

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*: ATIVIDADE PRÓ-
INFLAMATÓRIA E EFEITOS EM CÉLULAS EPITELIAIS
GÁSTRICAS

Porto Alegre – Brasil

Agosto de 2014

Urease de *Helicobacter pylori*: Atividade Pró-
Inflamatória e Efeitos em Células Epiteliais
Gástricas

Augusto Frantz Uberti

Tese de doutorado elaborada no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica e do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da professora doutora

Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre – Brasil

Agosto de 2014

Urease de *Helicobacter pylori*: Atividade Pró-Inflamatória e Efeitos em Células Epiteliais Gástricas

Augusto Frantz Uberti

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Dr.^a. Célia Regina Carlini
Centro de Biotecnologia – UFRGS
Orientadora

Dr. Guido Lenz
Centro de Biotecnologia – UFRGS
Co-orientador

Dr. Deiber Olivera Severo
Centro de Biotecnologia – UFRGS
Co-orientador

Dr. Rafael Roesler
Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Jose Claudio Fonseca Moreira
Departamento de Bioquímica
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr.^a. Dulciene Queiroz
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais

Dr.^a. Márcia Wink
Departamento de Ciências Fisiológicas
Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
[revisora]

Esta tese foi desenvolvida sob a orientação da Professora Doutora Célia Regina Carlini, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular e Molecular, junto ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ficha Catalográfica

CIP – Catalogação na Publicação

Uberti, Augusto Frantz
Urease de *Helicobacter pylori*:
Atividade Pró-Inflamatória e Efeitos em Células
Epiteliais Gástricas / Augusto Frantz Uberti - 2014.
xxxx f.

Orientadora: Célia Regina Carlini.
Coorientadores: Deiber Olivera-Severo, Guido Lenz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. urease. 2. *Helicobacter pylori*. 3. inflamação.
4. neutrófilos. 5. células epiteliais gástricas. I.
Carlini, Célia Regina, orient. II. Olivera-Severo,
Deiber, coorient. III. Lenz, Guido, coorient. IV.
Título

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS
com os dados fornecidos pelo autor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Célia pelo exemplo e o empenho que coloca em tudo que faz. Pelas oportunidades e toda a confiança que tem no nosso trabalho. Sabemos que as portas do teu gabinete estão sempre abertas. Obrigado por tudo!

Ao Deiber, que, mesmo sem saber, lá no início da iniciação científica, me instigou a ler, a buscar, a pesquisar. O co-orientador que virou amigo, desses de mesa de bar, de abrir o coração.

A todos os colegas do Laprotox, agradeço a ajuda, conversas, risadas, cafés. O convívio diário tem seus altos e baixos, mas gosto de pensar que tivemos muito mais altos. Obrigado por tudo, até pelos ocasionais puxões de orelha. Agradeço em especial ao Tinoco, que resolve todos os pepinos do laboratório, além de ser conselheiro e massagista nas horas vagas.

Agradeço à Prof^ª Christina Barja-Fidalgo, e todos os colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia da UERJ, em especial ao Pedro e ao João. Também agradeço à Prof^ª Céu Figueiredo, Marina, Miguel, e a todos os colegas e amigos do IPATIMUP.

À Silvia e ao Luciano, sempre muito solícitos em nos ajudar.

Aos amigos, que sempre sabem o que dizer. Sem eles, eu não seria o que sou hoje.

Agradeço à minha rica família, que tá sempre lá, pro que der e vier. Meus pais, César e Veronica, pelo amor, carinho e dedicação. Às manas, Carolina e Isabela, e aos sobrinhos, Pedro, Santiago e Lucca, e a alegria e felicidade que me proporcionam.

Agradeço à Laura, companheira incondicional nesta caminhada.

SUMÁRIO

1. Introdução	xi
1.1. <i>Helicobacter pylori</i> : Breve Histórico	1
1.2. <i>Helicobacter pylori</i> : Patogenicidade	2
1.3. A urease de <i>H. pylori</i>	5
1.4. Ureases vegetais – a canatoxina	7
1.5. Eicosanóides	13
1.6. Endocitose de toxinas	14
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Produção da urease recombinante de <i>H. pylori</i> :	17
3.2. Produção da urease de <i>H. pylori</i> nativa:	19
3.3. Medida de conteúdo proteico	19
3.4. Detecção de atividade ureásica	20
3.5. Ensaio de edema de pata em camundongos	20
3.6. Isolamento de neutrófilos humanos	20
3.7. Ensaio de migração de neutrófilos	21
3.8. Medida da apoptose	21
3.9. Preparo de extratos celulares	22
3.10. Western Blot	22
3.11. Células de epitélio gástrico em cultura	23
3.12. Imunocitoquímica e microscopia confocal	23
3.13. Ensaio de migração celular	24
3.14. Expressão de citocinas pró-inflamatórias	24
3.15. Análise estatística	25
4. Resultados	26
4.1. Capítulo 1	27
4.2. Capítulo 2	39
5. Discussão	63
6. Conclusões	68
7. Perspectivas	69
8. Referências Bibliográficas	70

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CagA	<i>Cytotoxic antigen A</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
EEA1	<i>Early endosome antigen 1</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HP-NAP	<i>Helicobacter pylori</i> neutrophil activating protein
Lamp1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
VacA	<i>Vacuolating cytotoxin</i>

RESUMO

O patógeno gástrico *Helicobacter pylori* é uma espiroqueta microaerofílica que infecta o estômago humano, causando gastrite, úlcera e até câncer gástrico. Esta bactéria produz grandes quantidades da enzima urease, essencial para a sobrevivência deste organismo no ambiente ácido do estômago. No entanto, nosso grupo já demonstrou que ureases possuem propriedades independentes de sua atividade ureolítica em modelos mamíferos, através de rotas mediadas por derivados de lipoxigenases. Neste trabalho avaliamos o potencial pró-inflamatório da urease de *H. pylori*, além de seus efeitos em células epiteliais gástricas. A urease induz edema de pata em camundongos com intensa infiltração de neutrófilos. *In vitro*, a urease a 100 nM foi quimiotática para neutrófilos humanos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Neutrófilos ativados por urease mostraram um aumento de meia-vida, com a inibição de apoptose sendo acompanhada por alterações nos conteúdos das proteínas Bcl-X_L e Bad. Estes efeitos da urease persistem na ausência de atividade enzimática. Os efeitos de edema de pata em camundongos, quimiotaxia e proteção contra a apoptose em neutrófilos humanos foram revertidos na presença de inibidores de lipoxigenase, como esculetina e AA861. Neutrófilos expostos a urease mostraram elevados níveis de 5-lipoxigenase, e nenhuma alteração nos níveis de ciclo-oxigenases. Também observamos que a urease é endocitada por células AGS de epitélio gástrico, que ocorre via endossomos EEA1 e Lamp1-positivos e é dependente de colesterol. Adicionalmente, a urease induz a migração de células AGS em um experimento que simula o ensaio de *wound-healing*. A urease também estimula a expressão de GM-CSF. Juntos, estes dados indicam que a urease, além do papel na sobrevivência no ambiente ácido do estômago, tem um papel importante nas doenças inflamatórias estomacais causadas por *H. pylori*.

ABSTRACT

The gastric pathogen *Helicobacter pylori* produces large amounts of urease, whose enzyme activity enables the bacterium to survive in the stomach. We have previously shown that ureases display enzyme-independent effects in mammalian models, most through lipoxygenases-mediated pathways. Here, we evaluated potential pro-inflammatory properties of *H. pylori* urease and its effects in epithelial gastric cells. Urease induced paw edema with intense neutrophil infiltration. In vitro 100 nM urease was chemotactic to human neutrophils, inducing production of reactive oxygen species. Urease-activated neutrophils showed increased lifespan, with inhibition of apoptosis accompanied by alterations of Bcl-X_L and Bad contents. These effects of urease persisted in the absence of enzyme activity. Urease-induced paw edema, neutrophil chemotaxis and apoptosis inhibition reverted in the presence of the lipoxygenase inhibitors esculetin or AA861. Neutrophils exposed to urease showed increased content of lipoxygenase(s) and no alteration of cyclooxygenase(s). We observed that the endocytosis occur via EEA1 and Lamp1 endosomes, and is dependent of lipid rafts. Additionally, the urease induces the migration of AGS cells in an experiment that simulates the wound healing assay. Urease also stimulates the over-expression of GM-CSF by AGS cells. Altogether, our data indicate that the urease, besides allowing the bacterial survival in the stomach, could play an important role in the pathogenesis of the gastrointestinal inflammatory disease caused by *H. pylori*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto típico de <i>H. pylori</i> (Sycuro et al., 2012).	1
Figura 2. (A) Estrutura cristalográfica da urease de <i>H. pylori</i> [(UreAB) ₃] ₄ . A subunidade A está representada em azul e a B, em amarelo, para um trímero. Em cinza estão as outras três unidades da estrutura (Ha et al., 2001). (B) Esquema da reação catalisada pela urease: hidrólise da ureia produzindo CO ₂ e amônia.....	5
Figura 3. Estrutura das ureases: as enzimas vegetais, como a de <i>C. ensiformis</i> , possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem dois (<i>H. pylori</i>) ou três (<i>K. aerogenes</i> ; <i>P. mirabilis</i> ; <i>B. pasteurii</i>) tipos de cadeias polipeptídicas formando suas “unidades funcionais”. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A porcentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de <i>C. ensiformis</i> está indicada abaixo das barras.	8
Figura 4. Principais vias do metabolismo dos eicosanóides. (Harizi et al., 2008).	13
Figura 5. Estrutura do plasmídeo pHP8080, contendo o operon da urease de <i>H. pylori</i> linhagem 26695 (ureABIEFGH), o gene codificante para proteína transportadora de níquel (nixA) e marca de resistência para cloranfenicol (cat) (McGee et al., 1999).	17
Figura 6. Sistema utilizado para medir migração celular.	24
Figura 7. Perfil cromatográfico da separação da urease e da GroEL em cromatografia de troca iônica Source 15Q.	39
Figura 8. SDS-PAGE dos dois maiores picos da cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q.	40
Figura 9. Ensaio de imunofluorescência de urease e EEA1.	41
Figura 10. Imunolocalização de urease e EEA1.	42
Figura 11. Co-localização da urease com endossomos Lamp1-positivos.	43
Figura 12. A endocitose é colesterol dependente.	44
Figura 13. Ensaio de migração celular utilizando o modelo de inserto da Ibidi.	45
Figura 14. Expressão de citocinas em células AGS ativadas por urease.	46

1. Introdução

1.1. *Helicobacter pylori*: Breve Histórico

Helicobacter pylori é uma bactéria gram-negativa, helicoidal, de aproximadamente 3 μm de comprimento e 1 μm de diâmetro, e com até 6 flagelos em uma de suas extremidades. Microaerofílica, requer um ambiente pobre em oxigênio para proliferar (Goodwin and Armstrong, 1990).

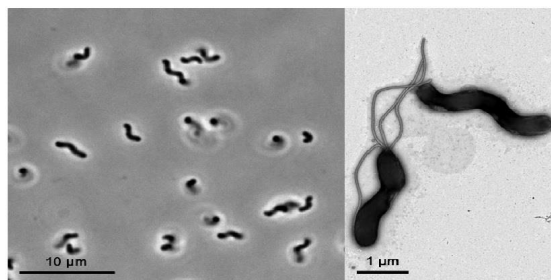


Figura 1. Aspecto típico de *H. pylori* (Sycuro et al., 2012)

Estudos recentes indicam que o estômago do *Homo sapiens* moderno estava infectado com *H. pylori* antes mesmo das primeiras migrações para fora do continente africano, cerca de 60 mil anos atrás (Linz et al., 2007).

A primeira descrição de bactérias do gênero *Helicobacter* ocorreu em 1893, por Bizzozero, um anatomista italiano, que, observando a mucosa gástrica de cães, relatou a presença de espiroquetas habitando as glândulas gástricas (Bizzozero, 1893). Sabe-se hoje em dia que estas espiroquetas eram *Helicobacter canis* e/ou *Helicobacter heilmannii*.

Durante o século XX, patologistas e anatomistas observaram organismos espiralados na mucosa gástrica humana. Na década de 70, Steer e Colin-Jones estudaram a presença de bactérias e inflamação em úlceras gástricas com sangramento. Eles notaram que numerosas bactérias espiraladas estavam presentes em 80% das biópsias observadas. Infelizmente, não foi possível cultivar estes organismos, pois as técnicas para o isolamento de bactérias microaerofílicas só seriam desenvolvidas alguns anos depois (Steer and Colin-Jones, 1975).

Em 1982, Marshall e Warren, na Austrália, iniciaram suas pesquisas com tentativas de cultivar o organismo espiralado presente na maioria das biópsias de pacientes com úlcera péptica duodenal (Marshall and Warren, 1984). Apenas após a 35ª biópsia eles obtiveram sucesso. Algumas culturas foram esquecidas no incubador durante um longo feriado, e isso proporcionou tempo para que a bactéria pudesse crescer (Marshall, 2001).

Marshall e Warren mostraram concisamente a correlação e causalidade da bactéria e a ocorrência de gastrite em pacientes infectados. Antes deste estudo, gastroenterologistas ainda eram céticos com o fato de uma bactéria causar gastrite e úlcera gástrica. Subsequentemente, diversos estudos demonstraram que a erradicação de *H. pylori* com antibióticos curava a úlcera péptica (Coghlan et al., 1987, Rauws and Tytgat, 1990, Graham, 1991). Em 2005, Barry Marshall e Robin Warren receberam o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pela “redescoberta” de *H. pylori* e sua participação no desenvolvimento de gastrite e úlcera péptica.

1.2. ***Helicobacter pylori*: Patogenicidade**

Atualmente, *H. pylori* é reconhecido como o agente patológico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal (IARC, 1994). Estima-se que este microrganismo pode ser encontrado em cerca de 60% da população mundial (Carter et al., 2011), e em países subdesenvolvidos, ocorrências de 80% são relatadas em adultos (Wang and Peura, 2011). Apesar de ainda não ser completamente conhecida, sugere-se que a transmissão deste organismo ocorra através de contatos pessoa-pessoa e disseminação intrafamiliar. Comunidades com alta densidade familiar tendem a ser grandes repositórios da bactéria (Calvet et al., 2013).

Muitos fatores de virulência estão envolvidos no mecanismo patológico da infecção por *H. pylori*, incluindo várias enzimas (urease, catalase, proteases) e toxinas proteicas, como a citotoxina vacuolizante VacA, a proteína ativadora de neutrófilos (HP-NAP) e a proteína citotóxica CagA.

CagA, uma proteína de 120-145 KDa codificada pelo gene *cagA*, localizado na ilha de patogenicidade *cag* (*cag* PAI), é um importante efetor da infecção por *H. pylori*. O CagA é translocado para dentro da célula gástrica

através de um sistema de secreção do tipo IV, onde é fosforilado e causa uma série de reações, como danos a complexos de junção célula-célula e mudanças na transdução de sinais intracelulares, o que leva a alterações no crescimento e motilidade das células (Wu et al., 2013).

A proteína VacA é assim chamada por induzir a formação de estruturas vesiculares em células de epitélio gástrico, levando a uma desregulação de vias de tráfego intracelular. Além disso, apresenta outros efeitos, como a interrupção das funções mitocondriais, estímulo de apoptose e bloqueio da diferenciação de linfócitos T. Esta toxina é um hexâmero de subunidades de 88 kDa, com uma forma de “estrela”. Foi proposto que esta conformação confere à toxina VacA uma propriedade de formação de canais iônicos, que alteram o potencial eletroquímico de membranas mitocondriais, levando à liberação de citocromo c, e a indução de apoptose (Palframan et al., 2012). VacA é internalizada por células epiteliais gástricas, e acumula em endossomos tardios, caracterizados por serem revestidos pela GTPase Rab7, e este acúmulo inicia a formação de vacúolos (Gauthier et al., 2007).

A HP-NAP foi identificada em extratos aquosos de *H. pylori* em 1995, por sua habilidade de estimular a produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos, e promover sua adesão a células endoteliais (Evans et al., 1995). Esta proteína é um dodecâmero esférico de subunidades de 150 kDa, contendo uma cavidade central onde acumula ferro (Tonello et al., 1999). A HP-NAP é quimiotática para neutrófilos, e também leva a uma diferenciação de linfócitos T helper a um fenótipo Th1, uma resposta geralmente associada a doenças graves (Amedei et al., 2006).

A infecção por *H. pylori* promove uma inflamação crônica na mucosa gástrica, o passo principal na iniciação e desenvolvimento de câncer gástrico. A bactéria induz uma resposta inflamatória em células epiteliais e células do sistema imunitário circulantes, recrutadas ao sítio de infecção. Foi relatado que a infecção regula positivamente as citocinas IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , NF- κ B, importantes mediadores no desenvolvimento de inflamação gástrica (Lamb and Chen, 2013). *H. pylori* também estimula a produção de fatores de crescimento, como o estimulador de colônias das células progenitoras da medula óssea (GM-CSF - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), e

moduladores inflamatórios, como ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (Beales and Calam, 1997, Cho et al., 2010).

Espécies reativas de oxigênio são subprodutos de processos metabólicos das células, e em altas concentrações podem estar implicados em processos inflamatórios. A gastrite associada à infecção por *H. pylori* estimula a geração de ROS por células inflamatórias presentes na mucosa (Smoot et al., 2000). Distúrbios no balanço oxidante-antioxidante podem aumentar os riscos de morte celular, ou ainda causar danos ao DNA, podendo representar um passo inicial da carcinogênese gástrica. Já foi relatado que extratos aquosos de *H. pylori* induzem diretamente a síntese de ROS por células epiteliais gástricas, levando a um aumento de expressão dos componentes de reparo de DNA (Obst et al., 2000).

A apoptose em neutrófilos e a subsequente atuação de fagócitos é crucial para a instalação de uma inflamação aguda (Savill et al., 2002). A apoptose é retardada em neutrófilos humanos ativado por IL-8, GM-CSF, LPS, ou leucotrieno B₄, que modulam rotas de sinalização incluindo as MAPKs, especialmente as rotas ERK e PI3K/Akt (Hebert et al., 1996, Ward et al., 1999). A rota de ativação de NF-κB tem um efeito protetor, regulando a expressão de genes antiapoptóticos. Em neutrófilos humanos, a ativação de NF-κB parece regular a apoptose espontânea, bem como o efeito antiapoptótico de TNF-α. Além disso, as respostas intermediadas pela ativação de NF-κB, na infecção por *H. pylori*, dependem do envolvimento de balsas lipídicas ricas em colesterol nas células de epitélio gástrico (Hutton et al., 2010). Vários estudos mostram que *H. pylori* é capaz de induzir apoptose em células do epitélio gástrico, tanto *in vivo* como *in vitro*, bem como em monócitos de camundongos (Cover et al., 2003, Galgani et al., 2004).

O processo inflamatório crônico desencadeado por *H. pylori* leva a dano tecidual. Em um estudo realizado com *Helicobacter felis*, uma espécie adaptada a infectar camundongos, foi demonstrado que células derivadas da medula óssea (BMDCs) migram e implantam-se em sítios de inflamação - particularmente em focos em que o dano tecidual induz apoptose - repovoam a mucosa gástrica e podem contribuir para metaplasias, displasias e câncer (Houghton et al., 2004).

A exposição do mesentério a extratos aquosos de *H. pylori*, ricos em urease, resultou em um aumento de três vezes na aderência de leucócitos nas vênulas, e de quatro vezes na migração destes para a região intersticial, contribuindo para o dano à mucosa gástrica (Yoshida et al., 1993).

1.3. A urease de *H. pylori*

A urease é uma enzima níquel dependente altamente expressa por *H. pylori*, podendo compor de 10% a 15% das proteínas totais dessa bactéria. Sua unidade funcional (“monômero”) é composta por duas cadeias polipeptídicas (UreA [30kDa] e UreB [62kDa]) em proporção 1:1. A forma da urease encontrada em cristais é dodecamérica, possuindo massa molecular de aproximadamente 1,1 MDa (Figura 2) (Ha et al., 2001). Em solução também podem ser encontrados hexâmeros da urease, bem como formas menores. A urease catalisa a reação de hidrólise da ureia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono. A afinidade dessa enzima pelo substrato ureia, com um $K_m \sim 0.3$ mM, a torna cataliticamente eficiente nas concentrações submilimolares de ureia presentes nos fluidos humanos (Dunn et al., 1990, Hu and Mobley, 1990).

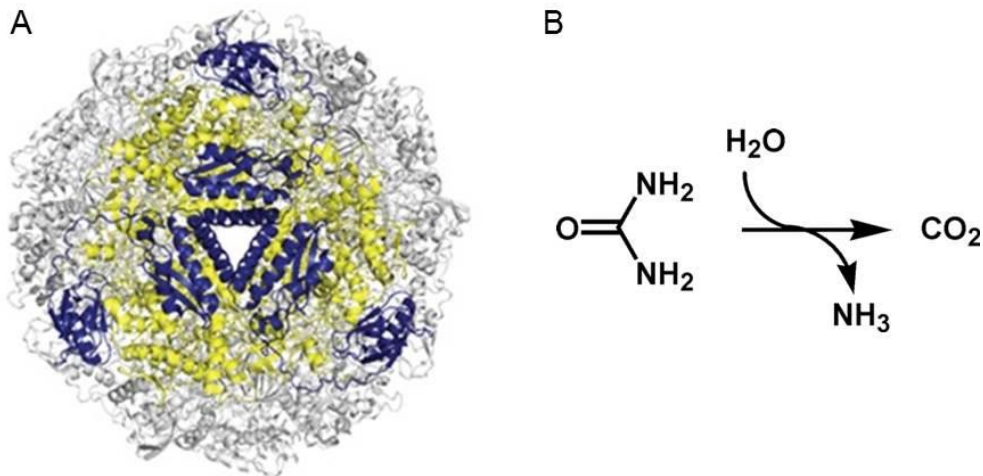


Figura 2. (A) Estrutura cristalográfica da urease de *H. pylori* [(UreAB)₃]₄. A subunidade A está representada em azul e a B, em amarelo, para um trîmero. Em cinza estão as outras três unidades da estrutura (Ha et al., 2001). (B) Esquema da reaao catalisada pela urease: hidrólise da ureia produzindo CO₂ e amônia.

A urease é uma proteína citoplasmática, mas também pode ser encontrada na superfície de algumas bactérias, provavelmente devido à lise bacteriana de subpopulações que não resistem a acidez estomacal (Marcus and Scott, 2001). Esta urease extracelular não possui atividade enzimática (Stingl et al., 2001). A uréia é captada pelo *H. pylori* através de um canal de uréia regulado por prótons, Urel (Weeks et al., 2000). A urease regula o pH intracelular, liberando amônia para ligar-se a prótons, e também regula o pH extracelular, quando a amônia difunde para o periplasma e ao ambiente ao redor da bactéria (Montecucco and Rappuoli, 2001). Apesar de ser extremamente abundante, a transcrição, expressão e atividade da urease são reguladas por NikR, uma proteína responsável pela regulação da entrada de níquel na bactéria (van Vliet et al., 2002).

