclo-oxigenase, a esculetina é um inibidor de lipoxigenases e a apirase é uma enzima que hidrolisa ATP, ADP e outros
trifosfo- e difosfonucleósídeos, na presença de cátions divalentes, aos seus equivalentes monofosfonucleósídeos com liberação de fosfatos inorgânicos (Plesner, 1995).

A Figura 18 mostra que o pré-tratamento das plaquetas com a indometacina não altera a capacidade da UreB de agregar plaquetas, como esperado. Dados anteriores do grupo (Wassermann et al., 2010) demonstraram que a HPU agrega plaquetas via 12-lipoxigenase, e não envolve a via ciclo-oxigenase. Quando as plaquetas foram pré-incubada com esculetina, observou-se inibição da agregação plaquetária induzida por UreB sugerindo que, à semelhança da HPU, a UreB também recruta a rota da 12-lipoxigenase para ativar as plaquetas (Figura 19).

**Figura 18. Efeito da indometacina na agregação plaquetária induzida por UreB.** As plaquetas foram pre-incubadas por 5 min a temperatura ambiente na presença de indometacina em concentrações crescentes, conforme protocolo experimental 2.4 tipo (3). Em seguida, foi adicionado 750 nM de UreB, e após mais 5 min à temperatura ambiente, e 2 min à 37 ºC, o experimento foi disparado com o início da agitação. A agregação foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 7 segundos durante 20 min a 650 nm. Em A temos os traçados da agregação plaquetária induzida por UreB na presença de indometacina. E em B temos as médias da agregação plaquetária induzida por UreB na presença de indometacina, em triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.
Figura 19. Efeito da esculentina na agregação plaquetária induzida por UreB. As plaquetas foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente na presença de esculentina em concentrações crescentes, conforme protocolo experimental 2.4 tipo (4), ver métodos. Em seguida, foi adicionado 750 nM de UreB, e após mais 5 min à temperatura ambiente, e 2 min à 37 ºC, o experimento foi disparado. A agregação foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 7 segundos durante 20 min a 650 nm. Em A, traçados da agregação plaquetária induzida por UreB na presença de esculentina. Em B, médias da agregação plaquetária induzida por UreB na presença de esculentina, em triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores de p<0,05 * e p <0,01**.

Quando a apirase foi utilizada como inibidor da agregação plaquetária (por hidrolisar o ADP liberado) induzida por UreB, observamos um discreto aumento da resposta de agregação (Figura 20, painéis A e B), ao contrário de dados anteriores do grupo que mostravam que a apirase inibe a agregação plaquetária induzida por HPU (Wassewrmann et al., 2010). Para fins comparativos, o efeito inibitório da apirase foi testado em ensaios de agregação induzidos por ADP (Figura 20, painéis C e D) e por colágeno (Figura 21).
Figura 20. Efeito da apirase na agregação plaquetária induzida por UreB. As plaquetas foram incubadas por 5 min a 37 °C na presença de apirase (2 U/mL) antes da adição do indutor, ou a apirase foi adicionada juntamente com o indutor, conforme desenho experimental 2.4 itens (4) e (5), ver métodos. A agregação foi induzida com 750 nM de UreB (painéis A e B) ou 20 μM de ADP (painéis C e D), e a resposta das plaquetas foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 7 segundos durante 20 min a 650 nm. Em A, traçados da agregação plaquetária induzida por UreB na ausência e na presença de apirase, resultado típico. Em B, médias da agregação plaquetária induzida por UreB na ausência e presença de apirase (triplicatas). Em C, traçados da agregação plaquetária induzida por ADP na ausência e na presença de apirase, resultado típico. Em D, médias da agregação plaquetária induzida por ADP na ausência e presença de apirase (triplicatas). Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Valores de p <0,001***.
Figura 21. Efeito da apirase na agregação plaquetária induzida por colágeno. As plaquetas foram incubadas por 5 min a 37 ºC na presença de apirase (2 U/mL). Em seguida, a agregação foi induzida com 5 µg de colágeno bovino, conforme desenho experimental 2.4 item (4). A agregação foi acompanhada em leitor de placas SpectraMax M3, com leituras a cada 7 segundos durante 20 min a 650 nm. Em A, traçados da agregação plaquetária induzida por colágeno na presença de apirase, resultado típico. Em B, médias da agregação plaquetária induzida por colágeno na presença de apirase, em triplicatas. Os dados foram analisados por ANOVA com pós-teste Turkey-Kramer os valores de p < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3.4 Interação da HPU com Plaquetas

