

# Urease de *Helicobacter pylori* (HPU) e seus efeitos sobre células epiteliais gástricas

## Introdução

*Helicobacter pylori* é uma espiroqueta gram-negativa atualmente reconhecida como patógeno gástrico responsável pela gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal. Segundo estimativas, aproximadamente 60% da população mundial está infectada com essa bactéria, e em países subdesenvolvidos, ocorrências alarmantes de 80% são relatadas. Essa bactéria produz grandes quantidades de urease (HPU), enzima dependente de níquel que catalisa a reação da hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono, e é considerada um fator de virulência dessa bactéria. Isso por que essa enzima está relacionada com a formação de um microclima neutro no lúmen gástrico, promovendo assim a sobrevivência das bactérias em ambientes de pH desfavorável. Previamente, nosso grupo demonstrou a capacidade da urease de induzir a ativação plaquetária (Wassermann *et al.*, 2010). Além disso, a enzima também ativa neutrófilos humanos, protegendo-os contra apoptose e induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio, promovendo o dano tecidual. Esta propriedade ativadora de plaquetas e neutrófilos é independente da ureólise, já que foram realizados experimentos na presença de inibidores irreversíveis da atividade ureolítica. Dados não publicados por nosso grupo demonstram que a HPU tem efeitos em células epiteliais gástricas, como ativação de migração celular e o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias.

## Objetivos

O objetivo deste trabalho é estudar a internalização da urease de *H. pylori* em células epiteliais gástricas. Para verificar sua localização, as células foram incubadas com HPU e a detecção da proteína no citoplasma celular se deu por ensaios de imunofluorescência.

## Metodologia

### • Purificação da urease de *H. pylori* recombinante (rHPU)

Do cultivo celular da cepa BL 21 DE3 RIL de *E. coli* se obtém o extrato bruto que passará por cromatografias de troca iônica e gel-filtração para a purificação da enzima.

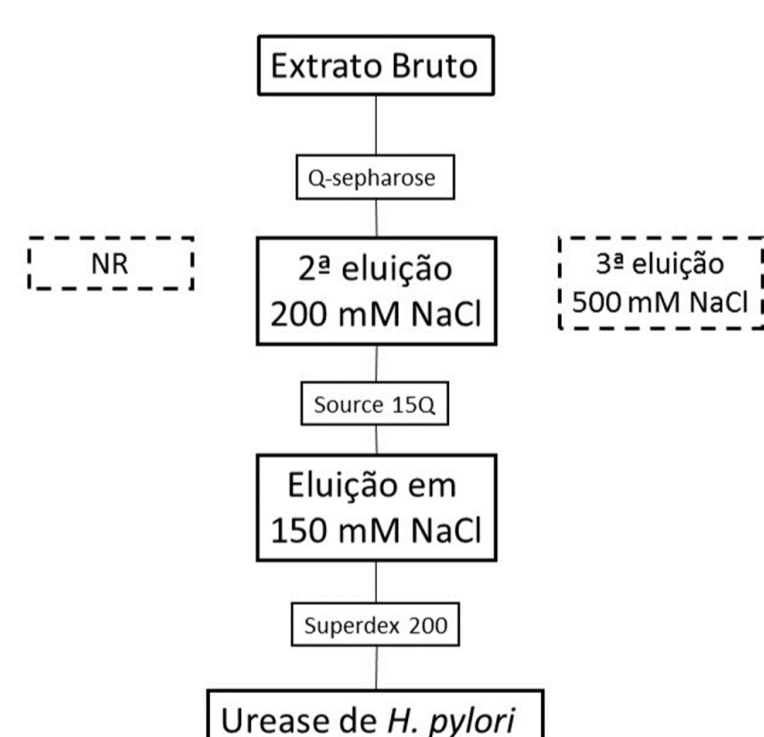


Figura 1. Fluxograma de purificação da urease recombinante de *H. pylori*

### • Estabelecimento e manutenção de cultura celular

Foi estabelecida a cultura e manutenção de duas linhagens celulares de carcinoma gástrico: AGS e MKN-28. As células, previamente armazenadas a -196°C em nitrogênio líquido, foram descongeladas e acondicionadas em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino, 200 µg/mL estreptomicina e 200 IU/mL penicilina a 37°C, e 5% CO<sub>2</sub>. Ao atingir a confluência, as células são tripsinizadas e colocadas em novo frasco com meio RPMI.

### • Ensaio de imunofluorescência

Estudos de imunocitoquímica foram realizados a partir da cultura de células MKN28 em câmaras LabTek (Ibidi), fixadas com paraformaldeído 4%, e permeabilizadas com metanol 100%. As células foram incubadas com anticorpos primários para a proteína Lamp-1 (Santa Cruz, EUA). A detecção de Lamp-1 foi monitorada com anticorpo secundário acoplado a Alexa-488 (verde), e a urease foi marcada covalentemente com TexasRed (Thermoscientific, vermelho). 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.