Em 1990, foi demonstrado por Marshall e colaboradores que a potente atividade ureolítica da urease de *H. pylori* explica sua capacidade de colonizar o ambiente extremamente ácido do estômago (Marshall et al., 1990). A urease é considerada um importante fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador amplamente utilizado para diagnósticos (Krogfelt et al., 2005). Mutantes de *H. pylori* urease negativos são incapazes de colonizar o estômago de leitões gnotobióticos e tampouco camundongos *nude* (Eaton et al., 1991, Tsuda et al., 1994). *H. pylori*, uma bactéria não acidófila, sobrevive em uma faixa de pH que vai de 4.0 a 8.0. No entanto, na presença de ureia, a bactéria consegue sobreviver em ambientes com pH de até 2.5. Além disso, o aumento do pH da mucosa gástrica diminui sua viscosidade e permite uma maior quimiotaxia da bactéria (Celli et al., 2009).

Apesar de inibidores de urease terem sido utilizados no tratamento de algumas destas patologias, seu uso foi descontinuado pelo fato de muitos pacientes apresentarem reações colaterais adversas. O uso clínico de ácido acetohidroxâmico, um inibidor de urease, causa depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, além de ser teratogênico em doses elevadas (Baillie et al., 1986). Diversos novos estudos de *screening* de inibidores de urease vem sendo realizados nos últimos anos. Por exemplo, fosforamidatos mostram altíssima atividade inibitória, porém não foram industrializados devido à hidrólise destas moléculas no baixo pH do estômago. Vários estudos de grupos japoneses têm demonstrado a ação inibitória de polifenóis encontrados em

extratos vegetais. No entanto, compostos com alta atividade inibitória e estabilidade hidrolítica ainda não foram descritos (Kosikowska and Berlicki, 2011).

A degradação de ureia, que difunde do leito capilar, pela urease e, conseqüentemente, a liberação de amônia resulta em danos celulares (Barer et al., 1988) e contribui na indução de vacuolização das células epiteliais gástricas, em conjunto com a toxina VacA. A urease de *H. pylori* também está envolvida na ativação de fagócitos e na produção de citocinas inflamatórias (Harris et al., 1996).

Tight junctions são estruturas localizadas na porção apical de contatos célula-célula, e tem um papel crítico na manutenção da função da barreira epitelial gástrica, essencial para prevenir o acesso de elementos danosos à mucosa gástrica. Um trabalho publicado em 2009 demonstrou que *H. pylori* interrompe a função desta barreira, e que a urease, e sua atividade ureolítica, estariam envolvidos nesta propriedade da bactéria (Wroblewski et al., 2009).

1.4. Ureases vegetais – a canatoxina

Ureases (ureia amidohidrolase; EC 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes (Dixon et al., 1975) que catalisam a hidrólise de ureia a amônia e dióxido de carbono. As ureases são encontradas em bactérias, fungos e plantas, não sendo sintetizadas por animais, e possuem unidades funcionais compostas por um único tipo de cadeia polipeptídica com aproximadamente 90 kDa. Já as ureases bacterianas possuem unidades funcionais compostas por duas ou três cadeias polipeptídicas diferentes, que são homólogas às cadeias únicas das proteínas vegetais ou fúngicas (Moblely et al., 1995, Sirko and Brodzik, 2000). A figura 3 ilustra as diferenças entre ureases vegetais e bacterianas, quanto às suas estruturas quaternárias.

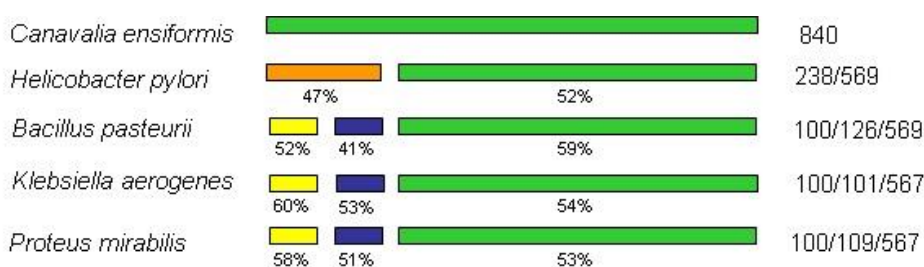


Figura 3. Estrutura das ureases: as enzimas vegetais, como a de *C. ensiformis*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem dois (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*) tipos de cadeias polipeptídicas formando suas “unidades funcionais”. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A porcentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de *C. ensiformis* está indicada abaixo das barras.

Em bactérias, estas enzimas estão envolvidas em vários processos patogênicos, como, por exemplo, em casos de infecção por *Proteus mirabilis*, na formação de cálculos urinários, incrustação de cateter, pielonefrites, e inclusive coma hepático (Armbruster and Mobley, 2012).

Em plantas, essas enzimas estão amplamente distribuídas, no entanto pouco se conhece sobre seu papel fisiológico. Uma possível função para urease em plantas superiores seria a biodisponibilização de nitrogênio (Polacco and Holland, 1993). Constatou-se que, em plantas e culturas de tecidos vegetais desprovidos de urease, quer induzidos geneticamente, na presença de inibidores de urease, ou por remoção do níquel, observa-se um acúmulo de ureia ou um comprometimento do emprego de ureia como fonte de nitrogênio (Polacco and Holland, 1993). O fato de a ureia ser uma forma de excreção de nitrogênio apenas em animais, ou seja, não é um metabólito majoritário nos vegetais onde esta enzima é abundante, constitui um entrave na argumentação de que a urease teria como função principal a biodisponibilização de nitrogênio.

Com a descoberta de duas isoenzimas de urease na soja (*Glycine max*), a urease ubíqua da soja, presente em todos os tecidos da planta, e a urease embrião-específica, encontrada na semente madura, onde apresenta atividade ureolítica 1000 vezes maior que a ubíqua, surgiram algumas dúvidas a respeito da função dessas enzimas nas plantas (Polacco and Winkler, 1984). Como a perda da urease embrião-específica não acarreta danos visíveis na planta,

acredita-se que esta enzima não desempenha função fisiológica ligada ao metabolismo de nitrogênio na planta. O fato do embrião em desenvolvimento produzir altas quantidades de uma enzima que praticamente não tem contato com o seu substrato, sugere que esta urease esteja envolvida em algum outro tipo de função, por exemplo, a defesa da planta (Polacco and Holland, 1993).

A canatoxina, uma isoenzima de urease encontrada nas sementes de *Canavalia ensiformis*, é letal para ratos e camundongos por via intraperitoneal, mas inócua se administrada oralmente (Carlini and Guimaraes, 1981). Essa toxina possui também atividade inseticida (Carlini et al., 1997, Ferreira-DaSilva et al., 2000, Staniscuaski et al., 2005, Defferrari et al., 2011), e fungicida (Becker-Ritt et al., 2007, Postal et al., 2012), o que reforça a hipótese de que as ureases estariam envolvidas nos mecanismos de defesa das plantas.

Vários peptídeos internos da canatoxina já foram sequenciados, obtidos por hidrólise trípica ou por endoproteinase Lys-C, sendo que todos eles revelaram um alto grau de similaridade com a sequência primária de urease da *C. ensiformis*. A composição percentual de aminoácidos é indicativa de uma grande semelhança das duas proteínas. A partir dessa evidência, a canatoxina foi caracterizada como uma variante da urease de *C. ensiformis*, apresentando-se em sua forma nativa como um dímero não covalente de cadeias de 95 kDa (Follmer et al., 2001). As duas isoformas de urease podem ser separadas cromatograficamente, sendo que a canatoxina apresenta maior afeição por metais (Zn^{++} e Co^{++}) em cromatografia de afinidade em metal imobilizado, o que permitiu o estabelecimento de protocolos de purificação para a obtenção das isoformas altamente purificadas (Follmer et al., 2004).

Apesar da alta similaridade, a canatoxina purificada apresenta apenas 30-40% da atividade ureolítica da urease de *C. ensiformis*. Postula-se que essas ureases possuem domínios protéicos distintos, os quais são responsáveis por atividades biológicas diferentes: um domínio com atividade hidrolítica sobre ureia, suscetível de inibição por agentes quelantes e oxidantes; e pelo menos mais outro domínio, níquel e tiol independentes, que seria responsável pelos seus outros efeitos biológicos (Follmer et al., 2001, Follmer et al., 2004).

Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que a canatoxina apresenta uma série de efeitos biológicos que parecem estar relacionados com

a capacidade da proteína em ativar os sistemas secretórios de diversos tipos celulares. Tal efeito secretagogo da canatoxina envolve mediação por metabólitos do ácido araquidônico via lipoxigenases. A tabela 1 expõe alguns dos efeitos descritos para canatoxina.

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

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

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

A canatoxina, quando administrada intraperitonealmente em ratos e camundongos (DL₅₀ de 0.4-0.6 e 2-3 mg/kg respectivamente), induz alterações respiratórias, convulsões e morte (Carlini and Guimaraes, 1981, Carlini et al., 1984). Em doses subconvulsivantes, a canatoxina promove um aumento dos níveis plasmáticos de gonadotrofinas (Ribeiro-DaSilva et al., 1989), de insulina, de modo dose e sexo dependente em ratos (Ribeiro-DaSilva and Prado, 1993), e apresenta também efeitos pró-inflamatórios em ratos, tanto em modelos *in vivo* como *ex-vivo* (Benjamin et al., 1992, Barja-Fidalgo et al., 1992).

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

A maioria dos efeitos descritos para a canatoxina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, envolve mediação por metabólitos do ácido araquidônico via lipoxigenases, já que esses efeitos são bloqueados por inibidores de lipoxigenase, por exemplo, ácido nordihidroguaiarético e esculetina, e não por inibidores de ciclo-oxigenases, como ácido acetilsalicílico e indometacina (Benjamin et al., 1992, Carlini et al., 1985, Barja-Fidalgo et al., 1991a, Ribeiro-DaSilva et al., 1989)

A canatoxina também apresenta um efeito inibitório sobre o acúmulo de Ca^{2+} em vesículas do retículo sarcoplasmático, resultante da atividade enzimática da $Ca^{2+}Mg^{2+}$ -ATPase presente. A toxina parece desacoplar o transporte de cálcio, através da membrana, da atividade hidrolítica da enzima sobre o ATP, um dado relevante para o entendimento das propriedades secretagogas desta proteína (Alves et al., 1992).

O efeito pró-inflamatório da canatoxina foi caracterizado em ratos pela indução de migração de neutrófilos e monócitos para as cavidades peritoneal e pleural, além de apresentar efeito no modelo *air pouch*, mediado pela liberação de fatores quimiotáticos de macrófagos peritoneais de ratos (Barja-Fidalgo et al., 1992). Em ensaio de edema de pata em ratos, com doses de 50 μ g e 100 μ g de canatoxina por pata, a inflamação é dose dependente, com pico máximo após 6 horas da injeção intraplantar e com regressão total em 48 horas. Este fenômeno parece ser mediado por metabólitos das vias das lipoxigenases, provavelmente leucotrienos, que causam infiltração celular intensa no local da inflamação (Benjamin et al., 1992).

Desde 2004, nosso grupo vem demonstrando que propriedades biológicas independentes de ureólise não são exclusivas das ureases de

Canavalia ensiformis. A urease embrião-específica de soja (*Glycine max*) e a urease da bactéria de solo *Bacillus pasteurii* também induzem ativação de plaquetas, de modo semelhante às ureases de *C. ensiformis* (Follmer et al., 2004). A rota de ativação da resposta das plaquetas à urease de *B. pasteurii* foi caracterizada, demonstrando-se o envolvimento da 12-lipoxigenase plaquetária e de canais de cálcio voltagem dependentes (Olivera-Severo et al., 2006).

Na tese de doutorado de Olivera-Severo, em 2006, foi descrito pela primeira vez o potencial pró-inflamatório da urease de *H. pylori*, através do modelo de edema de pata em camundongos. Este resultado mostrou que a formação de edema tem um pico entre 4 e 6 horas após a injeção sub-plantar da amostra (Olivera-Severo, 2006).

Mais recentemente, Wassermann (2010) mostrou que a urease da bactéria *H. pylori* também ativa plaquetas sanguíneas e induz agregação plaquetária, recrutando a rota dos eicosanóides, através da via da lipoxigenase. Esta ativação é inibida por dexametasona (inibidor de fosfolipase A2) e esculetina (inibidor de lipoxigenases), e potenciada por indometacina (inibidor de ciclooxigenases), como ilustra a Tabela 3 (Wassermann et al., 2010).

Tabela 2. Envolvimento de fosfolipase A2 e eicosanóides na agregação plaquetária induzida pela urease de *H. pylori*.

Tratamento	Agregação Plaquetária % Média ± DP
Nenhum	100 ± 10,04
Dexametasona (50 µM)	62,64 ± 6,06
Esculetina (500 µM)	55 ± 6,06
Indometacina (150 µM)	160,74 ± 12,74
(300 µM)	313,26 ± 3,78

(Retirado de Wassermann et al., 2010)

Em 2010, demonstramos que a urease tem diversos efeitos em neutrófilos, como proteção contra apoptose, quimiotaxia e aumento da produção de ROS (Uberti, 2010).

1.5. Eicosanóides

Os eicosanóides são autacóides derivados do ácido araquidônico por rotas metabólicas distintas, entre as quais a via das ciclo-oxigenases e a via das lipoxigenases (figura 3), hoje reconhecidos como segundo mensageiros envolvidos na transdução de sinais numa vasta gama de fenômenos fisiológicos e patológicos.

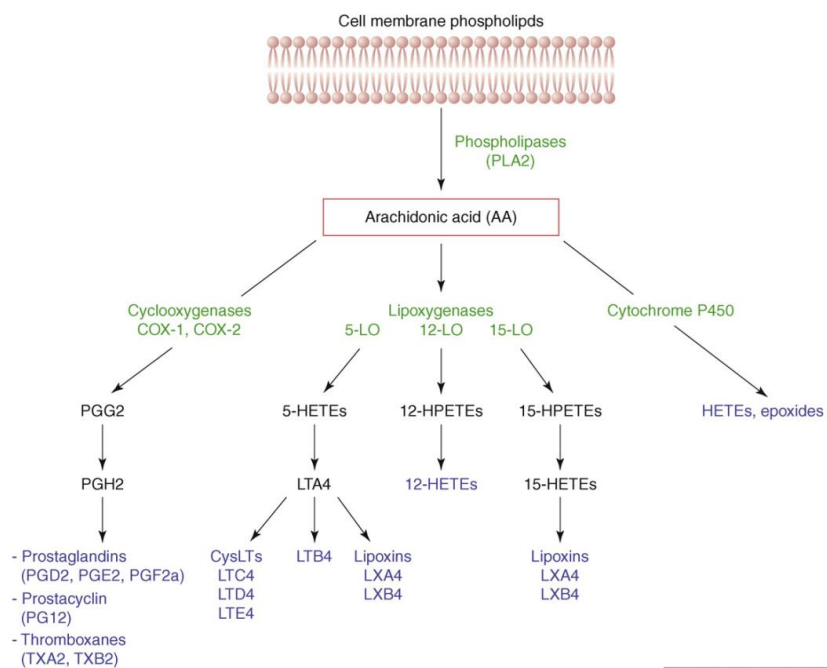


Figura 4: Principais vias do metabolismo dos eicosanóides. A liberação de ácido araquidônico, constituinte minoritário dos fosfolípidos de membranas, ocorre por hidrólise catalisada por fosfolipases tipo A2. Uma vez liberado, o ácido araquidônico será substrato para diferentes rotas metabólicas, particulares para cada tipo celular. Através da via da ciclo-oxigenase formam-se prostaglandinas e tromboxanas, enquanto que a ação das diferentes lipoxigenases levará a formação de hidroperóxidos e leucotrienos (Harizi et al., 2008).

O ácido araquidônico, atuando diretamente ou na forma de seus metabólitos, eicosanóides, regula uma série de funções celulares (Sakata et al.,

1987, Sumida et al., 1993). Prostaglandinas, produtos de cicloxigenases, e leucotrienos, produtos de lipoxigenases, são mediadores de atividades biológicas em várias doenças inflamatórias, e em condições crônicas de inflamação, os níveis de eicosanóides estão aumentados (Harizi et al., 2008).

Existem muitos indícios de que os produtos de lipoxigenases, como os leucotrienos, estariam envolvidos nos processos secretórios de diferentes tipos celulares (Wang and Dubois, 2010). Além disso, a inibição da 5-lipoxigenase diminui o crescimento e promove morte celular em diversas linhagens transformadas (Massoumi and Sjolander, 2007). A indução de colite, uma doença que induz uma resposta inflamatória violenta, em camundongos lipoxigenase-negativos, foi significativamente reduzida (Cuzzocrea et al., 2005). Receptores para leucotrieno B₄ tem sua expressão aumentada em amostras de câncer gástrico (Venerito et al., 2011), e sabe-se que a inflamação decorrente da infecção por *H. pylori* estimula a produção de metabólitos de 5-lipoxigenase, resultando em um aumento na produção de citocinas inflamatórias (Park et al., 2007).

1.6. Endocitose de toxinas

Geralmente, as toxinas bacterianas são divididas em três classes de acordo com seu modo de ação nas células do hospedeiro: (i) interferem em vias de sinalização transmembrana; (ii) alteram a permeabilidade da membrana plasmática; e (iii) atuam dentro da célula. No último caso, a internalização da toxina segue alguns passos: ligação à superfície celular, internalização e tráfego intracelular, e translocação para o citosol. A toxina de *H. pylori* VacA atua dentro da célula gástrica, e sua internalização tem sido estudada. VacA interage com *lipid rafts*, onde pode se ligar a diferentes receptores de membrana, é internalizada para endossomos iniciais, e associa-se a endossomos tardios, onde induz vacuolização (Cover and Blanke, 2005).

A urease de *H. pylori* interage com a cadeia invariante do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, CD74. Esta interação induz a expressão de NF-κB e IL-8 em células epiteliais gástricas, respostas

que foram bloqueadas com anticorpos monoclonais para CD74 (Beswick et al., 2006).

2. Objetivos

Objetivo geral: Baseados nos estudos anteriores sobre as propriedades farmacológicas da canatoxina, em especial o seu efeito pró-inflamatório, bem como suas ações secretagoga e indutora de ativação plaquetária, no presente trabalho exploramos a hipótese de que a urease de *H. pylori* compartilha estas propriedades independentes de atividade ureolítica.

Objetivos específicos:

- a) Investigar o potencial pró-inflamatório da urease de *H. pylori* utilizando o modelo *in vivo* de edema de pata.
- b) Verificar a participação da urease na ativação de neutrófilos humanos.
 - a. Efeito na apoptose e quimiotaxia;
 - b. Indução da produção de espécies reativas de oxigênio;
 - c. Envolvimento da rota da 5-lipoxigenase nos efeitos induzidos pela urease.
- c) Avaliar o efeito da urease em processos inflamatórios e angiogênicos em células de epitélio gástrico;
 - a. Internalização da urease;
 - b. Efeito na motilidade celular;
 - c. Indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias.

3. Materiais e Métodos

Neste trabalho, a urease de *H. pylori* foi purificada de duas maneiras diferentes: 1) proteína recombinante, obtida a partir de uma linhagem de *Escherichia coli* transformada com um vetor contendo o operon da urease, e 2) proteína nativa, obtida a partir da própria *Helicobacter pylori*, linhagem 26695.

3.1. Produção da urease recombinante de *H. pylori*:

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

Foi utilizado o plasmídeo pHP8080 (cedido gentilmente pelo Dr. Harry L.T. Mobley - University of Michigan Medical School). A figura 4 mostra a estrutura do plasmídeo.

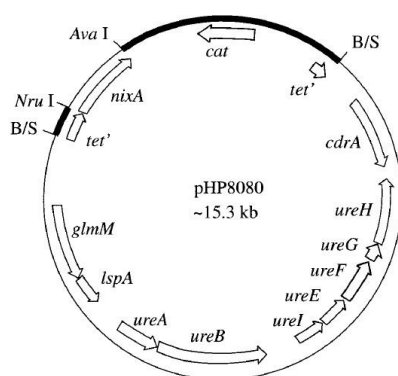


Figura 5: Estrutura do plasmídeo pHP8080, contendo o operon da urease de *H. pylori* linhagem 26695 (ureABIEFGH), o gene codificante para proteína transportadora de níquel (nixA) e marca de resistência para cloranfenicol (cat) (McGee et al., 1999).

Colônias mantidas a -196°C em nitrogênio líquido foram inoculadas em meio de cultura LB com cloranfenicol ($20\ \mu\text{g/ml}$). Este pré-inóculo foi cultivado overnight (O/N, ~16 horas) a 37°C , e adicionado, na proporção 1:50, em LB contendo cloranfenicol ($20\ \mu\text{g/ml}$) e Ni_2Cl ($1\ \mu\text{M}$). Tipicamente, foram utilizados 5 mL do pré-inóculo. O cultivo foi incubado a 37°C por cerca de 16 horas sob agitação (180 RPM).

Após o desenvolvimento das cepas, o cultivo foi centrifugado em Sorvall Plus RC5b, a 15000 g, a 4°C , durante 10 minutos. O material sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em tampão 20 mM NaPB, pH 7.0 (tampão de extração).

As células suspensas no tampão de extração foram lisadas por ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos ($40\ \text{kHz}$) de 1 minuto, com intervalos de 2 minutos, em banho de gelo. Em seguida esse material foi novamente centrifugado em Sorvall Plus RC 5b, a 15000 g, durante 20 minutos, o material insolúvel foi descartado e o sobrenadante, após diálise contra tampão fosfato pH 7.0, foi denominado como Extrato Bruto.

A próxima etapa consistiu em uma cromatografia de troca iônica Q-Sepharose (Amersham Biosciences) do Extrato Bruto, na proporção de 1 mL de resina para cada 5 mg de proteína; a resina foi equilibrada em tampão de extração. Após a adsorção da amostra à resina, esta foi lavada com o tampão de equilíbrio e então eluída com gradiente descontínuo: Os tampões de eluição foram: 1ª eluição – Tampão de extração mais 100 mM NaCl; 2ª eluição - Tampão de extração mais 200 mM NaCl; 3ª eluição - Tampão de extração mais 300 mM NaCl; 4ª eluição - Tampão de extração mais 1 M NaCl.

A fração rica em atividade ureolítica oriunda da 2ª eluição da Q-Sepharose foi dialisada para a retirada do NaCl e submetida a uma nova cromatografia de troca iônica em coluna Source 15-Q (Amersham Biosciences), esta adaptada em ÄKTA (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão de extração pH 7.5, e o sistema foi programado para gerar um gradiente contínuo de NaCl 25% a 75% em 20mL de tampão de extração, para eluição da amostra. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram realizados ensaios de determinação de atividade ureolítica.

A fração rica em urease proveniente da Source 15-Q foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna Superose 6 (GE Healthcare),

equilibrada com tampão de extração, em ÄKTA (Pharmacia), obtendo-se assim a urease recombinante purificada.