3.4.1 Alinhamentos

Considerando os resultados que sugerem que a HPU (Wassermann et al., 2010) e sua subunidade UreB (esta dissertação) ativam plaquetas por rotas que são semelhantes àquelas descritas para a agregação plaquetária induzida por colágeno (Coffey et al., 2004) investigamos, através de alinhamentos, possíveis pontos de similaridade das partes expostas da HPU com o colágeno. As sequências das proteínas foram retiradas do NCBI (Wheeler et al., 2008) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e alinhadas com ClustalW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)
(Larkin et al., 2007). Foram feitos alinhamentos das subunidades A e B da HPU contra a sequência de colágeno.

### Alinhamento UreA e colágeno

| COLxxx0 | ----------------------------------------------- |
| HPU_beta | MKLTKELDKLMHYEVALISAHIMEEARAGKRTAELMGE       |
| 70       | 80       | 90       | 100      | 110      | 120      |
| COLxxx0 | GTPP --|--PPGPPG|PPGPPP--|--          |          |
| HPU_beta | GRTLLPDPVMDGVASMINHEVGIEMPFDTKLTVHPFIEANGKLVPGEFLKNEDITI |
| 130      | 140      | 150      | 160      | 170      | 180      |
| COLxxx0 | GKP--|--PPGPPP|--          |          |          |
| HPU_beta | NECKHAASVWYAVGDRPQIGSHHFFEVRMCDFDNKFGKHDIAAGTAACPEGE |

**Alignment data:**
Alignment length : 238  
Identity (*) : 14 is 5.88 %  
Strongly similar (:): 0 is 0.00 %  
Weakly similar (.): 4 is 1.68 %  
Different : 220 is 92.44 %  
Sequence 0001 : COLxxx0 (37 residues).  
Sequence 0002 : HPU_beta (238 residues).

Figura 22. Alinhamento da sequência de aminoácidos da UreA com colágeno. As sequências de aminoácidos foram retiradas do banco de dados do NCBI e o alinhamento foi realizado utilizando o software ClustalW.

### Alinhamento UreB e colágeno

| COL_Ax0 | ------------------------------------------------- |
| HPU_alpha | MKKISRKEYVSMYGPTTDKVLGDLIASEVAHYGEELEKFGGKTLREGMSQSNN |
| 70       | 80       | 90       | 100      | 110      | 120      |
| COL_Ax0 | GKP--|--PPGPPP|--          |          |          |
| HPU_alpha | PSKKELDITNLIVGTLKYKADIGKDGKAGIGGCGDMQDGKNNLSVGFATEA |
| 130      | 140      | 150      | 160      | 170      | 180      |
| COL_Ax0 | GKP--|--PPGPP|--          |          |          |
| HPU_alpha | LAGEGLIVTAAGIDTHIFISPOPIFTAFASGVTMMIGGGTGFGDGTNATTITPPRNLIK |