### • Microscopia confocal

Análises dos ensaios envolvendo imunocitoquímica foram realizadas utilizando microscópio confocal LSM-5 Exciter (Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ.

## Resultados e Discussão

Dados não publicados do nosso grupo demonstram que a rota de endocitose seguida pela urease se dá por endossomos precoces (marcador EEA-1), sendo esses o primeiro compartimento celular a receber moléculas internalizadas pela membrana plasmática e redirecioná-las para diferentes destinos celulares (Marko *et al.*, 2010).

Na figura 2 é possível visualizar que a urease está co-localizada com estruturas contendo o marcador de endossomos tardios e lisossomos Lamp-1 em células das linhagem MKN28, indicando que a urease é direcionada para uma rota de degradação. Entretanto, é possível perceber que sua internalização não resultou em degradação significativa, uma vez que a fluorescência emitida pela urease não diminuiu.

Novos ensaios estão sendo realizados com a linhagem AGS para posterior comparação.

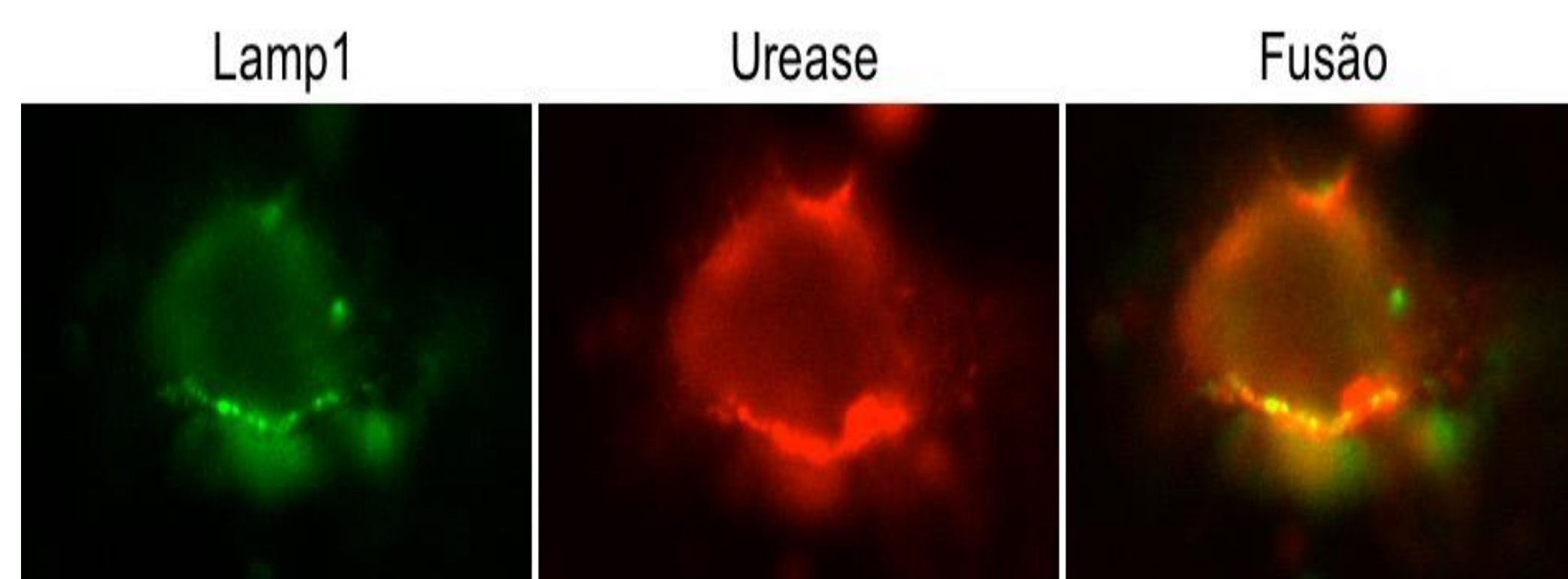


Figura 2: A endocitose da urease tem a participação de endossomos Lamp1-positivos. Células MKN28 foram tratadas com urease-TxRed por 20 minutos a 37°C. As células foram fixadas, permeabilizadas e processadas para a detecção de urease (100 nM; vermelho) e Lamp1 (verde) por imunofluorescência. As células foram visualizadas em microscópio confocal.

## Referências

Olivera-Severo, D., *et al.*, 2006; Wassermann, G., *et al.*, 2010; Uberti, A.F., *et al.*, 2013; Marko *et al.*, 2010).