

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Purificação e caracterização da urease recombinante de *Proteus mirabilis*

Valquiria Broll

Porto Alegre, 2013.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Purificação e caracterização da urease recombinante de *Proteus mirabilis*

Valquiria Broll

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientação:

Prof.^a. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
– Depto Biofísica/IB e CBIOT - UFRGS

Coorientação:

Dr. Diogo Ribeiro Demartini
– Centro de Biotecnologia (CBIOT) - UFRGS

Porto Alegre, 2013

Composição da banca de mestrado

Prof. Dr. Augusto Schrank
– Centro de Biotecnologia (CBIOT) - UFRGS

Prof. Dr. Rogério Margis
– Depto Biofísica/IB e CBIOT - UFRGS

Prof^a. Dra. Russolina Zingali
– Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ

Dr. Rafael Real Guerra (Revisor da dissertação e membro suplente)
– Centro de Biotecnologia - UFRGS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biofísica/IB e no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no período de Agosto de 2011 a Julho de 2013.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Célia R. Carlini, não apenas pelas incontáveis oportunidades, aprendizado, e confiança em meu trabalho, mas também por estar sempre presente, sempre atenta à mínima necessidade tanto profissional quanto pessoal.

Ao meu co-orientador, Dr. Diogo Ribeiro Demartini, que sempre esteve presente, me acompanhando e ensinando dia após dia, mesmo à distância, por msn, skype, facebook..., onde distância, fuso-horário e tempo nunca foram problema. Agradeço pelos ensinamentos, paciência, companheirismo e amizade que nunca faltaram. Obrigada por sempre acreditar no meu trabalho!

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores Dr. Itabajara Vaz, Dr. Guido Lenz por acompanharem o andamento desta dissertação, como comissão de acompanhamento, e ainda por terem, algumas vezes, colocado seus laboratórios e equipamentos à disposição.

Aos secretários do PPGBCM, a Silvinha e o Luciano, que atendem nossos pedidos, e respondem nossas dúvidas com atenção, agilidade e sempre com um sorriso no rosto!

Aos colegas do Laboratório de Proteínas Tóxicas (LAPROTOX), pela amizade e por estarem sempre dispostos a discutir e ensinar.

Ao Daniel Sulis, por dividir suas tardes comigo, fazendo mil cromatografias ao mesmo tempo!

Agradeço à Fernanda Lopes, por ser a melhor colega de laboratório que eu podia querer! Mesmo conversando todos os dias (pelo skype ou facebook) ainda sinto muita falta da companhia, afinal é sempre bom ter alguém para dividir as gargalhadas (e patéticas) diárias!

Agradeço ao Rodrigo Braun, que além de colega é um grande amigo e companheiro. Sempre disposto e procurando ajudar, e quando até ele não encontra a solução, ainda assim, ajuda dando apoio moral... obrigada!

À Angela Piovesan, pessoa que consegue me fazer rir, mesmo nos piores dias, e com a maior facilidade do mundo... nossos almoços são sempre os melhores!

O Vander (Tinoco) grande parceiro de todos os momentos! Sem o Tinoco a vida no LAPROTOX seria muito mais difícil!

Anne Helene, Vanessa, Ana Helena ("Bichinha"), Marina, Angela Menegassi, Mayara, Jozi, Karine, o laboratório não seria o mesmo sem a presença de vocês! Não importa se a conversa é séria, ou não, é sempre bom estar com vocês.

Agradeço às minhas mães, Sueli, Terezinha e Naila, por sempre acreditarem em mim. Agradeço pelo apoio, mesmo quando minhas escolhas não foram as que vocês acreditam serem as mais adequadas... não teria chegado sequer em 1/3 do caminho sem este apoio e compreensão!

A meus amigos, Pedroso, Fran, Alinne, Harry, Felipe Kessler, Diego, Dessa, Gui, Vero, Rafa, Leandro, Daia, pela amizade incondicional. Agradeço a todos meus amigos por me darem suporte quando eu mais precisei.

Obrigada.

Índice

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES..... | XI |
| RESUMO..... | XII |
| ABSTRACT..... | XIII |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 1.1 <i>PROTEUS MIRABILIS</i> | 14 |
| 1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DA BACTÉRIA <i>P. MIRABILIS</i> | 14 |
| 1.3 UREASES..... | 20 |
| 1.3.1 Toxicidade da urease..... | 21 |
| 1.3.2 Efeito tóxico em mamíferos e mecanismos de ação da urease/canatoxina..... | 22 |
| 1.4 UREASE DE <i>PROTEUS MIRABILIS</i> - PMU..... | 22 |
| 1.4.1 Papel da PMU na infecção..... | 23 |
| 1.5 SISTEMAS EM ESTUDO..... | 25 |
| 1.5.1 Plaquetas..... | 25 |
| 1.5.2 Fungos..... | 29 |
| 2 OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 31 |
| 3 METODOLOGIA..... | 32 |
| 3.1 LINHAGEM BACTERIANA..... | 32 |
| 3.2 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (RSM)..... | 32 |
| 3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO..... | 33 |
| 3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO..... | 33 |
| 3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS..... | 34 |
| 3.6 ATIVIDADE UREÁSICA E ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA..... | 34 |
| 3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)..... | 35 |
| 3.8 ZIMOGRAMA E WESTERN BLOT..... | 36 |
| 3.9 CROMATOGRÁFIAS..... | 37 |
| 3.9.1 Cromatografia de troca iônica..... | 37 |
| 3.9.2 Cromatografia de Gel filtração..... | 38 |
| 3.10 DETERMINAÇÃO DO K_M E V_{MAX} | 38 |
| 3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS..... | 38 |
| 3.11.1 Ensaio com fungos filamentosos e leveduras..... | 38 |
| 3.11.2 Ensaio de Agregação plaquetária..... | 40 |
| 3.12 ALINHAMENTO DE ESTRUTURAS E SEQUÊNCIAS..... | 40 |
| 4 RESULTADOS..... | 42 |
| 4.1 OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PMU..... | 42 |
| 4.2 PURIFICAÇÃO..... | 46 |
| 4.2.1 Purificação utilizando NaCl como eluente..... | 46 |
| 4.2.2 Purificação utilizando KCl como eluente..... | 51 |
| 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA..... | 56 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.3.1 | Determinação das constantes cinéticas | 56 |
| 4.3.2 | Inibição por Ácido acetohidroxâmico | 57 |
| 4.3.3 | Estabilidade da PMU frente a pH, temperatura e sais | 59 |
| 4.4 | ENSAIOS BIOLÓGICOS | 64 |
| 4.4.1 | Atividade antifúngica..... | 64 |
| 4.4.2 | Agregação plaquetária..... | 66 |
| 4.5 | ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ESTRUTURAS | 69 |
| 4.5.1 | Alinhamentos entre PMU e peptídeos oriundos da JBU..... | 69 |
| 4.5.2 | Alinhamentos relacionados à atividade de agregação plaquetária .. | 70 |
| 5 | DISCUSSÃO | 73 |
| 6 | CONCLUSÕES | 81 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 82 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Fatores de virulência sintetizados por <i>P. mirabilis</i> ligados a infecções do trato urinário (ITUs) e Infecções urinárias associadas ao uso de ceteteres | 15 |
| Figura 2: Diferenciação da bactéria <i>P. mirabilis</i> | 16 |
| Figura 3: Relação da PMU com o ciclo de Krebs em <i>P. mirabilis</i> | 18 |
| Figura 4: Reação de hidrólise da ureia | 20 |
| Figura 5: Organização genética para o cluster gênico da urease de <i>Proteus mirabilis</i> | 23 |
| Figura 6: Papel da urease na infecção por <i>P. mirabilis</i> | 24 |
| Figura 7: Etapas para formação de trombos. | 26 |
| Figura 8: Rota de biosíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico. | 28 |
| Figura 9: Seleção de colônias produtoras de urease | 42 |
| Figura 10: Análise de variância por ANOVA. | 44 |
| Figura 11: Curva de superfície de resposta | 45 |
| Figura 12: Marcha de purificação utilizando NaCl como eluente. HiTrapQ e Q-Sepharose | 47 |
| Figura 13: Cromatografia de troca iônica em coluna Q-Sepharose | 48 |
| Figura 14: Cromatografia de gel filtração com a resina Superdex 200 | 49 |
| Figura 15: SDS-PAGE dos <i>pools</i> reunidos de frações com atividade enzimática, a partir da segunda cromatografia em Q-Sepharose e da cromatografia de gel filtração | 50 |
| Figura 16: Marcha de purificação utilizando KCl como eluente. Cromatografias de troca iônica em HiTrapQ e Q-Sepharose. | 53 |
| Figura 17: Cromatografia de Gel filtração e acompanhamento das etapas de purificação por SDS-PAGE e Western blot..... | 54 |
| Figura 18: Eletroforese em gel nativo e zimograma | 56 |
| Figura 19: Determinação da constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima para a PMU..... | 57 |
| Figura 20: Ensaio de inibição enzimática para PMU frente à presença de AAH..... | 58 |
| Figura 21: Ensaios de atividade ureásica em diferentes pHs e temperatura de incubação | 61 |
| Figura 22: Ensaio de estabilidade enzimática na presença de diferentes sais | 63 |
| Figura 23: Efeito da PMU sobre a germinação e crescimento de fungos filamentosos.. | 64 |
| Figura 24: Teste de atividade antifúngica da PMU sobre leveduras..... | 65 |
| Figura 25: Alteração morfológica em leveduras causada pela adição de PMU | 66 |

| | |
|--|----|
| Figura 26: Ensaio de agregação plaquetária..... | 67 |
| Figura 27: Ação da PMU sobre o efeito do ADP durante o processo de agregação plaquetária | 68 |
| Figura 28: Alinhamento de sequências entre peptídeos a partir da JBU, e as sequencias equivalentes em PMU. | 69 |
| Figura 29: <i>Alinhamento parcial das sequências de aminoácidos a partir da PMU, HPU e do peptídeo de colágeno.....</i> | 71 |
| Figura 30: Representação tridimensional das regiões homólogas entre PMU, HPU e peptídeo do colágeno..... | 72 |

Índice de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Proteínas usadas na calibração da coluna de gel filtração Superdex 200 | 38 |
| Tabela 2: Variáveis testadas no ensaio de RSM. | 43 |
| Tabela 3: Desenho experimental e atividade ureásica para construção de uma curva de superfície de resposta..... | 43 |
| Tabela 4: Validação do experimento de superfície de resposta (RSM) | 45 |
| Tabela 5: Tabela de purificação para o <i>pool</i> recolhido da gel filtração a partir da fração 1 da Q-Sepharose TM | 50 |
| Tabela 6: Tabela de purificação para o <i>pool</i> recolhido da cromatografia de gel filtração a partir da fração 2 da Q-Sepharose. | 51 |
| Tabela 7: Tabela de purificação para PMU. | 55 |
| Tabela 8: Comparação entre parâmetros cinéticos de diferentes ureases | 58 |

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

| | |
|------------------|---|
| AAH | Ácido acetohidroxâmico |
| ADP | Adenosina difosfato |
| ATFs | Fímbrias de temperatura ambiente |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BCIP | 5-Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato |
| BPU | Urease de <i>Bacillus pasteurii</i> |
| CFU | Contagem de unidades formadoras de colônias |
| CGU | Urease de <i>Cryptococcus gattii</i> |
| CNTX | Canatoxina |
| DL ₅₀ | Dose letal para morte de 50 indivíduos |
| GdhA | Glutamato desidrogenase |
| GlnA | Glutamina sintase |
| GPIb-V-IX | Glicoproteína Ib-V-IX |
| GPVI | Glicoproteína VI |
| HPU | Urease de <i>Helicobacter pylori</i> |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgG | Imunoglobulina G |
| ITU | Infecções do trato urinário |
| JBU | Urease de <i>Canavalia ensiformis</i> |
| kDa | Quilodalton |
| LB | Luria broth |
| MRK | Manose-resistente <i>Klebsiella-like</i> |
| MRP | Manose-resistente <i>Proteus-like</i> |
| NBT | Cloreto de <i>p</i> -nitro azul de tetrazólio |
| PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida |
| PBS | 20 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio e 150 mmol.L ⁻¹ de cloreto de sódio |
| PDA | Ágar dextrose batata |
| PDB | Meio de cultura dextrose batata |
| PEB | 20 mmol.L ⁻¹ de fosfato de sódio, 1mmol.L ⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5 mmol.L ⁻¹ de β-mercaptoetanol |
| pH | Potencial iônico de hidrogênio |
| PMU | Urease de <i>Proteus mirabilis</i> |
| PPP | Plasma pobre em plaquetas |
| PRP | Plasma rico em plaquetas |
| RSM | Método de superfície de resposta |
| SDS | Dodecilsulfato de sódio |
| TRIS-HCl | Tris(hidroximetil)aminometano HCl |
| TTBS | Tris(hidroximetil)aminometano HCl: 20 mmol.L ⁻¹ pH 7,5 com Cloreto de sódio 150 mmol.L ⁻¹ e 0,05 % de Tween 20 |
| TTBS-caseína | Tris(hidroximetil)aminometano HCl: 20 mmol.L ⁻¹ pH 7,5 com Cloreto de sódio 150 mmol.L ⁻¹ , 0,05 % de Tween 20 e 5 % de caseína. |
| Tween 20 | Polioxietilenosorbitano |
| TxA2 | Tromboxana A2 |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| USA | Urea segregation agar |
| vWF | Fator de Von Willebran |

Resumo

Ureases são metaloenzimas dependentes de níquel, amplamente distribuída em bactérias, fungos e plantas. Estas enzimas atuam na catálise da hidrólise da ureia a amônia e dióxido de carbono. *Proteus mirabilis* é uma bactéria patogênica, produtora de urease, um de seus mais importantes fatores de virulência. Esta bactéria Gram-negativa se comporta como um uropatógeno oportunista responsável por severas infecções em pacientes hospitalizados. A amônia liberada pela hidrólise da ureia catalisada pela urease de *Proteus mirabilis* (PMU) causa um aumento no pH levando à formação de microclima, possibilitando a colonização do patógeno no trato urinário do hospedeiro. A PMU apresenta alta similaridade com outras ureases, como a urease de sementes de “Jack bean” (JBU) e a urease de *Helicobacter pylori* (HPU), para as quais nosso grupo descreveu diversas atividades biológicas que são independentes da hidrólise de ureia. Neste trabalho, nós produzimos PMU, e logo depois investigamos se esta, assim como a JBU e a HPU, apresenta atividades não relacionadas à atividade enzimática. As condições de cultivo para expressão da PMU expressa em *Escherichia coli* HB101 foram otimizadas pela metodologia de superfície de resposta. Concentrações de níquel, ureia e tempos de indução foram testados. A purificação da enzima recombinante foi obtida em 3 etapas cromatográficas. A primeira, uma HiTrapQ™ HP (pH 7,5) onde a urease foi eluída com 400 mMol.L⁻¹ de KCl. O pico das frações eluídas foram reunidas, dialisadas e aplicadas na coluna HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP, usando o mesmo tampão e sal para eluição. As frações ativas foram novamente reunidas e a PMU foi submetida a cromatografia de gel filtração (Superdex 200™ 26/60-pg). A PMU apresenta estabilidade na faixa de pH 7,0 a 8,5, com seu pH ótimo estimado em 8,0. Alta atividade ureolítica pode ser detectada de 37 °C a 48 °C. Diferentes soluções salinas induzem o aumento na atividade enzimática desta urease, e quanto maior o tempo de exposição, maior a tendência a este aumento. Assim como a JBU, esta urease é capaz de inibir o crescimento de leveduras, mas diferentemente desta e da HPU, a PMU não apresenta atividade inibitória sobre a germinação de esporos e o crescimento de fungos filamentosos. As ureases de *P. mirabilis* e de *H. pylori* apresentam regiões de semelhança com o peptídeo proveniente do colágeno, e de acordo com testes de modelagem, esta região estaria exposta para interação com receptores localizados nas membranas de plaquetas, visto que ambas ativam plaquetas resultando na formação de agregados.

Abstract

Ureases are Ni-dependent metalloenzymes, widespread in bacteria, fungi and plants, that catalyze the hydrolysis of urea into ammonium and carbon dioxide. The pathogenic bacteria *Proteus mirabilis* produces urease as virulence factor. *Proteus mirabilis* is a Gram negative opportunistic uropathogen, which causes severe infections in hospitalized patients. Ammonia released from urea hydrolysis by *Proteus mirabilis* urease (PMU) increases the local pH and forms a microclimate which allows the colonization of the host urinary tract. PMU presents high similarity to other ureases, such as that from Jack bean seeds (JBU) or from *Helicobacter pylori* (HPU), for which our group has described biological activities unrelated to urea hydrolysis. Here we aimed to investigate whether PMU shares with JBU and HPU other properties unrelated to enzyme activity. Growth conditions of PMU-expressing *Escherichia coli* HB101 were optimized by response surface methodology prior to purification. Concentrations of nickel, urea, and induction time were tested. A partially purified recombinant enzyme was obtained after 3 chromatographic steps. In the first, a HiTrapQ™ HP (pH 7.5), urease eluted with 400 mMol.L⁻¹ KCl. Peak fractions were pooled, dialyzed and loaded in a HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP column using same buffer and eluting salt. The active fractions were pooled and PMU was submitted to gel filtration (Superdex 200™26/60-pg). The enzyme was stable in the range of pH 7.0 up to 8.5, with optimum pH at 8.0. The ureolytic activity is high from 37 °C up to 48 °C. Different salts increased the ureolytic activity of PMU, the longer the exposition, the higher was the increase in activity. PMU inhibited yeast growth, similarly to the effect induced by JBU. Differently from JBU and HPU, this urease did not inhibit spore germination and growth of different filamentous fungi. Ureases from *P. mirabilis* and *H. pylori* presented regions of homology with collagen, and according to modeling tests, these region are exposed to receptor recognition localized in platelets membrane, which might explain their platelet aggregating effect.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *PROTEUS MIRABILIS*

Proteus mirabilis, é uma bactéria Gram-negativa, patogênica oportunista, associada a infecções no trato urinário. Muitas espécies de *Proteus*, assim como *P. mirabilis*, são encontradas principalmente no solo e em águas contaminadas. Elas também são encontradas no trato intestinal de diferentes animais, inclusive em humanos, onde participam da decomposição de matéria orgânica (Jacobsen *et al.*, 2008; Gibbs e Greenberg, 2011).

O gênero *Proteus* é considerado um agente causador de diferentes infecções hospitalares entre elas: infecções no trato respiratório, infecções em feridas nos olhos, orelha, nariz e garganta, infecções de pele (especialmente em casos de queimaduras), e em casos de gastroenterite ocasionada pelo consumo de carnes contaminadas por bactérias (Rózalski, Sidorczyk e Kotelko, 1997; Jacobsen *et al.*, 2008).

Complicações causadas pelas infecções por *P. mirabilis* costumam ser severas e incluem cistite, pielonefrite, urolitíase, prostatites (Armbruster e Mobley, 2012). Pessoas de ambos sexos podem apresentar infecções no trato urinário (ITUs); entretanto, a população feminina é a mais propensa. Os riscos aumentam em mulheres grávidas e pessoas idosas, sendo maior em pacientes hospitalizados e que estão cateterizados por longo tempo (independente do sexo e/ou idade) (Magliano *et al.*, 2012). A presença da bactéria *P. mirabilis* no trato intestinal pode ser uma importante causa de autocontaminação, ou até mesmo de contaminação entre pacientes, especialmente em locais com má higienização (Chow *et al.*, 1979; Rozalski, Sidorczyk e Kotelko, 1997; Coker *et al.*, 2000; Manos e Belas, 2006).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DA BACTÉRIA *P. MIRABILIS*

A bactéria *P. mirabilis*, apresenta muitas estratégias de desenvolvimento no hospedeiro, com um mecanismo de defesa bastante sofisticado. Fazem parte destes mecanismos: reações não específicas envolvidas na adesão do patógeno a mucosas do hospedeiro; controle na transferência de ferro, e ainda, formas de

evitar a fagocitose pelo hospedeiro. Este patógeno possui fatores de virulência (esquematzadas na figura 1), que são importantes e/ou essenciais para instalação e manutenção das infecções urinárias associadas. Estes fatores de virulência são sintetizados pela bactéria, protegendo-a de eliminação por ataque enzimático, e do ataque do sistema imune do hospedeiro (Coker *et al.*, 2000).

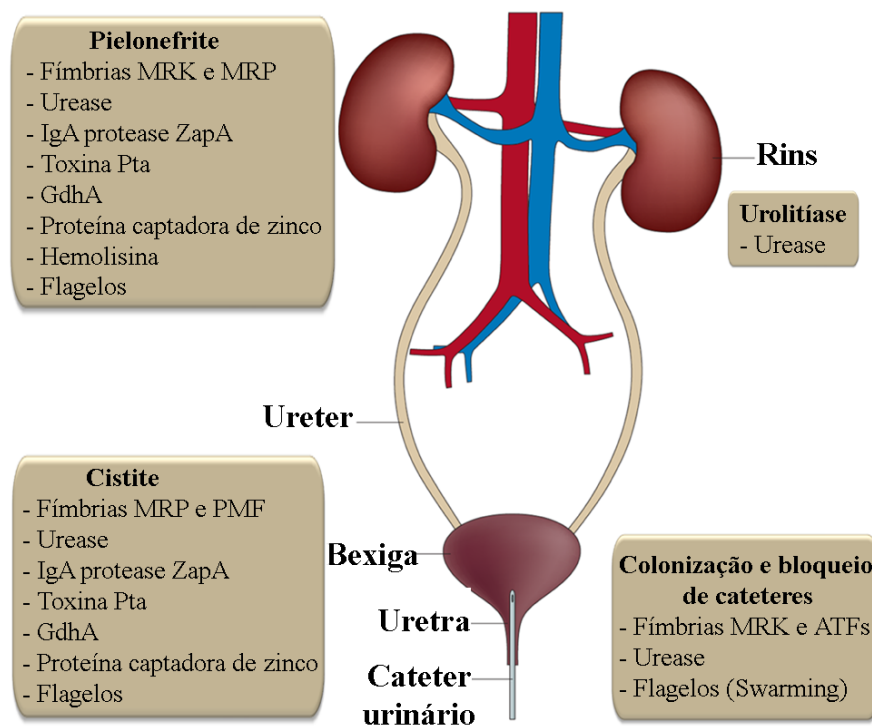


Figura 1: Fatores de virulência sintetizados por *P. mirabilis* ligados a infecções do trato urinário (ITUs) e Infecções urinárias associadas ao uso de ceteteres. ATFs, fímbrias de temperatura ambiente; GdhA, glutamato desidrogenase; IgA, imunoglobulina A; MRK, manose-resistente *Klebsiella*-like; MRP, manose-resistente *Proteus*-like. Adaptada de Armbruster e Mobley, 2012.