...
<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>190</th>
<th>200</th>
<th>210</th>
<th>220</th>
<th>230</th>
<th>240</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>WMLRRAEEYSMNLGFLAKGNA ngănASLDAQIEAGAI GFIMHEWGGTTPSAINTHLNVADK</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>250</td>
<td>260</td>
<td>270</td>
<td>280</td>
<td>290</td>
<td>300</td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>YDVQVAHDTDITNEAGCVETMAAIAGRTMHTFHTETAGGGGHPDIIVKVEGHNMLPAST</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>310</td>
<td>320</td>
<td>330</td>
<td>340</td>
<td>350</td>
<td>360</td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>NPTIPFTVNTVAEIHMDLMVCHHLDKSIKEVDVQFADSFRIPQITAAEDTVHDMGAFSITS</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>370</td>
<td>380</td>
<td>390</td>
<td>400</td>
<td>410</td>
<td>420</td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>SDSQAMGRVGEVITRTWQTADKNKKEFGRKLKEEKGDNDNPIKRYLNYTYINPAIAGGIS</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>430</td>
<td>440</td>
<td>450</td>
<td>460</td>
<td>470</td>
<td>480</td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>EYVGSVEVGVADVLWLSPAFFVKNMIIKGGFIALSQMGDANASIPTQPYYREMFA</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>490</td>
<td>500</td>
<td>510</td>
<td>520</td>
<td>530</td>
<td>540</td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>HHGKAYTDANITFVSQAAYDKGIKEELGLERQVLPVKNCHRVTIMQFSNNTTAEHVNP</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>550</td>
<td>560</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>COL_Ax0</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>HPU_alpha</td>
<td>ETYHFVGDKEVTSKPANKVSLAQLFPSIF</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Alignment data:
- Alignment length: 569
- Identity (*): 14 is 2.46%
- Strongly similar (:): 0 is 0.00%
- Weakly similar (.): 12 is 2.11%
- Different: 543 is 95.43%
- Sequence 0001: COL_Ax0 (37 residues).
- Sequence 0002: HPU_alpha (569 residues).

Figura 23. Alinhamento da sequência de aminoácidos da UreB com colágeno. As sequências de aminoácidos foram retiradas do banco de dados do NCBI e o alinhamento foi realizado utilizando o software ClustalW.

A partir dos resultados obtidos no alinhamento, construímos uma representação tridimensional da estrutura do dodecâmero de HPU (Figura 24), para localização das regiões de UreA e UreB que apresentam homologia com colágeno, e verificar se estas estão expostas na superfície da molécula.
Figura 24. Representação estrutural da HPU. Em preto são mostradas regiões do alinhamento da UreA com o colágeno, e em branco regiões de alinhamento da UreB com o colágeno. As demais cores, representam, cada uma, uma unidade funcional (UreA+UreB).

3.4.2 Interação da HPU receptor de colágeno

Considerando: 1) a inibição parcial da agregação induzida por colágeno pelas subunidades da HPU, 2) as regiões de homologia com o colágeno detectadas na HPU, e 3) os dados mostrando que HPU e colágeno recrutam a 12-lipoxigenase plaquetária, avaliamos o papel da glicoproteina VI (GPVI), um importante receptor plaquetário do colágeno, na resposta das plaquetas a HPU. Na Figura 25 mostramos que, quando as plaquetas são incubadas por 10 min a 37°C na presença de 1µg/mL do anticorpo anti GPVI (Santa Cruz Inc. Co.), ocorre inibição da agregação induzida por HPU. Nas mesmas condições de ensaio, o anticorpo provoca uma inibição total da agregação induzida por colágeno.
Figura 25. Envolvimento do GPVI na agregação plaquetária induzida por HPU. Agregação plaquetária induzida por 300 nM de HPU ou 5 µg colágeno é completamente inibida na presença do anticorpo anti-GPVI. As plaquetas foram pré-incubadas com anti-GPVI (1 µg/mL) por 10 min a temperatura ambiente sem agitação; depois a agregação foi induzida pela adição de HPU ou colágeno (tempo zero na figura; protocolo experimental 4), sendo monitorada turbidimetricamente por 10 min com Lummi-agregômetro (Chrono-Log).

3.5 Oligomerização da UreB

Ao longo desse trabalho, notamos que a UreB é bastante instável, ou seja, com o passar do tempo a atividade de indução da agregação plaquetária produzida por UreB decresce assim como a quantidade total de proteína solúvel, monitorada diariamente através do método de Bradford (dados não mostrados). A fim de esclarecer o porquê, foi realizada análise cromatográfica da UreB em sistema Äkta utilizando a coluna cromatográfica Superose 6, em
diferentes tempos após a purificação. Observa-se uma modificação no perfil cromatográfico da UreB, mostrado na figura 26, indicando alterações no estado oligomérico da UreB em função do tempo. É importante salientar que a UreB 8d, 8 dias após a purificação, apresenta capacidade de indução de agregação plaquetária, enquanto a UreB 30d, 30 dias após a purificação, não apresenta mais esse efeito.