3.2. Produção da urease de *H. pylori* nativa:

A linhagem 26695 (ATCC 700392; *cag* PAI⁺) de *H. pylori* foi utilizada para a purificação da urease nativa. O *H. pylori* foi cultivado em meio tripton de soja (TSA) sólido suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, a 37°C em um ambiente microaerofílico (10% CO₂, 7,5% O₂, 82,5% N₂), em jarras de microaerofilia.

Após 48 horas de incubação, as colônias de *H. pylori* de 40 placas de meio de cultura foram coletadas, suspensas em tampão fosfato (20 mM NaH₂PO₄) e lisadas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710), com 10 pulsos (40 kHz) de 1 minuto, com intervalos de 30 segundos, em banho de gelo. Em seguida esse material foi centrifugado em Sorvall Plus RC 5b, a 15000 g, durante 20 minutos, o material insolúvel foi descartado e o sobrenadante dialisado contra tampão fosfato pH7.0 e denominado como Extrato Bruto.

A purificação da urease a partir de colônias de *H. pylori* é igual à da recombinante, exceto por um passo adicional no final do processo. Este passo adicional é mais uma etapa de cromatografia de troca iônica em coluna Source 15-Q (Amersham Biosciences), montada em um ÄKTA (Pharmacia), nas mesmas condições da primeira corrida, a partir da fração obtida na eluição com 200 mM NaCl. Após a coleta dos picos cromatográficos, foram realizados ensaios de determinação de atividade ureolítica, e SDS-PAGE para determinar a pureza da amostra.

3.3. Medida de conteúdo proteico

A determinação do conteúdo proteico das amostras de urease foi realizada a partir da absorção no ultravioleta em comprimento de onda de 280nm, utilizando cubetas de quartzo com passo óptico de um cm. No caso de

lisados celulares, o conteúdo protéico foi medido através do método de Bradford, 1976 (Bradford, 1976).

3.4. Detecção de atividade ureásica

Alíquotas de amostras de todas as etapas de purificação foram incubadas com 10 mM de ureia, a 37°C, em tampão PBS 1X 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, 1967), utilizando-se uma curva padrão de sulfato de amônio na faixa de 15 a 250 nM. Uma unidade enzimática de urease foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de amônia por minuto, em pH 7,0 a 37°C.

3.5. Ensaio de edema de pata em camundongos

Grupos com nove camundongos foram submetidos ao ensaio de edema de pata: na pata traseira direita foram aplicados, com injeção sub-plantar, 30 μL de urease a 2,78 μM , diluída em soro fisiológico e como controle negativo interno, no mesmo animal, na pata esquerda traseira, 30 μL de soro fisiológico. Após 4 horas, os camundongos foram sacrificados, as patas traseiras foram removidas e fixadas em formalina 10% para preparo de blocos de parafina. Cortes de 5 μm foram marcados com hematoxilina-eosina e analisados em um microscópio de luz no Serviço de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, sob o n° 23078.00605212014-03.

3.6. Isolamento de neutrófilos humanos

Experimentos envolvendo neutrófilos humanos foram realizados no Departamento de farmacologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, em colaboração com a Dra. Christina Barja-Fidalgo.

Neutrófilos humanos foram isolados de voluntários saudáveis, a partir de sangue venoso periférico, tratado com 0,5% de EDTA, utilizando-se quatro etapas de gradiente descontínuo de Percoll (Sigma) (Böyum, 1968). Após remoção das hemácias por lise hipotônica, neutrófilos foram suspensos em meio RPMI-1640 (Sigma) ou DMEM (Dulbecco modified Eagle medium). A pureza e a viabilidade dos neutrófilos foi analisada pelo ensaio de exclusão do corante vital *trypan blue*.

3.7. Ensaio de migração de neutrófilos

A quimiotaxia foi medida em Câmara de Boyden (NeuroProbe, Gaithersburg, MD), com 48 poços, utilizando-se filtros de policarbonato de 5 µm para separar dois compartimentos. No compartimento superior foram colocados os neutrófilos (10^6 cells/mL em RPMI-0.01% albumina de soro bovino [BSA]), enquanto que o compartimento inferior da câmara continha N-Formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP; 700 nM, Sigma), urease (10 nM, 30 nM, 100 nM) ou o meio (migração aleatória; 37°C, 5% CO₂) (Arraes et al., 2006). Após 1 hora, os filtros foram removidos, fixados, e corados, e neutrófilos que migraram através da membrana foram contados ao microscópio, em pelo menos 5 campos aleatoriamente selecionados. Para a inibição da urease, a proteína foi incubada *overnight* a 4°C com 1 mM p-hidroxi-mercúrio-benzoato (Sigma), seguida por diálise para remoção do excesso de inibidor. Para avaliar a participação de produtos de 5-lipoxigenase (5-LO), as células foram tratadas com o inibidor AA861 (10 µM; Sigma) por 15 minutos antes do estímulo com a urease. Cada amostra foi medida em triplicata. Resultados foram expressos como o número médio ± DP de neutrófilos por campo.

3.8. Medida da apoptose

Neutrófilos foram expostos a AA861 (10 µM), urease (100 nM), urease + AA861, e IL-8 (100 nM, Sigma), ou somente ao meio de cultura, durante 24 horas. As células foram centrifugadas, coradas com Diff-Quik (Dade Behring – Suíça), e contadas em um microscópio óptico (x 1000) para determinação da

proporção de células exibindo núcleo picnótico, resultado da condensação irreversível da cromatina, uma morfologia característica de células em apoptose (Arruda et al., 2004). Pelo menos 400 células foram contadas por amostra. Resultados foram expressos como média \pm DP.

3.9. Preparo de extratos celulares

Para obter lisados celulares, neutrófilos foram suspensos em tampão de lise (50 mM HEPES, pH 6,4, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 µg/mL DNase, 0,5 µg/mL RNase) contendo os seguintes inibidores de proteases: 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 1 µM leupeptina e 1 µM SBTI (Sigma).

3.10. Western Blot

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) e aquecidos em “banho-maria” fervente por 3 minutos. As amostras (30 µg proteína total) foram resolvidas em 12% SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Marcadores “Rainbow” (Invitrogen) correram em paralelo para estimativa as massas moleculares. As membranas foram bloqueadas com Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0,9% NaCl, 0.1% Tween-20) contendo 1% BSA e como sondas foi usado o seguinte anticorpo desenvolvido em coelho: policlonal anti-5-LO (Cayman Chemicals), na diluição 1:5000. Após extensiva lavagem com Tween-TBS, as membranas de PVDF foram incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado a biotina por uma hora, e então incubado com estreptavidina conjugada a peroxidase na proporção 1:1000 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Proteínas imunorreativas foram visualizadas após coloração com 3,3' - diaminobenzidina (Sigma). As bandas foram quantificadas por densitometria usando Scion Image Software (Scion Co., MD, USA).

3.11. Células de epitélio gástrico em cultura

Experimentos com células humanas em cultura foram realizados no Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto, Portugal.

Células de epitélio gástrico humano AGS (ATCC) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen) com 10% de soro fetal bovino, 200 µg/mL estreptomicina e 200 IU/mL penicilina a 37°C, e 5% de CO₂.

3.12. Imunocitoquímica e microscopia confocal

Estudos envolvendo imunocitoquímica foram realizados utilizando um microscópio confocal Leica SP5, com uma lente objetiva PL APO 63x 1,40 (TCS SP; Leica). As imagens foram analisadas utilizando os softwares LAS AF Lite (Leica) e ImageJ (Schneider et al., 2012, Linkert et al., 2010). Para a imunocitoquímica, células AGS foram cultivadas em câmaras LabTek (Ibidi), fixadas com paraformaldeído 4%, e permeabilizadas com metanol 100% gelado. As células foram incubadas com anticorpos primários para as proteínas EEA1, Lamp1, e UreB (Santa Cruz Biotechnology). A detecção de EEA1 e Lamp1 foi monitorada com anticorpo secundário acoplado à Alexa-594 (vermelho), e a detecção de UreB foi monitorada com anticorpo secundário acoplado à Alexa-488 (verde).

Em experimentos com células vivas, células AGS foram transfectadas previamente com os plasmídeos codificando a proteína Lamp1-GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Allan Levey, Escola de Medicina da Universidade de Emory, EUA.

Células AGS foram cultivadas até uma confluência de 50%, e então foi adicionado à cultura um mix, contendo o meio adequado para transfecções Opti-MEM (Life Technologies), lipofectamina (Life Technologies) e o DNA plasmidial. As células foram incubadas por 24 horas. Para estes experimentos, a urease foi marcada covalentemente com TexasRed (Thermo Scientific). A urease ficou em contato com o marcador durante uma hora, a 4°C, com agitação. Após, a amostra foi dialisada exaustivamente contra o tampão fosfato 20 mM, pH 7,0, e gel-filtrada em uma coluna De-Salting (Sigma) para remover

qualquer excesso de corante. O plasmídeo utilizado foi gentilmente cedido pelo Dr. Allan Levey, Escola de Medicina da Universidade de Emory, EUA.

Células AGS transfectadas com Lamp1-GFP foram previamente tratadas com M β CD (5 mg/ml) por uma hora para ensaios envolvendo a participação de colesterol.

3.13. Ensaio de migração celular

Células AGS foram cultivadas até a confluência de 100% em placas para migração celular, contendo um inserto removível de silicone (Ibidi®, Alemanha – figura 6). Após atingir a confluência de 100%, o inserto de silicone foi removido, e a migração celular na direção do espaço anteriormente ocupado pelo inserto (*gap*) foi monitorada em microscópio óptico com 1, 3, 5, 7 e 24 horas. As áreas residuais de *gap* foram calculadas utilizando o software ImageJ (Schneider et al., 2012).

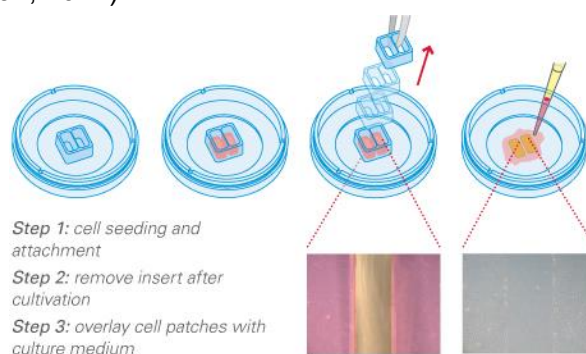


Figura 6: Sistema utilizado para medir migração celular

3.14. Expressão de citocinas

O sobrenadante das culturas do ensaio de migração foi coletado após as 24 horas do tratamento com a urease. Doze citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN γ , TNF α , GM-CSF) foram medidas através de um Multi-Analyte Human Inflammatory Cytokines ELISArray Kit (Qiagen Biosciences), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, 50 μ L dos sobrenadantes foram incubados em uma placa de 96 poços por uma hora, seguido por passos de lavagem, incubação com os anticorpos de detecção por

uma hora, lavagem, incubação com avidina-peroxidase por 30 minutos, lavagem, revelação por 15 minutos e quantificação colorimétrica a 450 nm.

3.15. **Análise estatística**

Os dados foram analisados por ANOVA seguido por Turkey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 e o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

Os resultados desta tese estão apresentados da seguinte forma:

- Capítulo 1: dados relativos a estudos do potencial pró-inflamatório da urease estão apresentados no artigo científico “Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease”, Uberti, A.F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Scopel-Guerra, S., Moraes, J.A., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., Carlini, C.R. *Toxicon*. 69:240-9 (2013).

- Capítulo 2: manuscrito a ser submetido a uma revista internacional, contendo dados com células epiteliais gástricas, obtidos durante estágio Doutorado-Sanduíche realizado no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal, sob a supervisão e orientação da Prof^a. Dr^a. Céu Figueiredo.
 - Anexo I: Dados referentes à purificação da urease nativa de *H. pylori*.

4.1. Capítulo 1

“Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease”, Uberti, A.F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Scopel-Guerra, S., Moraes, J.A., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., Carlini, C.R. *Toxicon*. 69:240-9 (2013).

Os dados que originaram este artigo foram coletados parcialmente no meu mestrado (Uberti, 2010) e complementados nesta tese.

Resumo

O patógeno gástrico *Helicobacter pylori* produz uma grande quantidade de urease cuja atividade enzimática permite a sobrevivência da bactéria no estômago. Nosso grupo já demonstrou que ureases possuem propriedades independentes de sua atividade ureolítica em modelos mamíferos, através de rotas mediadas por derivados de lipoxigenases. Neste trabalho, nós avaliamos o potencial pró-inflamatório da urease de *H. pylori*. O ensaio de edema de pata em camundongos e experimentos de ativação de neutrófilos humanos foram realizados utilizando uma urease recombinante. A urease induz edema de pata em camundongos com intensa infiltração de neutrófilos. In vitro, a urease a 100 nM foi quimiotática para neutrófilos humanos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Neutrófilos ativados por urease mostraram um aumento de meia-vida, com a inibição de apoptose sendo acompanhada por alterações nos conteúdos das proteínas Bcl-X_L e Bad. Estes efeitos da urease persistem na ausência de atividade enzimática. Os efeitos de edema de pata em camundongos, quimiotaxia e proteção contra a apoptose em neutrófilos humanos foram revertidos na presença de inibidores de lipoxigenase, como esculetina e AA861. Neutrófilos expostos a urease mostraram elevados níveis de 5-lipoxigenase, e nenhuma alteração nos níveis de ciclo-oxigenases. Juntos, estes dados indicam que a urease, além do papel na sobrevivência no ambiente ácido do estômago, tem um papel importante nas doenças inflamatórias estomacais causadas por *H. pylori*.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Toxicon

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxicon

Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease

Augusto F. Uberti^{a,2}, Deiber Olivera-Severo^{a,2}, German E. Wassermann^{a,1},
Adrielle Scopel-Guerra^a, João A. Moraes^b, Pedro Barcellos-de-Souza^b,
Christina Barja-Fidalgo^b, Célia. R. Carlini^{a,c,d,*}

^a Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^b Dept. Pharmacology, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Dept. Biophysics & Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, CEP 91501-970, Brazil

^d Universidade Luterana do Brasil, Graduate Program in Cellular and Molecular Biology Applied to Health, Canoas, RS, CEP 92425-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 September 2012

Received in revised form 25 December 2012

Accepted 5 February 2013

Available online 1 March 2013

Keywords:

Mouse paw edema

Chemotaxis

Inhibition of apoptosis

Pro-inflammatory eicosanoids

Reactive oxygen species

Urease inhibitor

ABSTRACT

The gastric pathogen *Helicobacter pylori* produces large amounts of urease, whose enzyme activity enables the bacterium to survive in the stomach. We have previously shown that ureases display enzyme-independent effects in mammalian models, most through lipoxygenase-mediated pathways. Here, we evaluated potential pro-inflammatory properties of *H. pylori* urease (HPU). Mouse paw edema and activation of human neutrophils were tested using a purified, cell-free, recombinant HPU. rHPU induced paw edema with intense neutrophil infiltration. In vitro 100 nM rHPU was chemotactic to human neutrophils, inducing production of reactive oxygen species. rHPU-activated neutrophils showed increased lifespan, with inhibition of apoptosis accompanied by alterations of Bcl-X_L and Bad contents. These effects of rHPU persisted in the absence of enzyme activity. rHPU-induced paw edema, neutrophil chemotaxis and apoptosis inhibition reverted in the presence of the lipoxygenase inhibitors esculetin or AA861. Neutrophils exposed to rHPU showed increased content of lipoxygenase(s) and no alteration of cyclooxygenase(s). Altogether, our data indicate that HPU, besides allowing the bacterial survival in the stomach, could play an important role in the pathogenesis of the gastrointestinal inflammatory disease caused by *H. pylori*.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: rHPU, recombinant *Helicobacter pylori* urease; LTB₄, leukotriene B₄; ROS, reactive oxygen species; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; CM-H₂DCFDA, 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester; IL-8, interleukin-8; 5-LO, 5-lipoxygenase; fMLP, formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine.

* Corresponding author. Dept. Biophysics & Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, CEP 91501-970, Brazil. Tel.: + 55 51 3308 7606; fax: +55 51 3308 7003.

E-mail addresses: ccarlini@ufrgs.br, celia.carlini@pq.cnpq.br (Célia.R. Carlini).

¹ Present address: Cristália, Rodovia Itapira-Lindóia, s/n, km14, Itapira, SP, Brazil.

² These authors have contributed equally to this work.

1. Introduction

Helicobacter pylori infects at least half of the world's population and is a major cause of gastroduodenal pathologies. In 1994, the International Agency for Research on Cancer and the World Health Organization (WHO) classified *H. pylori* as a definite (group I) carcinogen (IARC-Working-Group, 1994). Gastric colonization by *H. pylori* is usually accompanied by an intense infiltration of polymorphonuclear leukocytes, macrophages and lymphocytes. The degree of mucosal damage correlates with an intense neutrophil infiltration (D'Elíos et al., 2007). Neutrophils act

as the first line of defense against infectious agents, and the infiltration of gastric tissue by neutrophils is the hallmark of acute and chronic inflammatory disorders caused by the persistence of *H. pylori* in the gastric lumen (Elliott and Wallace, 1998). Prolonged inflammation can lead to tumor formation (Mantovani et al., 2008), and the persistence of ROS-producing neutrophils contributes to the amplification of inflammation.

H. pylori produces factors that damage gastric epithelial cells, among which are the vacuolating cytotoxin VacA, the cytotoxin-associated protein CagA, a neutrophil activating protein (HP-NAP) and a urease that neutralizes the acidic medium allowing its survival in the stomach. The gastro-duodenal illness induced by *H. pylori* depends on the host inflammatory response elicited by the several virulence factors produced by the microorganism. There are reports showing that *H. pylori* whole cells or extracts of its water-soluble proteins promote inflammation, activate neutrophils and induce release of cytokines (Andrutis et al., 1995; Nielsen and Andersen, 1992). Infection by *H. pylori* may also induce impairment of DNA repair mechanisms, inducing gastric epithelial cells into a mutator phenotype (Machado et al., 2009). The biology of *H. pylori* and its involvement in stomach illness were reviewed recently (Herrera and Parsonnet, 2009; Polk and Peek, 2010).

The urease of *H. pylori* accounts for about 10% of total cell protein and is consistently present in all naturally occurring strains (Suzuki et al., 2007). It has been previously shown that genetically engineered urease-deficient *H. pylori* is unable to colonize either germfree piglets, ferrets, or mice (Andrutis et al., 1995; Eaton et al., 1991; Hu and Mobley, 1990). In vitro, purified *H. pylori* urease stimulates macrophages, eliciting the production of reactive species and cytokines, thus contributing to tissue inflammation and injury (Shimoyama et al., 2003). We have previously reported that a purified *H. pylori* urease activates platelets through a lipoxygenase-mediated pathway, leading to ADP exocytosis and, therefore, platelet aggregation (Wassermann et al., 2010).

In this study we aimed to evaluate the participation of *H. pylori* urease in the acute inflammatory process promoted by this bacterium. For that purpose we worked with a purified recombinant HPU (rHPU) produced in *Escherichia coli*. Our results showed that rHPU induces: (i) mouse paw edema; (ii) human neutrophil migration; (iii) protection of human neutrophils against apoptosis; (iv) production of reactive oxygen species by neutrophils, and (v) induction of expression of lipoxygenase(s) in human neutrophils.

2. Material and methods

2.1. Recombinant *H. pylori* urease (rHPU)

H. pylori recombinant urease (rHPU) was produced by heterologous expression (McGee et al., 1999) in *E. coli* SE5000 transformed with plasmid pHP8080, kindly provided by Dr. Harry T. Mobley, University of Michigan Medical School. rHPU was purified from bacterial extracts as previously described (Wassermann et al., 2010). For the experiments, the purified protein was concentrated using Centrprep cartridges (30 kDa cut-off) to give a 0.5 mg protein/mL solution (Suppl. Fig. 1) and dialyzed against

20 mM sodium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 5 mM 2-mercaptoethanol. The buffer from the last dialysis change was used as a negative control in all bioassays.

2.2. Protein determination

Protein content of samples was determined by their absorbance at 280 nm, or by the Coomassie dye binding method (Bradford, 1976).

2.3. Urease activity

Urease activity was measured colorimetrically by the alkaline nitroprussiate method (Weatherburn, 1967). For studies of urease inhibition, protein solutions were incubated overnight at 4 °C with 1 mM p-hydroxy-mercuribenzoate followed by extensive dialysis to remove excess of inhibitor (Follmer et al., 2001).

2.4. Neutrophil isolation and culture

Neutrophils were isolated from EDTA (0.5%)-treated peripheral venous blood of healthy human volunteers by Percoll gradient (Coelho et al., 2004) and suspended in RPMI medium (97% of viable cells, as assessed by trypan blue exclusion). Residual erythrocytes were removed by hypotonic lysis.

2.5. Neutrophil migration assay

Chemotaxis was assayed in 48-well microchemotaxis chambers (NeuroProbe, Gaithersburg, MD) using 5- μ m polycarbonate filter (Coelho et al., 2004). Neutrophils (10^6 cells/mL in RPMI, 0.01% bovine serum albumin, BSA) were allowed to migrate toward formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, 100 nM), rHPU (10 nM, 30 nM, 100 nM) or medium (random migration; 37 °C, 5% CO₂). After 1 h, filters were removed, fixed, stained, and neutrophils that migrated through the membrane were counted under a light microscope on at least 5 randomly selected fields (Coelho et al., 2004). To evaluate the participation of 5-lipoxygenase products, cells were treated with AA861 (10 μ M) for 15 min prior to stimulation with rHPU. Each treatment was assayed in triplicate. Results are expressed as mean \pm S.E.M.

2.6. Morphological assessment of neutrophil apoptosis

Cells were cytocentrifuged, stained with Diff-Quik (Dade Behring, Switzerland), and counted under light microscopy ($\times 1000$) to determine the proportion of cells showing characteristic apoptotic morphology (picnotic nuclei). Cells were either untreated or treated with AA861 (10 μ M) alone, HPU (100 nM) alone, HPU plus AA861, or IL-8 (100 nM). At least 400 cells were counted per slide. The results were expressed as mean \pm S.E.M.

2.7. Preparation of cell extracts

To obtain whole cell lysates, neutrophils (5×10^6 cells/mL) were resuspended in lysis buffer (50 mM HEPES, pH

6.4, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 µg/mL DNase, 0.5 µg/mL RNase) containing a cocktail of protease inhibitors: 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 mM benzamidine, 1 µM leupeptin and 1 µM soybean trypsin inhibitor (all reagents from Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA).

2.8. Western blot analysis

Cell lysates were denatured in sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and heated in a boiling water bath for 3 min. Samples (30 µg total protein) were resolved in 12% SDS-PAGE gels and proteins were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). Rainbow markers (Amersham Pharmacia Biotech) were run in parallel to estimate molecular masses. Membranes were blocked with Tween-TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 1% BSA and probed with polyclonal antibodies: anti-Bcl-XL (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), polyclonal anti-Bad (Santa Cruz Biotechnology, 1:500), polyclonal anti-5-LO (Cayman Chemicals, 1:500), or polyclonal anti-COX (Cayman Chemicals, 1:500). After washing in Tween-TBS, PVDF sheets were incubated with biotin-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) antibody for 1 h and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) staining and bands were quantified by densitometry using Scion Image Software (Scion Co., MD, USA).