Fímbrias e flagelos

Inicialmente a bactéria acessa o trato urinário, sendo na maior parte dos casos por contato direto com superfícies, como cateteres contaminados. *P. mirabilis* é uma bactéria capaz de aderir a diferentes materiais, mas para tal, é necessária a produção de fímbrias. Fímbrias são apêndices filamentosos que auxiliam na aderência da bactéria em duas fases diferentes da contaminação. Na fase inicial, aderindo-a ao meio contaminado, e em um segundo momento, possibilitando a aderência da bactéria à superfície de mucosas, e células

epiteliais. A fim de estabelecer esta adesão, diferentes tipos de fímbrias são sintetizadas. Como pode ser visto na figura 1, a fímbria MRP (Manose-resistente *Proteus-like*), está envolvida diretamente com inflamações nos rins. Já as PMFs (Fímbrias de *Proteus mirabilis*) estão relacionadas à cistite. As ATFs (Fímbrias sintetizadas a temperatura ambiente) estão associadas à colonização e bloqueio de cateteres, e por fim, a fímbria MRK (Manose-resistente *Klebsiella-like*) está ligada às três formas de infecções citadas acima (Mobley e Belas, 1995; Coker *et al.*, 2000; Armbruster e Mobley, 2012). Esta aderência reforça a interação célula-célula, levando à formação de biofilmes.

Flagelos são estruturas que conferem mobilidade à bactéria. Células de *P. mirabilis* apresentam-se de duas formas, *swimmer* e *swarmer*, conforme o seu ciclo de desenvolvimento, mostrado na figura 2.

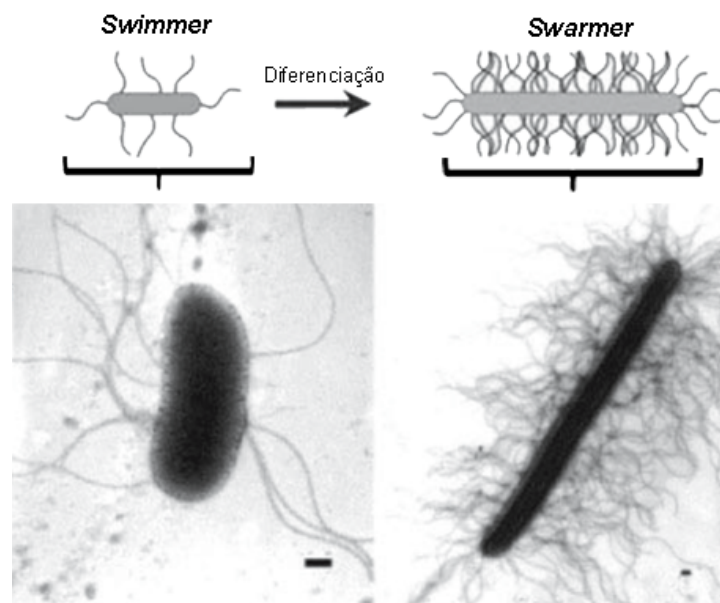


Figura 2: Diferenciação da bactéria *P. mirabilis*. Na parte superior da figura tem-se um desenho esquemático para o processo de diferenciação celular, enquanto que na parte inferior, encontram-se figuras de microscopia para estas mesmas etapas. A barra representa 200 nm. Figura adaptada de Manos e Belas, 2006.

A forma como os flagelos no *P. mirabilis* se diferenciam, *swimmer* ou *swarmer*, é determinada de acordo com a viscosidade do meio em que esta se encontra. Quando em meio líquido, a bactéria faz uso da sua forma *swimmer* de

locomoção, com 6 a 10 flagelos de 1,5 a 2,0 μm de comprimento (Manos e Belas, 2006).

A fase *swarmer* é determinante para a migração do patógeno através do trato urinário do hospedeiro, possibilitando o movimento bacteriano mesmo com o fluxo urinário no sentido oposto (Gibbs e Greenberg, 2011). Nesta etapa, a bactéria possui até mil vezes mais flagelos que na etapa *swimmer* (10^3 a 10^4 flagelos), e de maior comprimento (10 a 80 μm), conforme demonstrado na figura 2. Esta diferenciação é rápida e altamente coordenada, sendo dependente de interações multicelulares e sinalização de célula-célula.

Uma vez alcançado o trato urinário, esta bactéria é capaz de produzir fímbrias e flagelos concomitantemente, possibilitando tanto o movimento bacteriano quanto a aderência célula-célula (Armbruster e Mobley, 2012).

Glutamato desidrogenase (GdhA)

Proteus mirabilis faz uso de glutamato desidrogenase para monitorar os níveis de carbono-nitrogênio *in vivo*, podendo inverter os níveis de um ou outro conforme necessário (Figura 3). Em *P. mirabilis* o gene *gdhA*, que codifica a proteína glutamato desidrogenase (GdhA) é superexpresso, enquanto que o gene *glnA*, que codifica a glutamina sintetase (GlnA) apresenta baixa expressão. Em *Escherichia coli*, a expressão destes ocorre de forma oposta (Pearson *et al.*, 2011; Armbruster e Mobley, 2012).

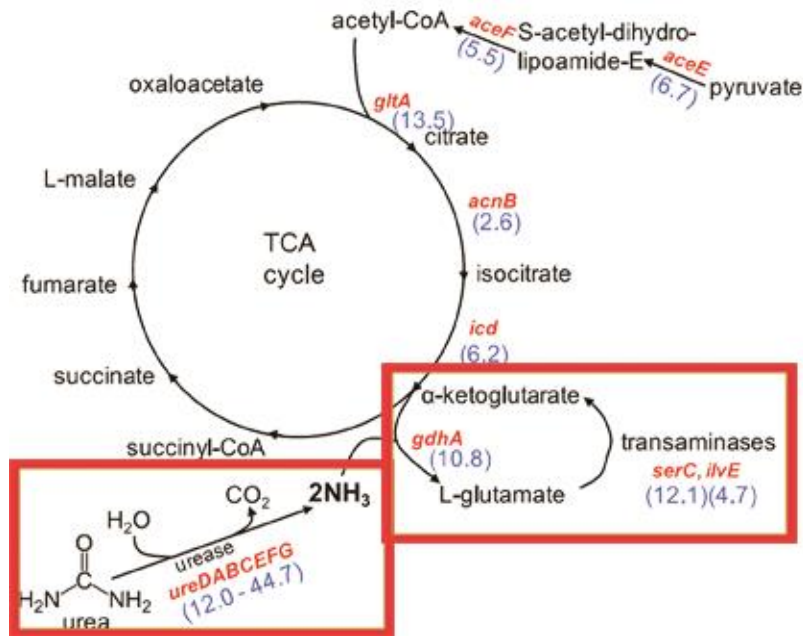


Figura 3: Relação da PMU com o ciclo de Krebs em *P. mirabilis*. Em destaque, nos quadros em vermelho destaca-se a influência da urease no ciclo do ácido tricarboxílico, onde o aumento da concentração de amônia no meio devido à ação da urease aumenta a expressão da GdhA. Em vermelho estão mostrados os genes com expressão aumentada em *P. mirabilis* comparada a expressão em *E. coli*, em azul estão indicados os níveis de aumento da expressão (Pearson *et al.*, 2011).

A GlnA é a proteína responsável pela rota de incorporação de nitrogênio, para a síntese de proteínas, quando a bactéria encontra-se em privação do mesmo, já quando a bactéria está em um meio com altas fontes de nitrogênio, a rota de absorção é via GdhA (Pearson *et al.*, 2011).

A proteína Glutamato desidrogenase (GdhA) é a responsável pela assimilação da amônia pelo α -cetoglutarato. Quando há amônia presente no meio, ocorre um aumento na expressão do gene *gdhA*, sugerindo que *P. mirabilis* usa GdhA e a amônia, produzida a partir da atividade ureásica, para a geração de glutamato durante a infecção (Pearson *et al.*, 2011; Armbruster e Mobley, 2012).

Hemolisina

Hemolisinas são proteínas que, ao entrar em contato com a membrana de células sanguíneas eucarióticas, atuam formando poros e causando dano celular

(Braun e Focareta, 1991; Coker *et al.*, 2000). Estas hemolisinas estão presentes em bactérias gram-negativas, positivas e são encontradas também em fungos. Em bactérias, auxiliam na propagação, e no caso de *P. mirabilis*, facilitam a entrada das mesmas nos rins, proporcionando o desenvolvimento de infecções do trato urinário superior (Armbruster e Mobley, 2012).

A atividade hemolítica é mais acentuada, em espécies de *Proteus*, entre as fases logarítmica e estacionária de crescimento. Três diferentes atividades hemolíticas foram identificadas por Koronakis e colaboradores, 1987 para a espécie *P. mirabilis*. Sendo duas dessas atividades hemolíticas, a “intracelular”, e a “associada à célula”. O terceiro tipo de atividade hemolítica, dita “livre de células”, é encontrada apenas em outras espécies de *Proteus*, como *vulgaris* e *penneri*, e em outras bactérias patogênicas, como *Morganella morganii* e *E. coli* (Rózalski, Sidorczyk e Kotełko, 1997; Manos e Belas, 2006).

A atividade hemolítica independente de células não é encontrada em *P. mirabilis*, pois esta bactéria não contém em seu genoma o gene *hlyD*, presente em *E. coli* e outras bactérias, requerido para secreção de hemolisinas (Koronakis *et al.*, 1987; Manos e Belas, 2006), mantendo a atividade hemolítica associada à célula.

Hemolisinas em *P. mirabilis* não são cruciais para o desenvolvimento da patogênese, mas ainda assim são enzimas importantes na infecção. (Koronakis *et al.*, 1987; Manos e Belas, 2006).

Urease de *Proteus mirabilis* (PMU)

Juntamente com os fatores de virulência citados anteriormente, e ainda outros não citados neste trabalho, temos a produção de urease. No caso da urease, a hidrólise da ureia presente na urina aumenta o pH do meio proporcionando a colonização do trato urinário. Desta forma a urease é vista como um fator crítico de virulência (Jones *et al.*, 1990), e que será abordado adiante neste trabalho.

1.3 UREASES

Ureasas (EC 3.5.1.5) são aminohidrolases, dependentes de níquel, que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, conforme esquematizado na figura 4 (Mobley e Hausinger, 1989).

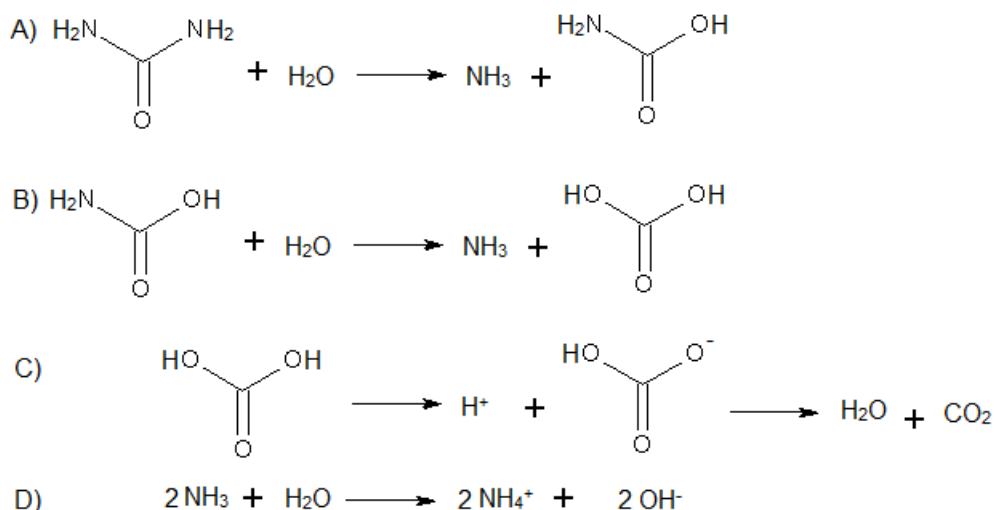


Figura 4: Reação de hidrólise da ureia. A) Para cada molécula de ureia tem-se a formação de uma molécula de amônia e uma molécula de carbamato. B) O carbamato reage com a água resultando em uma molécula de amônia e um ácido carbônico. C) Ocorre a dissociação do ácido carbônico, com a liberação de um próton, após a dissociação completa do ácido há a formação de uma molécula de gás carbônico. D) As amônias geradas anteriormente são protonadas devido à sua interação com a água do meio, que é então alcalinizado (Mobley e Hausinger, 1989).

A urease de *Canavalia ensiformis* (JBU) foi a primeira enzima a ser cristalizada, por Sumner em 1926 (Sumner, 1926), o que lhe rendeu o prêmio Nobel de química em 1946. A JBU tem sua cadeia polipeptídica constituída por 840 aminoácidos e massa molecular de 90 kDa. A forma mínima, enzimaticamente ativa, da JBU em solução é a de um trímero, com 270 kDa, e sua conformação nativa mais provável é a de um hexâmero, com 540 kDa. A JBU possui dois átomos de níquel no seu sitio ativo, cada qual coordenado por dois resíduos de histidina (Follmer e Carlini, 2005). Apesar de ter sido historicamente a primeira enzima a ser cristalisada, sua estrutura somente foi resolvida por cristalografia de

raios X, recentemente, por Balasubramanian e Ponnuraj (Balasubramanian e Ponnuraj, 2010).

As ureases são amplamente distribuídas em bactérias, fungos e plantas. Enquanto que ureases vegetais e fúngicas apresentam-se como trímeros ou hexâmeros de apenas um tipo de subunidade, as ureases bacterianas são multímeros complexos, formados por dois ou três tipos de subunidades (Olivera-Severo, Wassermann e Carlini, 2006; Becker-Ritt e Carlini, 2012; Ligabue-Braun *et al.*, 2013). A diferença mais evidente entre as ureases está em suas estruturas quaternárias nativas. A urease de *C. ensiformis* (JBU) apresenta-se como um hexâmero α_6 , com apenas um tipo de subunidade. A urease de *H. pylori* (HPU) apresenta-se como um dodecâmero $[(\alpha\beta)_3]_4$, sendo cada monômero composto por duas subunidades diferentes, ureA e ureB (Ha *et al.*, 2001). Já a urease de *P. mirabilis* (PMU) apresenta-se como um trímero $(\alpha\beta\gamma)_3$ cada um formado por ureA, ureB e ureC (Heimer e Mobley, 2001).

Apesar da ampla distribuição das ureases em plantas, ainda não há muitas informações sobre seu papel fisiológico, sua principal função pode estar relacionada à reciclagem de nitrogênio (Sirko e Brodzik, 2000), mesmo que a ureia, seu principal metabólito, não seja abundante em plantas, ou ainda estar ligada a defesa da planta contra fitófagos e patógenos (Carlini *et al.*, 1988; Polacco e Holland, 1993; Polacco, Mazzafera e Tezotto, 2013).

1.3.1 Toxicidade da urease

Em 1981, Carlini & Guimarães isolaram uma proteína tóxica, que quando aplicada intraperitonealmente em camundongos e ratos, provoca convulsão e morte ($DL_{50} = 0,5 - 2,0 \text{ mg.kg}^{-1}$). Essa proteína foi chamada de canatoxina (CNTX) (Carlini e Guimaraes, 1981; Carlini *et al.*, 1984). Mais tarde foi demonstrado que a CNTX é uma isoforma da JBU (Follmer *et al.*, 2001). A CNTX possui cerca de 30 - 40 % de atividade ureásica quando comparada com a JBU (Follmer *et al.*, 2001; Carlini e Grossi-De-Sa, 2002).

Esta isoforma da JBU têm sua conformação proteica apresentada na forma de dímeros. Cada subunidade com 95 kDa, e um íon de Zn^{2+} e um de Ni^{2+} no seu sítio catalítico (Follmer *et al.*, 2001).

1.3.2 Efeito tóxico em mamíferos e mecanismos de ação da urease/canatoxina

Uma extensa variedade de bactérias produzem urease, desde as presentes no solo como o *Bacillus pasteurii*, até bactérias com importância médica, como *K. aerogenes*, *H. pylori* e *P. mirabilis*. Esta enzima está envolvida em vários processos patogênicos, e na infecção por *P. mirabilis*, contribui para a formação de cálculos urinários, incrustação de catéter, pielonefrites, chegando a causar coma hepático (para uma revisão ver Carlini e Polacco, 2008).

Estudos *in vivo*, realizados em ratos e camundongos, demonstraram que a canatoxina induz bradicardia, hipertensão e hipotermia, que ocorrem antes do fenômeno de convulsão, característico de sua ação tóxica (Barja-Fidalgo, Guimaraes e Carlini, 1991; Ferreira-Dasilva *et al.*, 2000). Outros estudos mostraram que doses nanomolares da canatoxina induzem excitose em diversos tipos celulares, como plaquetas, neutrófilos, sinaptosomas, ilhotas pancreáticas, mastócitos, etc. Estes efeitos são mediados por eicosanóides e por alterações dos níveis intracelulares de cálcio (Carlini, Guimaraes e Ribeiro, 1985; Barja-Fidalgo, Guimaraes e Carlini, 1991; Ghazaleh *et al.*, 1997).

1.4 UREASE DE *PROTEUS MIRABILIS* - PMU

O operon da urease de *P. mirabilis* tem sua expressão induzida pela presença de ureia. Este operon é composto por oito genes contíguos, conforme demonstrado na figura 5.

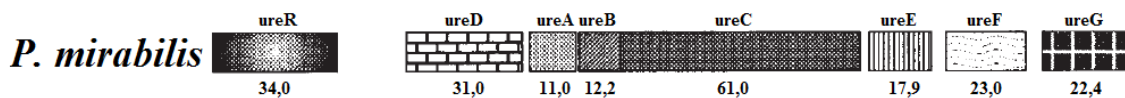


Figura 5: Organização genética para o cluster gênico da urease de *Proteus mirabilis*. Cada gene aparece associado a um retângulo e na parte inferior de cada retângulo estão dispostos os tamanhos em kDa para cada proteína expressa (Mobley, Island e Hausinger, 1995).

O operon da PMU é composto pelos genes estruturais *ureA*, *B* e *C*, os quais codificam as subunidades α (*ureA*), β (*ureB*) e γ (*ureC*) da enzima, com 11, 12,2 e 61 kDa, respectivamente. Na forma nativa, a PMU apresenta-se como trímeros $(\alpha\beta\gamma)_3$, com massa molar de aproximadamente 280 kDa (Jones e Mobley, 1987; Coker *et al.*, 2000). Os genes acessórios *ureD*, *E*, *F* e *G* codificam as proteínas acessórias. As proteínas *ureD*, *ureE* e *ureF* estão envolvidas na inserção do níquel na apoenzima, dando origem à proteína enzimaticamente ativa (Mobley, Island e Hausinger, 1995). A sequência *ureG* é uma ORF essencial para a presença da atividade ureásica. Quando esta região é removida do DNA, não é possível detectar nenhuma atividade da PMU (Sriwanthana, Island e Mobley, 1993). O oitavo gene que compõe o operon da urease é o gene *ureR*, que codifica uma proteína pertencente à família de proteínas regulatórias, responsável por ativar a transcrição dos genes estruturais e acessórios quando na presença de ureia (Dattelbaum *et al.*, 2003). Há evidências de que a *ureR* liga-se à ureia presente no trato urinário, dando início à expressão da urease (Dattelbaum *et al.*, 2003; Poore e Mobley, 2003).

1.4.1 Papel da PMU na infecção

Conforme exposto anteriormente, a urease de *P. mirabilis* é considerada um fator de virulência, sem o qual a bactéria não é capaz de estabelecer ou manter a infecção no hospedeiro. Conforme demonstrado por Johnson e colaboradores, linhagens desta bactéria negativas para urease são incapazes de estabelecer infecção nos rins de camundongos CBA (Johnson *et al.*, 1993).

Sabe-se até o momento que este fator de virulência está diretamente associado à urolitíase (formação de cálculos nos rins), pielonefrite, coma hepático,

incrustação de cateteres e, ainda, encefalopatia hepática por intoxicação por amônia, devido à sua atividade enzimática (Mobley e Hausinger, 1989). A hidrólise da ureia promove um aumento no pH da urina, podendo chegar a valores acima de 9,0 (Irwin *et al.*, 2013). Com o aumento do pH, sais antes solúveis na urina passam a precipitar, formando pedras que causam danos teciduais, mecanismo esquematizado na figura 6. As mais comumente encontradas são estruvita ($(\text{MgNH}_4\text{PO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e carbonato hidróxi-apatita ($[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4\text{CO}_3\text{OH})_6]\cdot\text{OH}$) (Jones e Mobley, 1989).