Figura 26. Sobreposição dos cromatogramas de UreB. Em sistema Äkta utilizando a coluna cromatográfica Superose 6 para gel filtração, foram analisadas duas partidas da subunidade UreB em diferentes tempos após a purificação. As partidas ficaram estocadas em tampão 20 mM de fosfato de sódio pH 7,5 a 4º C pelo tempo indicado. UreB 30d (linha preta), com mais de 30 dias após purificação; UreB 8d (linha cinza), com 8 dias após a purificação.

Na Figura 27 notamos que na UreB 8d exibe um perfil cromatográfico bastante
diferente da UreB 30d. Western Blot com anti corpo anti-UreB (dado não mostrado) confirmou que todos os picos dos cromatogramas correspondem a UreB em diferentes estados de oligomerização. Os primeiros picos, que apresentam maior tamanho molecular, não entraram no gel. Os resultados confirmam que a UreB pode se polimerizar, o que parece comprometer a sua capacidade de induzir agregação plaquetária, diminuindo a resposta a medida que aumentam as formas maiores da proteína presentes na amostra.

![Figura 28. SDS-PAGE dos picos de eluição das cromatografias de UreB. Em 1, marcador de massa molecular; em 2 e 3, primeiro e segundo picos da cromatografia de UreB 30d, respectivamente; em 4 a 7, os picos de eluição da cromatografia da UreB 8d.](image)
4 DISCUSSÃO

Apesar das ureases terem ampla distribuição entre plantas, bactérias e fungos, e apresentarem organização terciária bastante diversa, essas enzimas são altamente conservadas quanto a sua estrutura quaternária e mecanismos catalíticos. Nosso grupo tem demonstrado que as ureases vegetais e microbianas compartilham propriedades não enzimáticas, como a capacidade de ativar exocitose, e de recrutar a rota dos eicosanóides, (Carlini et al., 1985; Barja-Fidalgo et al., 1991; Olivera-Severo et al., 2006; Wassermann et al., 2010), além de apresentarem potencial pró-inflamatório (Benjamin et al., 1992; Barja-Fidalgo et al., 1991). Uberti et al., 2013 mostraram que a HPU tem grande potencial quimiotático para neutrófilos, ativando a produção de ROS e retardando a apoptose destes, dados sugestivos de que a urease de *H. pylori* pode estar envolvida em outros mecanismos da patogenicidade dessa bactéria, e não somente com a formação de um microclima que possibilita a sua sobrevivência no ambiente gástrico.