2.9. Reactive oxygen species (ROS) measurement

The luminol-enhanced chemiluminescence of human neutrophils was measured using a microplate-reader Spectramax (Molecular Devices, CA, USA), as described previously (Shimoyama et al., 2002). Briefly, cells were stimulated with rHPU (10, 30 or 100 nM) or phorbol 12-miristate 13-acetate (PMA; 30 nM) and ROS production was measured for 60 min. Neutrophils were incubated for 30 min prior to stimulation. In order to measure intra- and extracellular ROS production, CM-H₂DCFDA (chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; λ_{ex}470 nm, λ_{em}529 nm) and lucigenin (bis-N-methylacrydinium nitrate) were used, respectively. The protocol described by (Kujbida et al., 2008) was applied for luminol or lucigenin. For CM-H₂DCFDA, neutrophils were incubated with the dye (5 µM) for 15 min at 37 °C prior to stimulation (Espinosa et al., 2009).

2.10. Paw edema

Male Swiss mice (20–22 g), housed at 22 ± 3 °C with a 12/12 h light/dark cycle were used for the bioassays. On the day of the experiments, the mice received, under light ether anesthesia, a 30 µL intraplantar injection of different doses of rHPU into the right hind paw. The left hind paw of the same animal was used as control, receiving an injection of 30 µL of dialysis buffer. In some experiments the animals were pre-treated with anti-inflammatory drugs given

subcutaneously 1 h (esculetin, 50 mg/kg, Sigma) or 4 h (dexamethasone, 0.5 mg/kg, Sigma) before rHPU administration. Increased paw thickness due to edema was measured with a micrometer (Mitutoyo, 0–25 mm, with 0.002 mm increments) at the indicated time intervals after the injections. Paw edema was expressed as the difference between the thickness of right and left paws of the same animal. Thus the results represent the net edema (in mm) induced by HPU.

2.11. Histological analyses

Mice paws injected with 45 µg HPU or 30 µL dialysis buffer were fixed in 10% formalin for paraffin block preparation. Sections of 5 µm were stained with hematoxylin-eosin, and studied under light microscopy at the Pathology Service of the Faculty of Veterinary, Universidade Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

2.12. Animal experimentation

All procedures involving animals were conducted in strict accordance to Brazilian legislation (Law no. 6.638/1979) and in compliance with the Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines (www.nc3rs.org.uk/ARRIVE), developed by the National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs).

2.13. Statistical analysis

Data were analyzed by ANOVA followed by the Tukey-Kramer test using the Instat Graph Pad software and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Paw edema induced by rHPU

To investigate whether purified rHPU possesses pro-inflammatory activity the model of mouse paw edema was chosen. Fig. 1 shows the time course and dose-dependency curves of paw edema induced by subplantar injection of rHPU in mouse hind paws. As low as 0.5 µg (0.4 pmol) of injected protein produced an intense paw edema in some animals. At a dose of 45 µg, the rHPU-induced edema peaked at 4–6 h and lasted more than 24 h. Histopathological analysis of the paw edema showed an intense neutrophil infiltration (Fig. 2).

Pretreatment of mice with dexamethasone, or with the lipoxygenase inhibitor esculetin, produced significant reduction in the paw edema indicating that eicosanoids, particularly lipoxygenase metabolites, mediate the pro-inflammatory activity of rHPU (Table 1).

3.2. rHPU-induced human neutrophil chemotaxis

H. pylori infection induces an acute neutrophil-dominant inflammation and neutrophil density correlates with tissue damage (Nielsen and Andersen, 1992). *H. pylori* whole extracts were shown to stimulate chemokine production and

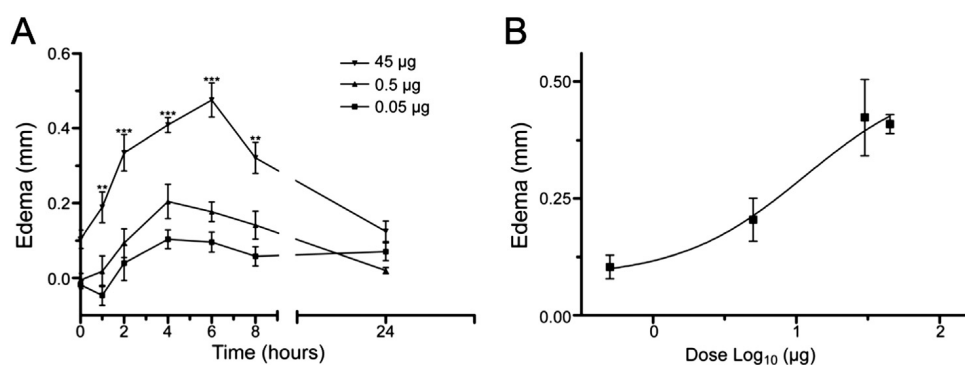


Fig. 1. Time course (A) and dose-response curve (B) of rHPU-induced mice paw edema. rHPU was injected into the right paw of mice in a final volume of 30 µL and the left paw of the same animal received vehicle (last change of buffer used in dialysis of rHPU). Results are expressed as net increase in thickness (mm) of the right paw as compared to the left. Each point represents mean ± SD from 9 animals. Values of $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ or $p < 0.001^{***}$ were considered statistically significant.

activation of neutrophils *in vitro* (Shimoyama et al., 2003). Fig. 3A shows that rHPU stimulated human neutrophil migration in a dose-dependent manner. The chemotactic effect of 100 nM rHPU (55.6 ± 6.8 neutrophils/field) was equivalent to that induced by 100 nM fMLP (63 ± 7.2 neutrophils/field). This property of HPU is independent of its ureolytic activity, as rHPU treated with active-site inhibitors promoted the same migration profile (Fig. 3A). Treatment of cells with AA861, a lipoxygenase inhibitor, reverted the rHPU-induced chemotaxis, indicating the participation of lipoxygenases-derived products in neutrophil migration (Fig. 3B).

3.3. HPU induces production of reactive oxygen species by human neutrophils

It has been reported that *H. pylori* whole cells stimulate the generation of reactive oxygen species by neutrophils

(Handa et al., 2010). Total ROS production comprises intra- and extracellular release and increase of ROS production is associated with an increased level of DNA damage/repair in epithelial cells (Machado et al., 2010). Here we evaluated the total, intra- and extracellular production of reactive oxygen species in rHPU-activated neutrophils. Cells were exposed to rHPU or PMA (positive control, not shown) and total ROS production was measured using luminol-amplified luminescence. Fig. 4, panels A–D, show that neutrophil exposed to 100 nM rHPU had a 2.5 fold increase in total ROS production as compared to controls. Extracellular ROS release was measured using lucigenin, a chemiluminescent probe that is more specific for superoxide anions released extracellularly, while CM-H₂DCFDA was used to measure intracellular ROS production (Abe et al., 2000; Espinosa et al., 2009). Data shown in Fig. 4E indicated that the increased ROS production induced by rHPU is entirely directed toward the extracellular medium.

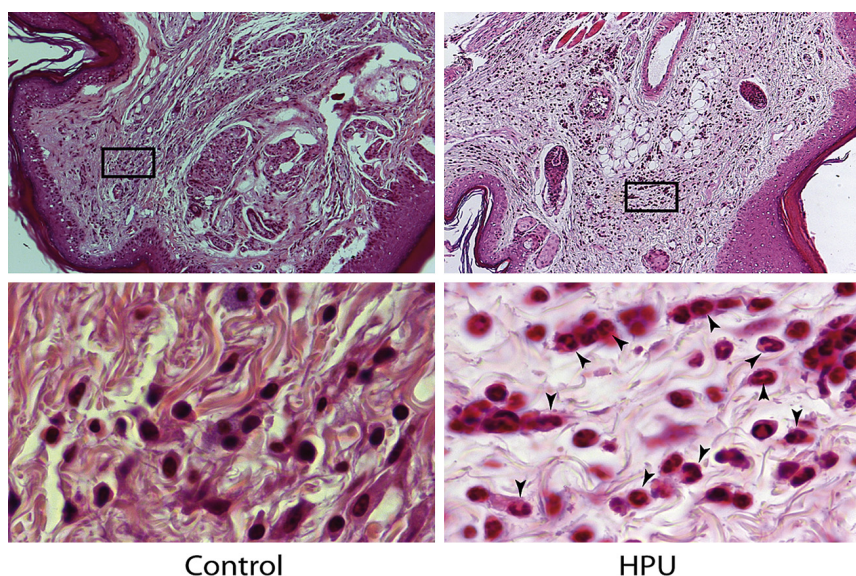


Fig. 2. rHPU induced neutrophil infiltration accompanying paw edema. Hematoxylin and eosin staining sections of mouse paw injected with rHPU (45 µg–3.6 pmoles) or control paws. The area in the boxes is enlarged in the panels below. Data are representative of 3 mice for each group. Neutrophils are indicated by arrowheads. Upper panels, magnification 100×; lower panels, 1000×.

Table 1
Involvement of lipoxygenases(s) metabolites in HPU effects.

Biological effect	Evidence of involvement of lipoxygenase metabolites
HPU-activated platelet	Inhibition by dexamethasone and esculetin treatment ^a Detection of 12-HETE production ^a
HPU-activated neutrophil	Inhibition of HPU-induced chemotaxis by AA861 ^b Reversion of HPU anti-apoptotic effect by AA861 ^b Increase of 5-lipoxygenase levels (Western blot) ^b
Mouse Paw Edema	Dexamethasone and esculetin treatment ^b

^a (Wassermann et al., 2010).

^b This paper.

3.4. HPU inhibits apoptosis of neutrophils by inducing *Bad* degradation and *Bcl-x_L* expression

The regulation of neutrophil apoptosis during an inflammatory response is a key point for its resolution (Serhan and Savill, 2005). As the intensity of gastric tissue damage in *H. pylori* infection correlates with the neutrophil density (Allen, 2001), we investigated the neutrophil viability after a 20 h culture in the presence of 100 nM rHPU or 100 nM IL-8. Fig. 5A shows that neutrophil apoptosis is significantly delayed when the cells are exposed to rHPU. The anti-apoptotic effect of rHPU persisted for the enzyme-inhibited protein after treatment with p-hydroxy-mercurybenzoate (not shown). Human neutrophils have a very short half-life, characterized by a constitutive expression of proapoptotic proteins, and almost undetectable levels of anti-apoptotic proteins (Akgul et al., 2001). Fig. 5C shows that rHPU-activated neutrophils had lower levels of *Bad*, a pro-apoptotic *Bcl-2* member. On the other hand, rHPU induced the expression of the anti-apoptotic protein *Bcl-x_L* (Fig. 5B), increasing the survival rate of neutrophils.

We then investigated the involvement of 5-lipoxygenase products in the anti-apoptotic effect of rHPU. Data shown in Fig. 5D indicated that the protective effect is at least partly

due to production of leukotrienes, given that pre-treatment of neutrophils with AA861 reverted this effect (Fig. 5D).

3.5. rHPU activates the arachidonic acid pathway in neutrophils

Two metabolites of the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway, leukotriene B₄ and 5-hydroxyeicosatetraenoic acid, have been identified as important mediators of inflammatory processes in the gastrointestinal tract (Wang and Dubois, 2010). Considering our previous data showing that platelet activation by rHPU depends on eicosanoid(s) produced by a 12-lipoxygenase (Wassermann et al., 2010), here we studied the participation of 5-lipoxygenase in rHPU-activated neutrophil signaling. Western blot analyses of rHPU-activated neutrophils showed significantly increased levels of 5-LO (Fig. 6) while no alterations of cyclooxygenase-2 levels were observed (not shown), suggesting the possible involvement of leukotrienes or 5-HETE in neutrophil's response to rHPU. Contrasting to these results, stimulation of neutrophils by LPS (1 µg/mL) under the same experimental conditions did not alter their 5-LO content (not shown). Table 1 summarizes these data.

4. Discussion

Ureases (EC 3.5.1.5) are highly homologous nickel-dependent enzymes that hydrolyze urea into ammonia and carbon dioxide (Dixon et al., 1975; Mobley et al., 1995). We have previously reported that canatoxin (Carlini and Guimaraes, 1981), an isoform of jackbean (*C. ensiformis*) urease (Follmer et al., 2001), presents biological properties that are independent of its enzyme activity, including activation of blood platelets (Barja-Fidalgo et al., 1991; Carlini et al., 1985; Ghazaleh et al., 1997) and pro-inflammatory effect (Barja-Fidalgo et al., 1992; Benjamin et al., 1992). Submicromolar concentrations of canatoxin induced exocytosis in a number of cell systems in vitro such as platelets, synaptosomes, pancreatic islets, macrophages,

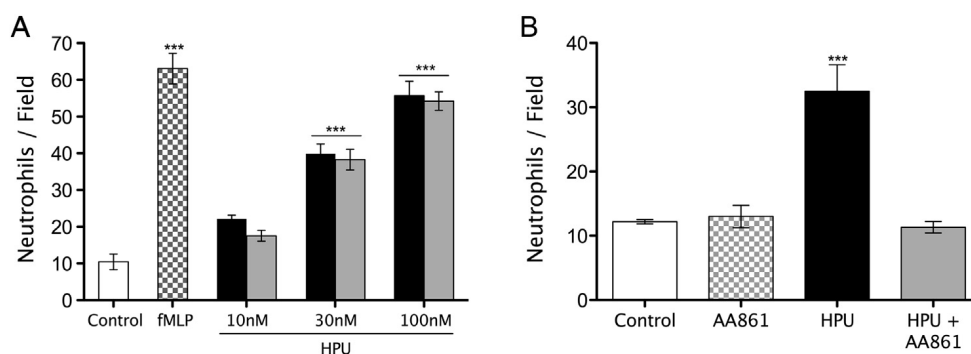


Fig. 3. Effect of rHPU on human neutrophil chemotaxis. (A) Chemotaxis was assayed in 48-well microchemotaxis chambers using 5-µm PVP-free polycarbonate filter. Neutrophils (10^6 cells/mL in RPMI-0.01% bovine serum albumin at 37 °C, 5% CO₂) were allowed to migrate toward rHPU (10 nM, 30 nM or 100 nM; untreated (black bars) or treated (gray bars) with the inhibitor p-hydroxymercurybenzoate 50 µM) and fMLP (100 nM), or medium alone (control – random migration). After 1 h, filters were removed, fixed, and stained, and neutrophils that migrated through the membrane were counted under a light microscope on at least 5 randomly selected fields. (B) Neutrophils were incubated with 10 µM AA861 prior to stimulation with 100 nM HPU. Each sample was assayed in triplicate. Results are expressed as number of neutrophils per field. All data show mean ± S.E.M. from at least three independent experiments done in triplicates. ****p* < 0.001 compared to control.

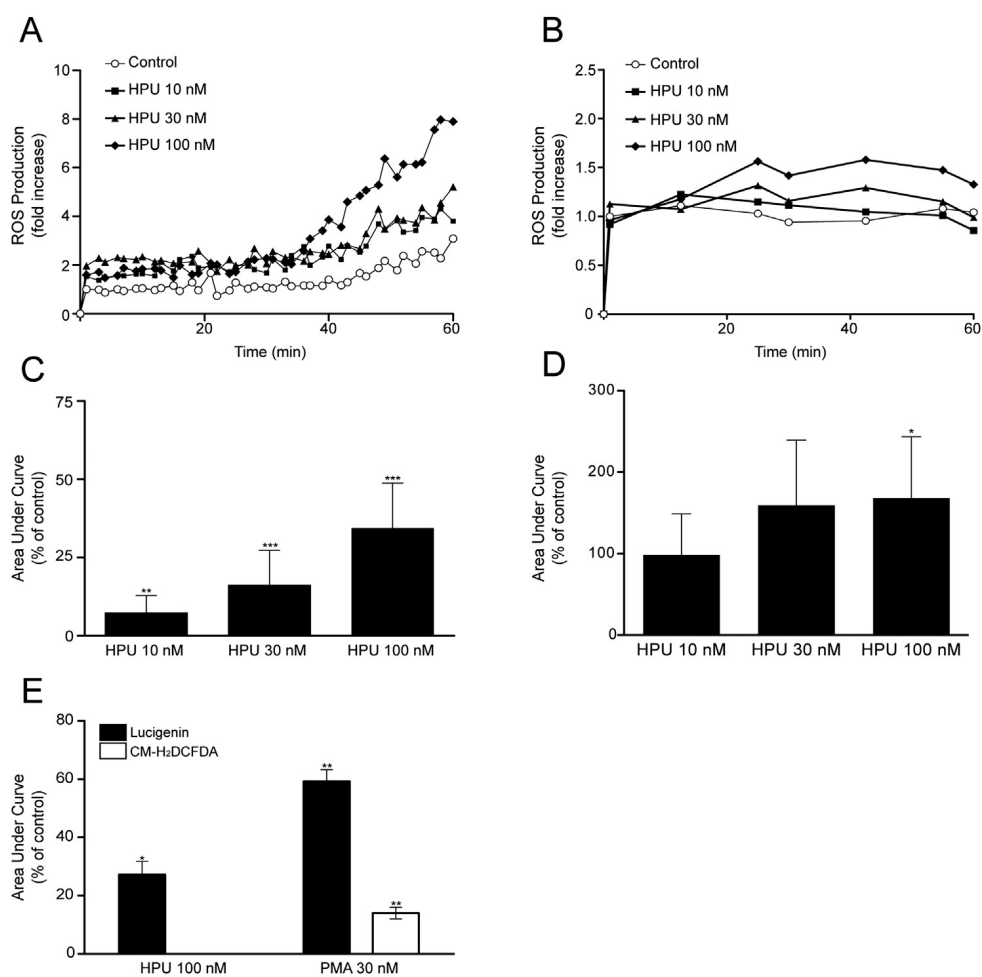


Fig. 4. rHPU induces neutrophil ROS production. (A) Time-course. Neutrophils (5×10^5 cells/well) were placed in a white flat-bottom 96-wells plate. Cells were not stimulated (circles) or stimulated with 10 nM (squares), 30 nM (triangles) and 100 nM (diamonds) of rHPU in the presence of luminol (500 mM). (B) Same experiment was performed using lucigenin as chemiluminescent probe (25 mM). Data are representative means of three independent experiments. ROS accumulation was evaluated calculating the area under curve using luminol (C), or lucigenin (D) over 60 min treatment. Results are mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (E) rHPU promotes extracellular ROS production while maintaining the intracellular redox status. Neutrophils (6×10^5 cells/well) were placed in a white flat-bottom 96-wells plate for lucigenin chemiluminescence assay or in a black flat-bottom 96-wells plate for CM-H₂DCFDA fluorescence assay. Cells were then not stimulated or stimulated with rHPU 100 nM or PMA 30 nM in the presence of lucigenin (25 mM; gray bar) or CM-H₂DCFDA (5 mM; black bar). Accumulated ROS generation was evaluated calculating the area under curve of lucigenin-dependent emitted chemiluminescence or CM-H₂DCFDA fluorescence accumulation over 120 min treatment. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared to control.

neutrophils and mast cells (reviewed in [Olivera-Severo et al., 2006b](#)). Lipoxygenase metabolites were shown to modulate most of canatoxin's pharmacological effects, either in vivo or in vitro ([Barja-Fidalgo et al., 1991](#); [Benjamin et al., 1992](#); [Carlini et al., 1985](#)).

Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases induce aggregation of platelets in nanomolar concentrations independently of enzyme activity ([Follmer et al., 2004](#); [Olivera-Severo et al., 2006a](#)). More recently, we demonstrated that purified recombinant *H. pylori* urease also promotes activation of rabbit platelets recruiting the lipoxygenase pathway ([Wassermann et al., 2010](#)). The fact that bacterial and plant ureases evolutionarily conserved the property of activating some cell types may shed new lights into the so far poorly understood biological functions of these proteins, which clearly are not restricted only to their ureolytic activities.

The data gathered here show that the cell-free, purified rHPU displays potent pro-inflammatory properties. [Fig. 7](#) summarizes these and other previous results pointing to a relevant participation of HPU in the gastric inflammatory disease caused by *H. pylori*.

The time-course of HPU-induced mouse paw edema is very similar to that described for the rat paw edema induced by canatoxin ([Benjamin et al., 1992](#)). rHPU is at least 100-fold more potent than canatoxin in its ability to induce paw edema, although differences in inflammatory reactions of animal models have also to be considered. As described for canatoxin, eicosanoids derived from lipoxygenase(s) pathway(s) play an important role in the rHPU-induced inflammation, as evidenced by the reduction in paw edema in mice pre-treated with esculetin. More and more evidences are pointing to an important role of the arachidonic acid pathway in the development of chronic

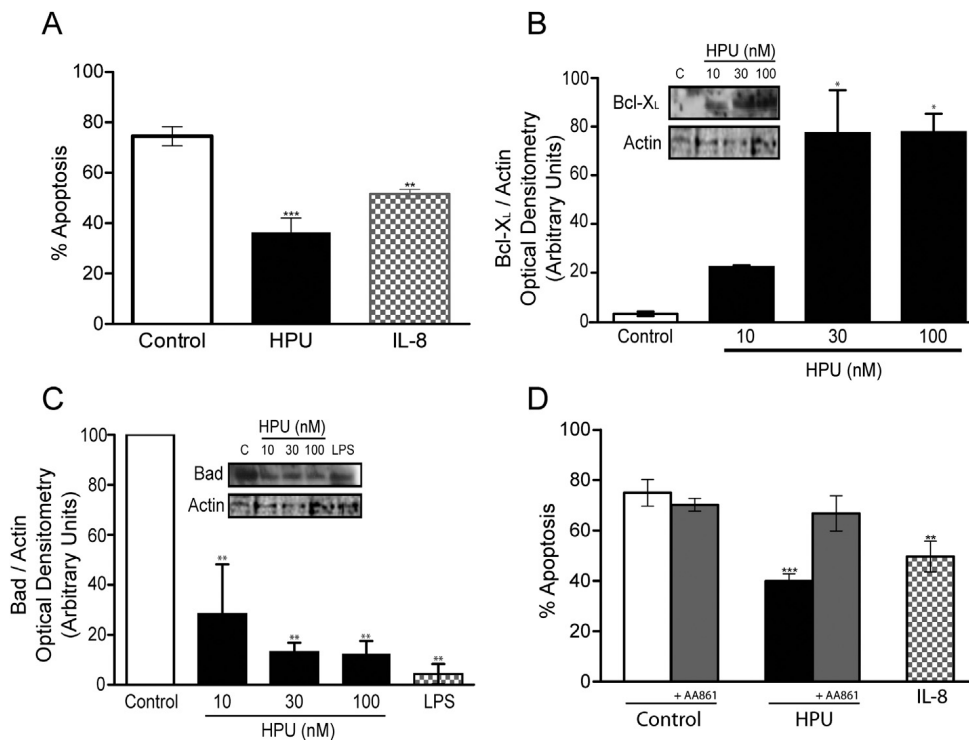


Fig. 5. rHPU inhibits human neutrophil apoptosis. (A) Neutrophils (5×10^6 /ml) were incubated in the absence or in the presence of rHPU (100 nM) or IL-8 (100 nM). After 20 h, cells were centrifuged, and the number of apoptotic cells was determined in an optical microscope by counting the picnotic nuclei. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared to control. (B) rHPU induces the expression of Bcl-X_L in neutrophils. Human neutrophils (5×10^6 cells) were incubated with rHPU (10 nM, 30 nM and 100 nM) and LPS (1 μ g/mL). After 4 h, Bcl-X_L protein expression was assessed by Western blot analysis. Results are mean \pm S.E.M. of triplicates. Data shown in the inset are of a typical experiment. $*p < 0.05$ compared to control. (C) Decrease in Bad levels in rHPU-activated neutrophils. Human neutrophils (5×10^6 cells) were incubated with rHPU (10 nM, 30 nM and 100 nM) and LPS (1 μ g/mL). After 4 h, Bad protein expression was assessed by Western blot analysis. Results are mean \pm S.E.M. of triplicates. Data shown in the inset are of a typical experiment. $**p < 0.01$ compared to control. (D) Neutrophils were incubated with 10 μ M AA861 prior to rHPU (100 nM) stimulation. IL-8 (100 nM), positive control. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ compared to control.

inflammation and gastric carcinogenesis (Wang and Dubois, 2010; Wymann and Schneider, 2008). Lipoxygenase metabolites such as LTB₄ enhance the proliferation of epithelial cells and may induce oncogenes in these cells (Wang and Dubois, 2010).