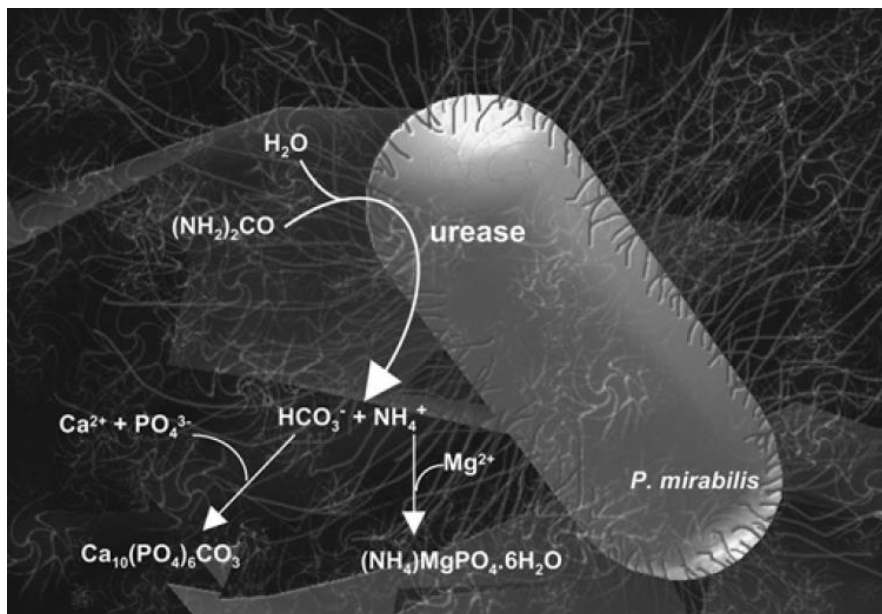


Figura 6: Papel da urease na infecção por *P. mirabilis*. Infecção induzida pela formação de cálculos são formadas na presença de amônia e dióxido de carbono (Follmer, 2010).

Os cristais de fosfato de cálcio e de magnésio, aos quais as bactérias estão aderidas, protegem suas colônias de possíveis agentes terapêuticos, mantendo-as de forma latente. Contudo, assim que as bactérias são expostas novamente ao meio, reiniciam ou dão continuidade ao processo de infecção. A incrustação de cateteres é também facilitada pela presença de cristais de sais agregados às bactérias, auxiliando na aderência destas ao polímero utilizado para confecção do cateter. Os cálculos, o biofilme formado, ou ainda a combinação

destes pode ocasionar um bloqueio parcial, ou até mesmo total do trato urinário. A urina fica retida na bexiga, o que causa uma distensão da mesma e severa dor ao paciente. Nos casos mais severos, a urina contaminada sofre refluxo até os rins causando pielonefrite aguda (Kunin, 1997; Stickler e Morgan, 2006).

1.5 SISTEMAS EM ESTUDO

1.5.1 Plaquetas

Plaquetas são células anucleadas produzidas por megacariócitos na medula óssea. Estas células permanecem na corrente sanguínea por até 10 dias, sendo depois removidas pelo baço e fígado. Apenas quando a camada celular endotelial dos vasos sanguíneos sofrem danos teciduais, seja fisiologicamente ou por lesão tecidual, tem-se a exposição da matriz subendotelial e a atração das plaquetas circulantes para a região (Cimmino e Golino, 2013).

O contato das plaquetas com a superfície injuriada provoca mudanças conformacionais nas plaquetas, que alteram sua forma discóide para uma forma esférica, com emissão de pseudópodes, processo denominado *Shape-change*. A mudança conformacional somada à associação entre o receptor GPIb-V-IX da plaqueta e o Fator de Von Willebran (vWF) plasmático, que promovem a interação do colágeno com a glicoproteína VI (GPVI), conforme visualizado na figura 7, induzem a adesão das plaquetas ao colágeno exposto no local da lesão, que é a primeira etapa da ativação plaquetária. Quando as plaquetas são ativadas por um agonista solúvel, como trombina ou ADP, essa etapa de adesão não ocorre.

As plaquetas são células secretórias e, através de exocitose (reação de degranulação), podem liberar para o meio o conteúdo de pelo menos dois tipos diferentes de grânulos. Os chamados grânulos alfa contêm fatores da coagulação, como o fator XIII e fibrinogênio, enquanto que os grânulos densos armazenam, além de Ca^{2+} , aminas vasoativas como serotonina (5-HT), ATP e ADP, entre outras proteínas.

Uma vez ativadas as plaquetas, diferentes compostos são produzidos e/ou secretados, como por exemplo, tromboxana A₂ (TxA₂), serotonina e ainda

adenosina difosfato (ADP). A secreção destes compostos fortalecem a adesão, recrutando e ativando mais plaquetas, e levando à formação de agregados. A exposição e consequente ativação de receptores na superfície das plaquetas são responsáveis pela aderência entre estas, levando ao processo de agregação (Varga-Szabo, Pleines e Nieswandt, 2008; Cimmino e Golino, 2013).

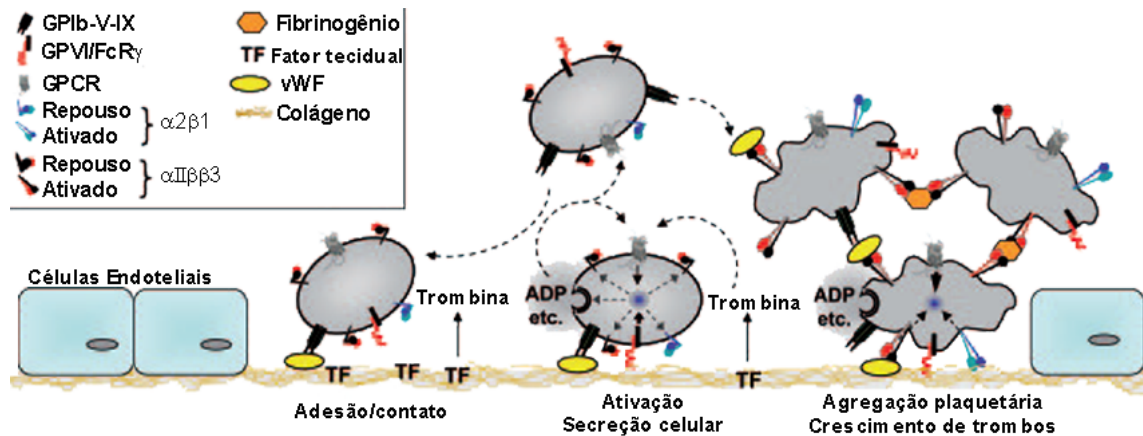


Figura 7: Etapas para formação de trombos. Como primeira etapa tem-se a adesão celular, mediada pelo receptor GPIb-V-IX e o Fator de von Willebrand (vWF), promovendo a interação entre colágeno e glicoproteína VI (GPVI), ativando a plaqueta. A ativação plaquetária resulta em secreção de diferentes agonistas como a serotonina e ADP, estes agonistas atuam ativando outras plaquetas e recrutando formando agregados plaquetários. Adaptada de Varga-Szabo e colaboradores (Varga-Szabo, Pleines e Nieswandt, 2008)

As etapas para a formação de trombos plaquetários geralmente incluem duas ondas de agregação. A primeira onda de agregação é desencadeada por diferentes agonistas, como ADP, PAF-acéter ou TxA₂, que são capazes de ativar as plaquetas diretamente, sem a necessidade da reação de degranulação (Nieswandt e Watson, 2003). A segunda onda de agregação é consequente à secreção de ADP pelas próprias plaquetas, que assim promove uma amplificação da resposta primária (Nieswandt e Watson, 2003; Li *et al.*, 2004). A segunda onda de agregação costuma ser bastante mais intensa que a primeira, devido ao fato de haver uma retroalimentação do sistema promovido pela secreção plaquetária.

O colágeno é um dos agonistas fisiológicos mais importantes de plaquetas, promovendo adesão e ativação plaquetária, através da síntese de TxA₂

e da reação de degranulação, com liberação de ADP. Entre os receptores plaquetários de colágeno está a glicoproteína VI (GPVI) (Clemetson *et al.*, 1999, Jandrot-Perrus *et al.*, 2000, Nieswandt e Watson, 2003). Em 1995, Morton e colaboradores detectaram a sequência de aminoácidos a seguir, [GKO(GPO)₁₀GKOG], como a região no colágeno responsável pela interação plaquetária com GPVI (Morton *et al.*, 1995; Polanowska-Grabowska, Gibbins e Gear, 2003).

Coffey e colaboradores, 2004, mostraram que a sequência peptídica presente no colágeno [GKO(GPO)₁₀GKOG] interage com a GPVI, e ativa plaquetas por um rota que recruta a 12-lipoxigenase plaquetária (Coffey *et al.*, 2004).

Efeito da urease/canatoxina sobre plaquetas

A ação de ureases sobre plaquetas já foi descrita por nosso grupo anteriormente. Inicialmente esta atividade foi determinada para CNTX, mais tarde, em 2004, Follmer e colaboradores detectaram a mesma atividade para duas outras ureases de planta, a JBU e a urease embrião específico de soja, e ainda para uma urease bacteriana, a partir da bactéria *Bacillus pasteurii* (Follmer *et al.*, 2004).

O mesmo fenômeno foi descrito por Wassermann e colaboradores, em 2010 para urease de *Helicobacter pylori*. Em 1997 foi visto por Ghazaleh e colaboradores que a CNTX promove influxo de Ca²⁺ através da membrana das plaquetas e em um segundo momento promove a ativação da fosfolipase A2, secreção de ATP e agregação plaquetária.

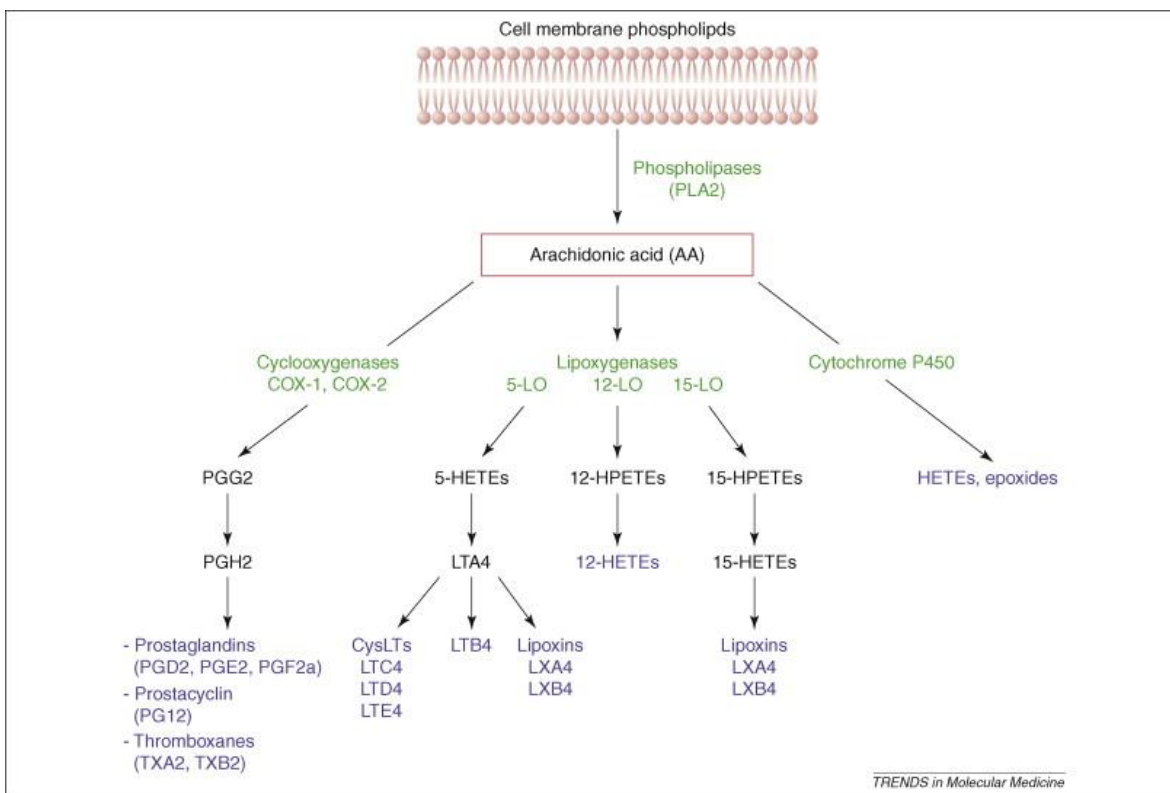


Figura 8: Rota de biosíntese de eicosanóides a partir do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é liberado a partir de fosfolípidios de membrana pela ação da fosfolipase A2. O ácido araquidônico livre pode ser convertido em eicosanóides através da rota das ciclo-oxigenases, lipoxigenases ou ainda das epoxigenases P-450 (Harizi, et al., 2008).

A resposta de ativação plaquetária induzida por ureases envolve a rota de do ácido araquidônico, através da via da 12-lipoxigenase (Figura 8), conforme demonstrado para a CNTX (Carlini et al., 1985), para a urease de *B. pasteurii* (Olivera-Severo, Wassermann e Carlini, 2006) e também para a HPU (Wassermann *et al.*, 2010).

Coffey e colaboradores demonstraram, em 2004, que o colágeno é capaz de ativar a rota das 12-lipoxigenases em plaquetas, da forma semelhante às ureases, sugerindo que ambos apresentem a mesma rota de sinalização, enquanto Scopel-Guerra em 2011, identificou que a sequência de peptídeos responsável pela interação colágeno-GPVI estava também contida na HPU por alinhamento de sequências, e o de forma bastante interessante, a localização desta sequência ficou contida na superfície da urease, reforçando a hipótese de

que as ureases ativam o processo de agregação plaquetária utilizando a via do colágeno.

1.5.2 Fungos

O reino fungi é um dos mais extensos reinos existentes, segundo Ajesh e Sreejith, este reino apresenta aproximadamente 74 mil espécies descritas até o momento. Mesmo com toda diversidade de fungos já descritos, apenas algumas centenas são patogênicos para humanos (Ajesh and Sreejith, 2009).

De acordo com a morfologia, pode-se classifica-los em filamentosos e leveduras, ou ainda cogumelos (Esposito e Azevedo, 2004). Os fungos filamentosos se desenvolvem como hifas, sendo o crescimento destas de forma apical, com ramificações laterais. Podem se dispersar através do ar na forma de esporos ou conídeos (Sidrim e Rocha, 2004). Além de causar apodrecimento de plantas e sementes, alguns fungos filamentosos são capazes de produzir micotoxinas, que são substâncias tóxicas quando ingeridas por animais, através da alimentação (Pastore e Macedo, 2004).

As leveduras são fungos unicelulares, com forma arredondada ou oval, chamadas de blastoconídeos. Algumas leveduras, como espécies do gênero *Candida* estão presentes na microbiota normal humana, porém em indivíduos imunossuprimidos algumas destas espécies causam infecções (Periroth *et al.*, 2007; Kirpatrick, 1994). O gênero *Candida*, é composto por um grande número de espécies e entre as principais leveduras patogênicas estão, *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis* (Rodloff, et al., 2011).

Efeito da urease/canatoxina sobre a inibição da proliferação em fungos

Com o intuito de verificar uma possível atividade antifúngica, nosso grupo testou diferentes ureases vegetais, como a CNTX (Oliveira et al., 1999), a urease de sementes de algodão (Menegassi et al., 2008), a JBU e a urease da soja (SBU), bem como uma urease bacteriana, a HPU, frente a diferentes fungos filamentosos, incluindo alguns fitopatogênicos (Becker-Ritt *et al.*, 2007). Em fungos filamentosos as ureases, em doses de 10^{-7} - 10^{-6} mol.L⁻¹, inibiram a germinação de

esporos e também o crescimento de hifas, comprometendo a integridade da parede/membrana celular (Becker-Ritt *et al.*, 2007; Postal *et al.*, 2012). Mais recentemente, observou-se que a JBU também é tóxica para leveduras. Em doses submicromolares, a JBU inibiu extensamente o metabolismo energético, aumentando a permeabilidade da membrana celular, causando inibição de multiplicação e formação de pseudohifas em diferentes espécies de *Candida* (Postal *et al.*, 2012). Ainda em 2012, Postal e colaboradores observaram que um *pool* de peptídeos internos da JBU, com massa menor que 3 kDa, obtidos a partir da digestão *in vitro* da proteína com papaína, apresentavam uma atividade antifúngica 10 vezes maior (relação massa/volume) do que a proteína completa. Alguns dos peptídeos presentes nesse *pool* foram identificados por espectrometria de massas (Postal *et al.*, 2012).

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho é produzir a urease de *Proteus mirabilis* e investigar outras propriedades biológicas além de sua atividade enzimática.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a expressão da urease recombinante de *P. mirabilis* através da metodologia de superfície de resposta.
- Purificar a PMU recombinante em sistema de expressão procariótico.
- Caracterizar aspectos cinéticos da enzima recombinante.
- Verificar se esta urease apresenta atividade antifúngica e promotora de agregação plaquetária.

3 METODOLOGIA

3.1 LINHAGEM BACTERIANA

A linhagem utilizada foi *Escherichia coli* HB101, na qual foi transformado o operon completo da urease de um isolado clínico de *P. mirabilis* HI4320, que foi gentilmente cedida pelo Dr. Harry L. T. Mobley. A sequência do operon foi clonada em plasmídeo pMID 1010 por Mobley e Warren, 1987.

A seleção bacteriana, visando identificar colônias produtoras de urease, foi feita utilizando o meio *Urea Segregation Agar* (USA) (Farmer Iii, et al., 1977), com ampicilina na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após cultivo bacteriano por 3 horas em meio de cultura Luria broth (LB), uma alíquota foi transferida para uma placa contendo meio de cultura LB sólido, e após aproximadamente 18 h a 37 °C, as colônias isoladas foram transferidas para o meio USA, contido em outra placa. Após o cultivo *overnight* em meio USA, que contém níquel para síntese da enzima ativa, e vermelho de fenol, reagente que atua como indicador de pH, as colônias com halo avermelhado foram selecionadas, por serem capazes aumentar o pH do meio, deixando o mesmo básico, característica presente apenas nas cepas contendo o operon da PMU.

3.2 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA (RSM)

A fim de obter condições ótimas de expressão da PMU, foi delineado um planejamento fatorial 2^2 variando as condições de indução para produção da enzima. As variáveis utilizadas foram:

- Concentração de ureia, variando de 50 a 600 mmol.L^{-1} .
- Tempo de indução, variando de 3,3 a 20 h.

Com um planejamento fatorial 2^2 , tem-se matematicamente 12 experimentos, onde cada uma das variáveis é analisada em três níveis: limite superior (+ α), inferior (- α) e um ponto central (0), os valores reais são transformados em valores codificados (entre parênteses) e a partir de um algoritmo já estabelecido obtêm-se os pontos intermediários a serem testados.

Para analisar os resultados obtidos com as diferentes condições de expressão foi utilizado o software STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, Okla, USA), obtendo-se uma equação polinomial, que permite prever um aumento ou redução na síntese da proteína de interesse (equação 1).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

Onde:

Y_i : atividade ureásica predita;

X_1 : concentração de ureia utilizada;

X_2 : tempo de indução;

β_1 e β_2 : são os parâmetros do modelo

β_0 : corresponde à variável independente.

A partir do R^2 e Teste de Fischer (F-test) pode-se avaliar a qualidade e significância dos resultados, respectivamente.

O teste de Fischer é feito através da comparação entre as constantes de Fischer tabelada e calculada, e para calculá-la, fez-se uma razão entre os valores da soma dos quadrados e os graus de liberdade obtidos pela tabela de ANOVA.

3.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Identificada uma boa colônia produtora de urease, o cultivo celular foi realizado em meio de cultura LB, com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina e $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de cloreto de níquel (NiCl_2) a 37°C e sob constante agitação de 185 rpm. Após a OD de 0,7 deu-se início à indução da enzima, pela adição de 500mmol.L^{-1} de ureia e agitação constante de 185 rpm a 37°C por 3 horas.

O cultivo bacteriano para produção do controle negativo (material utilizado para o ensaio biológico com leveduras) foi feito exatamente da mesma forma que citada anteriormente, porém sem a etapa de indução da enzima.

3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Após o cultivo, as células foram coletadas por centrifugação a $5800 \times g$ por 15 minutos a 4°C . O *pellet* bacteriano obtido foi ressuspensão em PEB (20

mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio, 1 mmol.L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 5 mmol.L⁻¹ de β-mercaptoetanol) pH 7,5, e logo depois lavado pelo menos 3 vezes com o mesmo tampão (5800 x g por 15 minutos a 4 °C, através de ciclos de centrifugação e ressuspensão do *pellet* formado), a fim de retirar o resíduo de ureia que possa ter permanecido em solução. O rompimento da membrana celular foi feito por sonicação em banho de gelo no Ultrasonic Homogenizer Unique (Indaiatuba, São Paulo, BR) com 10 pulsos de 50 segundos em intervalos de 3 minutos cada. Este material foi novamente centrifugado para eliminação dos *debris* celulares a 23000 x g por 60 minutos a 4 °C, e o sobrenadante contendo a proteína de interesse foi denominado extrato bruto.

3.5 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS

Neste trabalho o conteúdo de proteínas foi determinado espectrofotometricamente por absorbância a 280 nm (A_{280}) (Hubbard, 1969), e corroborado pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se albumina bovina como padrão.

3.6 ATIVIDADE UREÁSICA E ENSAIO DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A determinação da atividade ureásica foi executada em microplaca de 96 poços, onde foram adicionados o tampão PBS (20 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio e 150 mmol.L⁻¹ de cloreto de sódio) pH 7,5, amostra e 100 mmol.L⁻¹ de ureia, para um volume final do poço de 100 µL. A reação enzimática foi realizada a 37 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida com fenol-nitroprussiato e a liberação de amônia foi dosada pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (Weatherb.Mw, 1967). A medida de absorbância foi determinada a 570 nm em SpectraMax M3[®] (Molecular Device, California, US). Para cálculo da concentração de amônia liberada uma curva padrão com sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) foi utilizada, em concentrações de 0,1 a 10 µg.mL⁻¹. Uma unidade de urease foi definida como a concentração de enzima necessária para liberação de 1 nmol de amônia por minuto de reação enzimática.

Os ensaios de pH ótimo e estabilidade de pH foram executados na presença de diferentes soluções tampão, são elas: 50 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio para pH entre 5,0 e 6,0, 50 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio para pHs entre 7,0 e 8,0 e 50 mmol.L⁻¹ de carbonato de sódio para pH entre 9,0 e 10,0.

Os ensaios com a urina mimética utilizaram os seguintes sais e suas concentrações: 5.9 mmol.L⁻¹ de cloreto de cálcio (CaCl₂), 6.8 mmol.L⁻¹ cloreto de magnésio (MgCl₂), 78.7 mmol.L⁻¹ cloreto de sódio (NaCl), 16.2 mmol.L⁻¹ sulfato de sódio (Na₂SO₄), 20.6 mmol.L⁻¹ fosfato de potássio (KH₂PO₄), 21.5 mmol.L⁻¹ cloreto de potássio (KCl), de acordo com Prywer e Torzewska, 2012.