Nesse trabalho produzimos em *E. coli* as subunidades recombinantes UreA e UreB na forma solúvel e demonstramos que essas são capazes de interagir com as plaquetas, o que evidencia que as proteínas recombinantes adquiriram pelo menos parte do seu enovelamento original. Verificamos que apesar da UreA não agregar as plaquetas, ela interage com as mesmas, atuando como um inibidor da agregação induzida por ADP e colágeno. Já a UreB parece atuar como um agonista parcial nas plaquetas, podendo induzir *per se* agregação ou atuar como um inibidor da resposta induzida por ADP ou colágeno. Nossos dados mostram que a subunidade UreB provavelmente contem o domínio proteico da HPU que é responsável pela ativação e agregação plaquetária.
As plaquetas de coelho respondem de forma dose-dependente a UreB com um máximo de agregação ocorrendo com 750 nM da proteína, praticamente a mesma concentração em que a HPU promove o máximo de agregação. Além das curvas dose-resposta que se sobrepõem, HPU e UreB promovem perfis muito semelhantes de agregação plaquetária, caracterizada por um início retardado da agregação, e quase nenhum shape-change. Enquanto a HPU produz uma agregação monofásica nas várias concentrações testadas, para a UreB vemos claramente a formação de duas ondas de agregação (Figuras 15 e 16). Outros ativadores de plaquetas, em particular o ADP, induzem ondas bifásicas de agregação, sendo a onda primária um reflexo da ação agregante direta do ADP nas plaquetas, enquanto a segunda onda está associada com a liberação de mais ADP, a partir dos grânulos plaquetários. No caso da canatoxina, uma isoforma da urease de *C. ensiformis*, demonstrou-se que a proteína é desprovida de ação agregante direta, promovendo agregação somente em consequência do ADP liberado (Carlini et al., 1985). Este também é o caso da HPU, uma vez que a apirase, por consumir o ADP liberado pelas plaquetas, inibe completamente a agregação (Wassermann et al., 2010). Não foi possível esclarecer nessa dissertação o significado da onda bifásica de agregação induzida pela UreB. Uma explicação provável seria o próprio comportamento de agonista parcial da UreB, que inibiria em parte a agregação promovida por ADP liberado pelas plaquetas ativadas por ela, além de acelerar a reversão da agregação (como observado na Figura 17). Para compreender esse fenômeno mais estudos serão necessários, como caracterizar a cinética de liberação de ADP das plaquetas ativadas por UreB, e investigar, por exemplo, se plaquetas degranuladas por trombina respondem a UreB.

Pode-se observar no traçado de agregação induzida por ADP na presença das subunidades UreA ou UreB (figuras 14 e 17), que a fase primária da agregação (ação
direta do ADP) parece não ser afetada (mesma cinética da reação não inibida). É importante ressaltar aqui que para visualizarmos a inibição por UreB da agregação plaquetária induzida por ADP ou colágeno, os experimentos foram realizados em tempos inferiores ao tempo de início da agregação plaquetária induzida por UreB (protocolo experimental 1 versus 3). De fato, não observamos uma amplificação da agregação induzida por esses agonistas e sim, uma intervenção da UreB no processo da agregação plaquetária disparado por esses indutores, provavelmente interagindo com componentes da membrana celular das plaquetas, responsáveis pela sua ativação. A inibição da segunda onda de agregação induzida por ADP (Figura 17, inset) sugere que as subunidades interferem nessa fase da agregação, caracterizada pelo processo secretagogo que libera os grânulos densos, reduzindo assim a amplitude da resposta das plaquetas ao ADP.

Considerando os dados anteriores com a canatoxina e a HPU, para os quais o ADP liberado pela plaqueta é o responsável pela resposta de agregação, causou surpresa o resultado apresentado na Figura 20, mostrando que a apirase não inibe, ao contrário, aumenta discretamente a agregação induzida por UreB. Esse resultado sugere que a plaqueta ativada por UreB, diferentemente do que ocorre na ativação por HPU, provavelmente produz/libera traços de outras substâncias que promovem agregação. Essa hipótese explicaria o porquê do efeito agregante da UreB ser muito lento, após um retardo de vários minutos: estando a resposta ao ADP liberado por ação da UreB bloqueado por ela mesma, outro(s) composto(s) produzido(s) pela plaqueta ativada estaria(m) sendo acumulado(s) durante esses minutos, até atingir uma concentração agregante. Como a indometacina não bloqueou a resposta das plaquetas à UreB, descartou-se a produção de tromboxano A2. Outro produto das plaquetas a ser considerado é o PAF-acether, cuja síntese envolve, ainda que indiretamente, a rota da
lipoxigenase (McAManus & Pinckard, 2000), concordando com o efeito inibitório observado para a esculetina. Para investigar essa hipótese, pode-se testar o efeito de antagonistas de PAF-acether na agregação induzida por UreB na presença de apirase. Como podemos ver na Figura 21, a agregação plaquetária induzida por colágeno também não é afetada pela apirase. Nesse caso, no entanto, sabe-se que a produção de tromboxano A2 é majoritariamente responsável pela resposta de agregação da plaqueta (McAManus & Pinckard, 2000). Para compreender melhor a ação agregante da UreB e as diferenças desse processo em relação ao disparado pela HPU, será crucial esclarecer se está havendo liberação de ADP dos grânulos densos, e investigar se outros compostos agregantes estão sendo produzidos pelas plaquetas ativadas pela UreB.