Our data show that nanomolar doses of HPU directly activates human neutrophils. Chemotaxis induced by 100 nM

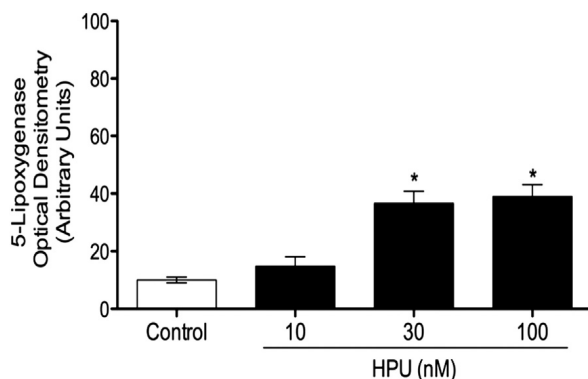


Fig. 6. HPU increases the content of 5-lipoxygenase in human neutrophils. Human neutrophils (5×10^6 cells) were incubated with HPU (10 nM, 30 nM and 100 nM) or buffer alone (control). After 4 h, 5-LO protein expression was assessed by Western blot analysis. Results are mean \pm S.E.M. of triplicates. $*p < 0.05$ compared to control.

rHPU was similar to that produced by 100 nM fMLP, a synthetic peptide that mimicks bacterial peptides (Niedel et al., 1979). The chemotactic effect of rHPU did not require its enzymatic activity. Additionally, histology sections of rHPU-induced edema showed an increased neutrophil infiltration. We have previously reported that the plant urease canatoxin induced neutrophil migration into rat pleural cavity and “air-pouches” and also that macrophages exposed to canatoxin released a neutrophil-chemotactic factor (Barja-Fidalgo et al., 1992).

Other studies have shown that purified *H. pylori* urease directly activated primary human blood monocytes and stimulated dose-dependent production of inflammatory cytokines (Harris et al., 1996).

The neutrophil activating protein HP-NAP is a dodecameric protein, structurally similar to bacterioferritins, which activates neutrophils by stimulating the production of reactive forms of oxygen (D’Elios et al., 2007; Evans et al., 1995; Zanotti et al., 2002). In monocytes HP-NAP induces activation and synthesis of cytokines, plasminogen activator inhibitor-2 and tissue factor (Montemurro et al., 2001). HP-NAP was shown to increase the lifespan of neutrophils and monocytes indirectly through the release of endogenous pro-survival factors (Cappon et al., 2010). Preliminary data suggest that rHPU is as powerful as HP-NAP in promoting activation of monocytes with induction

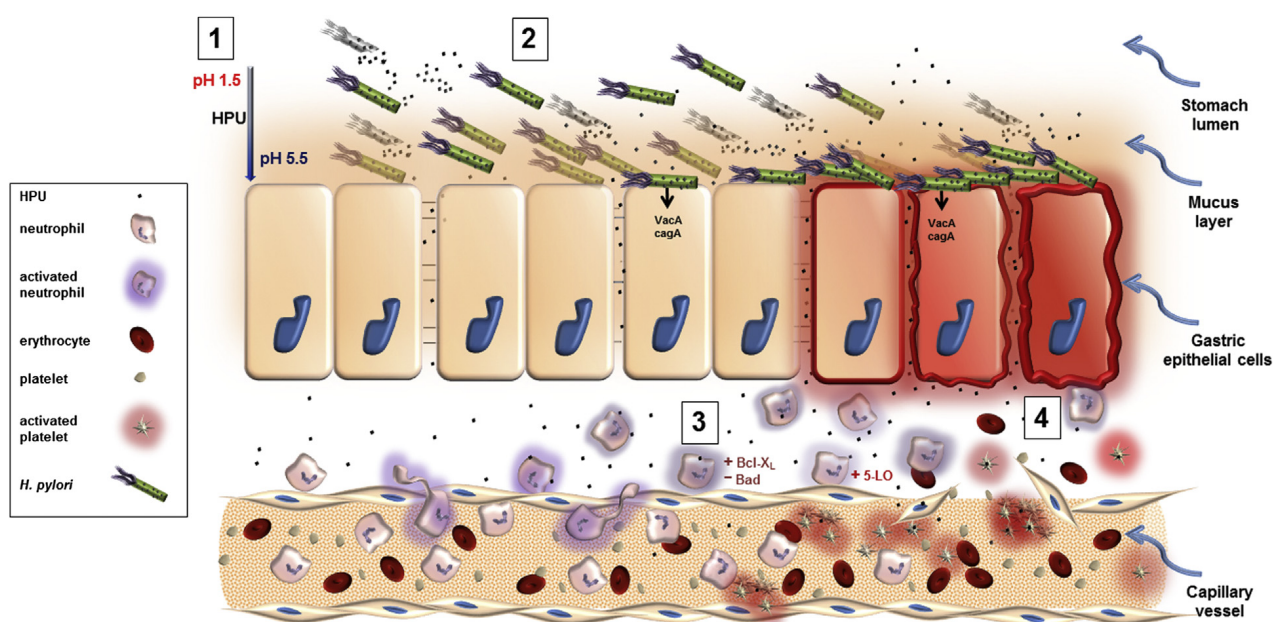


Fig. 7. Contributions of *H. pylori* urease to the gastric inflammation. The figure illustrates data from this work and from other groups on the cell-activating properties of HPU that potentially contribute to gastric inflammation. **1.** Infection by *H. pylori* starts when the bacterium enters the gastric mucus layer and promotes alkalization of its surrounding by action of its cytoplasmic urease (HPU), allowing bacterial proliferation and colonization; **2.** *H. pylori* adheres to the apical surface of epithelial cells and subsequently injects the *cagA* protein into the epithelial cells and releases other virulent factors such as *vacA*. Bacterial lysis releases HPU to the extracellular medium, part of which adsorbs onto the surface of viable *H. pylori* cells. HPU contributes to alterations of the gastric epithelial tight junction barrier function, increasing the epithelial permeability. **3.** HPU reaches the vascular lining and activates platelets and neutrophils through a lipoxigenase(s)-modulated process. Neutrophils migrate toward HPU released at the site of infection. HPU inhibits apoptosis of neutrophils by interfering on the levels of Bad and Bcl-X_L; **4.** HPU-activated-neutrophils cause tissue damage by releasing reactive oxygen species. HPU-induced increase of neutrophil survival leads to a sustained focus of inflammation.

of mRNA synthesis for the cytokines IL1b, IL6, IL8, IL23 and TNF α (Olivera-Severo, D and De Bernard M, unpublished data). As proposed for HP-NAP (De Bernard and D'Elisio, 2010), HPU is released most likely after lysis of *H. pylori* cells, reaching the underlying tissue and lamina propria where it would exert its pro-inflammatory effects, synergistically with other bacterial factors, recruiting neutrophils and monocytes, and activating platelets within nearby injured microcapillaries.

Enarsson et al., 2005, reported that *H. pylori* promoted significant T-cell activation and transendothelial migration in a model of human umbilical vein endothelial cells and that purified *H. pylori* urease induced a migratory effect similar to that of whole bacteria. Mutant *H. pylori* negative for the urease A subunit still promoted significant T-cell migration, an effect that was imparted as a contribution of the functional *cag* pathogenicity island (Enarsson et al., 2005). In face of our results, another possibility to consider is that this effect may rely on an ability of the bacterial urease B chain to induce leukocyte transmigration.

Handa et al., 2010, reported that *H. pylori* infection stimulates inflammatory cells within the gastric tissue to release ROS (Handa et al., 2010) which correlates with higher levels of DNA repair in gastric epithelial cells (Machado et al., 2010). Studies by Allen et al. (2005), showed that *H. pylori* infection interferes on the activity of human neutrophil NADPH oxidase leading to extracellular release of ROS (Allen, 2001). Here, we demonstrated that rHPU-activated neutrophils release ROS

extracellularly potentially contributing to damage the gastric tissue.

The half-life of human neutrophils is typically of 12 h, as a result of the constitutive expression of pro-apoptosis proteins and almost non-detectable levels of anti-apoptosis proteins (Witko-Sarsat et al., 2011). Neutrophils release proteolytic enzymes and ROS that inflict local tissue damage and are removed from the inflammatory site by induction of apoptosis. Thus fine regulation of pro- and anti-apoptosis proteins that control neutrophil lifespan is a critical process for the resolution of inflammation. Our data show that rHPU delays neutrophils apoptosis, prolonging their survival and contributing to the underlying local tissue inflammation, as seen in the mouse paw edema assay. Increased lifespan of rHPU-activated neutrophils was accompanied by reduced levels of the pro-apoptotic protein Bad and induction of expression of the anti-apoptotic protein Bcl-X_L, a situation that would ultimately lead to a persistent inflammatory status. In agreement with our data, other groups have demonstrated that products of *H. pylori* exert an important role in maintaining inflammation, by suppressing human neutrophil apoptosis (Cappon et al., 2010; Kim et al., 2001). Interestingly, other studies demonstrated that *H. pylori* can induce apoptosis in gastric epithelial cell lines (Ashktorab et al., 2008), contributing to the worsening of the gastroduodenal illness.

Lipoxygenase products contribute to the anti-apoptotic property as well as to chemotaxis induced by HPU as indicated by the AA861 pretreatment of neutrophils. HPU-

treated neutrophils had increased levels of lipoxygenase(s) but no alteration of cyclooxygenase(s) content. Our data show that lipoxygenases play an important role in mediating the cell-activating property of HPU (Table 1).

Altogether our data demonstrate that HPU, besides its well known role in allowing bacterial gastric colonization, also displays potent pro-inflammatory activity modulated by lipoxygenase-derived eicosanoids. The increased lifespan of HPU-activated neutrophils and its ability to attract more neutrophils toward the injured tissues, acting together with other bacterial factors, potentially amplify the gastric inflammatory process. These findings could be particularly relevant to the mechanisms leading to gastrointestinal disease caused by *H. pylori* and should be taken into consideration in the development of more efficient therapeutic approaches.

Author contributions

A.F.U., D.O-S., G.E.W., A.S-G., J.A.M., P.B-S, have acquired all data and interpreted the results, C.B-F. and C.R.C. have conceived and supervised this study. C.R.C. wrote the manuscript whose final version was approved by all authors.

Ethical statement

The authors declare that: a) the material has not been published in whole or in part elsewhere, except in the form of an abstract or part of academic thesis; b) the work is not currently being considered for publication elsewhere; c) all authors have agreed upon the content and form of the manuscript; d) all relevant ethical safeguards have been met regarding animal experimentation.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior – CAPES; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.009>.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Abe, T., Shimoyama, T., Fukuda, S., Nakaji, S., Sugawara, K., Saito, Y., 2000. Effects of *Helicobacter pylori* in the stomach on neutrophil chemiluminescence in patients with gastric cancer. *Luminescence* 15, 267–271.

Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W., 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 487, 318–322.

Allen, L.A., 2001. The role of the neutrophil and phagocytosis in infection caused by *Helicobacter pylori*. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 14, 273–277.

Allen, L.A.H., Beecher, B.R., Lynch, J.T., Rohner, O.V., Wittine, L.M., 2005. *Helicobacter pylori* disrupts NADPH oxidase targeting in human neutrophils to induce extracellular superoxide release. *J. Immunol.* 174, 3658–3667.

Andruti, K.A., Fox, J.G., Schauer, D.B., Marini, R.P., Murphy, J.C., Yan, L., Solnick, J.V., 1995. Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. *Infect. Immun.* 63, 3722–3725.

Ashktorab, H., Dashwood, R.H., Dashwood, M.M., Zaidi, S.I., Hewitt, S.M., Green, W.R., Lee, E.L., Darempouran, M., Nouraie, M., Malekzadeh, R., Smoot, D.T., 2008. *H. pylori*-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria. *Helicobacter* 13, 506–517.

Barja-Fidalgo, C., Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Flores, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 1992. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation* 16, 1–12.

Barja-Fidalgo, C., Guimarães, J.A., Carlini, C.R., 1991. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon* 29, 453–459.

Benjamin, C.F., Carlini, C.R., Barja-Fidalgo, C., 1992. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon* 30, 879–885.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Cappon, A., Babolin, C., Segat, D., Cancian, L., Amedei, A., Calzetti, F., Cassatella, M.A., D'Elia, M.M., de Bernard, M., 2010. *Helicobacter pylori*-derived neutrophil-activating protein increases the lifespan of monocytes and neutrophils. *Cell. Microbiol.* 12, 754–764.

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.

Carlini, C.R., Guimarães, J.A., Ribeiro, J.M., 1985. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84, 551–560.

Coelho, A.L., De Freitas, M.S., Mariano-Oliveira, A., Rapozo, D.C., Pinto, L.F., Niewiarowski, S., Zingali, R.B., Marcinkiewicz, C., Barja-Fidalgo, C., 2004. RGD- and MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. *Exp. Cell. Res.* 292, 371–384.

D'Elia, 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.

De Bernard, M., D'Elia, M.M., 2010. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: friend or foe? *Toxicon* 56, 1186–1192.

Dixon, N.E., Gazzola, T.C., Blakeley, R.L., Zermer, B., 1975. Letter: jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4131–4133.

Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R., Krakowka, S., 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59, 2470–2475.

Elliott, S.N., Wallace, J.L., 1998. Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can. J. Gastroenterol.* 12, 559–568.

Enarsson, K., Brissert, M., Backert, S., Quiding-Jarbrink, M., 2005. *Helicobacter pylori* induces transendothelial migration of activated memory T cells. *Infect. Immun.* 73, 761–769.

Espinosa, A., Garcia, A., Hartel, S., Hidalgo, C., Jaimovich, E., 2009. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *J. Biol. Chem.* 284, 2568–2575.

Evans Jr., D.J., Evans, D.G., Takemura, T., Nakano, H., Lampert, H.C., Graham, D.Y., Granger, D.N., Kvietys, P.R., 1995. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect. Immun.* 63, 2213–2220.

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 protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.* 360, 217–224.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D., Carlini, C.R., 2004. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357–1363.

- Ghazaleh, F.A., Francischetti, I.M., Gombarovits, M.E., Carlini, C.R., 1997. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 362–367.
- Handa, O., Naito, Y., Yoshikawa, T., 2010. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflamm. Res.* 59, 997–1003.
- Harris, P.R., Mobley, H.L., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., Smith, P.D., 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 111, 419–425.
- Herrera, V., Parsonnet, J., 2009. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 971–976.
- Hu, L.T., Mobley, H.L., 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58, 992–998.
- IARC-Working-Group, 1994. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*. In: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (Ed.), Lyon, France.
- Kim, J.S., Kim, J.M., Jung, H.C., Song, I.S., Kim, C.Y., 2001. Inhibition of apoptosis in human neutrophils by *Helicobacter pylori* water-soluble surface proteins. *Scand. J. Gastroenterol.* 36, 589–600.
- Kujbida, P., Hatanaka, E., Campa, A., Curi, R., Poliselli Farsky, S.H., Pinto, E., 2008. Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. *Toxicol* 51, 1274–1280.
- Machado, A.M., Figueiredo, C., Seruca, R., Rasmussen, L.J., 2010. *Helicobacter pylori* infection generates genetic instability in gastric cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1806, 58–65.
- Machado, A.M., Figueiredo, C., Touati, E., Maximo, V., Sousa, S., Michel, V., Carneiro, F., Nielsen, F.C., Seruca, R., Rasmussen, L.J., 2009. *Helicobacter pylori* infection induces genetic instability of nuclear and mitochondrial DNA in gastric cells. *Clin. Cancer Res.* 15, 2995–3002.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., Balkwill, F., 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454, 436–444.
- McGee, D.J., May, C.A., Garner, R.M., Himpsl, J.M., Mobley, H.L., 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J. Bacteriol.* 181, 2477–2484.
- Mobley, H.L., Island, M.D., Hausinger, R.P., 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Montemurro, P., Barbuti, G., Dundon, W.G., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Colucci, M., De Rinaldis, P., Montecucco, C., Semeraro, N., Papini, E., 2001. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J. Infect. Dis.* 183, 1055–1062.
- Niedel, J., Wilkinson, S., Cuatrecasas, P., 1979. Receptor-mediated uptake and degradation of ^{125}I -chemotactic peptide by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 254, 10700–10706.
- Nielsen, H., Andersen, L.P., 1992. Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut* 33, 738–742.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Carlini, C.R., 2006a. *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 452, 149–155.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Carlini, C.R., 2006b. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 851–861.
- Polk, D.B., Peek Jr., R.M., 2010. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 403–414.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–1197.
- Shimoyama, T., Fukuda, S., Liu, Q., Nakaji, S., Fukuda, Y., Sugawara, K., 2002. Production of chemokines and reactive oxygen species by human neutrophils stimulated by *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 7, 170–174.
- Shimoyama, T., Fukuda, S., Liu, Q., Nakaji, S., Fukuda, Y., Sugawara, K., 2003. *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J. Clin. Pathol.* 56, 348–351.
- Suzuki, H., Hibi, T., Marshall, B.J., 2007. *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. *J. Gastroenterol.* 42, 1–15.
- Wang, D., Dubois, R.N., 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 10, 181–193.
- 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, 2025–2034.
- Weatherburn, M.W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971.
- Witko-Sarsat, V., Pederzoli-Ribeil, M., Hirsch, E., Sozzani, S., Cassatella, M.A., 2011. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol.* 32, 117–124.
- Wymann, M.P., Schneider, R., 2008. Lipid signalling in disease. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9, 162–176.
- Zanotti, G., Papinutto, E., Dundon, W., Battistutta, R., Seveso, M., Giudice, G., Rappuoli, R., Montecucco, C., 2002. Structure of the neutrophil-activating protein from *Helicobacter pylori*. *J. Mol. Biol.* 323, 125–130.

4.2. Capítulo 2

O capítulo 2 é composto por um manuscrito, contendo dados obtidos estudando os efeitos da urease de *H. pylori* em células epiteliais gástricas, realizados durante estágio Doutorado-Sanduíche no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, Portugal, sob a supervisão e orientação da Prof^a. Dr^a. Céu Figueiredo. Este manuscrito está formatado para submissão na revista *Infection and Immunity*, da *American Society for Microbiology*.

- Anexo I: Contém o os dados da purificação da urease nativa de *H. pylori*, utilizada nos experimentos do capítulo 2.

The urease of *Helicobacter pylori* is internalized via a cholesterol-dependent endocytosis pathway

A. F. Uberti^a; M. Leite^b; D. Olivera-Severo^a; C. Figueiredo^b; C. R. Carlini^{a,c,#}

Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil^a;

Institute of Molecular Pathology and Immunology at the University of Porto, Portugal^b;

Instituto do Cérebro – InsCer, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, and Department of Biophysics, Biosciences Institute, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil^c

Running Title: *Helicobacter pylori* urease is endocytosed by gastric epithelial cells

Address correspondence to Celia R. Carlini: ccarlini@ufrgs.br

Abstract

The gastric pathogen *Helicobacter pylori* produces a large amount of urease, an enzyme with several different activities. Besides being responsible for the alkalization of the acidic medium allowing the survival of the bacteria, this protein also has enzyme-independent effects in mammalian cells, such as platelets, neutrophils, macrophages and gastric epithelial cells. Here we evaluated the process of urease internalization by gastric epithelial cells. We observed that the endocytosis occur via EEA1 and Lamp1 endosomes, and is dependent of lipid rafts. Additionally, the urease induces the migration of AGS cells in an experiment that simulates the wound healing assay. Urease also stimulates the over-expression of GM-CSF by AGS cells. These results contribute to the understanding of the role of the urease in the gastric pathologies caused by *Helicobacter pylori*.

Introduction

Helicobacter pylori infects half of the world population and is a major cause of gastroduodenal pathologies. In 1994, the International Agency for Research on Cancer and the World Health Organization (WHO) classified *H. pylori* as a definite (group I) carcinogen (1). *H. pylori* promotes a chronic inflammatory response in the gastric mucosa, a hallmark for gastric cancer evolution. The bacteria induce an inflammatory response by epithelial cells and circulatory immune cells, recruited to the site of infection. *H. pylori* infection positively regulates the expression of cytokines IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , NF- κ B, important mediators in the development of gastric inflammation (2). It was also reported the production of growth factors, such as GM-CSF, and inflammatory modulators, such as COX-2 and reactive oxygen species (ROS) (3, 4).

It has been suggested that *H. pylori* virulence factors associate with cholesterol-rich domains of the plasma membrane, termed lipid rafts (5). These domains are enriched with cholesterol but also contain sphingolipids and proteins (6) and have been shown to be sites utilized by bacteria to interact with host cells (7) and as the ports of entry by which bacteria enter these cells (8). Moreover, the perturbation of these cholesterol-rich microdomains using cholesterol-depleting agents like methyl- β -cyclodextrin (M β CD) significantly reduces the internalization of *H. pylori* virulence factors such as VacA and CagA into target cells (5, 9).

H. pylori produces an astounding amount of the protein urease, most of it being required for the degradation of urea into ammonia and carbon dioxide,

allowing the survival of the bacteria in the extremely acidic environment of the stomach (10). It has been reported that the urease induces nitric oxide synthesis by macrophages, and cytokine expression by monocytes and gastric epithelial cells (11-13). Our group has previously reported that the urease has other properties that could contribute to the chronic inflammatory diseases caused by *H. pylori*, such as the induction of mouse paw edema and the activation of human neutrophils (14).

Here we seek to evaluate the endocytosis of purified *H. pylori* urease in gastric epithelial cells, and its effect in cell migration and cytokine expression

Materials and Methods

Cell culture, *H. pylori* strains, and growth condition

Human AGS gastric adenocarcinoma cells were maintained in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 200 µg/mL streptomycin, and 200 IU/mL penicillin (Invitrogen) at 37°C under 5% CO₂ humidified atmosphere. *H. pylori* strain 26695 was grown in trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood (BioMérieux) and incubated for 48 h at 37°C under microaerophilic atmosphere.