Para o ensaio de inibição enzimática, foram adicionadas diferentes concentrações do agente quelante ácido acetohidroxâmico (AAH) (Follmer *et al.*, 2004; Tanaka, Kawase e Tani, 2004) às amostras de urease, e então incubadas por 24 horas a 4°C. As concentrações de AAH variaram de 1 a 1000 µmol.L⁻¹ e o ensaio enzimático procedeu de mesma forma que descrito anteriormente. O gráfico foi gerado em OriginLab 8 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Géis para eletroforese nas concentrações de 12,5, 7,5 e 5 % de poliacrilamida (0,75 mm), foram utilizados. Os géis com 12,5 % foram utilizados na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) (Laemmli, 1970) e as amostras resolvidas neste gel foram tratadas com tampão de amostra desnaturante e redutor (60 mmol.L⁻¹ de Tris(hidroximetil)aminometano – HCl (Tris-HCl) pH 6,8, 0,1 % (m/v) de SDS, 5 % (v/v) de glicerol, 100 mmol.L⁻¹ de β-mercaptoetanol e 0,02 % (m/v) de azul de bromofenol) e em seguida fervidas por 5 minutos. A eletroforese foi realizada no sistema PowerPac HC da Bio-Rad (Bio-Rad – Hercules, California, Estados Unidos) por 1 h a 250 V e com 30 mA.

Para fazer eletroforese com gel não desnaturante, a concentração do gel foi de 7,5 ou 5 % de poliacrilamida, sem a utilização de SDS e sem fervura da amostra. Os géis foram corados com nitrato de prata devido à baixa concentração de proteínas (Wray *et al.*, 1981).

3.8 ZIMOGRAMA E WESTERN BLOT

Após executada a eletroforese nativa, para processar um zimograma, o gel foi incubado sequencialmente, primeiro com água destilada, e depois com acetato de sódio 5 e 10 mMol.L⁻¹, por 5 min em cada etapa. Em seguida, o gel foi incubado por 15 minutos em uma solução contendo 5 mol.L⁻¹ de ureia, a 37 °C. A reação de coloração foi feita com o reagente nitroprussiato-tiol, de acordo com Sharma e colaboradores (Sharma *et al.*, 2008).

Para o Western blot, após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (GE Healthcare, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England). A transferência foi feita com amperagem de 300 mA e 35 V por 1 h. Todas as etapas foram feitas com TTBS-caseína [Tris(hidroximetil)aminometano HCl: 20 mM pH 7,5 com cloreto de sódio 150 mM, 0,05 % de tween 20 e 5 % de caseína], e os tempos de incubação foram de duas horas. A membrana foi bloqueada à temperatura ambiente, sob suave agitação. Em seguida, incubou-se a membrana com o anticorpo primário anti- subunidade B da urease de *Helicobacter pylori*, (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), na diluição de 1: 5.000. A incubação do anticorpo secundário foi feita com o anti-IgG de coelho acoplado à enzima fosfatase alcalina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído 5.000 vezes. Entre as incubações foram feitas lavagens da membrana com a mesma solução de bloqueio.

Ao término da última incubação, a membrana foi lavada com TTBS–caseína para a retirada do excesso de anticorpo secundário, seguida de duas lavagens com a solução na ausência da caseína e do detergente. A revelação das proteínas imunorreativas foi realizada com 0,75 mmol.L⁻¹ de nitroblue tetrazolium (NBT) e 30 mmol.L⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-indoil-fosfato (BCIP), tamponados em 10 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, e 20 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl pH 9,2. A membrana foi tratada com 30 mL da solução de revelação e mantidas em contato até o desenvolvimento da

cor desejada para identificação das bandas de proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose.

3.9 CROMATOGRAFIAS

As etapas cromatográficas foram as mesmas para o material com indução da expressão de urease, e para o material sem a indução da enzima. Os cromatogramas foram acompanhados por ensaio de atividade ureásica conforme item 3.6 e a pureza do material acompanhada por SDS-PAGE.

3.9.1 Cromatografia de troca iônica

A primeira etapa cromatográfica a partir do extrato bruto obtido no item 3.4, foi feita com uma resina de troca aniônica - HiTrapQ™ HP (GE Health Life Science, Fairfield, USA) - com uso de bomba peristáltica.

A resina foi equilibrada com PEB pH 7,5 e foram aplicadas na coluna um total de 150 mg de proteínas. A lavagem foi feita com o mesmo tampão e a eluição do material foi executada por gradiente descontínuo de 200, 400, 600 e 1000 mmol.L⁻¹ de KCl. A fração com maior atividade foi recolhida. O *pool* de amostra recolhido da HiTrapQ™ foi dialisado contra PEB pH 7,5 a fim de ser aplicado em uma segunda cromatografia de troca aniônica.

Em uma coluna HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP (GE Health Life Science, Fairfield, USA) foi aplicado um volume de amostra contendo 5 mg de proteínas. Após proceder a lavagem da resina com os mesmos tampões utilizados anteriormente, a eluição deste material foi feita por gradiente contínuo, variando de 0 a 600 mmol.L⁻¹ de KCl em PEB pH 7,5, em cromatógrafo ÄKTA (GE Health Life Science, Fairfield, USA) com fluxo de 3,5 mL.min⁻¹. O *pool* de frações com atividade foi reunido e concentrado por ultracentrifugação em Amicon (Milipore, Billerica, MA, USA) com membrana de corte de 10 kDa.

3.9.2 Cromatografia de gel filtração

A última etapa de purificação foi feita em Superdex 200™ 26/60-pg (GE Health Life Science, Fairfield, USA), utilizando PEB pH 7,0 como tampão. A calibração da coluna procedeu com o mesmo tampão citado anteriormente, e utilizadas as proteínas listadas a seguir como padrão para massa molecular.

Tabela 1: Proteínas usadas na calibração da coluna de gel filtração Superdex 200

| Proteína | Massa molecular (kDa) |
|----------------------|-----------------------|
| Tiroglobulina | 669 |
| Ferritina | 440 |
| β -amilase | 200 |
| Álcool desidrogenase | 150 |
| Anidrase carbônica | 29 |

3.10 DETERMINAÇÃO DO K_M E V_{MAX}

Neste ensaio, as concentrações de ureia testadas foram 1, 3, 5, 7, 10, 13, 25, 50 e 100 mmol.L⁻¹, enquanto a concentração enzimática permaneceu constante, em 37 nmol.L⁻¹. O ensaio enzimático foi feito conforme descrito no item 3.6. O tempo de reação foi variado para cada condição a fim de obter valores de velocidades na fase linear de reação. Tanto o gráfico de Michaelis-Menten quanto o gráfico de Lineweaver Burk foram feitos em GraphPad Prism Versão 5 (GraphPad, California, USA).

3.11 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os tampões utilizados para os ensaios biológicos foram: 20 mmol.L⁻¹ de fosfato de sódio para os ensaios de agregação plaquetária e 20 mmol.L⁻¹ de Tris para as atividades contra fungos, ambos em pH 7,5.

Controles adicionais foram feitos com as frações equivalentes obtidas de bactérias cultivadas sem indução da urease, conforme item 3.3.

3.11.1 Ensaio com fungos filamentosos e leveduras

As espécies de fungos filamentosos e leveduras utilizados neste trabalho foram *Penicillium herguei*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia lunata*, *Rhizoctonia*

solani, *Colletotrichum musae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Todos gentilmente cedidos pela Dra. Valdirene Gomes da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil e também pelo Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira, da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Os fungos filamentosos foram cultivados por aproximadamente 5 dias a 28 °C em ágar dextrose batata (PDA). Em seguida, esporos foram coletados, contados em câmara de Neubauer, e feita uma suspensão em água estéril (Becker-Ritt *et al.*, 2007).

A suspensão descrita acima foi distribuída em uma placa de 96 poços, já contendo meio de batata-dextrose (PDB), em uma concentração final de 10^6 esporos/poço, para então ser adicionada a enzima a ser testada. Este ensaio foi executado na concentração de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de PMU/poço. O controle positivo, material com o qual espera-se uma inibição do crescimento fúngico, foi executado na presença de H_2O_2 (10 %), enquanto que o controle negativo foi feito na presença de tampão Tris 20mmol.L^{-1} pH 7.5.

Para o ensaio com leveduras, o crescimento celular foi feito por 24, ou 48 horas, em ágar Sabouraud. As leveduras foram suspensas em solução salina (0,9 % (m/v) NaCl), e após contagem em câmara de Neubauer, ajustadas para uma concentração de aproximadamente 10^6 células. mL^{-1} (Postal *et al.*, 2012).

Em uma placa de 96 poços, já contendo meio de cultura Sabouraud, foram adicionados 10^4 células/poço e então adicionada a PMU, neste ensaio foram utilizados 267 e 134 nmol.L^{-1} como concentração final a ser ensaiada.

As placas foram incubadas por até 48 horas, e acompanhados com leituras de absorvância de 620 nm, e medida de pH em cada poço. Para as leveduras foi ainda feita uma contagem de unidades formadoras de colônias (CFU) (Postal *et al.*, 2012).

Para os ensaios com leveduras foi feito um controle negativo adicional, consistindo de um material purificado a partir de um cultivo bacteriano sem indução da urease por adição de ureia, conforme item 3.3. Os passos

cromatográficos aplicados ao extrato do cultivo sem a indução de urease foram os mesmos descritos no item 3.9. As frações equivalentes às aquelas que conteriam a PMU foram concentradas e ensaiadas nas mesmas condições que a enzima de interesse.

3.11.2 Ensaio de agregação plaquetária

Amostras de sangue humano periférico foram coletadas na presença de 0,313 % (m/v) de citrato de sódio como anti-coagulante, a partir de doadores voluntários, após assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

Para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP), o sangue humano foi centrifugado a 400 x g por 10 minutos a 25 °C. A geração do plasma pobre em plaquetas (PPP) foi feita a partir da centrifugação de 1 mL de PRP a 25000 x g por 1 minuto.

Ambos, PPP e PRP foram incubados por 2 minutos a 37 °C, sob constante agitação, em Lumni-Aggregometer (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA), e após o período de incubação o agonista a ser testado foi adicionado (Carlini, Guimaraes e Ribeiro, 1985; Wassermann *et al.*, 2010). Neste caso, as concentrações de PMU utilizadas foram: 10,9 e 69,7 mmol.L⁻¹. O controle positivo para agregação utilizado foi ADP, na concentração final de 20 µmol.L⁻¹.

3.12 ALINHAMENTO DE ESTRUTURAS E SEQUENCIAS

Sequências de peptídeos resultantes da clivagem de JBU por papaína (Postal *et al.*, 2012) foram alinhados à sequência de PMU utilizando o algoritmo ClustalW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html) (Larkin *et al.*, 2007). O alinhamento deu origem a peptídeos de PMU correspondentes aos encontrados na JBU.

O peptídeo [GKO(GPO)₁₀GKOG] (Morton *et al.*, 1995), teve os aminoácidos hidroxiprolina (O) alterados para prolina (P), e posteriormente alinhado às sequências das ureases de *P. mirabilis* e de *H. pylori*, utilizando o algoritmo ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). As regiões semelhantes foram mapeadas nas respectivas estruturas tridimensionais, obtidas em PyMol (Schrödinger, 2011).

Para a PMU a estrutura utilizada foi o trímero $(\alpha\beta\gamma)_3$ e para HPU foi utilizado um trímero $(\alpha\beta)_3$.

Todas as análises de sequências e estruturas neste trabalho tiveram a colaboração do aluno de pós-graduação Rodrigo Ligabue-Braun, membro do Laprotox (<http://www.ufrgs.br/laprotox/>) e do Grupo de bioinformática estrutural (<http://www.ufrgs.br/bioinfo/>), ambos localizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4 RESULTADOS

4.1 OTIMIZAÇÃO DE PRODUÇÃO DA PMU

A urease de *Proteus mirabilis* utilizada neste trabalho é uma enzima recombinante, expressa na cepa *E. coli* HB101, com o plasmídeo pMID 1010 (Jones e Mobley, 1988). Para dar início a este estudo, foi necessário um *screening* inicial a fim de verificar se as colônias de bactérias expressavam a enzima recombinante. Conforme pode ser visto na figura 9, todas as colônias testadas estavam expressando a enzima de interesse.

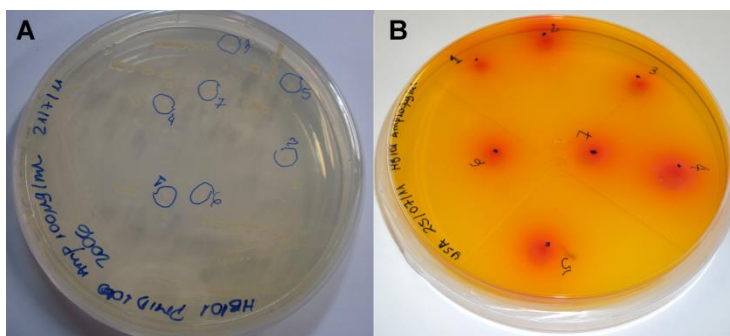


Figura 9: Seleção de colônias produtoras de urease. A) Em meio de cultura LB sólido, colônias de *E. coli* foram cultivadas, e colônias isoladas foram selecionadas. B) A partir do cultivo inicial (A), as colônias selecionadas foram cultivadas em meio USA. A cor avermelhada em torno das colônias denota a produção de amônia a partir da hidrólise de ureia por ação da urease.

As colônias produtoras de urease foram cultivadas e estocadas em meio de cultura LB contendo 25 % de glicerol, a - 80 °C. Após a seleção das bactérias produtoras de urease, optou-se pela RSM (De Lima, Coelho e Contiero, 2010), descrita no item 3.3, como estratégia para otimizar as condições de cultivo e indução da enzima recombinante.

As variáveis testadas no RSM foram apenas duas das variáveis referentes à indução de expressão da enzima, a citar, concentração de ureia e tempo de indução (Tabela 2), e os valores obtidos estão listados na tabela 3.

Tabela 2: Variáveis testadas no ensaio de RSM. Os limites superiores e inferiores são codificados como + e $-\alpha$, o ponto central é 0, e os pontos intermediários estão codificados como + e -1.

| Variáveis | $-\alpha$ | $+\alpha$ | 0 | -1 | +1 |
|-------------------------------|-----------|-----------|------|-----|------|
| Ureia (mmol.L ⁻¹) | 50 | 600 | 325 | 130 | 520 |
| Tempo (h) | 3,3 | 20,0 | 11,5 | 5,5 | 17,6 |

Tabela 3: Desenho experimental e atividade ureásica para construção de uma curva de superfície de resposta. U_{Total} diz respeito à atividade ureásica quantificada experimentalmente. Os valores entre parênteses são valores codificados para cada valor real, ao lado. Uma unidade de atividade ureásica foi definida como a concentração de enzima necessária para liberação de 1 nmol de amônia por minuto de reação enzimática. U_{Total} diz respeito à atividade ureásica quantificada experimentalmente (N=1).

| Experimento | Atividade Ureásica | | |
|-------------|------------------------------|--------------------|-------------|
| | Urea (mmol.L ⁻¹) | Tempo (hora) | U_{Total} |
| 1 | 130 (-1) | 5,5 (-1) | 30198 |
| 2 | 130 (-1) | 17,6 (1) | 15975 |
| 3 | 520 (1) | 5,5 (-1) | 50462 |
| 4 | 520 (1) | 17,6 (1) | 15069 |
| 5 | 325 (0) | 11,5 (0) | 39562 |
| 6 | 325 (0) | 11,5 (0) | 42464 |
| 7 | 325 (0) | 11,5 (0) | 40966 |
| 8 | 325 (0) | 11,5 (0) | 45580 |
| 9 | 325 (0) | 3,3 ($-\alpha$) | 54121 |
| 10 | 325 (0) | 20,0 ($+\alpha$) | 28530 |
| 11 | 50 ($-\alpha$) | 11,5 (0) | 7818 |
| 12 | 600 ($+\alpha$) | 11,5 (0) | 30112 |

Os resultados obtidos na tabela 3, foram utilizados para as análises de variância por ANOVA (Figura 10), que validaram os dados obtidos. Na figura 10 vemos os valores obtidos para os coeficientes de determinação, permanecendo em 95 %.

| ANOVA; R-sqr=,96824; Adj:,95009 | | |
|---------------------------------|---------------------|----------|
| 2 factors, 1 Blocks, 12 Runs; | | |
| DV: U Total | | |
| Factor | SS | df |
| (1)Urea (mmol/L)(L) | 3,234540E+08 | 1 |
| Urea (mmol/L)(Q) | 9,530467E+08 | 1 |
| (2) Time (h)(L) | 9,207890E+08 | 1 |
| 1L by 2L | 1,120356E+08 | 1 |
| Lack of Fit | 5,579188E+07 | 4 |
| Pure Error | 1,996136E+07 | 3 |
| Total SS | 2,385079E+09 | 11 |

Figura 10: Análise de variância por ANOVA. R-sqr e Adj correspondem aos coeficientes de determinação e o coeficiente de determinação ajustado, respectivamente. SS, são a soma dos quadrados e df são os graus de liberdade para cada variável analisada.

Os dados experimentais acima, contidos na tabela 3, resultaram em uma equação polinomial quadrática (equação 2), onde o X_1 se refere à concentração de ureia, e X_2 ao tempo de indução para expressão da PMU. O gráfico que gerou a equação 2, pode ser visto na figura 11.

$$Y_i = 41390,0 + 6368,1X_1 + 10744,4X_2 + 5292,3X_1X_2 + 12013,6X_1^2 \quad (2)$$

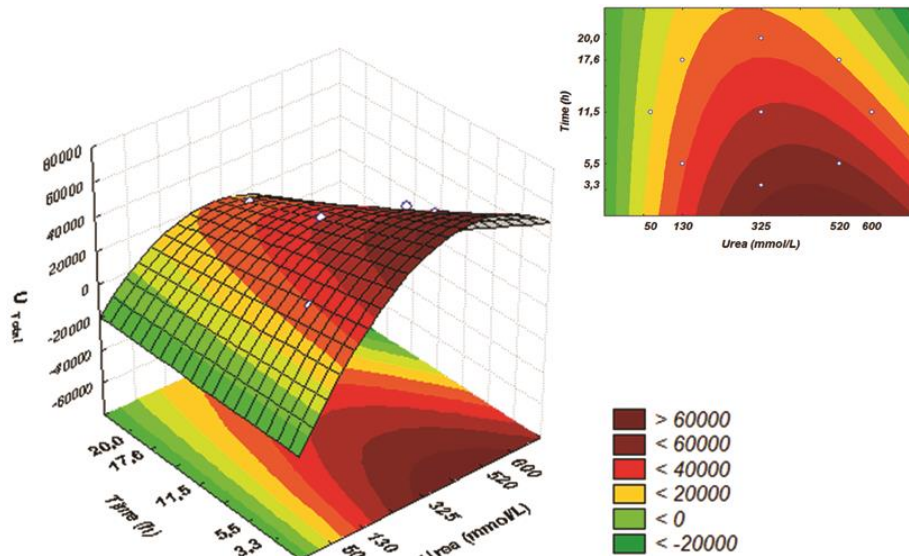


Figura 11: Curva de superfície de resposta. Quanto mais quente a coloração (vermelho escuro) maior a atividade ureásica do material. Quanto mais fria a coloração (verde) menor a atividade.

Observada a superfície de resposta verifica-se que a produção de PMU variou de 7818 a 54121 unidades totais de atividade ureásica nas condições testadas. Tendo a melhor condição para expressão da PMU predita quando se utiliza o tempo mínimo ensaiado para indução, e aproximadamente 500 mmol.L^{-1} de ureia como condição de indução.

A validação deste experimento foi feita através da escolha dos pontos citados na tabela 4. De acordo com o protocolo experimental da RSM, os pontos podem ser quaisquer valores entre os limites superior e inferior utilizados para o experimento analisado anteriormente.

Tabela 4: Validação do experimento de superfície de resposta (RSM). Os valores entre parênteses são valores codificados para cada valor real, ao lado.

| Validação | Urea (mmol.L^{-1}) | Tempo (h) | Valor Experimental | Valor Predito | Dif. (%) |
|-----------|-------------------------------|------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | | | U_{Total} | U_{Total} | |
| 1 | 150 (-0,90) | 5 (-1,08) | 36800 | 32388 | 12 |
| 2 | 500 (0,90) | 3 ($-\alpha$) | 67575 | 59256 | 12 |
| 3 | 500 (0,90) | 5 (-1,08) | 61440 | 54138 | 12 |
| 4 | 100 (-1,15) | 20 ($+\alpha$) | 12681 | 11611 | 8 |

A validação do experimento de RSM é considerada satisfatória quando os valores de atividade ureásica obtidos experimentalmente não diferem em mais de 20 % dos valores preditos, obtidos da equação 2. Conforme a tabela 4, a diferença máxima observada foi de 12 %, validando o experimento em questão.

4.2 PURIFICAÇÃO

4.2.1 Purificação utilizando NaCl como eluente

Com as condições de expressão da PMU estabelecidas em 3 horas de indução e 500 mmol.L⁻¹ de uréia, os extratos brutos obtidos conforme item 3.4 foram utilizados para purificação da enzima. A purificação da PMU recombinante foi inicialmente executada com o sal NaCl como eluente para as cromatografias de troca iônica.

A marcha de purificação com melhor desempenho obtido com este sal, resultou em quatro etapas cromatográficas, sendo as três primeiras, cromatografias de troca iônica, conforme as figuras 12 e 13.

