

# Propriedade inibitória de compostos de Biginelli na Urease de *Helicobacter pylori* (HPU)

Natalia Callai da Silva, Profa. Célia Regina Carlini  
Laboratório de Proteínas Tóxicas – Dept. Biofísica  
Centro de Biotecnologia - UFRGS



## Introdução

*Helicobacter pylori* é atualmente reconhecido como agente patológico de gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico e duodenal. Algumas estimativas apontam que esse microrganismo pode ser encontrado em aproximadamente 60% da população mundial, e em países subdesenvolvidos, ocorrências de 80% são relatadas. A urease de *H. pylori* (HPU) é considerada um fator de virulência, sendo sua atividade um marcador amplamente utilizado para diagnóstico. Sabe-se 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 induzida pela urease (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. Também já demonstramos que a HPU induz a inflamação em ensaio in vivo de edema de pata em camundongo, sendo a inflamação caracterizada por uma grande infiltração de neutrófilos (Uberty *et al.*, 2013). Esta propriedade ativadora de plaquetas e neutrófilos é independente da ureólise, já que foram realizados experimentos na presença de inibidores irreversíveis da atividade ureolítica, como o p-hidroximercuriobenzoato. Assim, para esclarecer o modus operandi da urease na patofisiologia da doença, mostrou-se relevante o reconhecimento de regiões específicas na holoenzima, bem como nas suas subunidades, que são responsáveis por tais atividades biológicas.

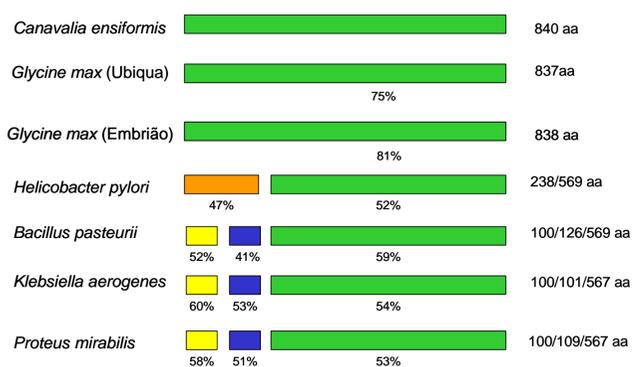


Figura 1. Ureases vegetais como a de *Canavalia ensiformis*, possuem apenas uma subunidade enquanto as ureases bacterianas possuem duas (*Helicobacter pylori*), ou três (*Klebsiella aerogenes*) subunidades. Estão indicados o número de aminoácidos de cada subunidade e o percentual de identidade que cada uma delas tem com a urease de *Canavalia ensiformis*.

## Objetivos

O objetivo deste trabalho é testar os adutos de Biginelli, moléculas sintéticas análogas da ureia, capazes de interagir com diferentes regiões da urease, com o interesse de descobrir inibidores para as diferentes propriedades biológicas descritas para esta proteína.

## Metodologia

### Urease de *H. pylori* recombinante (rHPU)

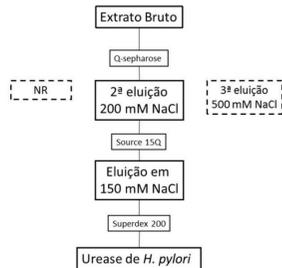


Figura 2. Fluxograma de purificação da urease recombinante de *H. pylori*

### Adutos de Biginelli

Os adutos de Biginelli, gentilmente cedidos pela professora da Universidade Federal de Minas Gerais, Dra. Luzia Modolo, foram preparados em soluções contendo 50% etanol, com concentrações entre 452µM e 884µM de acordo com o peso molecular de cada molécula e armazenados a 4°C.

### Agregação Plaquetária

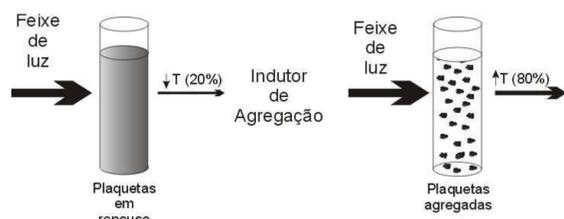


Figura 3. Representação esquemática do aumento de transmitância proporcionado pela adição de indutor de agregação plaquetária em plasma com citrato

## Resultados e Discussão

### Adutos de Biginelli

Nesse ensaio foi possível determinar os possíveis inibidores a partir de uma medição das unidades enzimáticas/mg. Além disso foi possível inferir que o etanol utilizado na solubilização não interfere na relação HPU x ureia. No grupo 2A tivemos três adutos que demonstraram atividade inibitória – 2A5, 2A6 e 2A7. Entretanto, tivemos alguns adutos que amplificaram o sinal, como 2A4, 2A8 e 2A10, com ação contrária ao esperado. No grupo 2B não se observou nenhum composto com propriedade inibitória da HPU, assim como no grupo 2C. Já no grupo 2D o composto 2D4 apenas mostrou atividade inibitória (Figura 4).