Urease purification

H. pylori were cultivated for 48h (40 plates). Bacteria were collected, resuspended in phosphate buffer (20 mM NaH₂PO₄) and lysed by ultrasound (Ultrasonic Homogenizer 4710; 10 pulses of 30 sec. in ice bath). After centrifugation (20 min., 20.000 g, 4°C) the supernatant was purified according to the protocol in Wassermann et al., 2010, with a minor adjustment. An additional last step of ionic exchange is necessary in order to separate the urease and GroEL, a chaperonine described by Austin et al. in 1992 as a protein that interacts and elutes with the urease (15).

Immunofluorescence and microscopy

Immunofluorescence studies and analysis by confocal microscopy were performed using a PL APO 63× NA 1.40 oil objective (TCS SP; Leica). The images were combined and merged using ImageJ (16) with the plugin Bio-Formats (17). For immunocytochemistry, AGS cells were treated with the urease during fixed periods of time, fixed with paraformaldehyde 4%, washed with PBS, and permeabilized with ice-cold methanol 100%. Cells were incubated with primary antibodies for Ureb-Alexa488 and EEA1-Alexa594.

For live cell experiments, AGS cells were previously transfected with Lamp1-GFP (donated by Dr. Allan Levey, Emory University) using Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) according to manufacturer's recommendations. Urease was tagged with Texas Red.

Cholesterol depletion

AGS cells were depleted of cholesterol and subsequently replenished as previously described (28). In brief, cells were incubated with 5 mg/ml methyl- β -cyclodextrin (M β CD) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in serum-free medium at 37°C under 5% CO₂ for 60 min. and washed. This treatment did not affect cell viability.

Cell migration assay

An Ibidi culture insert (Ibidi GmbH) consists of two compartments separated by a 500 μ m thick wall. For the migration assay, an equal number of AGS cells (80 μ l; 2×10^4 cells/compartment) were added into the two reservoirs of the same

insert and incubated at 37°C under 5% CO₂. After confluence was reached, the insert was gently removed creating a gap ~500 µm. The well was washed and filled with complete medium and the migration was observed by optical microscopy. Cells were allowed to migrate for 24 hours.

Cytokine expression

Supernatants of the cell migration assay were collected after the 24 hour treatment with or without urease. Twelve cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17A, IFN γ , TNF α , GM-CSF) were measured by a Multi-Analyte ELISArray Kit (Qiagen Biosciences).

Results

The urease is internalized by AGS cells

We first examined the internalization of the urease added to AGS cells (Figure 1). In panel A, we see the urease in direct contact with plasma membrane, despite some molecules already in the cytoplasm. In panel B, 45 minutes after the stimulation, we still see some urease in a specific area of the plasma membrane, indicating that this process may occur via specific receptors or structures.

The internalization occurs through a classic endocytic pathway

As in the previous experiment we were unable to observe colocalization between the urease and early endosomes (EEs), we reduced incubation period to 5 minutes. Figure 2 shows that during the initial steps of internalization in AGS cells, the urease is colocalized with EEA1-positive endosomes. Worthy of notice is the fact that a great amount of urease is not localized in EEs, indicating a possible transfer to late endosomes, or other cellular structures.

The urease is sorted to Lamp1-positive endosomes

In light of the previous result, we next investigated whether the urease could be associated with Lamp1-positive endosomes. After 10 minutes, the colocalization

of urease and Lamp1 could be observed, suggesting the progression of the sorting of urease to late endosomes/lysosomes (figure 3).

The internalization is dependent of cholesterol

It has been showed that *H. pylori* associates with cholesterol-rich microdomains in AGS cells, stimulating NF- κ B-dependent inflammatory responses (18). We treated AGS cells with methyl- β -cyclodextrin, a cholesterol scavenger, in order to investigate the role of cholesterol in the endocytosis of the urease. Figure 4 shows that the internalization of the urease is dependent of cholesterol, or cholesterol-rich plasma membrane structures, such as lipid rafts. This same effect could be observed for the toxin VacA that also associates to lipid rafts (19).

The urease promotes cell migration

H. pylori urease stimulates chemotaxis in human neutrophils (14). In order to investigate the induction of cell migration of the urease in AGS cells, we used the Ibidi Culture-Insert assay where no cell damage occurs. It was observed that the urease significantly stimulated cell migration, three times faster than control.

The urease stimulates the expression of GM-CSF

Using the 24h supernatant of the cell migration assay, we performed an ELISA to measure the expression of some proinflammatory cytokines in urease-stimulated AGS cells. We found that only GM-CSF was significantly increased.

Discussion

The infection by *H. pylori* generates gastric tissue damage, and the bacteria induce apoptosis in gastric epithelial cells in vivo and in vitro (20). This infection can also cause cytoplasmic vacuolation and disorganization of gastric glands of the mucosa (21). Several of the damages induced by *H. pylori* are generated by the toxin VacA, which inserts in the plasma membrane and is internalized by gastric epithelial cells, where it induces vacuolation and affects mitochondrial function (22). Searching a better understanding how the urease exerts its effects, we monitored its internalization by AGS cells.

The urease is internalized after about 3 minutes following its addition to the AGS culture medium. This internalization seems to be receptor- or structure-specific since we could observe a preference for a particular region of the plasma membrane after 45 minutes of incubation, when most of the protein was already endocytosed. If the endocytosis is receptor-specific is unclear, but plasma membrane, such as lipid rafts could be involved in this process.

In figure 2, an assay using fixed cells, we could observe the localization of the urease in early endosomes, positives for the marker EEA1. Early endosomes are the first endocytic compartment to accept incoming cargo internalized from the plasma membrane and are responsible for the sorting of internalized cargo to different intracellular destinations (23).

Lamp-1 is a marker that can be found in either late endosomes or lysosomes. It is a glycoprotein which cycles between the cytoplasmic face of these organelles

(24). Figure 3 shows that 10 minutes after the addition of urease to AGS cells, the protein is localized in structures containing Lamp-1, indicating that the urease may follow a degradation route. However, it has been shown that *H. pylori* is an invasive bacterium. During cellular infection *H. pylori* induces autophagy in gastric epithelial cells, a process that results in the sequestration of cytosolic components within double-membrane compartments called autophagosomes (25). These compartments fuse with lysosomes to become autophagolysosomes, which degrade vesicle contents through the action of lysosomal hydrolases. *H. pylori* is able to modulate and subvert this process, preventing the formation of the autophagolysosome and allowing bacterial proliferation (26). The urease may have a role in the regulation of the fusion of lysosomes and autophagolysosome, as its localization in lamp1-positive compartments did not affect its fluorescence.

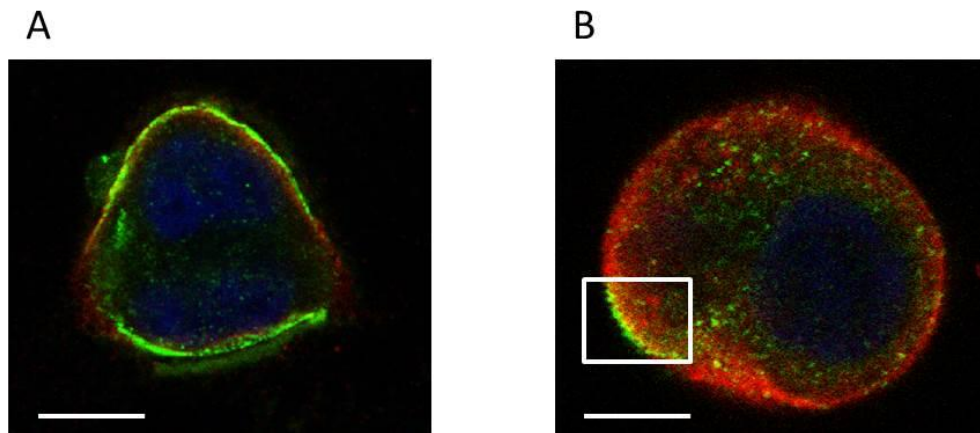
H. pylori utilizes cholesterol-rich lipid rafts to induce responses in epithelial cells, such as the activation of NF- κ B, IL-8 and the delivery of peptidoglycans (18). When treated with the cholesterol scavenger M β CD the internalization of the urease was completely abolished (figure 4). Other *H. pylori* structures interact with lipid rafts like the type IV secretion system apparatus and the toxin VacA.

The sonicate of *H. pylori* has chemotactic activity in neutrophils and monocytes (27), and as our group showed, the urease also possess this effect in human neutrophils (14). In figure 5 we show that the urease of *H. pylori* has a chemotactic activity on gastric epithelial cells as well. A study from 1996 demonstrated that ammonia had no effect in the migration or proliferation of the gastric cell line MKN28 (28), indicating that this property may be independent of the ureolytic activity of the urease.

H. pylori induces a strong inflammatory response, that is accompanied of high cytokine levels (29). However, we observed that only GM-CSF was over-expressed significantly. This may have occurred because the greatest effect observed in cell migration took place after 7 hours, and the supernatant collected was from 24 hours after stimulation. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is an important hematopoietic growth factor and immune modulator, and can recruit circulating neutrophils, monocytes and lymphocytes to enhance their functions in host defense.

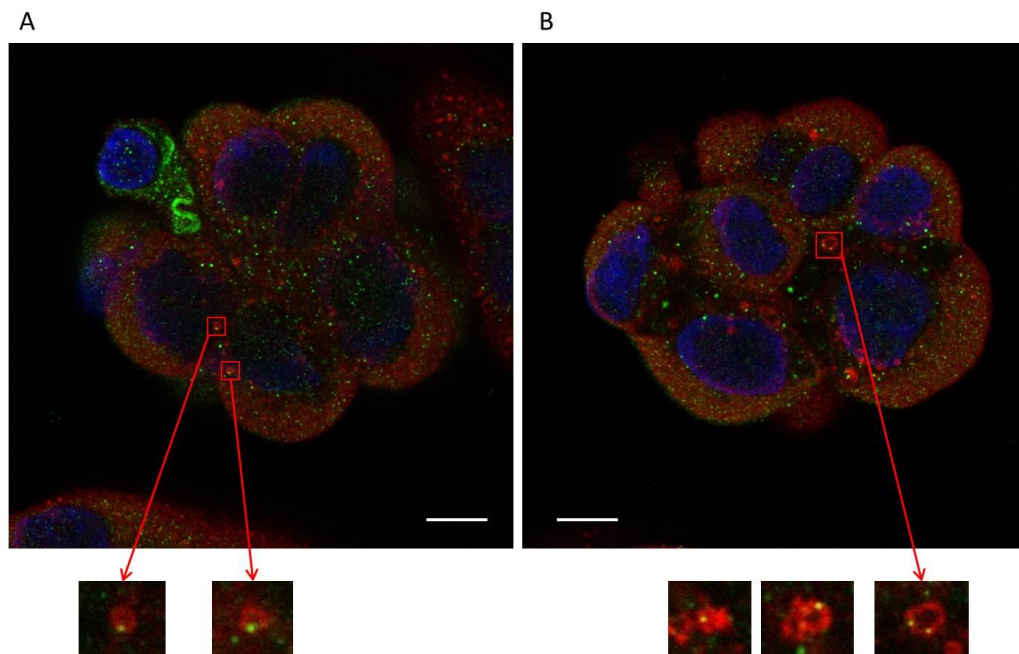
Figures

Figure 1



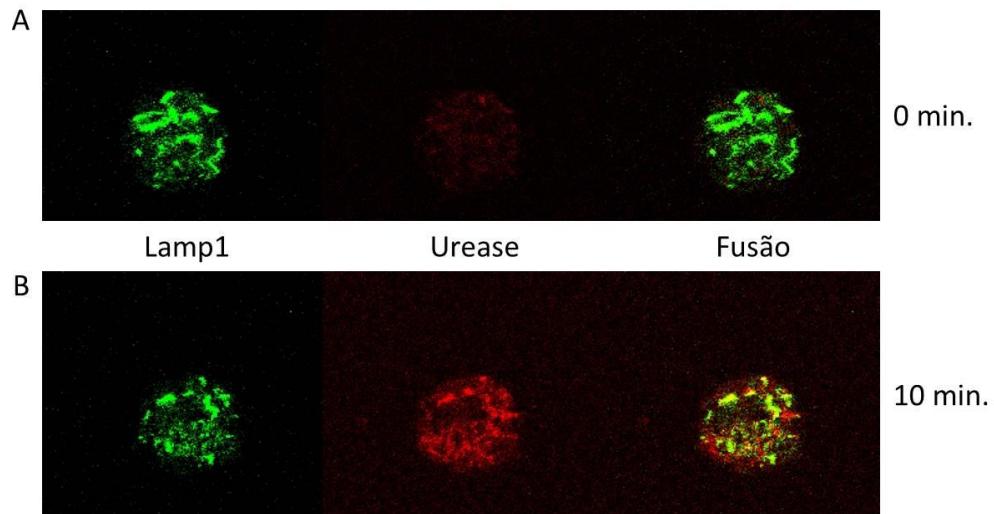
Legend to figure 1: Immunofluorescence of urease and EEA1. AGS cells were treated with urease for 5 and 45 minutes at 37°C. Cells were fixed, permeabilized and processed for the detection of urease (100 nM; green) and EEA1 (red). Cells were analysed by confocal microscopy. Panel A: cells fixed after 5 of urease addition; Panel B: cells fixed after 45 minutes of urease addition. Bars, 10 μm .

Figure 2



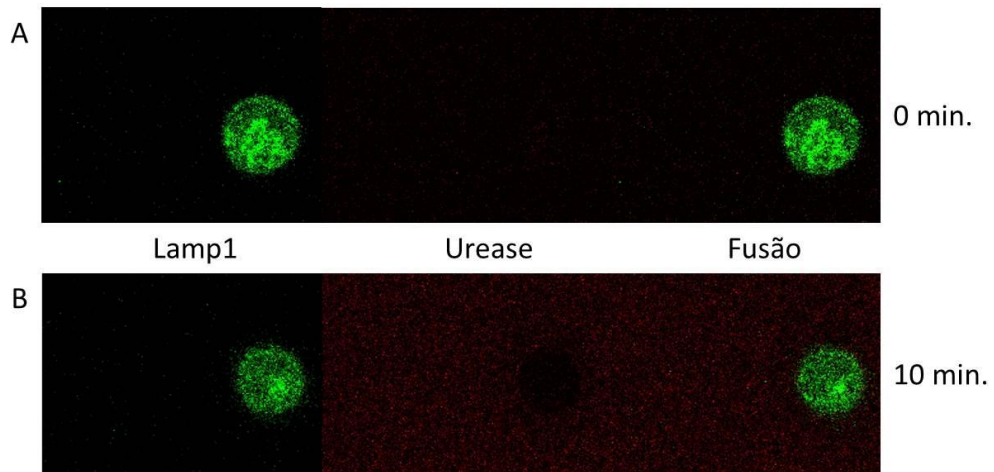
Legend to figure 2: Immunolocalization of urease and EEA1 endosomes. AGS cells were treated with urease for 15 minutes at 37°C. Cells were fixed, permeabilized and processed for the detection of urease (100 nM; green) and EEA1 (red). Cells were analysed by confocal microscopy. Panel A and B show different sections of the same cell agglomerate. Inserts are magnifications of EEA1-positive endosomes containing urease in the plasma membrane. Bars, 10 μm.

Figure 3



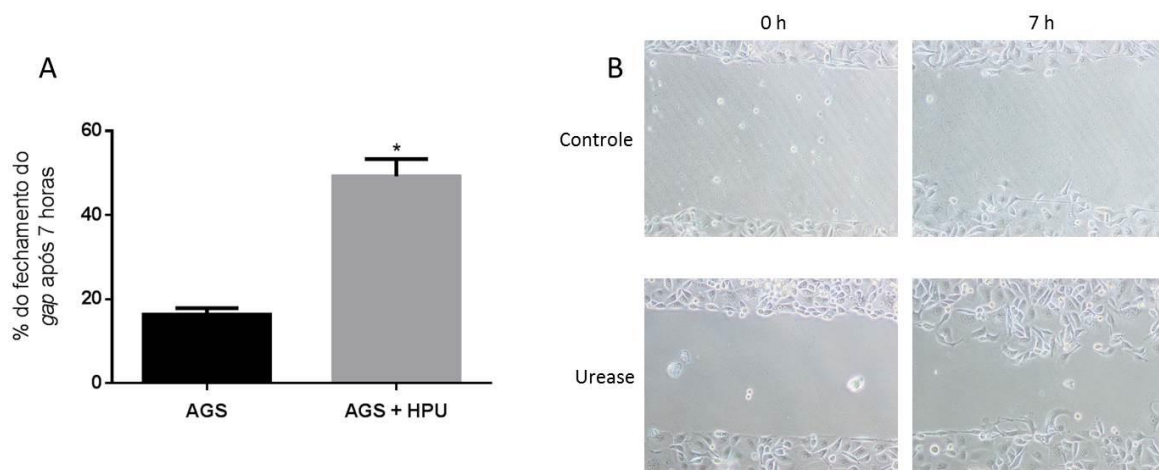
Legend to figure 3: The urease endocytosis has the participation of Lamp1-positive endosomes. AGS cells were transfected with Lamp1-GFP, prior to the addition of Texas-Red-tagged urease (100 nM). After ~1 minute, fluorescence was detected in confocal microscope.

Figure 4



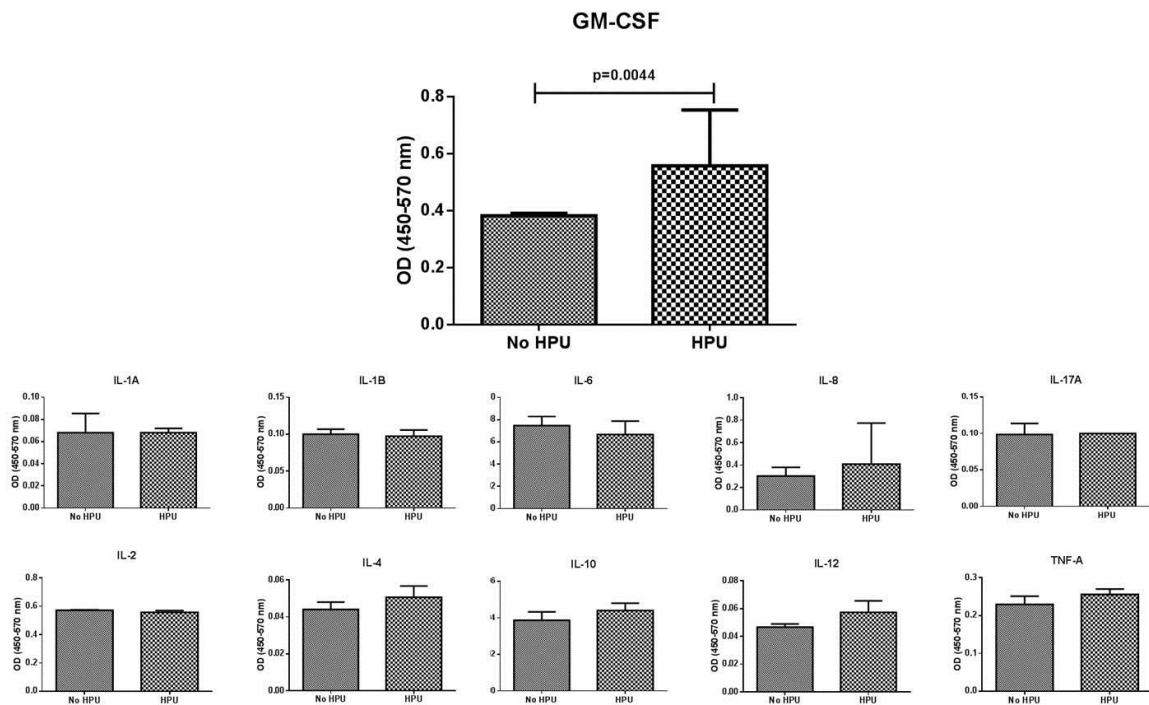
Legend to figure 4: AGS transfected with Lamp1-GFP were treated with M β CD (5 mg/ml) for one hour, washed, and then Texas-Red-tagged urease was added (100 nM).

Figure 5



Legend to figure 5: Cell migration assay. AGS cells were seeded into different reservoirs of an Ibidi insert. After confluence was reached, the insert was gently removed, cells were washed, and treated or not with urease (300 nM). The closing of the gap was monitored for 1, 3, 5, 7 and 24 hours. Panel A shows quantitative difference between urease treatment and control after 7 hours. Panel B shows a representative assay. Values represent \pm S.D. of three independent experiments. * $p < 0.05$.

Figure 6



Legend to figure 6: Expression of cytokines by AGS cells activated by urease. Supernatants of the migration assay were collected. The expression was analysed using a Multi-Analyte ELISArray kit (Qiagen).

Bibliography

1. **IARC.** 1994. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 61, Lyon, 7-14 June 1994.
2. **Lamb A, Chen LF.** 2013. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *J Cell Biochem* **114**:491-497.
3. **Beales ILP, Calam J.** 1997. *Helicobacter pylori* stimulates granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production from cultured antral biopsies and a human gastric epithelial cell line. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* **9**:451-455.
4. **Cho SO, Lim JW, Kim KH, Kim H.** 2010. Involvement of Ras and AP-1 in *Helicobacter pylori*-induced expression of COX-2 and iNOS in gastric epithelial AGS cells. *Digestive diseases and sciences* **55**:988-996.
5. **Lai CH, Chang YC, Du SY, Wang HJ, Kuo CH, Fang SH, Fu HW, Lin HH, Chiang AS, Wang WC.** 2008. Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infection and immunity* **76**:3293-3303.
6. **Simons K, Ehehalt R.** 2002. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation* **110**:597-603.
7. **Allen-Vercoe E, Waddell B, Livingstone S, Deans J, DeVinney R.** 2006. Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir translocation and pedestal formation requires membrane cholesterol in the absence of bundle-forming pili. *Cell Microbiol* **8**:613-624.
8. **Lafont F, Van Nhieu GT, Hanada K, Sansonetti P, van der Goot FG.** 2002. Initial steps of Shigella infection depend on the cholesterol/sphingolipid raft-mediated CD44-IpaB interaction, vol. 21.