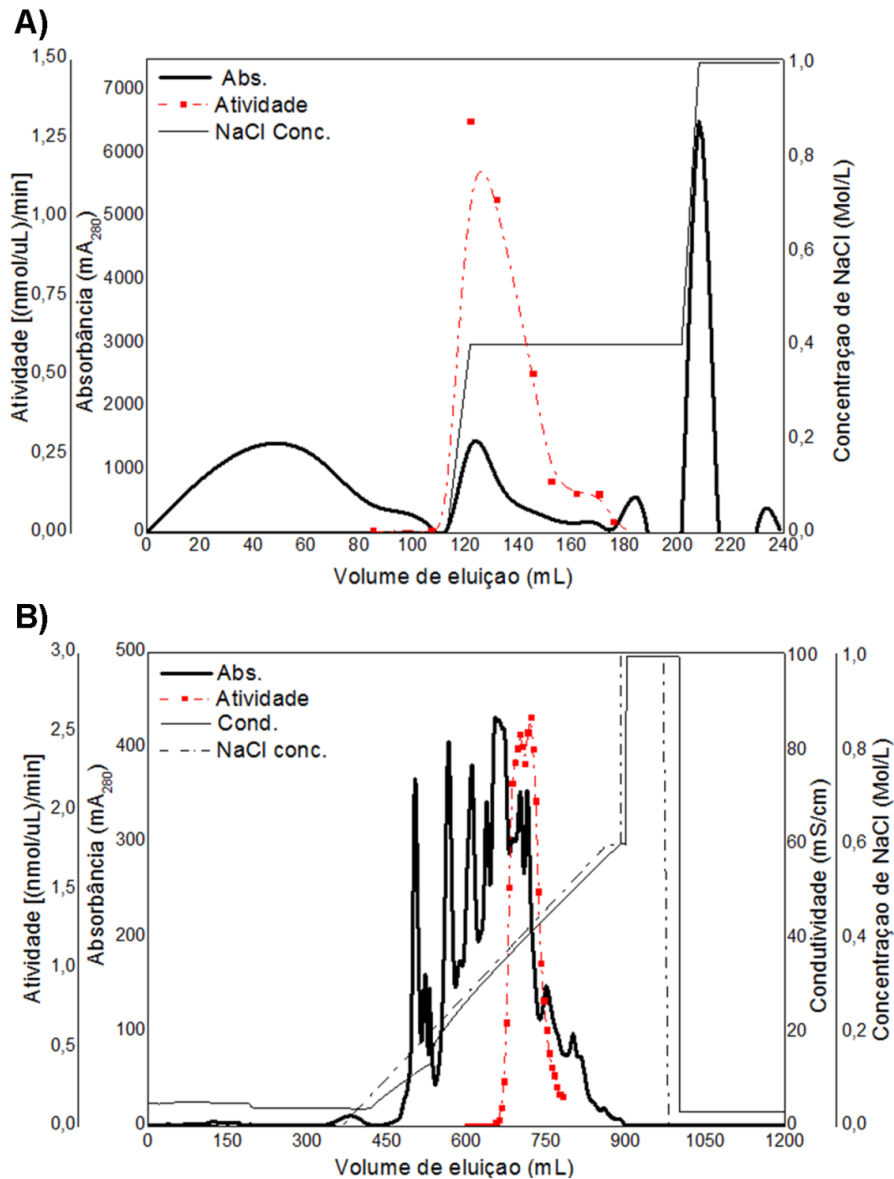


Figura 12: Marcha de purificação utilizando NaCl como eluente. A) HiTrapQ, o material com atividade ureásica foi eluído com 400 mmol.L^{-1} de NaCl em gradiente descontínuo. B) HiLoad Q-Sepharose, o pool de atividade eluído com 385 mmol.L^{-1} de NaCl foi recolhido.

A primeira etapa cromatográfica foi feita com a resina HiTrapQ™ HP (Figura 12A), utilizando PEB em pH 7,5 para execução do equilíbrio da resina, e eluição da urease em gradiente descontínuo de NaCl em PEB pH 7,5. A enzima foi eluída com 400 mmol.L^{-1} de NaCl, recolhida, dialisada contra PEB pH 7,5 e aplicada em uma segunda cromatografia de troca iônica, com a coluna HiLoad

26/10 Q-Sepharose™ HP (Figura 12B).

A Q-Sepharose™ foi feita em sistema ÄKTA com gradiente contínuo de sal de 0 a 600 mmol.L⁻¹ em 500 mL, com fluxo de 3,5 mL/min. Os tampões utilizados para as cromatografias de troca iônica foram os mesmos. A fração contendo atividade foi eluída em 400 mmol.L⁻¹ de NaCl e o *pool* de atividade foi reunido, e dialisado, para ser novamente aplicado na resina Q-Sepharose™. A cromatografia foi feita em sistema ÄKTA com gradiente contínuo de sal variando de 0 a 600 mmol.L⁻¹, em 500 mL, e o pH do tampão utilizado foi trocado para 7,0 (Figura 13).

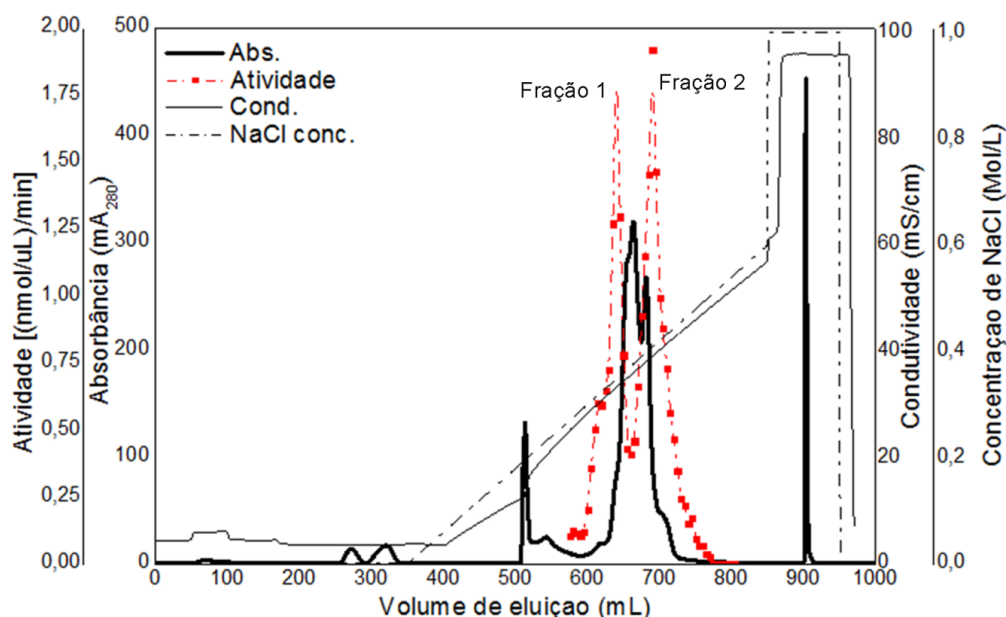


Figura 13: Cromatografia de troca iônica em coluna HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP. A fração 1 foi eluída com 360 mmol.L⁻¹ e a fração 2 com 400 mmol.L⁻¹ de NaCl. Os pools foram recolhidos separadamente e concentrados em Amicon® com membrana de corte de 10 kDa.

Na segunda cromatografia utilizando a coluna Q-Sepharose™, é possível verificar dois picos de atividade ureásica, o pico à esquerda, correspondente à fração 1 apresentando menor relação atividade ureásica/proteína que o pico referente à fração 2, mas ambos foram reunidos e concentrados separadamente

por ultracentrifugação em Amicon com membrana de corte de 10 kDa. Os materiais concentrados foram recromatografados em Superdex 200™, conforme a figura 14A e B.

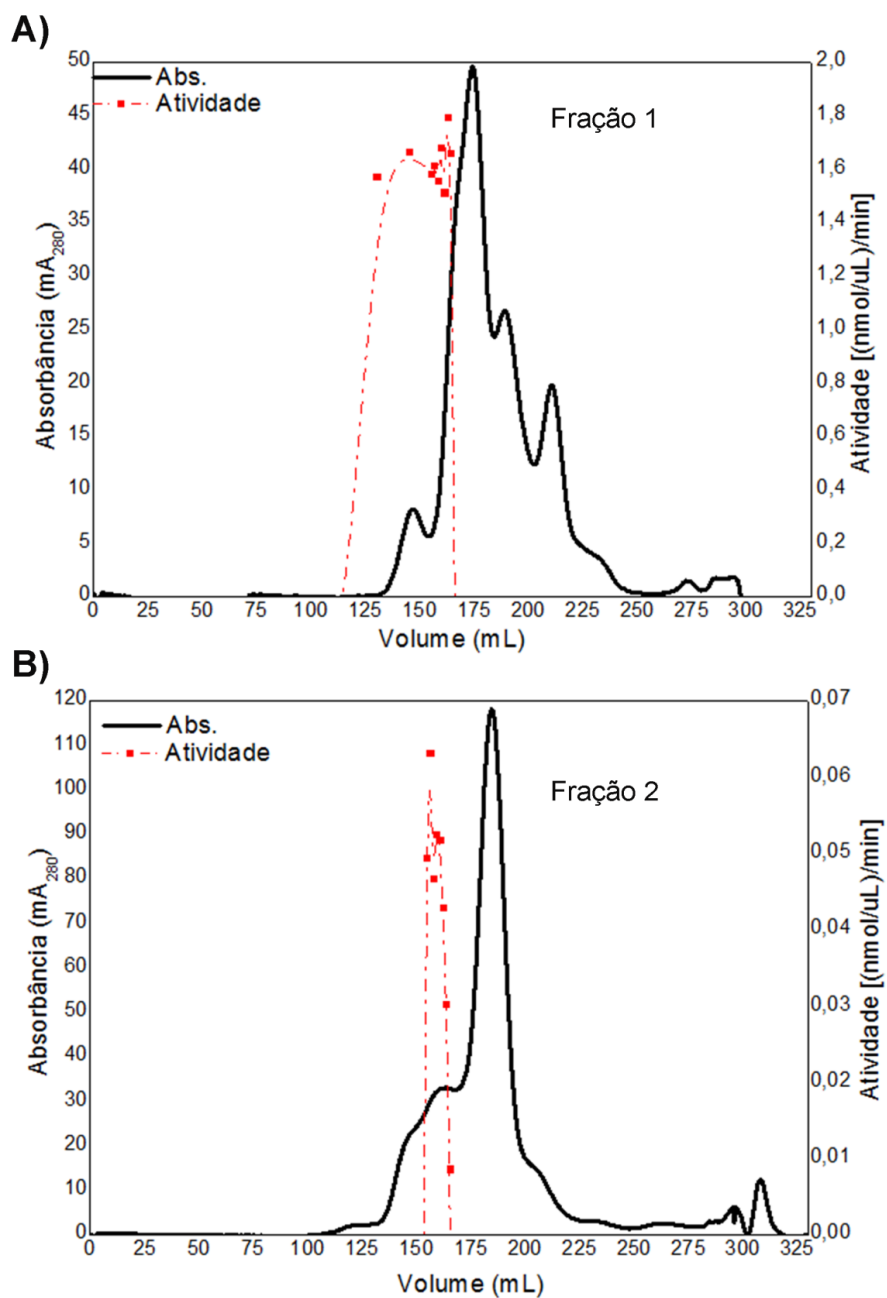


Figura 14: Cromatografia de gel filtração com a resina Superdex 200™. A) Fração 1 extraída da Q-Sepharose™. B) Fração 2 extraída da Q-Sepharose™.

As cromatografias de gel filtração mostradas na figura 14 foram executadas com PEB pH 7,0, as frações reunidas separadamente e novamente concentradas em Amicon® com membrana de corte de 10 kDa para execução de SDS-PAGE (Figura 15).

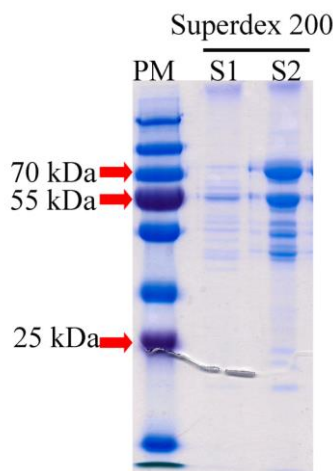


Figura 15: SDS-PAGE dos *pools* reunidos de frações com atividade enzimática, a partir da segunda cromatografia em HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP e da cromatografia de gel filtração. S1 corresponde à gel filtração da fração 1 obtida na troca iônica, e S2 corresponde à fração 2.

Após as etapas descritas acima, e verificada a pureza do material por SDS-PAGE, fez-se uma tabela de purificação para esta marcha, conforme as tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Tabela de purificação para o *pool* recolhido da gel filtração a partir da fração 1 da Q-Sepharose™.

| | U _{Total} | U _{Esp.} | Rendimento (%) | Fator de purificação |
|------------------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| Extrato bruto | 121056 | 0,5 | 100 | 1 |
| HiTrapQ™ | 122075 | 1 | 101 | 2 |
| Q-Sepharose™ pH 7,5 | 155432 | 8 | 128 | 19 |
| Q-Sepharose™ pH 7,0 Fração 1 | 1394 | 0,6 | 1 | 1 |
| Superdex 200™ S1 | 6860 | 14 | 6 | 32 |

Tabela 6: Tabela de purificação para o *pool* recolhido da cromatografia de gel filtração a partir da fração 2 da Q-Sepharose™.

| | U _{Total} | U _{Esp.} | Rendimento (%) | Fator de purificação |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|----------------|----------------------|
| Extrato bruto | 121056 | 0,5 | 100 | 1 |
| HiTrapQ™ | 122075 | 1 | 101 | 2 |
| Q-Sepharose™ pH 7,5 | 155432 | 8 | 128 | 19 |
| Q-Sepharose™ pH 7,0 Fração2 | 6048 | 1,5 | 5 | 3 |
| Superdex 200™ S2 | 2142 | 12 | 2 | 27 |

De acordo com as tabelas de purificação acima, o material obtido a partir da fração 1 da Q-Sepharose™ apresentou melhor rendimento (Tabela 5), ficando em 6 %, e um fator de purificação em 32 X, maior que o fator observado para a fração 2 (Tabela 6). A presença de menos contaminantes no material extraído da gel filtração através da fração 1 da troca iônica pode ser visualizada pelo gel de eletroforese na figura 15.

4.2.2 Purificação utilizando KCl como eluente

Da mesma forma que para a estratégia de purificação com NaCl, partiu-se de extratos brutos obtidos conforme item 3.4, e a purificação da urease foi iniciada com o uso de KCl como eluente para as cromatografias de troca iônica. A purificação da enzima foi feita em três etapas de cromatografias: duas trocas aniônicas seguidas de uma cromatografia de gel filtração.

A primeira etapa de purificação foi uma cromatografia de troca-iônica, com a resina HiTrapQ™ HP (Figura 16A). A coluna foi equilibrada com tampão PEB em pH 7,5, e a eluição do material foi feita por gradiente descontínuo de KCl em PEB pH 7,5. A atividade de PMU concentrou-se na eluição com 400 mmol.L⁻¹ de KCl.

A fração recolhida da HiTrapQ™ foi dialisada contra PEB e então aplicada em uma segunda cromatografia de troca iônica (Figura 16B), utilizando-se a coluna Q-Sepharose™. Os tampões foram os mesmos utilizados anteriormente, tendo sido esta cromatografia realizada no sistema ÄKTA com gradiente contínuo de sal, de 0 a 600 mmol.L⁻¹ em 500 mL e fluxo de 3,5 mL.min⁻¹. As frações que

apresentaram atividade ureásica foram reunidas e concentradas por ultracentrifugação em Amicon[®] (Millipore, Billerica, MA, USA) com membrana de corte de 10 kDa.

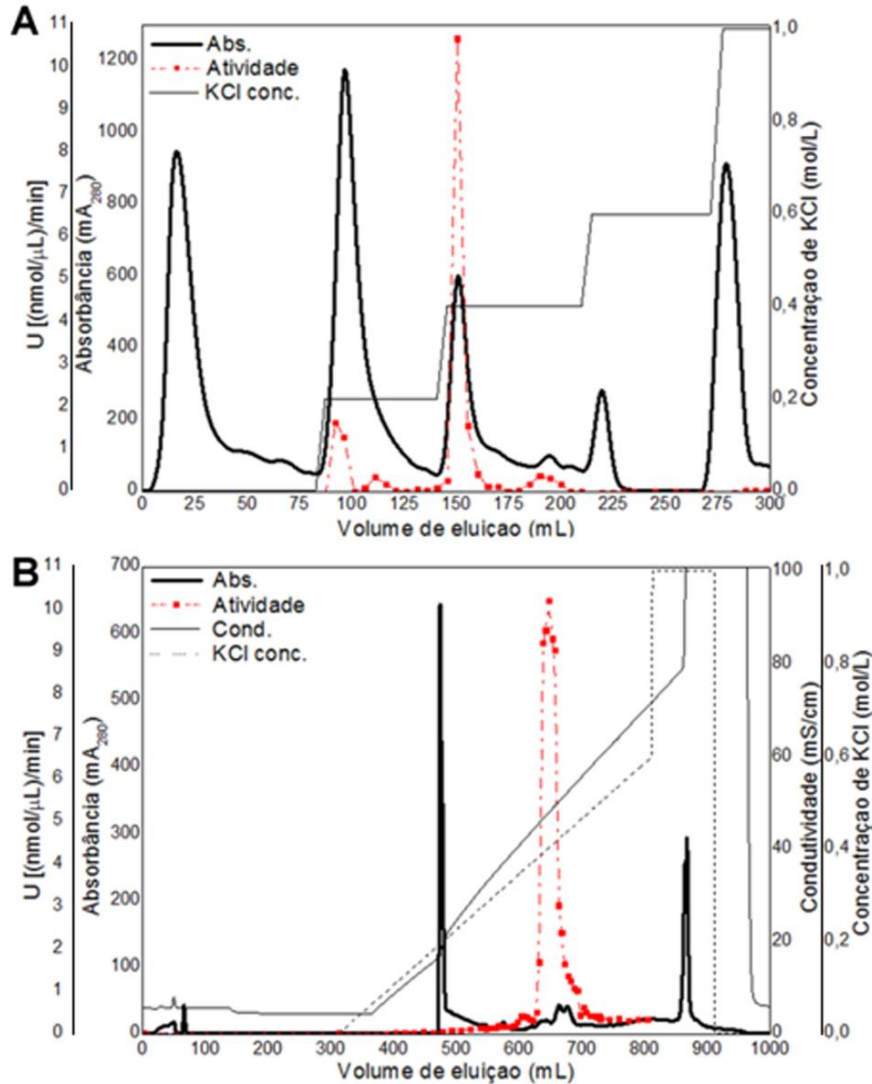


Figura 16: Marcha de purificação utilizando KCl como eluente. Cromatografias de troca iônica em HiTrapQ™ HP e HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP. Etapas de purificação para PMU recombinante. A) HiTrapQ™ HP, o material com maior atividade ureásica foi eluído com 400 mmol.L⁻¹ de KCl em gradiente descontínuo. B) HiLoad 26/10 Q-Sepharose™ HP, o pool de atividade eluído com 402 mmol.L⁻¹ de KCl foi recolhido e concentrado em Amicon® de 10 kDa. Os cromatogramas acima são representativos de diferentes marchas cromatográficas.

O material concentrado na eluição da segunda cromatografia de troca iônica foi submetido a uma coluna de gel filtração (Superdex 200™26/60-pg), com PEB pH 7,0. O cromatograma está mostrado na figura 17A. As frações com atividade ureásica estão indicadas.

A figura 17, painel B à esquerda, mostra um SDS-PAGE 12,5 % e à direita, Western blot das frações reunidas correspondentes a cada etapa cromatográfica. Em ambos pode-se detectar a banda correspondente à subunidade maior desta enzima (Ure α), em aproximadamente 70 kDa.

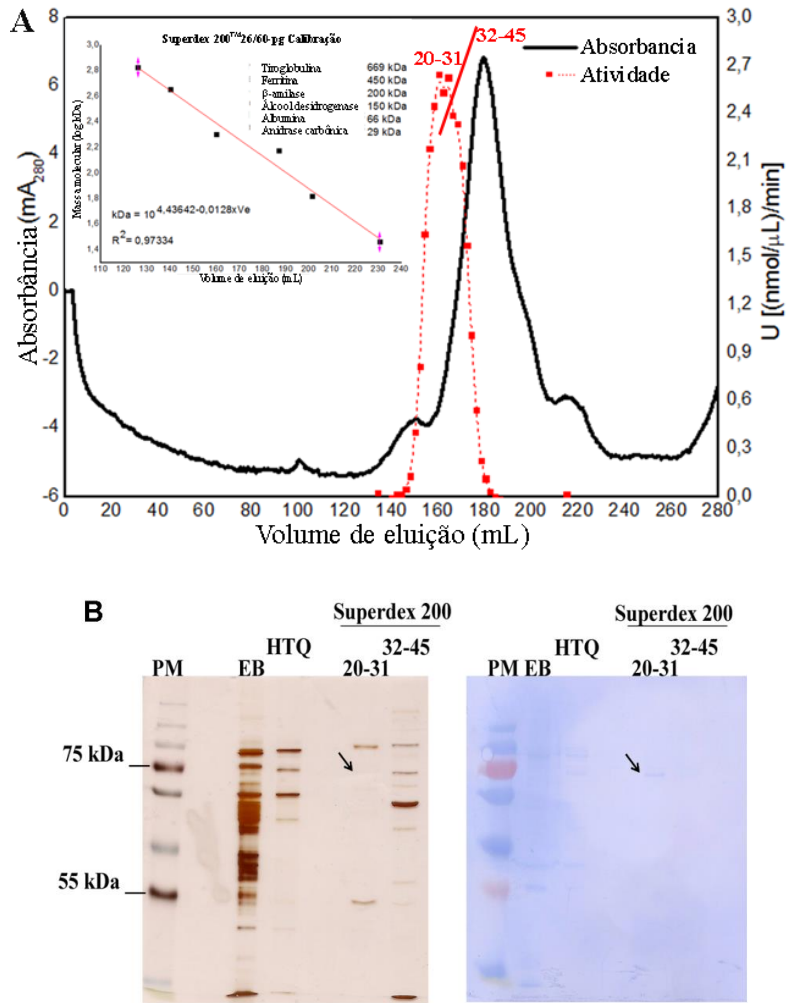


Figura 17: Cromatografia de Gel filtração e acompanhamento das etapas de purificação. A) Superdex 200. As frações ativas foram reunidas e concentradas para o SDS-PAGE. B) SDS-PAGE (esquerda) a 12,5 %, corado com nitrato de prata, e Western blot (direita), de frações das etapas cromatográficas. EB, extrato bruto; HTQ, fração ativa da HiTrapQ; fração 20-31 e 32-45, *pool* de frações da Superdex 200, como indicado no cromatograma (painel A). Os cromatogramas acima são representativos de diferentes marchas cromatográficas.