A ausência de efeito inibitório da indometacina permite concluir que a agregação plaquetária induzida por UreB não envolve metabólitos da ciclo-oxigenase. Por outro lado, a participação da via da 12-lipoxigenase na ativação plaquetária induzida por UreB foi demonstrada nos experimentos com esculetina. Esses resultados estão de acordo com o que se conhece para todas as ureases já estudadas quanto à atividade indutora de agregação plaquetária, a canatoxina (Carlini et al., 1985), a urease de Bacillus pasteurii (Oliveira-Severo et al., 2006) e a HPU (Wassermann et al., 2010).

Mostramos, nas Figuras 14 e 17 que UreA e UreB inibem parcialmente a resposta das plaquetas ao colágeno, de uma forma dose dependente. Esses dados sugeriram que UreA e UreB interagem direta ou indiretamente com o principal receptor de colágeno das plaquetas, a GPVI, bloqueando a interação do agonista com seu receptor. Uma análise in silico nos permitiu observar que existem regiões homólogas entre a HPU e o colágeno. Essas sequências homólogas ocorrem em ambas as subunidades da urease, e interessantemente, essas regiões estão parcialmente
sobrepostas na representação estrutural do dodecâmero de HPU mostrado na Figura 24. Os resultados apresentados na Figura 25 apontam para um envolvimento de receptores plaquetários de colágeno, em particular a glicoproteína VI, na ativação e agregação plaquetária induzida por HPU. Em presença do anticorpo anti-GPVI não houve qualquer resposta de ativação das plaquetas em presença da HPU, sequer a mudança de forma (shape change) das plaquetas foi detectada (Wassermann et al., 2010).

O fato da HPU e do colágeno, um dos principais agonistas fisiológicos de plaquetas, interagirem com a mesma glicoproteína VI na superfície plaquetária e recrutarem a mesma rota de transdução de sinal, envolvendo a 12-lipoxigenase, pode ser altamente relevante para os mecanismos de patogênese da bactéria *H. pylori*. Somado a este, tem-se ainda a potente atividade pro-inflamatória da HPU (Uberti et al., 2013). Sabe-se que as plaquetas desempenham um importante papel na inflamação, visto que, quando ativadas são capazes de ativar células inflamatórias como neutrófilos e linfócitos T (Semple et al., 2011). Essas propriedades não enzimáticas da HPU evidenciam que essa proteína pode desempenhar um importante papel na associação entre doenças hematológicas e a infecção por *H. pylori* (Papagiannakis et al., 2013), atuando também como um prolongador da inflamação, que pode resultar na formação de tumores (Mantovani, Allavena et al., 2008).
5 PRÓXIMOS PASSOS

- Determinar se a plaquetas ativadas por UreB liberam ADP dos grânulos densos;
- Analisar a participação de canais de cálcio e de Paf-acether na ativação plaquetária por UreB;
- Verificar a participação do receptor PAR-2 na agregação plaquetária por UreB e colágeno (dados recentes indicam a presença de ativadores de PAR-2 em extratos de *H. pylori*);
- Caracterizar a ligação das UreA e UreB recombinantes com o receptor GPVI: estequiometria, afinidade, reversibilidade, competição com HPU;
- Verificar se UreA e UreB recombinantes possuem (ou interferem em) outras propriedades biológicas da HPU, em particular seus efeitos pró-inflamatórios: edema de pata em camundongos, quimiotaxia inibição de apoptose e produção de ROS de neutrófilos.
6 REFERÊNCIAS


Epithelial Cells and Induces NF-kB Activation and Interleukin-8 Production. Infect Immun. 74(2), 1148-1155.


65. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC.


cell response by Helicobacter pylori Urease subunit B. Immunobiology 216, 803–810.