9. **Schraw W, Li Y, McClain MS, van der Goot FG, Cover TL.** 2002. Association of *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) with lipid rafts. The Journal of biological chemistry **277**:34642-34650.
10. **Stingl K, De Reuse H.** 2005. Staying alive overdosed: how does *Helicobacter pylori* control urease activity? International journal of medical microbiology : IJMM **295**:307-315.
11. **Gobert AP, Mersey BD, Cheng Y, Blumberg DR, Newton JC, Wilson KT.** 2002. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. J Immunol **168**:6002-6006.
12. **Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD.** 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. Gastro **111**:419-425.
13. **Tanahashi T, Kita M, Kodama T, Yamaoka Y, Sawai N, Ohno T, Mitsufuji S, Wei YP, Kashima K, Imanishi J.** 2000. Cytokine expression and production by purified *Helicobacter pylori* urease in human gastric epithelial cells. Infection and immunity **68**:664-671.
14. **Uberti AF, Olivera-Severo D, Wassermann GE, Scopel-Guerra A, Moraes JA, Barcellos-de-Souza P, Barja-Fidalgo C, Carlini CR.** 2013. Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. Toxicon **69**:240-249.
15. **Austin JW, Doig P, Stewart M, Trust TJ.** 1992. Structural comparison of urease and a GroEL analog from *Helicobacter pylori*. J Bacteriol **174**:7470-7473.
16. **Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW.** 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature methods **9**:671-675.
17. **Linkert M, Rueden CT, Allan C, Burel JM, Moore W, Patterson A, Loranger B, Moore J, Neves C, Macdonald D, Tarkowska A, Sticco C, Hill E, Rossner M, Eliceiri KW,**

- Swedlow JR.** 2010. Metadata matters: access to image data in the real world. *The Journal of cell biology* **189**:777-782.
18. **Hutton ML, Kaparakis-Liaskos M, Turner L, Cardona A, Kwok T, Ferrero RL.** 2010. *Helicobacter pylori* exploits cholesterol-rich microdomains for induction of NF-kappaB-dependent responses and peptidoglycan delivery in epithelial cells. *Infection and immunity* **78**:4523-4531.
19. **Gauthier NC, Monzo P, Kaddai V, Doye A, Ricci V, Boquet P.** 2005. *Helicobacter pylori* VacA cytotoxin: a probe for a clathrin-independent and Cdc42-dependent pinocytic pathway routed to late endosomes. *Molecular biology of the cell* **16**:4852-4866.
20. **Cover TL, Krishna US, Israel DA, Peek RM, Jr.** 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Res* **63**:951-957.
21. **Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ.** 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* **19**:449-490.
22. **Palframan SL, Kwok T, Gabriel K.** 2012. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:92.
23. **Marko J, Mahak S, Juliati R, Steve C.** 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol* **25**:99-112.
24. **Cook NR, Row PE, Davidson HW.** 2004. Lysosome associated membrane protein 1 (Lamp1) traffics directly from the TGN to early endosomes. *Traffic* **5**:685-699.
25. **Terebiznik MR, Raju D, Vázquez CL, Torbricki K, Kulkarni R, Blanke SR, Yoshimori T, Colombo MI, Jones NL.** 2009. Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy* **5**:370-379.
26. **Greenfield LK, Jones NL.** 2013. Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its role in gastric carcinogenesis. *Trends in microbiology* **21**:602-612.
27. **Nielsen H, Andersen LP.** 1992. Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut* **33**:738-742.

28. **Ricci V, Ciacci C, Zarrilli R, Sommi P, Tummuru MK, Del Vecchio Blanco C, Bruni CB, Cover TL, Blaser MJ, Romano M.** 1996. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infection and immunity* **64**:2829-2833.
29. **Fiorentino M, Ding H, Blanchard TG, Czinn SJ, Sztejn MB, Fasano A.** 2013. *Helicobacter pylori*-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infection and immunity* **81**:876-883.

5. Discussão

As ureases são proteínas altamente conservadas, independente de sua origem e de sua organização terciária, apresentando estrutura quaternária e mecanismos catalíticos semelhantes. Este trabalho contribui para demonstrar que ureases vegetais e bacterianas conservam propriedades não enzimáticas em comum, como a capacidade de ativar exocitose, recrutar a rota dos eicosanóides, e estimular uma resposta pró-inflamatória. Com base nos dados apresentados no capítulo 1 é possível postular que, de forma independente da sua atividade ureolítica, esta proteína possivelmente está envolvida em outros processos da patogênese causada por *H. pylori*, além de promover a alcalinização do ambiente gástrico, formando um microclima que possibilita a colonização da mucosa gástrica pela bactéria. O tratamento da urease com o inibidor irreversível p-hidroxi-mercúrio-benzoato abole sua atividade ureolítica, mas não afeta algumas propriedades, como a agregação plaquetária e a ativação de neutrófilos (Wassermann et al., 2010, Uberti, 2010). Estas propriedades independentes da atividade enzimática provavelmente são consequência da interação de regiões da urease, que não o seu sítio ativo, com os diferentes modelos celulares.

No capítulo 1, os dados apresentados mostram que a urease de *H. pylori* induz edema de pata em camundongos de maneira semelhante à canatoxina (isoforma da urease de *Canavalia ensiformis*) (Benjamin et al., 1992), sendo a bacteriana 10 vezes mais potente, em bases molares, do que a vegetal em sua capacidade de induzir edema. Como descrito para a canatoxina, eicosanóides derivados da rota das lipoxigenases desempenham um papel importante na inflamação induzida pela urease de *H. pylori*, evidenciado pela redução do edema de camundongos pré-tratados com esculetina, um inibidor de lipoxigenases. Muitas evidências apontam para um importante papel da via do ácido araquidônico no desenvolvimento de inflamação crônica e carcinogênese (Wang and Dubois, 2010, Wymann and Schneiter, 2008), e a nossos resultados mostram que a urease de *H. pylori* ativa esta rota de sinalização (Wassermann et al., 2010, Uberti, 2010).

Em 2010, mostramos que a urease induz quimiotaxia em neutrófilos humanos, e que esta atividade é independente da atividade enzimática (Uberti, 2010). Aqui, demonstramos que esta quimiotaxia é dependente de produtos de lipoxigenase, já que esta propriedade foi completamente revertida quando os neutrófilos foram incubados com o inibidor de lipoxigenase AA861.

A meia-vida de neutrófilos humanos é de aproximadamente 8 horas, após sua liberação da medula óssea. Tipicamente, neutrófilos diferenciados sofrem apoptose e/ou migram para sítios de inflamação. Na ausência de um desafio infeccioso, a remoção de neutrófilos apoptóticos ocorre através do fígado, baço e medula óssea. Neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio que geram dano ao tecido. A fina regulação de proteínas anti- e pró-apoptóticas que regulam a vida útil dos neutrófilos é um processo crítico na resolução da inflamação (Witko-Sarsat et al., 2011). Já havíamos demonstrado que a urease ativa e mantém neutrófilos humanos vivos durante um período maior do que o controle, num processo que envolve um aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas e redução da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Uberti, 2010). Produtos de lipoxigenase contribuem para a propriedade anti-apoptótica da urease, como indicado na figura 3B, em que neutrófilos incubados com o inibidor AA861 foram menos protegidos da apoptose. A lipoxigenase mostrou elevados níveis de expressão em neutrófilos ativados pela urease (figura 6), enquanto nenhuma alteração nos níveis de ciclo-oxigenases foi observada. Um metabólito de lipoxigenases, o leucotrieno B₄, já foi identificado como um importante mediador de processos inflamatórios no trato gastrointestinal (Wang and Dubois, 2010).

A infecção por *H. pylori* gera dano ao tecido epitelial gástrico, e a bactéria é capaz de induzir apoptose em células de epitélio gástrico, tanto *in vivo* como *in vitro*, mediada da citotoxina vacuolizante VacA (Cover et al., 2003). O *H. pylori* é capaz de induzir respostas pró- e anti-apoptóticas em células de epitélio gástrico, provavelmente por causa do efeito de seus diferentes fatores de virulência e estado de infecção (Maeda et al., 2002). A infecção ainda pode causar vacuolização citoplasmática e desorganização de glândulas da mucosa gástrica (Kusters et al., 2006). Vários destes danos são gerados pela toxina vacuolizante, VacA, que insere-se na membrana e é

internalizada em células de epitélio gástrico, onde pode induzir vacuolização e afetar a função mitocondrial (Palframan et al., 2012). Buscando entender como a urease exerce suas funções em células humanas, investigamos a interação desta proteína com células epiteliais gástricas e monitoramos sua internalização nestas células por técnicas imunocitoquímicas.

A urease de *H. pylori* é internalizada em cerca de 3 minutos, após sua adição ao meio de cultura de células AGS. Esta internalização parece ser receptor-específica, já que um ensaio com células fixadas mostrou uma localização da urease na membrana celular após 10 minutos, e após 45 minutos, quando a maior parte da urease já havia sido endocitada, ainda havia pequenos focos da proteína concentrados em um ponto específico da membrana celular (Fig. 9). Além de poder ser receptor-específica, a endocitose pode acontecer em regiões específicas da membrana celular, como *lipid rafts*.

Na figura 10, em um ensaio com células fixadas, podemos observar a co-localização da urease com alguns endossomos precoces, positivos para o marcador EEA-1, o que pode indicar a rota de endocitose seguida pela urease. Os endossomos precoces são o primeiro compartimento endocítico a receber moléculas internalizadas pela membrana plasmática e são responsáveis pela distribuição destas diferentes moléculas para diferentes destinos intracelulares (Marko et al., 2010).

Já na figura 11, vemos que após 10 minutos, a urease está co-localizada com estruturas contendo o marcador *Lysosome-associated membrane protein-1*, um conhecido marcador de endossomos tardios e lisossomos (Lamp-1), indicando que a urease segue uma rota de degradação. No entanto, é importante ressaltar que *H. pylori* pode ser uma bactéria invasiva. Durante a infecção celular, a bactéria pode induzir autofagia em células de epitélio gástrico, um processo que resulta no sequestro de componentes citosólicos em compartimentos de membrana dupla, chamados autofagossomos (Terebiznik et al., 2009). Estes compartimentos fusionam-se com lisossomos e formam os autofagolisossomos, que degradam os conteúdos vesiculares através da ação de hidrolases lisossomais. A bactéria *H. pylori* é capaz de modular e subverter este processo, impedindo a formação do autofagolisossomo, de modo a permitir a proliferação bacteriana (Greenfield and Jones, 2013). A urease pode ter um papel na regulação da fusão entre autofagossomos e lisossomos, visto

que a suposta localização em compartimentos lamp1-positivos não diminuiu a fluorescência emitida pela urease, sugerindo que não foi significativamente degradada.

A *H. pylori* explora balsas lipídicas (*lipid rafts*) ricas em colesterol para induzir alguns efeitos em células de epitélio gástrico, como a indução de respostas dependentes de NF- κ B, a indução de IL-8, e a transferência de peptidoglicanos (Hutton et al., 2010). Investigamos a participação de colesterol na endocitose da urease por células AGS. Quando as células foram tratadas com M β CD, um *scavenger* de colesterol, houve a inibição da internalização da urease (Fig. 12). Outros componentes de *H. pylori* também interagem com estes microdomínios de colesterol, como o aparato do sistema de secreção tipo IV, e a toxina VacA (Hutton et al., 2010, Lai et al., 2008).

O sonicação de *H. pylori* possui atividade quimiotática em neutrófilos e monócitos humanos (Nielsen and Andersen, 1992), e como já mostramos, a urease também possui este efeito sobre neutrófilos humanos (Uberti et al., 2013). Além disso, mostramos no Capítulo 2 que a urease de *H. pylori* também possui efeito quimiotático em células de epitélio gástrico, aumentando a taxa de migração celular em até três vezes. Um trabalho de 1996 mostrou que a amônia não teve nenhum efeito em migração ou proliferação celular em células MKN28 (Ricci et al., 1996), indicando que esta propriedade da urease de *H. pylori* deve ser independente de sua atividade ureolítica. De fato, mostramos que o efeito quimiotático da urease de *H. pylori* sobre neutrófilos humanos não é alterado quando a proteína teve seu sítio catalítico inativado (Uberti et al., 2013).

Helicobacter pylori induz uma resposta inflamatória que contém elevados níveis de citocinas, como IL-8, IL-6, IL-10, IL-1 β , TNF- α (Fiorentino et al., 2013). No entanto, observamos que apenas a citocina *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) teve sua expressão aumentada de maneira significativa em células AGS tratadas com a urease de *H. pylori*. Isso pode ter ocorrido porque o maior efeito da urease nas células ocorreu 7 horas após o estímulo, sendo que o sobrenadante foi coletado 24 horas após o estímulo. É possível que a urease seja degradada com o tempo e na temperatura em que as células são mantidas, perdendo seu efeito sobre as células. GM-CSF é um importante fator de crescimento hematopoiético e

modulador imunitário, podendo atuar recrutando e ativando neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes (Shi et al., 2006).

Este trabalho apresenta resultados que enfatizam a participação da urease de *H. pylori* em efeitos que contribuem para o quadro inflamatório desencadeado por esta bactéria no tecido gástrico. A indução de edema de pata em camundongos, a ativação de neutrófilos, e a internalização desta toxina, são propriedades que podem contribuir de maneira significativa como fatores de patogenicidade de *H. pylori*.

6. Conclusões

Estes dados nos permitem concluir que a urease está envolvida nos seguintes processos:

1. Em camundongos:
 - a. Induz edema de pata, associado a um grande infiltrado de neutrófilos.

2. Em neutrófilos humanos:
 - a. Induz, de maneira dose-dependente, a quimiotaxia;
 - b. Neutrófilos ativados pela urease produzem espécies reativas de oxigênio exclusivamente para o meio extracelular;
 - c. A ativação pela urease protege neutrófilos humanos contra apoptose, aumentando sua meia-vida;
 - d. Aumenta a expressão de 5-lipoxigenase, uma enzima envolvida na quimiotaxia e proteção contra apoptose induzidos pela urease.

3. Em células epiteliais gástricas:
 - a. A urease é endocitada, e co-localiza com endossomos iniciais e endossomos tardios/lisossomos.
 - b. Esta endocitose acontece via balsas lipídicas.
 - c. Induz migração celular.
 - d. Induz a expressão de GM-CSF.

7. Perspectivas

- a) Investigar o possível envolvimento da urease no processo de autofagia ativado por *H. pylori*;
- b) Estabelecer a rota de internalização da urease por células epiteliais gástricas;
- c) Avaliar o efeito da urease em células gástricas por tempos prolongados, numa tentativa de simular a infecção crônica por *H. pylori*.

8. Referências Bibliográficas

- ALVES, E. W., FERREIRA-DASILVA, A. T., FERREIRA-DASILVA, C. T. & CARLINI, C. R. 1992. Effects of canatoxin on the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum membranes. *Toxicon*, 30, 1411-1418.
- AMEDEI, A., CAPPON, A., CODOLO, G., CABRELLE, A., POLENGHI, A., BENAGIANO, M., TASCA, E., AZZURRI, A., D'ELIOS, M. M., DEL PRETE, G. & DE BERNARD, M. 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *J Clin Invest*, 116, 1092-101.
- ARMBRUSTER, C. E. & MOBLEY, H. L. 2012. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol*, 10, 743-54.
- ARRAES, S. M., FREITAS, M. S., DA SILVA, S. V., DE PAULA NETO, H. A., ALVES-FILHO, J. C., AUXILIADORA MARTINS, M., BASILE-FILHO, A., TAVARES-MURTA, B. M., BARJA-FIDALGO, C. & CUNHA, F. Q. 2006. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood*, 108, 2906-13.
- ARRUDA, M. A., ROSSI, A. G., DE FREITAS, M. S., BARJA-FIDALGO, C. & GRACA-SOUZA, A. V. 2004. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF-kappaB. *J Immunol*, 173, 2023-30.
- 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.
- BARER, M. R., ELLIOTT, T. S., BERKELEY, D., THOMAS, J. E. & EASTHAM, E. J. 1988. Cytopathic effects of *Campylobacter pylori* urease. *J Clin Pathol*, 41, 597.
- BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, C. R., GUIMARAES, J. A., FLORES, C. A., CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. 1992. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation*, 16, 1-12.
- BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J. A. & CARLINI, C. R. 1991a. Canatoxin, a plant protein, induces insulin release from isolated pancreatic islets. *Endocrinology*, 128, 675-9.
- BARJA-FIDALGO, C., GUIMARAES, J. A. & CARLINI, C. R. 1991b. Lipooxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, 29, 453-9.
- BEALES, I. L. P. & CALAM, J. 1997. *Helicobacter pylori* stimulates granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) production from cultured antral biopsies and a human gastric epithelial cell line. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 9, 451-455.
- BECKER-RITT, A. B., MARTINELLI, A. H., MITIDIERI, S., FEDER, V., WASSERMANN, G. E., SANTI, L., VAINSTEIN, M. H., OLIVEIRA, J. T., FIUZA, L. M., PASQUALI, G. & CARLINI, C. R. 2007. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. *Toxicon*, 50, 971-83.

- BENJAMIN, C. F., CARLINI, C. R. & BARJA-FIDALGO, C. 1992. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon*, 30, 879-85.
- BESWICK, E. J., PINCHUK, I. V., MINCH, K., SUAREZ, G., SIERRA, J. C., YAMAOKA, Y. & REYES, V. E. 2006. The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun*, 74, 1148-55.
- BIZZOZERO, G. 1893. Ueber die schlauchförmigen Drüsen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut Dritte Mittheilung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 42, 82-152.
- BÖYUM, A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 97, 77-89.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-54.
- CALVET, X., RAMIREZ LAZARO, M. J., LEHOURS, P. & MEGRAUD, F. 2013. Diagnosis and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 18 Suppl 1, 5-11.
- 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, 161-6.
- CARLINI, C. R. & GUIMARAES, J. A. 1981. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19, 667-75.
- CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. & RIBEIRO, J. M. 1985. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipooxygenase pathway. *Br J Pharmacol*, 84, 551-560.
- CARLINI, C. R., OLIVEIRA, A. E., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J. & WELLS, M. A. 1997. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J Econ Entomol*, 90, 340-8.
- CARTER, F. P., FRANKSON, T., PINTARD, J. & EDGEcombe, B. 2011. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in adults in the Bahamas. *West Indian Med J*, 60, 662-5.
- CELLI, J. P., TURNER, B. S., AFDHAL, N. H., KEATES, S., GHIRAN, I., KELLY, C. P., EWOLDT, R. H., MCKINLEY, G. H., SO, P., ERRAMILLI, S. & BANSIL, R. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 14321-6.
- CHO, S. O., LIM, J. W., KIM, K. H. & KIM, H. 2010. Involvement of Ras and AP-1 in *Helicobacter pylori*-induced expression of COX-2 and iNOS in gastric epithelial AGS cells. *Dig Dis Sci*, 55, 988-96.
- COGLAN, J. G., GILLIGAN, D., HUMPHRIES, H., MCKENNA, D., DOOLEY, C., SWEENEY, E., KEANE, C. & O'MORAIN, C. 1987. *Campylobacter pylori* and recurrence of duodenal ulcers--a 12-month follow-up study. *Lancet*, 2, 1109-11.

- COVER, T. L. & BLANKE, S. R. 2005. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*, 3, 320-32.
- COVER, T. L., KRISHNA, U. S., ISRAEL, D. A. & PEEK, R. M., JR. 2003. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *Cancer Res*, 63, 951-7.
- CUZZOCREA, S., ROSSI, A., MAZZON, E., DI PAOLA, R., GENOVESE, T., MUIA, C., CAPUTI, A. P. & SAUTEBIN, L. 2005. 5-Lipoxygenase modulates colitis through the regulation of adhesion molecule expression and neutrophil migration. *Lab Invest*, 85, 808-822.
- DEFFERRARI, M. S., DEMARTINI, D. R., MARCELINO, T. B., PINTO, P. M. & CARLINI, C. R. 2011. Insecticidal effect of Canavalia ensiformis major urease on nymphs of the milkweed bug Oncopeltus fasciatus and characterization of digestive peptidases. *Insect Biochem Mol Biol*, 41, 388-99.
- DIXON, N. E., GAZZOLA, T. C., BLAKELEY, R. L. & ZERMER, B. 1975. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? *J Am Chem Soc*, 97, 4131-3.
- DUNN, B. E., CAMPBELL, G. P., PEREZ-PEREZ, G. I. & BLASER, M. J. 1990. Purification and characterization of urease from Helicobacter pylori. *J Biol Chem*, 265, 9464-9.
- EATON, K. A., BROOKS, C. L., MORGAN, D. R. & KRAKOWKA, S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 59, 2470-5.
- EVANS, D. J., JR., EVANS, D. G., TAKEMURA, T., NAKANO, H., LAMPERT, H. C., GRAHAM, D. Y., GRANGER, D. N. & KVIETYS, P. R. 1995. Characterization of a Helicobacter pylori neutrophil-activating protein. *Infect Immun*, 63, 2213-20.
- FERREIRA-DASILVA, C. T., GOMBAROVITS, M. E., MASUDA, H., OLIVEIRA, C. M. & CARLINI, C. R. 2000. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Arch Insect Biochem Physiol*, 44, 162-71.
- FIORENTINO, M., DING, H., BLANCHARD, T. G., CZINN, S. J., SZTEIN, M. B. & FASANO, A. 2013. Helicobacter pylori-induced disruption of monolayer permeability and proinflammatory cytokine secretion in polarized human gastric epithelial cells. *Infect Immun*, 81, 876-83.
- 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 protein from jack beans (Canavalia ensiformis), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem*, 360, 217-224.
- FOLLMER, C., REAL-GUERRA, R., WASSERMAN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D. & CARLINI, C. R. 2004. Jackbean, soybean and Bacillus pasteurii ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur J Biochem*, 271, 1357-63.
- GALGANI, M., BUSIELLO, I., CENSINI, S., ZAPPACOSTA, S., RACIOPPI, L. & ZARRILLI, R. 2004. Helicobacter pylori induces apoptosis of human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells: role of the cag pathogenicity island. *Infect Immun*, 72, 4480-5.

- GAUTHIER, N. C., MONZO, P., GONZALEZ, T., DOYE, A., OLDANI, A., GOUNON, P., RICCI, V., CORMONT, M. & BOQUET, P. 2007. Early endosomes associated with dynamic F-actin structures are required for late trafficking of *H. pylori* VacA toxin. *J Cell Biol*, 177, 343-54.
- GHAZALEH, F. A., ARAUJO, C. F., BARJA-FIDALGO, C. & CARLINI, C. R. 1992. Canatoxin induces activation on mice peritoneal macrophages. *Braz J Med Biol Res*, 25, 1033-5.
- 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.
- GRAHAM, D. Y. 1991. Effect of triple therapy (antibiotics plus bismuth) on duodenal ulcer healing. *Annals of Internal Medicine*, 115, 266.
- GRASSI-KASSISSE, D. M. & RIBEIRO-DASILVA, G. 1992. Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. *Agents Actions*, 37, 204-9.
- GREENFIELD, L. K. & JONES, N. L. 2013. Modulation of autophagy by *Helicobacter pylori* and its role in gastric carcinogenesis. *Trends Microbiol*, 21, 602-12.
- 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. *Nat Struct Biol*, 8, 505-9.
- HARIZI, H., CORCUFF, J. B. & GUALDE, N. 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med*, 14, 461-9.
- HARRIS, P. R., MOBLEY, H. L., PEREZ-PEREZ, G. I., BLASER, M. J. & SMITH, P. D. 1996. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastro*, 111, 419-425.
- HEBERT, M. J., TAKANO, T., HOLTHOFER, H. & BRADY, H. R. 1996. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol*, 157, 3105-15.
- HOUGHTON, J., STOICOV, C., NOMURA, S., ROGERS, A. B., CARLSON, J., LI, H., CAI, X., FOX, J. G., GOLDENRING, J. R. & WANG, T. C. 2004. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science*, 306, 1568-71.
- HU, L. T. & MOBLEY, H. L. 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 58, 992-8.
- HUTTON, M. L., KAPARAKIS-LIASKOS, M., TURNER, L., CARDONA, A., KWOK, T. & FERRERO, R. L. 2010. *Helicobacter pylori* exploits cholesterol-rich microdomains for induction of NF-kappaB-dependent responses and peptidoglycan delivery in epithelial cells. *Infect Immun*, 78, 4523-31.
- IARC 1994. *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, 7-14 June 1994.
- KOSIKOWSKA, P. & BERLICKI, L. 2011. Urease inhibitors as potential drugs for gastric and urinary tract infections: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 21, 945-57.
- KROGFELT, K. A., LEHOURS, P. & MÉGRAUD, F. 2005. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 10, 5-13.
- KUSTERS, J. G., VAN VLIET, A. H. & KUIPERS, E. J. 2006. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*, 19, 449-90.