Após a última etapa, a PMU foi recuperada com um fator de purificação de 64 vezes e um rendimento de 11 % (Tabela 7).

Tabela 7: Tabela de purificação para PMU. U diz respeito à unidade de atividade ureasica, definida como a concentração de enzima necessária para liberação de 1 nmol de amônia por minuto de reação enzimática

| | U _{Total} | U _{Esp.} | Proteínas totais (µg) | Rendimento (%) | Fator de purificação |
|---------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|-------------------------|
| Extrato bruto | 923 | 9 | 99986 | 100 | 1 |
| HiTrapQ™ | 708 | 129 | 5494 | 77 | 14 |
| Q-Sepharose™ | 164 | 161 | 1020 | 18 | 17 |
| Superdex 200™ | 103 | 595 | 173 | 11 | 64 |

Corroborando dados disponíveis na literatura (Jones e Mobley, 1987; Heimer e Mobley, 2001; Krajewska, 2009), a massa molecular da PMU estimada por cromatografia de gel filtração foi de 244 kDa, correspondendo à forma trimérica ($\alpha\beta\gamma$)₃ da enzima.

O material reunido e concentrado a partir da cromatografia de gel filtração foi aplicado em um SDS-PAGE e em um gel nativo, no SDS-PAGE podemos verificar a presença de diferentes bandas proteicas, porém na figura 18 (canaleta 1), vemos apenas uma.

No zimograma mostrado na figura 18 verifica-se a presença de duas bandas proteicas com atividade ureolítica, sendo que a região com atividade enzimática mais intensa é a mesma onde se vê a presença de proteína no gel nativo.

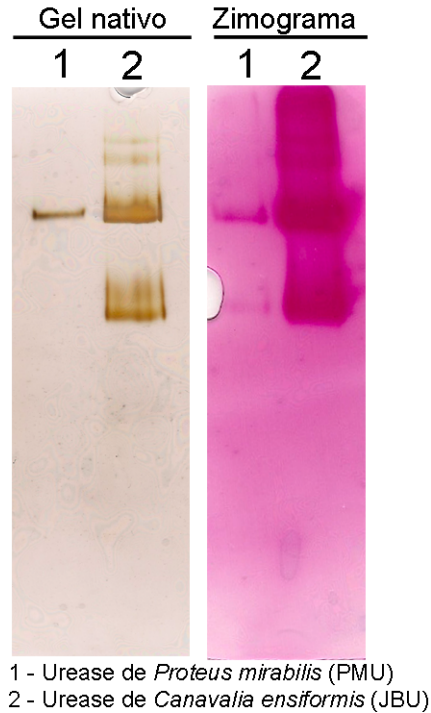


Figura 18: Eletroforese em gel nativo (a esquerda) corado com nitrato de prata e o zimograma (direita) ambos feitos com 7,5 % de poliacrilamida. Na canaleta 1, PMU após a Superdex 200TM, 1,3 µg de proteína. Na canaleta 2, JBU 7 µg de proteína.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização inicial da PMU foi feita a partir de sua atividade ureolítica, a fim de averiguar a estabilidade da enzima frente a sais, temperatura de ensaio, pH, e parâmetros cinéticos.

4.3.1 Determinação das constantes cinéticas

A determinação do K_M e da velocidade enzimática máxima da urease foram feitas com 10 valores de concentração de substrato, até onde foi possível obter-se leituras adequadas. Os valores obtidos variaram entre 108,7 e 167 mU.s⁻¹ para a velocidade máxima e o K_M estimado variou de 32,8 a 61 mmol.L⁻¹ (Figura 19), dependendo da análise executada.

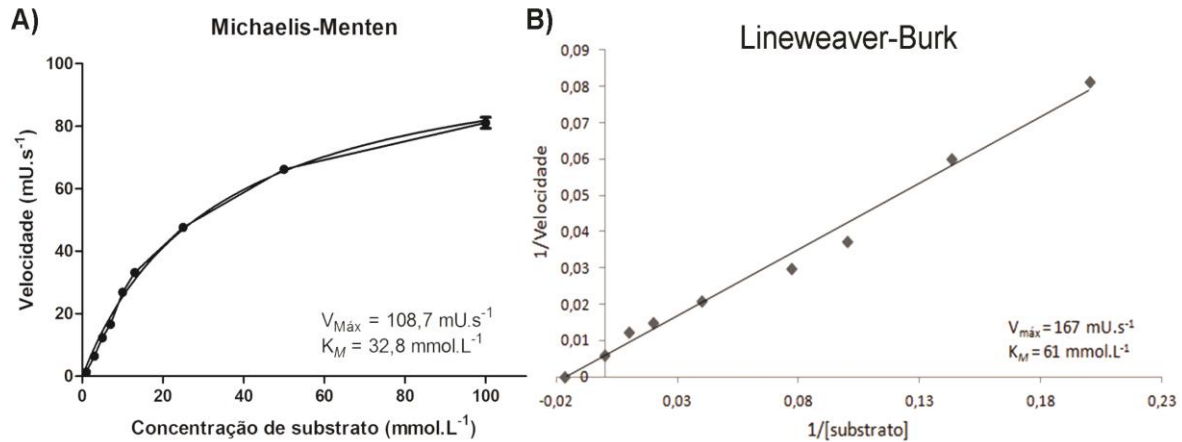


Figura 19: Determinação da constante de Michaelis-Menten e velocidade máxima para a PMU. A) Obtenção das constantes cinéticas por curva de Michaelis-Menten. B) Obtenção das constantes cinéticas por gráfico de Lineweaver-Burk. Todos os ensaios foram realizados a 37 °C (N=4).

4.3.2 Inibição por ácido acetohidroxâmico (AAH)

A enzima recombinante foi testada frente a um inibidor irreversível de ureases, o Ácido acetohidroxâmico (AAH, figura 20). Cerca de 80 % da atividade da PMU foi abolida após incubação de 24 h com AAH a 0,5 mmol.L⁻¹ e uma inibição ligeiramente maior, na ordem de 85% foi atingida com 1 mmol.L⁻¹.

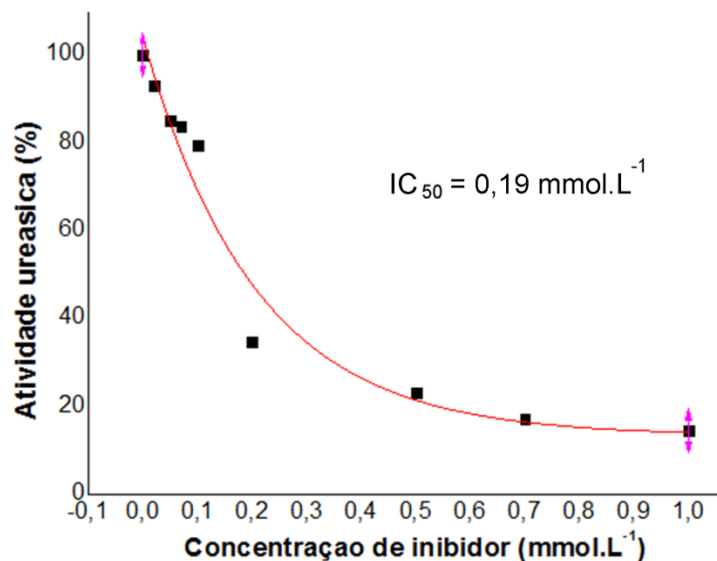


Figura 20: Ensaio de inibição enzimática para PMU frente à presença de ácido acetohidroxâmico. A referência de 100 % é o controle negativo para inibição, onde se têm a PMU apenas na presença de tampão e substrato. Em detalhe, a curva de inibição para as concentrações menores de AAH (N=3).

Na tabela 8, fez-se um apanhado dos valores de constantes cinéticas, pH ótimo e também IC_{50} para o inibidor AAH de diferentes ureases, afim de comparar a PMU purificada neste trabalho com estas.

Tabela 8: Comparação entre parâmetros cinéticos de diferentes ureases. Urease de *P. mirabilis* (PMU), urease de *Gossypium hirsutum* (GHU), urease embrião específica de *Glycine max* (SBU), urease de *C. ensiformis* (JBU) e urease de *Cryptococcus gattii* (CGU).

| | PMU | GHU ^a | SBU ^b | JBU ^c | CGU ^d |
|---|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Forma nativa | ($\alpha\beta\gamma$) ₃ | α_6 | α_6 | α_6 | α_2 |
| K_M (mmol.L ⁻¹) | 32,8 - 61 | 0,12 - 0,15 | 0,2 - 0,6 | 2 - 3,6 | 1,67 - 2,31 |
| $V_{m\acute{a}x}$ | 108 - 167 | 29 | 1.6000 | 13.700 | 17,8 |
| pH ótimo | 8,0 | 7,5 | 7,5 | 7,5 | 8,0 |
| IC_{50} (μ mol.L ⁻¹) | 190 | 152 | 216 | 42 | 36 |

^a(Menegassi et al., 2008), ^b(Follmer et al, 2004), ^c(Follmer et al., 2001), ^d(Feder, 2008; 2012).

Observa-se que, apesar da homologia e alto grau de conservação do sítio

catalítico dessas enzimas, alguns dos parâmetros cinéticos analisados variaram bastante.

4.3.3 Estabilidade da PMU frente a pH, temperatura e sais

A figura 21A mostra que a enzima apresentou-se estável quando estocada à 4 °C por 24 horas. Esta condição serviu como um controle neste experimento. Por outro lado, a PMU manteve 85 e 40 % da atividade enzimática quando incubada a 25 e 37 °C por 24 h, independente do pH testado.

A figura 21B mostra o ensaio de estabilidade enzimática da PMU quando incubada em diferentes valores de pH, antes do ensaio enzimático, feito em pH 7,5. Incubações por 24 h na faixa de pH entre 7,0 e 9,5 não mostraram diferenças significativas na atividade enzimática, demonstrando a estabilidade da PMU em uma faixa de pH relativamente ampla.

A PMU é ativa na faixa entre o pH 5,0 e pH 10,0, com o máximo em pH 8,0, conforme mostrado na figura 21C e 21D.4. Mesmo em pH relativamente baixo, como pH 5,0, a enzima ainda retém cerca de 35 % da atividade, quando comparada com o pH ótimo, de 8,0.

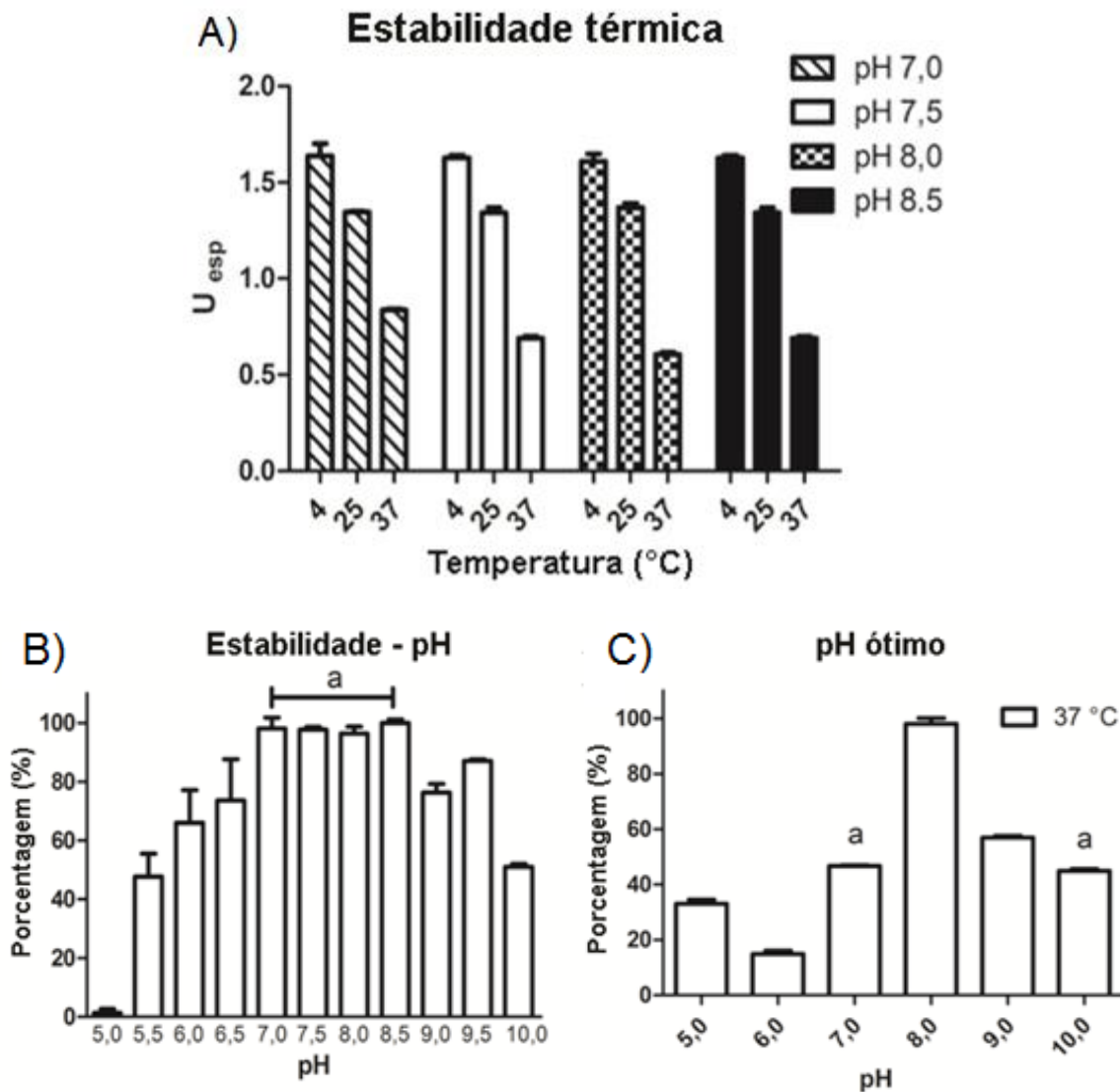


Figura 21: Ensaio de atividade ureásica em diferentes pHs de ensaio, incubação e temperatura. A) PMU estocada por 24 horas sob diferentes pHs e temperaturas. Neste experimento $97,4 \text{ nmol.L}^{-1}$ de urease foram ensaiados. B) Para a estabilidade frente à diferentes pHs, as amostras foram incubadas nos pHs indicados por 24 h, antes da medida da atividade ureásica, feita por 15 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. C) O pH ótimo da PMU foi determinado. A atividade enzimática foi realizada nos valores de pHs indicados, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e por 15 minutos. Legenda completa na página 61.

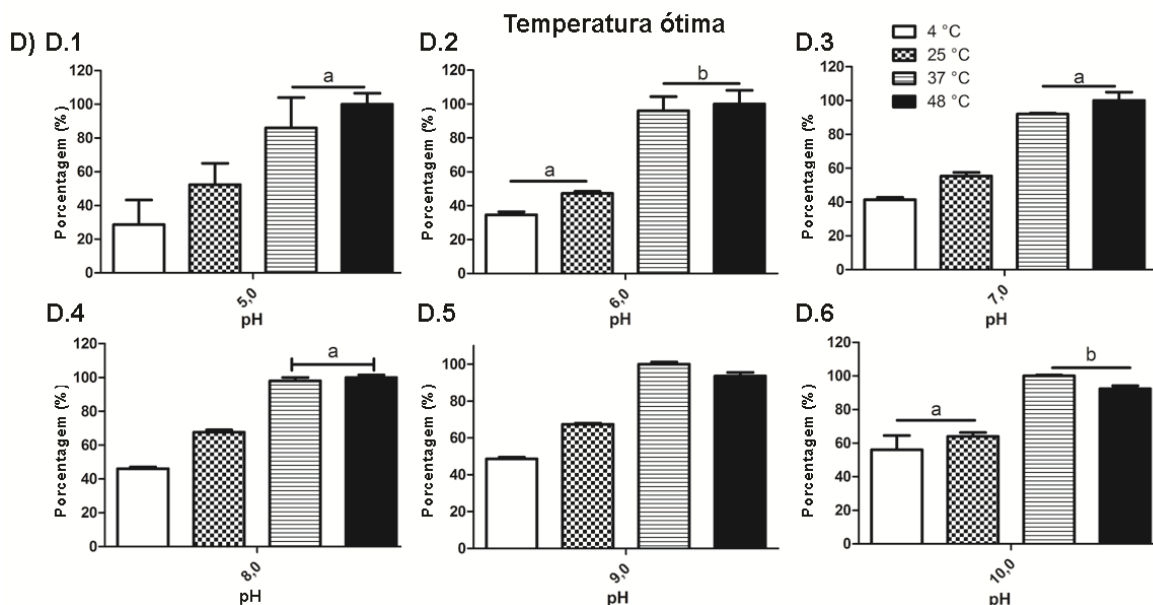


Figura 21: Ensaios de atividade ureásica em diferentes pHs de ensaio, incubação e temperatura. A) PMU estocada por 24 horas sob diferentes pHs e temperaturas. Neste experimento $97,4 \text{ nmol.L}^{-1}$ de urease foram ensaiados. B) Para a estabilidade frente à diferentes pHs, as amostras foram incubadas nos pHs indicados por 24 h, antes da medida da atividade ureásica, feita por 15 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. C) O pH ótimo da PMU foi determinado. A atividade enzimática foi realizada nos valores de pHs indicados, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e por 15 minutos. D) (D.1 a D.6) A temperatura ótima para execução da atividade ureásica foi determinada em diferentes temperaturas e pHs conforme indicado. Para os diferentes pHs foram utilizados os tampões a seguir: 50 mmol.L^{-1} de Acetato de sódio para pH entre 5,0 e 6,0, 50 mmol.L^{-1} de Fosfato de sódio para pHs entre 7,0 e 8,0, 50 mmol.L^{-1} de Carbonato de sódio para pH entre 9,0 e 10,0. Os dados representam média e desvio padrão ($N=3$), barras compartilhando a letra *a* indicam condições que não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Para ensaios de atividade ureásica, foram verificadas também as melhores condições de temperatura e pH. A variação de pH foi feita em uma faixa ampla, de 5 a 10, e em quatro diferentes temperaturas. Quando levado em consideração apenas as temperaturas, não houve diferença estatística entre os ensaios a 37 ou $48 \text{ }^\circ\text{C}$, no entanto, o pH mais apropriado para os ensaios ficou em torno de 8,0, como pode ser verificado na figura 21D (D1-D6), acima.

Foi ainda testado o comportamento desta enzima frente a uma mistura de sais mimetizando a urina humana, conforme Prywer e Torzewska, 2012, e ainda com os mesmo sais isoladamente. A PMU manteve-se relativamente estável na presença das soluções salinas testadas, verificando-se um aumento maior que 100 % da atividade ureásica, exceto para o KH_2PO_4 , que aumentou a atividade em 50 % quando mantida a 4 °C (Figura 22A.1). A 37 °C verificou-se um aumento significativamente maior da atividade da PMU, tanto nos ensaios com os sais em separado (Figura 22A.2), como no material ensaiado com a mistura de sais (Figura 22B). Nos ensaios enzimáticos realizados a 37 °C, todas as soluções salinas aumentaram em pelo menos 150 % a atividade basal quando incubados por 12 horas (Figura 22A.2), e com a mistura dos sais (Figura 22B), este aumento é mais expressivo, chegando a mais de 200 % em relação ao controle. Em tempos menores de incubação, as soluções salinas isoladamente aumentaram a atividade em cerca de 50 % do controle, mas com a mistura de sais a atividade ureásica é diminuída em aproximadamente 60 %.

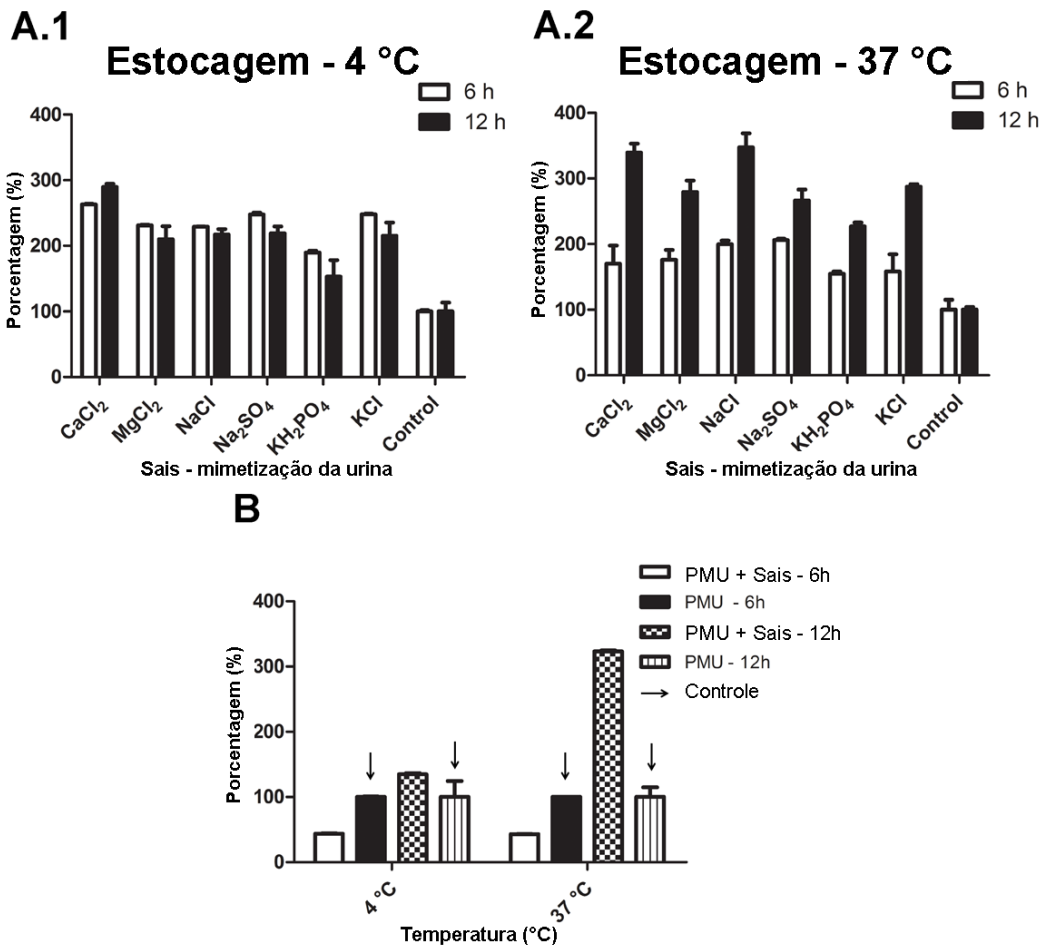


Figura 22: Ensaio de estabilidade enzimática na presença de diferentes sais. A) A PMU foi incubada a 4 °C (A.1) e 37 °C (A.2) com diferentes sais, por 6 (barra clara) e 12 horas (barra escura). B) Foi realizada uma incubação, por 6 e 12 horas da PMU com uma mistura dos sais utilizados em A, para mimetizar a urina humana. As concentrações de sais utilizados foram de acordo com Prywer e colaboradores (Prywer e Torzewska, 2012). 5.9 mmol.L⁻¹ de Cloreto de cálcio (CaCl₂), 6.8 mmol.L⁻¹ Cloreto de magnésio (MgCl₂), 78.7 mmol.L⁻¹ Cloreto de sódio (NaCl), 16.2 mmol.L⁻¹ Sulfato de sódio (Na₂SO₄), 20.6 mmol.L⁻¹ Fosfato de potássio (KH₂PO₄), 21.5 mmol.L⁻¹ Cloreto de potássio (KCl). A concentração de PMU utilizada em todos os ensaios foi 370 nmol.L⁻¹. Cada experimento apresenta seu 100 %, sendo este, a PMU ensaiada apenas na presença de PEB. As setas em B indicam os controles de cada condição (p < 0,05).