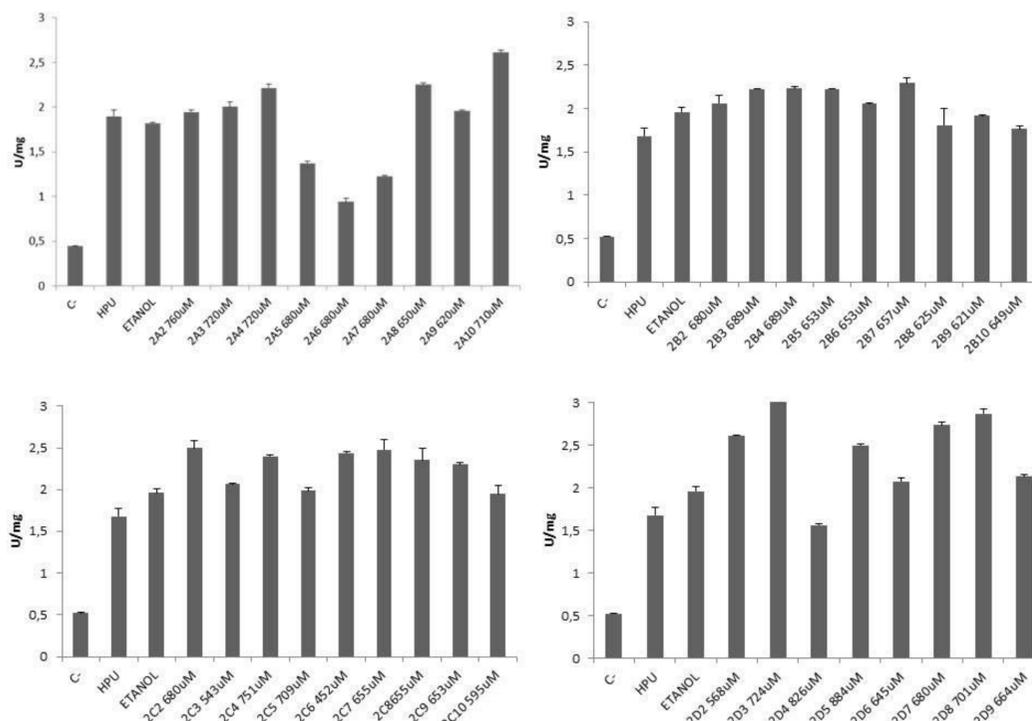


Figura 4. Adutos de Biginelli grupos 2A 2B, 2C e 2D x HPU. Apenas compostos dos grupos 2A e 2D demonstraram propriedade inibitória de urease nas condições testadas.

### Agregação plaquetária induzida por JBU

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado de acordo com Olivera-Severo *et al.*, 2006 e foram utilizadas duas concentrações de JBU: 2,5 µM e 2 µM.

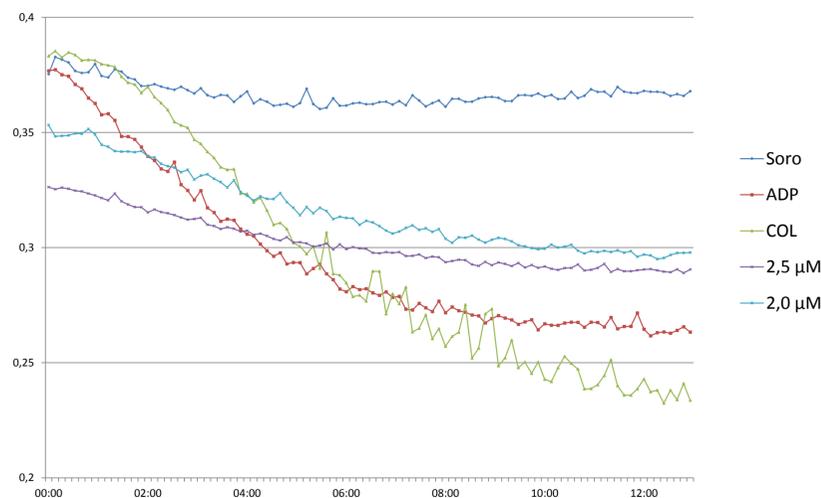


Figura 5. Agregação plaquetária induzida por JBU (2 µM e 2,5 µM).

## Conclusão

Nas condições testadas, apenas quatro adutos se mostraram inibidores da atividade ureolítica da HPU, logo, é necessário testá-los sob diferentes condições e com modelos biológicos para avaliar sua capacidade inibitória. No entanto, a incapacidade de um composto em inibir a ureólise promovida pela urease não invalida a possibilidade de inibição em um ensaio biológico em que a atividade ureolítica não é relevante. O modelo de agregação plaquetária com JBU foi escolhido por causa da maior facilidade em obtermos esta proteína comercialmente, e das semelhanças estruturais e funcionais de JBU com HPU.

## Referências

Olivera-Severo, D., et al., 2006; Wassermann, G., et al., 2010; Uberty, A.F., et al., 2013.