- LAI, C. H., CHANG, Y. C., DU, S. Y., WANG, H. J., KUO, C. H., FANG, S. H., FU, H. W., LIN, H. H., CHIANG, A. S. & WANG, W. C. 2008. Cholesterol depletion reduces *Helicobacter pylori* CagA translocation and CagA-induced responses in AGS cells. *Infect Immun*, 76, 3293-303.
- LAMB, A. & CHEN, L. F. 2013. Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *J Cell Biochem*, 114, 491-7.
- LINKERT, M., RUEDEN, C. T., ALLAN, C., BUREL, J. M., MOORE, W., PATTERSON, A., LORANGER, B., MOORE, J., NEVES, C., MACDONALD, D., TARKOWSKA, A., STICCO, C., HILL, E., ROSSNER, M., ELICEIRI, K. W. & SWEDLOW, J. R. 2010. Metadata matters: access to image data in the real world. *J Cell Biol*, 189, 777-82.
- LINZ, B., BALLOUX, F., MOODLEY, Y., MANICA, A., LIU, H., ROUMAGNAC, P., FALUSH, D., STAMER, C., PRUGNOLLE, F., VAN DER MERWE, S. W., YAMAOKA, Y., GRAHAM, D. Y., PEREZ-TRALLERO, E., WADSTROM, T., SUERBAUM, S. & ACHTMAN, M. 2007. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 445, 915-918.
- MAEDA, S., YOSHIDA, H., MITSUNO, Y., HIRATA, Y., OGURA, K., SHIRATORI, Y. & OMATA, M. 2002. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Molecular Pathology*, 55, 286-293.
- MARCUS, E. A. & SCOTT, D. R. 2001. Cell lysis is responsible for the appearance of extracellular urease in *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 6, 93-99.
- MARKO, J., MAHAK, S., JULIATI, R. & STEVE, C. 2010. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol Histopathol*, 25, 99-112.
- MARSHALL, B. J. 2001. One hundred years of discovery and rediscovery of *Helicobacter pylori* and its association with peptic ulcer disease. In: MOBLEY, H. L. T., MENDZ, G. L. & HAZELL, S. L. (eds.) *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington (DC): ASM Press.
- MARSHALL, B. J., BARRETT, L. J., PRAKASH, C., MCCALLUM, R. W. & GUERRANT, R. L. 1990. Urea protects *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* from the bactericidal effect of acid. *Gastroenterology*, 99, 697-702.
- MARSHALL, B. J. & WARREN, J. R. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*, 1, 1311-5.
- MASSOUMI, R. & SJOLANDER, A. 2007. The role of leukotriene receptor signaling in inflammation and cancer. *ScientificWorldJournal*, 7, 1413-21.
- MCGEE, D. J., MAY, C. A., GARNER, R. M., HIMPSEL, J. M. & MOBLEY, H. L. T. 1999. Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *Journal of Bacteriology*, 181, 2477-2484.
- MOBLEY, H., ISLAND, M. & HAUSINGER, R. 1995. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.*, 59, 451-480.
- MONTECUCCO, C. & RAPPUOLI, R. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 457-466.
- NIELSEN, H. & ANDERSEN, L. P. 1992. Chemotactic activity of *Helicobacter pylori* sonicate for human polymorphonuclear leucocytes and monocytes. *Gut*, 33, 738-742.

- OBST, B., WAGNER, S., SEWING, K. F. & BEIL, W. 2000. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis*, 21, 1111-1115.
- OLIVERA-SEVERO, D. 2006. *Ureasas vegetais e microbianas : efeitos na exocitose e participação de eicosanóides*. Ph. D. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- OLIVERA-SEVERO, D., WASSERMANN, G. E. & CARLINI, C. R. 2006. Bacillus pasteurii urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch Biochem Biophys*, 452, 149-155.
- PALFRAMAN, S. L., KWOK, T. & GABRIEL, K. 2012. Vacuolating cytotoxin A (VacA), a key toxin for Helicobacter pylori pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*, 2, 92.
- PARK, S., HAN, S. U., LEE, K. M., PARK, K. H., CHO, S. W. & HAHM, K. B. 2007. 5-LOX inhibitor modulates the inflammatory responses provoked by Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*, 12, 49-58.
- POLACCO, J. C. & HOLLAND, M. A. 1993. Roles of urease in plant cells. In: KWANG, W. J. & JONATHAN, J. (eds.) *International Review of Cytology*. Academic Press.
- POLACCO, J. C. & WINKLER, R. G. 1984. Soybean leaf urease: a seed enzyme? *Plant Physiol*, 74, 800-3.
- 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.
- RAUWS, E. A. & TYTGAT, G. N. 1990. Cure of duodenal ulcer associated with eradication of Helicobacter pylori. *Lancet*, 335, 1233-5.
- RIBEIRO-DASILVA, G., CARLINI, C. R., PIRES-BARBOSA, R. & GUIMARAES, J. A. 1986. Blood glucose alterations induced in rats by canatoxin, a protein isolated from jack bean (Canavalia ensiformis) seeds. *Toxicon*, 24, 775-82.
- RIBEIRO-DASILVA, G., PIRES-BARBOSA, R. & CARLINI, C. R. 1989. Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. *Braz J Med Biol Res*, 22, 387-95.
- RIBEIRO-DASILVA, G. & PRADO, J. F. 1993. Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon*, 31, 1131-6.
- RIBEIRO-DASILVA, G., PRADO, J. F., COLLARES, C. B. & SISTE-CAMPOS, M. 1992. Further studies on the hypoxia produced by canatoxin in rats. *Braz J Med Biol Res*, 25, 849-852.
- RICCI, V., CIACCI, C., ZARRILLI, R., SOMMI, P., TUMMURU, M. K., DEL VECCHIO BLANCO, C., BRUNI, C. B., COVER, T. L., BLASER, M. J. & ROMANO, M. 1996. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell migration and proliferation in vitro: role of VacA and CagA. *Infect Immun*, 64, 2829-33.
- SAKATA, A., IDA, E., TOMINAGA, M. & ONOUE, K. 1987. Arachidonic acid acts as an intracellular activator of NADPH-oxidase in Fc gamma receptor-mediated superoxide generation in macrophages. *The Journal of Immunology*, 138, 4353-9.
- SAVILL, J., DRANSFIELD, I., GREGORY, C. & HASLETT, C. 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2, 965-975.
- SCHNEIDER, C. A., RASBAND, W. S. & ELICEIRI, K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*, 9, 671-5.

- SHI, Y., LIU, C. H., ROBERTS, A. I., DAS, J., XU, G., REN, G., ZHANG, Y., ZHANG, L., YUAN, Z. R., TAN, H. S. W., DAS, G. & DEVADAS, S. 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*, 16, 126-133.
- SIRKO, A. & BRODZIK, R. 2000. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol*, 47, 1189-95.
- SMOOT, D. T., ELLIOTT, T. B., VERSPAGET, H. W., JONES, D., ALLEN, C. R., VERNON, K. G., BREMNER, T., KIDD, L. C., KIM, K. S., GROUPEMAN, J. D. & ASHKTORAB, H. 2000. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis*, 21, 2091-5.
- STANISCUASKI, F., FERREIRA-DASILVA, C. T., MULINARI, F., PIRES-ALVES, M. & CARLINI, C. R. 2005. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45, 753-60.
- STEER, H. W. & COLIN-JONES, D. G. 1975. Mucosal changes in gastric ulceration and their response to carbenoxolone sodium. *Gut*, 16, 590-7.
- STINGL, K., UHLEMANN EM, E. M., DECKERS-HEBESTREIT, G., SCHMID, R., BAKKER, E. P. & ALTENDORF, K. 2001. Prolonged survival and cytoplasmic pH homeostasis of *Helicobacter pylori* at pH 1. *Infect Immun*, 69, 1178-80.
- SUMIDA, C., GRABER, R. & NUNEZ, E. 1993. Role of fatty acids in signal transduction: modulators and messengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 48, 117-22.
- 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.
- TEREBIZNIK, M. R., RAJU, D., VÁZQUEZ, C. L., TORBRICKI, K., KULKARNI, R., BLANKE, S. R., YOSHIMORI, T., COLOMBO, M. I. & JONES, N. L. 2009. Effect of *Helicobacter pylori*'s vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy*, 5, 370-379.
- TONELLO, F., DUNDON, W. G., SATIN, B., MOLINARI, M., TOGNON, G., GRANDI, G., DEL GIUDICE, G., RAPPUOLI, R. & MONTECUCCO, C. 1999. The *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein is an iron-binding protein with dodecameric structure. *Molecular Microbiology*, 34, 238-246.
- TSUDA, M., KARITA, M., MORSHED, M. G., OKITA, K. & NAKAZAWA, T. 1994. A urease-negative mutant of *Helicobacter-pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude-mouse stomach. *Infection and Immunity*, 62, 3586-3589.
- UBERTI, A. F. 2010. *Urease de Helicobacter pylori : ativação de plaquetas e neutrófilos*. M. Sc. Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 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.
- VAN VLIET, A. H., POPPELAARS, S. W., DAVIES, B. J., STOOF, J., BERESWILL, S., KIST, M., PENN, C. W., KUIPERS, E. J. & KUSTERS, J. G. 2002. NikR mediates nickel-responsive transcriptional induction of urease expression in *Helicobacter pylori*. *Infect Immun*, 70, 2846-52.

- VENERITO, M., KUESTER, D., HARMS, C., SCHUBERT, D., WEX, T. & MALFERTHEINER, P. 2011. Upregulation of leukotriene receptors in gastric cancer. *Cancers (Basel)*, 3, 3156-68.
- 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.
- WANG, D. & DUBOIS, R. N. 2010. Eicosanoids and cancer. *Nat Rev Cancer*, 10, 181-93.
- WARD, C., CHILVERS, E. R., LAWSON, M. F., PRYDE, J. G., FUJIHARA, S., FARROW, S. N., HASLETT, C. & ROSSI, A. G. 1999. NF-kappa B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 4309-4318.
- WASSERMANN, G. E., OLIVERA-SEVERO, D., UBERTI, A. F. & CARLINI, C. R. 2010. Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxigenase-mediated pathway. *J Cell Mol Med*, 14, 2025-34.
- WEATHERBURN, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, 39, 971-974.
- WEEKS, D. L., ESKANDARI, S., SCOTT, D. R. & SACHS, G. 2000. A H⁺-gated urea channel: the link between Helicobacter pylori urease and gastric colonization. *Science*, 287, 482-485.
- WITKO-SARSAT, V., PEDERZOLI-RIBEIL, M., HIRSCH, E., SOZZANI, S. & CASSATELLA, M. A. 2011. Regulating neutrophil apoptosis: new players enter the game. *Trends Immunol*, 32, 117-24.
- 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.
- WU, J., XU, S. & ZHU, Y. 2013. Helicobacter pylori CagA: a critical destroyer of the gastric epithelial barrier. *Dig Dis Sci*, 58, 1830-7.
- WYMAN, M. P. & SCHNEITER, R. 2008. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 162-76.
- YOSHIDA, N., GRANGER, D. N., EVANS, D. J., JR., EVANS, D. G., GRAHAM, D. Y., ANDERSON, D. C., WOLF, R. E. & KVIETYS, P. R. 1993. Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced inflammation. *Gastroenterology*, 105, 1431-40.

ANEXO I

• Purificação da urease a partir de *H. pylori*

Neste trabalho a urease foi purificada a partir da própria bactéria *H. pylori* como alternativa à produção da proteína recombinante.

A purificação seguiu praticamente o mesmo protocolo utilizado para a purificação da urease recombinante, como descrito em (Uberti et al., 2013), tendo apenas o acréscimo de uma etapa adicional de cromatografia por troca iônica em coluna Source 15Q, montada em um ÄKTA. Esta última etapa é necessária para a separação da urease e da chaperonina GroEL, descrita no início da década de 1990 como uma proteína que interage e elui conjuntamente com a urease (Austin et al., 1992).

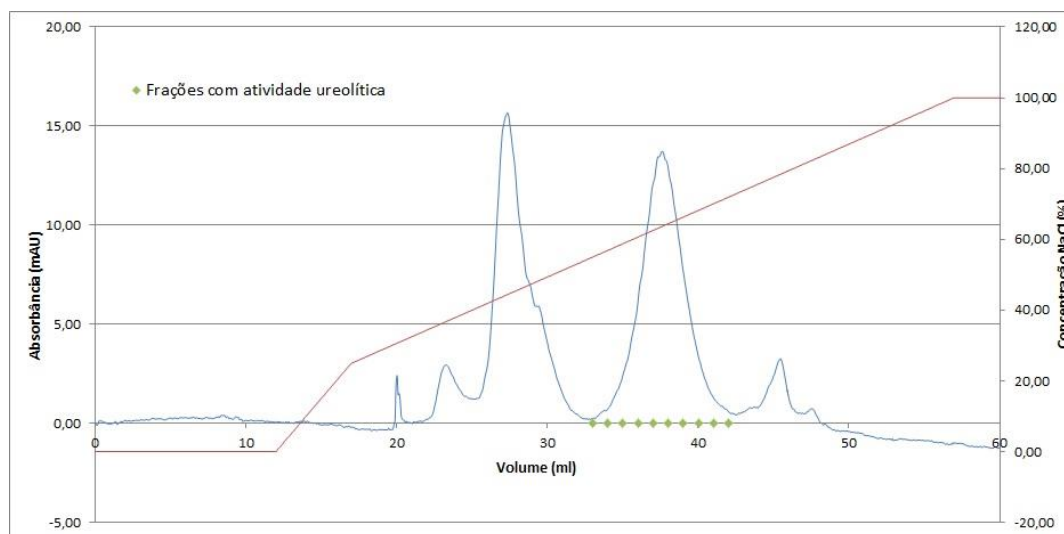


Figura 1: Perfil cromatográfico da separação da urease e da proteína GroEL em cromatografia de troca iônica Source 15Q. Frações eluídas entre 32 e 42 mL contém a urease purificada.

A fração com atividade ureolítica e o pico eluído em torno de 27 ml, oriundos da cromatografia de troca iônica, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Uma amostra de cada uma das bandas do gel de

poliacrilamida foi enviada para análise em espectrômetro de massas, que confirmou a pureza da purificação (dados não mostrados).

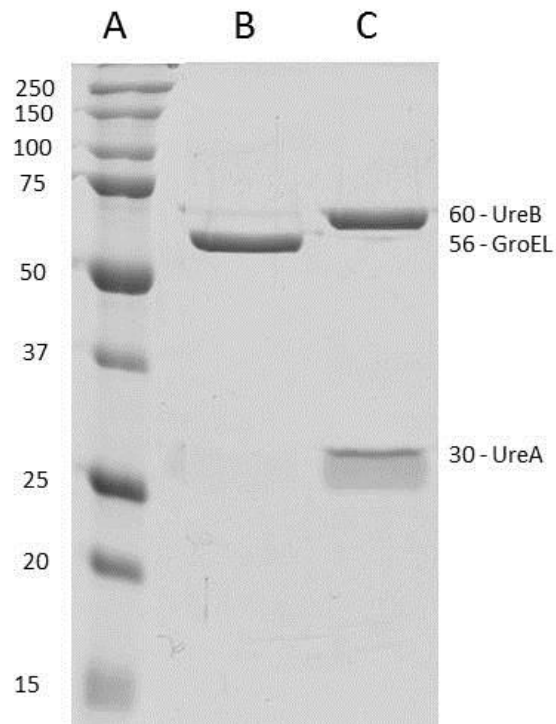


Figura 2: SDS-PAGE dos dois maiores picos da cromatografia de troca iônica em coluna Source 15Q. A – Marcador de peso molecular; B – Pico eluído com 27 ml (GroEL); C – Pico com atividade ureolítica.

Augusto Frantz Uberti
Curriculum Vitae

Agosto/2014

Augusto Frantz Uberti

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Augusto Frantz Uberti
Nascimento 15/07/1982 - Porto Alegre/RS - Brasil
CPF 815.407.440-00

Formação acadêmica/titulação

- 2010 - 2014** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Urease de *Helicobacter pylori*: atividade pró-inflamatória e efeitos em células gástricas epiteliais, Ano de obtenção: 2014
 Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
 Co-orientador: Deiber Olivera-Severo
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2010 - 2014** Doutorado em Biologia Celular e Molecular.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 com período sanduíche em Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (Orientador : Céu Figueiredo)
 Título: Urease de *Helicobacter pylori*: propriedades não enzimáticas que potencialmente contribuem para gastrite e câncer gástrico, Ano de obtenção: 2014
 Orientador: Célia Regina Carlini
 Co-orientador: Deiber Olivera-Severo
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2009 - 2010** Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Urease de *Helicobacter pylori*: ativação de plaquetas e neutrófilos, Ano de obtenção: 2010
 Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2003 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
 Título: Urease de *Helicobacter pylori*: vias de ativação plaquetária e rota da 12-lipoxigenase.
 Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

- 2010 - Atual** Vínculo: Estudante de pós-graduação , Enquadramento funcional: Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
- 2009 - 2010** Vínculo: Estudante de pós-graduação , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

2007 - 2008	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial
2004 - 2006	Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Atividades

03/2009 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Centro de Biotecnologia <i>Linhas de pesquisa:</i> <i>Ureases microbianas: efeitos secretagogos e pro-inflamatórios</i>
------------------------	---

Linhas de pesquisa

1. Ureases microbianas: efeitos secretagogos e pro-inflamatórios

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **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.
Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by Helicobacter pylori urease. Toxicon (Oxford). , v.69, p.240 - 249, 2013.
2. Flores, Debora Gazzana, Meurer, Luise, **Uberti, Augusto Frantz**, Macedo, Bruno R., Lenz, Guido, Brunetto, Algemir Lunardi, Schwartzmann, Gilberto, Roesler, Rafael
Gastrin-releasing peptide receptor content in human glioma and normal brain. Brain Research Bulletin. , v.82, p.95 - 98, 2010.
3. Wassermann, G.E., Olivera-Severo, D., **UBERTI, A. F.**, CARLINI, C. R.
Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. Journal of Cellular and Molecular Medicine (Print). , v.14, p.2025 - 2034, 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Scopel-Guerra, A., **UBERTI, A. F.**, Ligabue-Braun, R., Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease de Helicobacter pylori e sua interação com membranas plaquetárias In: XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2012, Porto Alegre - RS.
Livro de resumos XIV Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. , 2012.
2. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., Scopel-Guerra, A., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.
Urease of Helicobacter pylori: Roles in inflammation and platelet activation In: XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos - SP.

XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia , 2012.

3. Scopel-Guerra, A., **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease of *Helicobacter pylori* and its interaction with platelet membrana receptors In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE, 2011, Rio de Janeiro.
XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE , 2011.
4. Scopel-Guerra, A., **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease of *Helicobacter pylori* and its interaction with platelet membrane receptors In: XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2011, Porto Alegre - RS.
Livro de resumos XIII Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular , 2011.
5. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., Moraes, J. A., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.
Urease of *Helicobacter pylori*: Role in inflammation In: XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE, 2011, Rio de Janeiro.
XXVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE , 2011.
6. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., Moraes, J. A., Barcellos-de-Souza, P., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.
Mouse paw edema and human neutrophil activation by a recombinant urease from *Helicobacter pylori* In: Cell Inflammation and Disease Symposium, 2010, Lisboa, Portugal.
Cell Inflammation and Disease Symposium , 2010.
7. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease of *Helicobacter pylori*: Mechanisms of platelet aggregation and the lipoxigenase pathway In: XVI World Congress of The International Society on Toxinology X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia, 2009, Recife - PE.
XVI World Congress of The International Society on Toxinology X Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia , 2009.
8. UBERTI, A. F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.
Urease de *Helicobacter pylori* está envolvida na colonização gástrica e pode promover inflamação devido a propriedades biológicas independentes da atividade ureolítica. In: XX Salão de Iniciação Científica, 2008, Porto Alegre.
Livro de resumos do XX SIC , 2008.
9. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease de *Helicobacter pylori* pode promover inflamação devido a propriedades biológicas independentes da atividade ureolítica In: X Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008, Porto Alegre - RS.
Livro de Resumos X Reunião anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular , 2008.
10. UBERTI, A. F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.
Urease of *Helicobacter pylori*: evaluation of biological proprieties independent of ureolitic activity In: SBBq Program of the XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia - SP.
SBBq Program of the XXXVII Annual Meeting of SBBq and XI Congress of the PABMB , 2008.
11. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., CARLINI, C. R.
Urease de *Helicobacter pylori*: avaliação de atividades biológicas independentes da atividade ureolítica In: IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2007, Porto Alegre - RS.
Livro de resumos IX Reunião Anual do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular , 2007.
12. UBERTI, A. F., CARLINI, C. R.

Urease de *Helicobacter pylori*: avaliação de atividades biológicas independentes da atividade ureolítica In: XIX Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2007, Porto Alegre.

Livro de Resumos do XIX SIC. , 2007. v.19. p.349 -

13. UBERTI, A. F., Körbes, A.P., Pasquali, G., Bodanese-Zanettini, M. H., Passaglia, L. M. P. Transferência para soja [*Glycine max* (L.) Merril], por co-transformação, de genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico. In: XVII Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 2005, Porto Alegre.

Livro de Resumos do XVII SIC. , 2005. v.17. p.392 -

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **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.

Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease In: XXVIth International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer, 2013, Madrid.

XXVIth International Workshop on *Helicobacter* and Related Bacteria in Chronic Digestive Inflammation and Gastric Cancer. , 2013. v.18. p.98 -

2. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., Scopel-Guerra, A., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.

Urease of *Helicobacter pylori*: Roles in Inflammation and Platelet Activation In: 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week, 2012, Honolulu.

17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week, 2012. , 2012. v.60. p.159 -

3. **UBERTI, A. F.**, Olivera-Severo, D., Scopel-Guerra, A., Barja-Fidalgo, C., CARLINI, C. R.

Urease of *Helicobacter pylori*: Roles in Inflammation and Platelet Activation In: 17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week, 2012, Honolulu, EUA.

17th World Congress of the International Society on Toxinology & Venom Week. , 2012. v.60. p.159 -