4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.4.1 Atividade antifúngica

Neste estudo investigamos se a urease de *P. mirabilis* também apresenta atividade contra o crescimento de diferentes fungos e leveduras, como descrito para ureases de plantas (jack bean, soja, algodão) e da bactéria *H. pylori*.

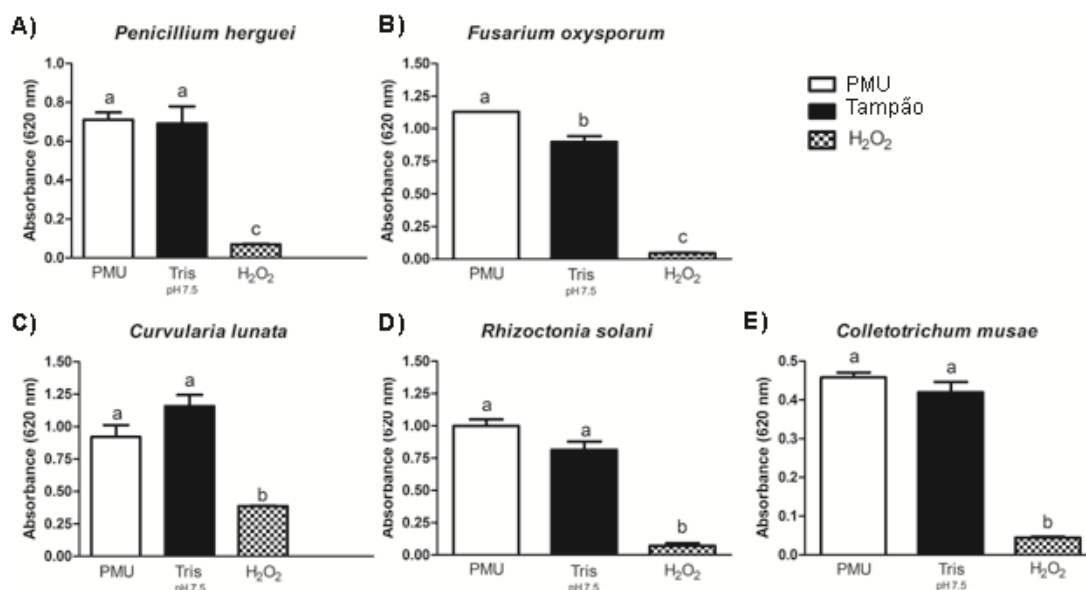


Figura 23: Efeito da PMU sobre a germinação e crescimento de fungos filamentosos. A) *Penicillium herquei*. B) *Fusarium oxysporum*. C) *Curvularia lunata*. D) *Rhizoctonia solani*. E) *Colletotrichum musae*. O controle positivo, onde deve haver inibição do crescimento, foi executado na presença de H₂O₂ (10 %). O controle negativo foi feito na presença de tampão Tris 20 mmol.L⁻¹ pH 7.5). A concentração de urease utilizada para este ensaio foi de 2 μmol.L⁻¹ e 10⁶ esporos de fungos por condição. O ensaio ocorreu por 48 horas a 28 °C. Os dados mostram médias e desvio padrão de 3 replicatas. Barras assinaladas com a mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05).

Conforme visto na figura 23, a presença da PMU não afetou significativamente os fungos nas condições testadas.

A próxima estratégia consistiu em testar se a PMU poderia interferir no crescimento de leveduras, e para tal foram feitos ensaios com três espécies do gênero *Cândida* (Figura 24), por ser um micro-organismo frequentemente encontrado em infecções do trato urinário (Vlamakis, 2011).

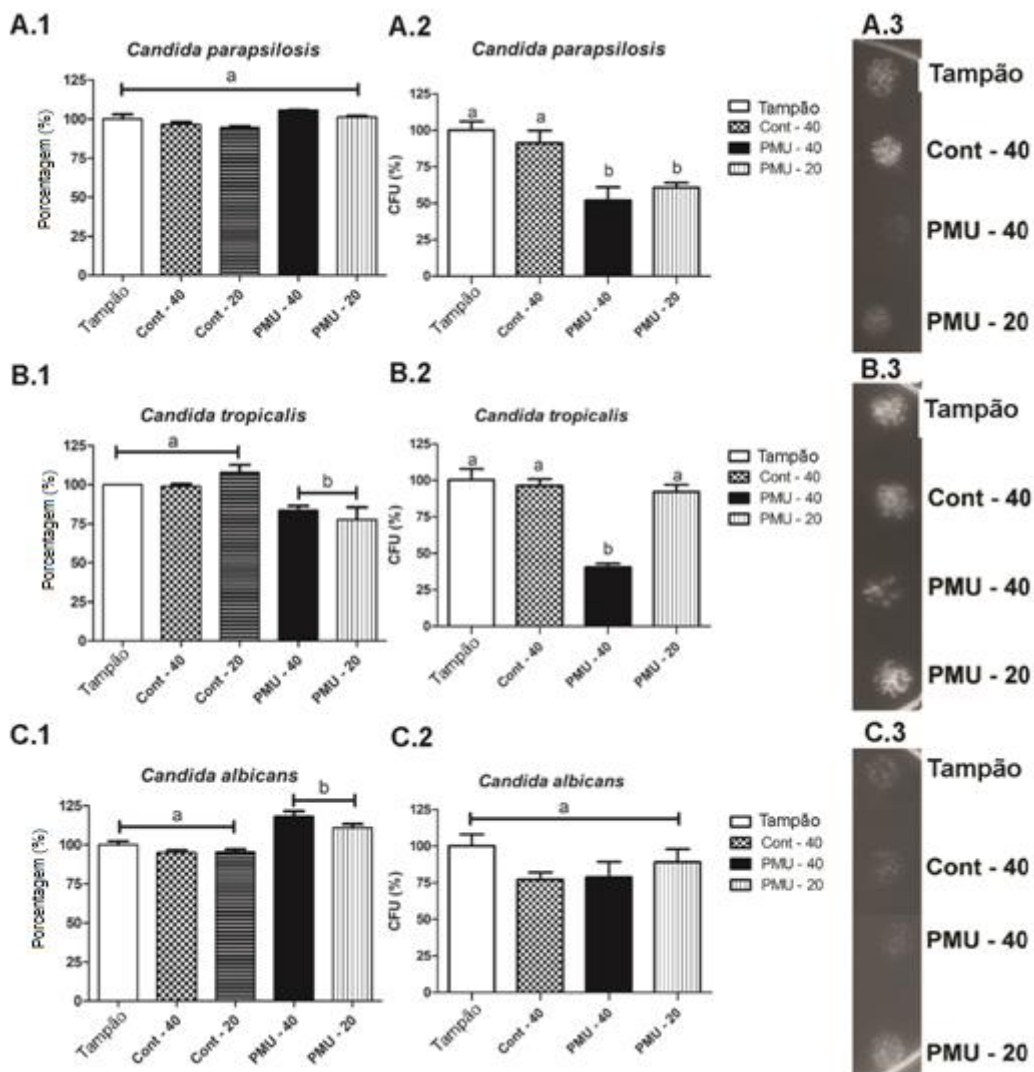


Figura 24: Teste de atividade antifúngica da PMU. O ensaio foi feito com três diferentes espécies de *Candida*. A) *Candida parapsilosis*, B) *Candida tropicalis* e C) *Candida albicans*. Em A.1, B.1 e C.1, a multiplicação das leveduras foi acompanhada espectrofotometricamente, por leitura de absorbância em 620 nm após 48 horas de cultivo a 28 °C. A.2, B.2 e C.2, estão apresentadas as análises de unidades formadoras de colônias (CFU) das leveduras recuperadas das placas após 48 h de incubação com PMU ou tampão. Para cada ensaio foram utilizados 10^4 células. No eixo x, em (PMU-40) foram adicionados 267 nmol.L^{-1} de PMU e em (PMU-20), a concentração de PMU foi de 134 nmol.L^{-1} . Cont - 40 corresponde às frações equivalentes de purificação de um cultivo bacteriano sem a indução da PMU, conforme descrito no item 3.11.1. A.3, B.3 e C.3 correspondem às placas para CFU. Os dados mostram médias e desvio padrão de 3 replicatas. Barras assinaladas com a mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A PMU é capaz de interferir no crescimento de duas das espécies de *Candida* testadas, conforme verificado nas figuras 24B e C itens 1, 2 e 3. No caso da *Candida tropicalis*, apesar da análise por turbidimetria sugerir que não há inibição das leveduras com a presença de PMU (Figura 24A), verificou-se uma diminuição nas UFCs na maior dose da proteína (Figura 24.3), e por microscopia óptica, observou-se a formação de pseudo-hifas que é resposta característica de estresse para leveduras (Figura 25) (Postal *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2012).

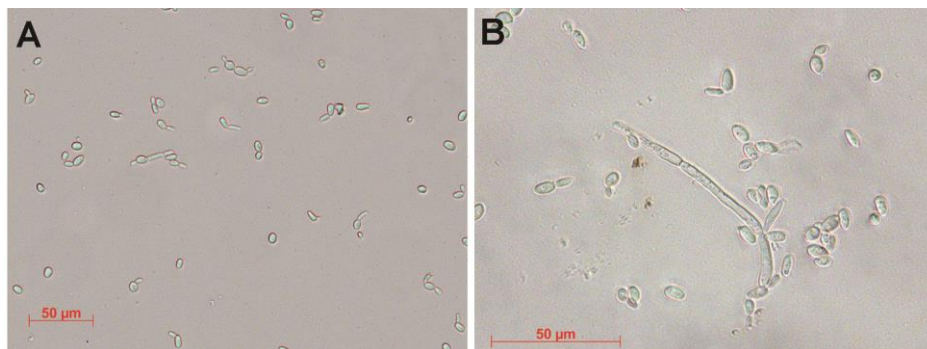


Figura 25: Alteração morfológica em leveduras causada pela adição de PMU. A. Controle negativo, *Candida tropicalis* apenas na presença de tampão. B. *Candida tropicalis* após cultivo de 48 horas na presença de 267 nmol.L^{-1} de PMU.

4.4.2 Agregação plaquetária

A urease de *P. mirabilis* também foi testada com relação à capacidade de promover agregação plaquetária. Para isso, a PMU foi ensaiada com PRP. Em função do baixo rendimento das purificações, apenas duas doses de PMU foram testadas e poucas repetições foram feitas. Ainda assim, foi possível observar que o contato da PMU com plaquetas humanas produz dois tipos de respostas, aparentemente dependendo da fonte das plaquetas.

Como pode ser visto na figura 26, a PMU foi capaz de induzir agregação em plaquetas humanas, na concentração de $69,7 \text{ nmol.L}^{-1}$, fato não verificado em concentrações de $10,9 \text{ nmol.L}^{-1}$ da proteína.

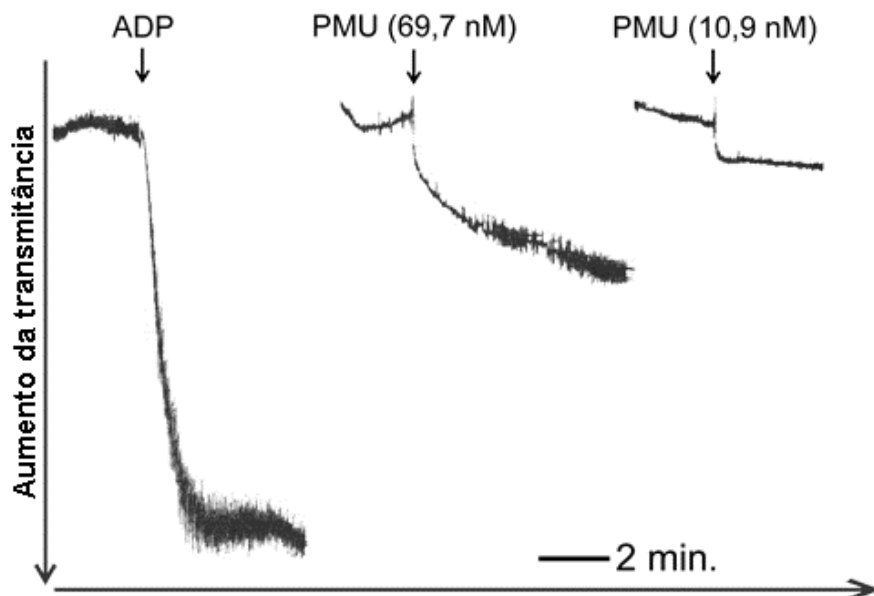


Figura 26: Ensaio de agregação plaquetária. O volume de PRP para o ensaio foi de 300 μL , e o controle positivo de agregação utilizado foi Adenosina difosfato (ADP) em concentração de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A PMU foi ensaiada nas concentrações de 10,9 e 69,7 nmol.L^{-1} . Resultados típicos (N=5), PRP obtido de doadores do sexo feminino.

A ação da PMU e do ADP foram analisadas em um experimento onde ambos agonistas foram utilizados sequencialmente. Neste caso, a PMU foi adicionada conforme descrito anteriormente. Após 4 minutos de ensaio com a PMU, o ADP foi adicionado ao PRP. Neste caso (Figura 27), a agregação provocada por ADP foi alterada pela presença prévia da PMU, especialmente na segunda onda de agregação plaquetária.

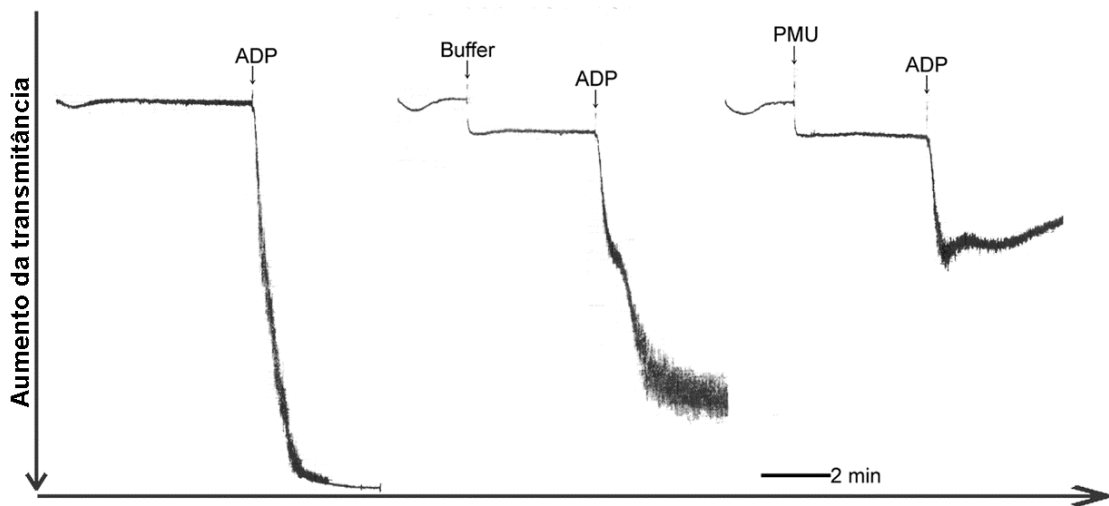


Figura 27: Ação da PMU sobre o efeito do ADP durante o processo de agregação plaquetária. ADP – $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de Adenosina difosfato, tampão utilizado – 20mmol.L^{-1} de fosfato de sódio, tampão em que a PMU está contida para execução deste ensaio. A concentração de PMU utilizada foi de 69nmol.L^{-1} . Resultados típicos (N=2), PRP obtido a partir de plaquetas de doador do sexo masculino.

Na presença de ADP, as plaquetas são ativadas dando início ao processo de agregação. Quando utilizado apenas ADP, ou ainda quando combinados fosfato de sódio 20mmol.L^{-1} e ADP, aplicados com intervalo de 4 minutos entre adição do tampão ou da PMU, pode-se verificar duas ondas de agregação. Na situação apresentada na figura 276, onde foi adicionada PMU ao PRP humano e não foi observada a agregação, o ADP foi adicionado após 4 min, verificando-se que a agregação por ele se comportou de forma diferente, com a inibição da segunda onda de agregação. Outra diferença bastante significativa é referente ao tamanho dos agregados. Nos controles foram obtidos agregados bastante grandes, já quando em presença da PMU, os agregados eram abundantes, e todos bastante pequenos (dado não mostrado).

4.5 ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E ESTRUTURAS

4.5.1 Alinhamentos entre PMU e peptídeos oriundos da JBU

Postal e colaboradores, 2012, descreveram que peptídeos produzidos por hidrólise da JBU com papaína possuíam ação antifúngica. Alguns desses peptídeos foram identificados por espectrometria de massas (Postal *et al.*, 2012). Para comparação, peptídeos da JBU, obtidos por hidrólise com papaína tiveram suas sequências alinhadas à sequência da PMU (Figura 28).

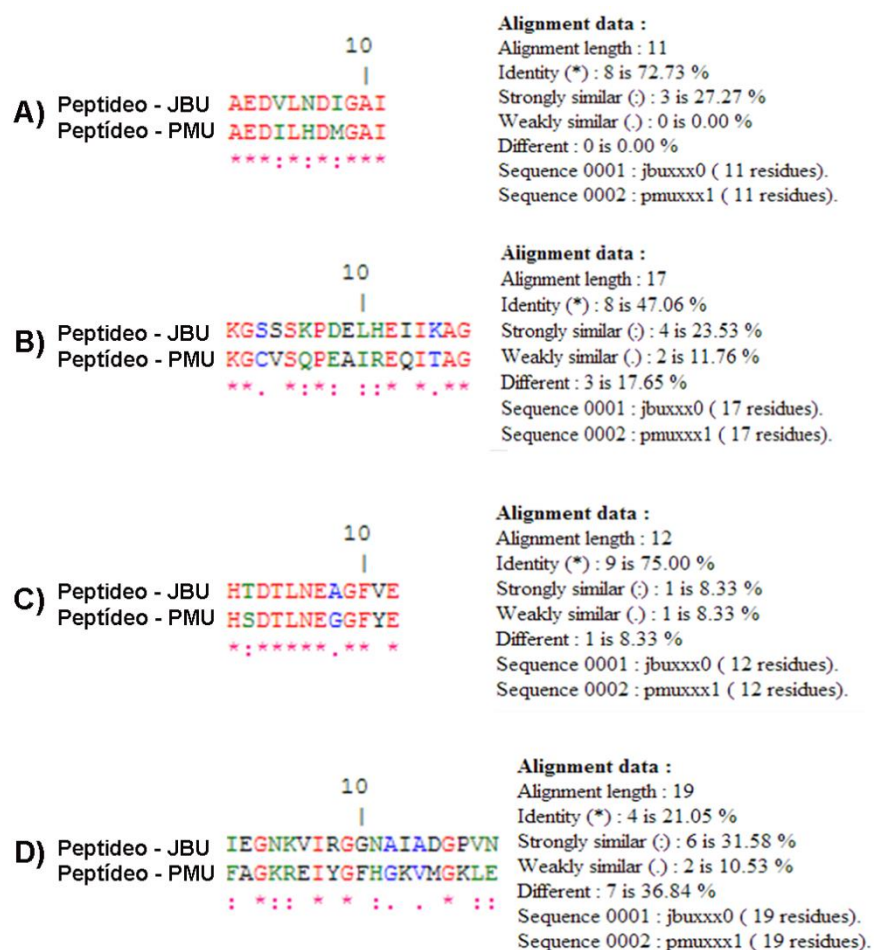


Figura 28: Alinhamento de sequências entre peptídeos a partir da JBU, e as sequencias equivalentes em PMU. Os diferentes peptídeos provenientes da JBU foram obtidos por hidrólise com papaína, de acordo com Postal e colaboradores (Postal *et al.*, 2012). PMU diz respeito às sequencias de aminoácidos para cada um dos peptídeos a ser alinhado com os peptídeos obtidos da JBU através da hidrolise por papaína.

Os quatro peptídeos provenientes da JBU, potencialmente associados ao efeito antifúngico dessa, também detectados na sequência da PMU, porém com diferentes graus de similaridade. O peptídeo mostrado na figura 28D, foi o que apresentou maior diferença na região correspondente homóloga na PMU.

4.5.2 Alinhamentos relacionados à atividade de agregação plaquetária

Uma vez que a PMU também induz agregação plaquetária à semelhança da HPU, investigamos a existência de regiões homólogas entre PMU e o peptídeo de colágeno que interage com a GPVI, para comparar à análise similar de homologia descrita para a HPU e o mesmo peptídeo de colágeno em Scopel-Guerra, 2011.

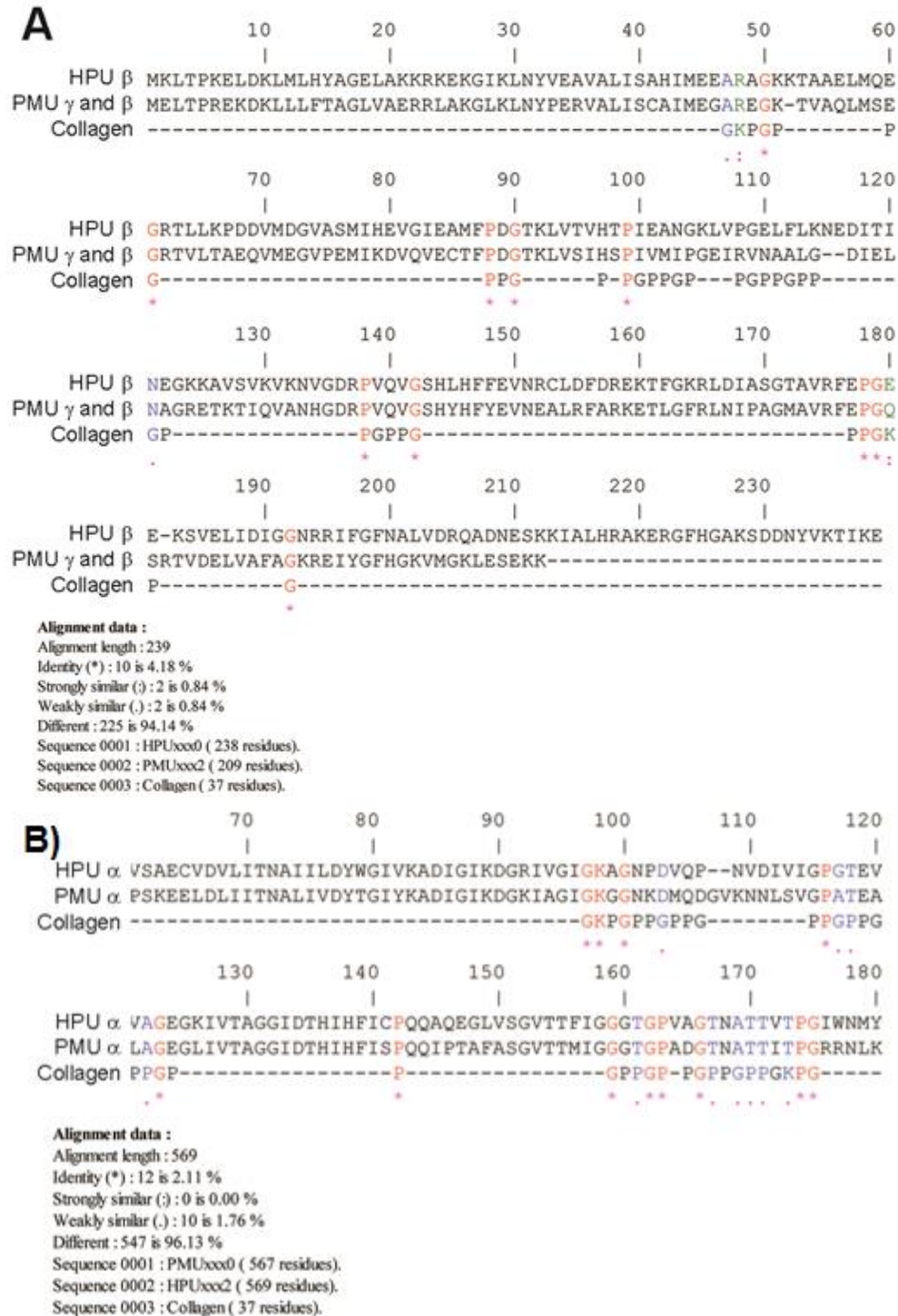


Figura 29: Alinhamento parcial das seqüências de aminoácidos a partir da PMU, HPU e do peptídeo de colágeno. A) Alinhamento entre as subunidades β da HPU, subunidades β e γ da PMU e a seqüência do colágeno. B) Alinhamento entre as subunidades α da HPU e da PMU com a seqüência do peptídeo de colágeno.

Com o alinhamento mostrado na figura 29, constatou-se que existem regiões de identidade entre as ureases e o peptídeo de colágeno que interage com o receptor plaquetário, glicoproteína VI (Morton *et al.*, 1995; Polanowska-Grabowska, Gibbins e Gear, 2003), distribuídas tanto nas subunidades menores com na maior. Uma representação tridimensional destas proteínas com as regiões homólogas destacadas em preto foi construída (colaboração com Rodrigo Ligabue-Braun – membro do Laprotox e Grupo de Biologia Estrutural da UFRGS), conforme pode ser visto na figura 30, para verificar onde exatamente estas regiões seriam encontradas.

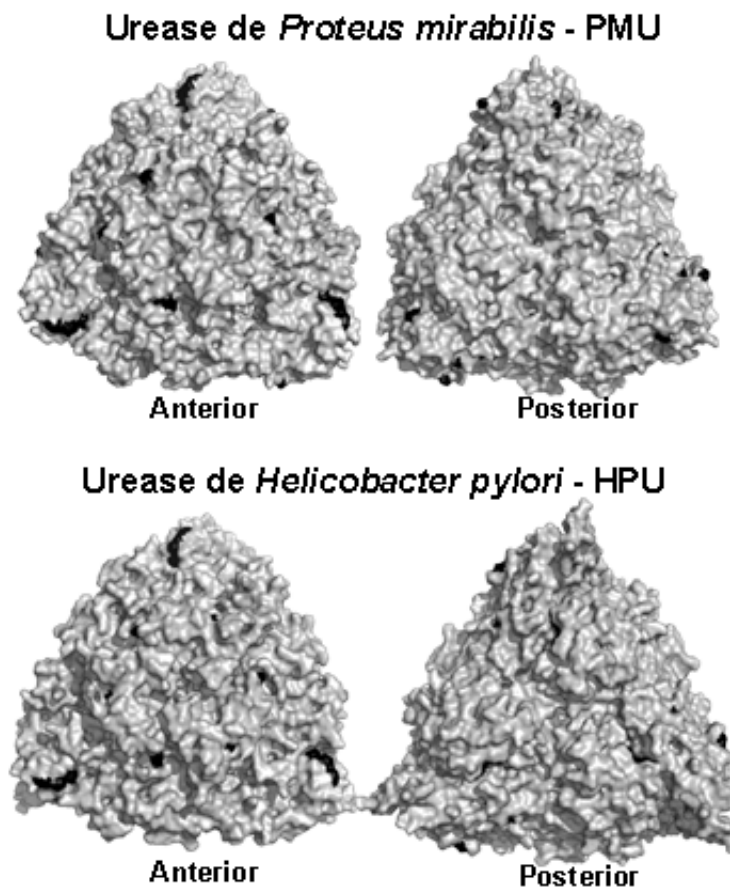


Figura 30: Representação tridimensional das regiões homólogas entre PMU, HPU e peptídeo do colágeno. HPU e PMU apresentam-se como trímeros, e as regiões de homologia com peptídeo do colágeno estão destacadas em preto. Contribuição de Rodrigo Ligabue-Braun.

Conforme pode ser visto na figura 30, as regiões homólogas ao colágeno estão localizadas na superfície acessível ao meio das proteínas alinhadas.

5 DISCUSSÃO

A urease de *P. mirabilis* atua como um fator crítico de virulência, sem a qual, a bactéria não é capaz de colonizar o trato urinário do hospedeiro, impossibilitando que a infecção se estabeleça (Jones *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1993). Em sua forma nativa, a PMU apresenta-se na forma de um trímero $(\alpha\beta\gamma)_3$, com massa molar variando entre 250 e 280 kDa (Jones e Mobley, 1987; Cocker *et al.*, 2000). Jones e Mobley relataram que o pI da urease de *P. mirabilis* varia de 5,2 - 5,9, e o K_M varia de 13 - 60 mmol.L^{-1} , de acordo com a cepa isolada (Jones e Mobley, 1987; Mobley e Hausinger, 1989). De acordo com Mobley e Hausinger, o pH ótimo para a PMU isolada da bactéria é 7,5 (Mobley e Hausinger, 1989).

Nesse trabalho, bactérias *E.coli* HB101 que expressam PMU tiveram otimizadas a expressão desta enzima através da metodologia de superfície de resposta. O coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de determinação ajustado indicaram que 95 % da variabilidade experimental pode ser explicada por este modelo (De Lima, Coelho e Contiero, 2010; Popov *et al.*, 2010). Para analisar se este experimento foi significativo, fez-se o teste de Fischer, verificando a diferença existente entre o valor calculado (obtido a partir dos dados experimentais, apresentados na tabela de ANOVA, presente na figura 10) e o valor tabelado do mesmo, devendo ser essa diferença de no mínimo 3 vezes. Para este experimento de superfície de resposta, o valor de F_{calc} ficou em 53,35 enquanto que o valor de F_{tab} é de 4,12, utilizando a confiança em 95 %, temos que o F_{calc} ficou 12 vezes maior que o F_{tab} , classificando o experimento também como significativo.

Neste tipo de experimento, a validação dos dados obtidos deve ser feita através da escolha de valores aleatórios para as variáveis, desde que estejam contidos entre os valores máximos e mínimos utilizados para execução do experimento inicial (Tabelas 2 e 4). Conforme pode ser verificado pela tabela 4, os valores experimentais de atividade ureásica diferem dos valores preditos para as

mesmas condições no máximo em 12 %, validando o experimento, e classificando-o como preditivo.

A expressão heteróloga da PMU na *E. coli* foi obtida através do plasmídeo pMID 1010, que contém todo o operon da urease, inclusive o gene promotor *ureR*, responsivo a ureia (Mobley e Warren, 1987). As condições ótimas de indução da PMU recombinante determinadas por RSM indicaram uma alta concentração de ureia como a melhor condição, revelando adaptações do microrganismo que causa infecção no trato urinário do hospedeiro, local onde as concentrações de ureia compreendem a faixa de 400 a 500 mmol.L⁻¹, estando o valor otimizado para indução, contido nesta faixa (Jones e Mobley, 1987; Coker *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 2008). Com a otimização das condições de indução, foi possível aumentar em aproximadamente 6 X a produção da PMU com relação à condição de menor expressão observada no gráfico da figura 11. Ainda se faz necessário refinar os dados com relação ao tempo de indução da enzima, porém os tempos baixos para indução são ideais pela menor tendência à formação de corpos de inclusão. Em tempos mais longos, pode-se ter concentrações mais altas de proteína expressa, porém a não identificação destas se daria pela perda de atividade ureolítica, devido à desnaturação da mesma quando parte de corpos de inclusão, ou ainda por inativação térmica devido à longa exposição a temperaturas de 37 °C.

A estratégia inicial de purificação da PMU baseou-se em dados anteriores do grupo, com a urease recombinante de *H. pylori* expressa em uma cepa de *E. coli*, que foi purificada com uma sequência de cromatografias de troca aniônicas e uma gel filtração (Wassermann *et al.*, 2010).

Diversas tentativas de purificação foram feitas com o uso do tampão PEB e eluições com NaCl, tanto na coluna HiTrapQTM como na Q-SepharoseTM. Apesar da alta atividade observada na eluição da Q-Sepharose, quando os *pools* eram submetidos à gel filtração em Superdex 200TM, o material recuperado não tinha o grau de pureza desejável (Tabelas 5 e 6 e figura 13). Desta forma, optou-se pela estratégia utilizada por Hu e colaboradores (Hu *et al.*, 1990), na purificação da urease de *Morganella morganii*. Naquele trabalho, os autores utilizaram cloreto de potássio como eluente nas cromatografias de troca iônica, melhorando

consideravelmente a purificação da urease. O uso do KCl foi adotado neste trabalho e conforme pode ser observado na figura 16A e B, e pela presença majoritária da enzima nas frações da última cromatografia (Figura 17 e 18), esta mudança foi determinante para o processo de purificação.

Após a troca de sais, o percentual de recuperação da enzima foi de 11 % (Tabela 7), o que extrapolado para o extrato bruto inicial, equivaleria a 103 U_{totais}, com um fator de purificação de 64 vezes, pelo menos duas vezes maior que o fator de purificação obtido quando se utilizou NaCl como eluente nas cromatografias de troca iônica (Tabelas 5 e 6). O percentual de recuperação da enzima teve um aumento ainda mais significativo, 5 vezes maior com KCl do que com NaCl, conforme visto nas tabelas 5 e 7.

A última etapa de purificação feita em coluna Superdex 200TM também foi utilizada para estimar a massa molecular da PMU recombinante, que foi de 244 kDa, muito próxima das massas moleculares estimadas para a enzima isolada da bactéria *P. mirabilis* em outros trabalhos, que varia de 250 a 280 kDa (Jones e Mobley, 1987; Coker *et al.*, 2000).

O valor de K_M , faixa entre 32,8 e 61 mmol.L⁻¹, encontrado para a PMU neste trabalho (Figura 19) está de acordo com os valores previamente estabelecidos para esta urease (isolada de *P. mirabilis*), que variam de 13 a 60 mmol.L⁻¹. Em contrapartida, os valores de $V_{m\acute{a}x}$, 108 a 167 mU.s⁻¹, ficaram uma ordem de grandeza acima dos valores obtidos na literatura, 35 a 55 mU.s⁻¹, para a enzima nativa (Jones e Mobley, 1987; Breitenbach e Hausinger, 1988; Mobley e Hausinger, 1989).

De acordo com a tabela 8, o K_M para a uréia da PMU é pelo menos uma ordem de grandeza superior aos valores das ureases de plantas e fúngica. Esse fato não é surpreendente, considerando a alta concentração de uréia no trato urinário, em contraste com o ambiente natural em que ocorrem as outras ureases. As enzimas na tabela 8, independente da fonte, apresentam pH ótimo entre 7,5 e 8,0. No entanto, essas ureases diferem bastante nos valores de $V_{m\acute{a}x}$ e também no IC₅₀ para AAH. A adição de 0,5 mmol.L⁻¹ de AAH inibiu em cerca de 80 % a atividade ureolítica da PMU. Esta inibição é devido à ação quelante do AAH sobre

os átomos de níquel presentes no sítio catalítico da enzima (Blakeley et al., 1969) (Figura 20).

A partir de testes *in-vitro*, realizados por Stegmayr em 1983, foi visto que a precipitação de sais presentes na urina pela PMU poderia ser prevenida com a adição de ácido aceto-hidroxâmico (AAH), tanto utilizando a própria urina humana, como em testes com urina sintética. Este efeito preventivo se daria pela inativação da PMU, caracterizando o AAH como um inibidor de PMU (Stegmayr, 1983; Mobley e Hausinger, 1989). A IC_{50} de $190 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para este ácido para inibição da PMU é semelhante a outras ureases na Tabela 8.

De acordo com Hausinger e colaboradores, a PMU apresenta melhor estabilidade em uma faixa neutra de pH, e como verificado neste trabalho, na figura 21A e B, a PMU purificada manteve estável sua atividade enzimática em pHs neutros e alcalinos, entre pH de 7,0 a 8,5 (Breitenbach e Hausinger, 1988).

A bactéria *P. mirabilis* coloniza o trato urinário de humanos, um ambiente com temperatura moderada (37°C), altas concentrações de ureia e de vários sais, normalmente presentes na urina (Armbruster e Mobley, 2012). Como esperado para um fator de virulência de um patógeno do trato urinário, a PMU apresentou elevada atividade enzimática quando ensaiada a 37°C ou 48°C (Figura 21D). A PMU mantém pelo menos 50% de sua atividade enzimática após incubação por 24 horas a 37°C (Figura 21A).

Na figura 22B, pode-se ver como é o comportamento deste fator de virulência em uma solução que mimetiza a urina humana. Inicialmente observou-se uma inibição da atividade ureásica, quando testada na mistura de sais, provavelmente um efeito tipo “*salting out*”. Apenas depois de transcorridas pelo menos 6 horas de incubação, a influência dos sais induz o aumento da atividade enzimática, em até 200 %. Este aumento na reação de hidrólise da ureia potencialmente favorece a sobrevivência bacteriana, alcalinizando o meio, além de facilitar a precipitação destes sais e, portanto, a urolitíase, mantendo a infecção por *P. mirabilis*.

Em 2007, dados publicados pelo grupo descreveram a atividade antifúngica de ureases da soja e do feijão-de-porco (jack bean), em concentrações de 0,5 a 1,0 mM, contra os fungos *C. musae*, *C. lunata*, *P. herguei* e *F. oxysporum*, e *F. solani*, (Becker-Ritt *et al.*, 2007). Nos ensaios com a PMU, as condições testadas para os fungos filamentosos foram semelhantes às aquelas utilizadas para a urease da *C. ensiformis* (JBU), ou seja, 10^6 esporos (Lopes *et al.*, 2012; Postal *et al.*, 2012). Contrastando com a JBU, a PMU não inibiu o crescimento dos fungos nas condições testadas (Figura 23). Nas mesmas doses, a urease da *H. pylori* (HPU) apresentou atividade antifúngica contra *P. herguei* e *C. lunata*. No experimento com a HPU foram testados 10^3 esporos de fungos por condição (Becker-Ritt *et al.*, 2007), que assim puderam ser acompanhados por 72 h. Nesse trabalho, o experimento foi interrompido com 48 horas de duração, tendo sido utilizados 10^6 esporos, ou seja, 10^3 esporos a mais que o utilizado por Becker-Ritt e colaboradores em 2007.

Por outro lado, como observado para a JBU anteriormente, a PMU também é capaz de interferir no crescimento de leveduras (Figura 24). Como visto em Postal e colaboradores, quando testada em *C. parapsilosis*, a JBU (360 nmol.L⁻¹) foi capaz de inibir em até 60 % o crescimento. A PMU, em uma dose ligeiramente menor, inibiu 50 % do crescimento desta mesma levedura. Nos testes com *C. tropicalis*, onde a JBU (360 nmol.L⁻¹) causou 30 % de inibição do crescimento (Postal *et al.*, 2012), a PMU, em concentrações de 267 nmol.L⁻¹ inibiu em até 50 % do crescimento da levedura.

Postal e colaboradores, compararam a atividade antifúngica da JBU com um hidrolisado desta, obtido por digestão com papaína, verificando que o efeito fungitóxico estava associado à fração de peptídeos com menos de 3 kDa. Análise por espectrometria de massas desta fração possibilitou a identificação de quatro peptídeos, no entanto, não foi possível estabelecer quais destes possuem atividade antifúngica (Postal *et al.*, 2012).

Nesse trabalho, investigou-se a presença de regiões homólogas a esses peptídeos da JBU na sequência da PMU, sendo estas encontrados em ambas as

subunidades α e β , conforme pode ser visto na figura 28. Dos 4 peptídeos da JBU, três destes correspondem a sequências com alta similaridade na PMU, sendo dois com maior identidade e um com identidade mais baixa. Porém, para os peptídeos IEGNKVIRGGNAIADGPVN e FAGKREIYGFHGKVMGKLE, presentes na JBU e PMU, respectivamente, ocorrem importantes diferenças, resultando em baixo grau de similaridade, sugerindo que estes não estão envolvidos na atividade antifúngica das ureases.

Uma outra característica das diversas ureases já testadas é a capacidade de promover a agregação plaquetária, entre elas as ureases vegetais, como de *C. ensiformis*, e soja *G. max*, e bacterianas, de *B. pasteurii*, e de *H. pylori* (Olivera-Severo, Wassermann e Carlini, 2006; Wassermann *et al.*, 2010). A agregação plaquetária é uma das respostas celulares à injúria vascular ou inflamação, disparada pela exposição destas células a diversos tipos de agonistas (Cerletti *et al.*, 2012). As ureases mencionadas acima agem como agonistas, promovendo a agregação plaquetária. Estudos realizados com a HPU por Wassermann e colaboradores, 2010 e Scopel Guerra, 2011, sugerem que ureases provavelmente interagem ou modulam o mesmo receptor plaquetário do agonista fisiológico colágeno, ambos recrutando sinalização envolvendo eicosanóides derivados da via da 12-lipoxigenase (Coffey *et al.*, 2004).

No ensaio de agregação plaquetária feito, o ADP foi utilizado como controle positivo. Conforme mostrado na figura 27, o ADP tipicamente produz duas “ondas” de agregação, que puderam ser observadas quando foi adicionado somente o tampão da PMU (fosfato de sódio 20 mmol.L⁻¹) seguido do ADP. A primeira onda de agregação diz respeito à ação do ADP adicionado diretamente nas plaquetas. Já a segunda onda é consequência da secreção dos grânulos densos, que contém ADP, pelas plaquetas ativadas, representando um “*feedback*” positivo e amplificando a resposta de agregação (Nieswandt e Watson, 2003; Li *et al.*, 2004).

Em função do baixo rendimento das purificações, apenas duas doses de PMU foram testadas e poucas repetições foram feitas. Ainda assim, foi possível

observar que o contacto da PMU com plaquetas humanas produz dois tipos de respostas, aparentemente dependendo da fonte das plaquetas.

Nos experimentos em que a PMU não foi capaz de induzir agregação plaquetária ao final de 4 minutos, as mesmas plaquetas foram estimuladas com ADP (Figura 27). Interessante observar que nas plaquetas pré-tratadas com PMU houve uma inibição parcial da agregação, aparentemente comprometendo a segunda “onda” de agregação. Isto sugere que a PMU pode estar interferindo na retroalimentação do ADP (Wijeyeratne and Heptinstall, 2011). Após a adição da PMU ao PRP, não havendo ativação, a mesma poderia interagir com algum receptor de membrana de plaqueta bloqueando-o, impossibilitando a interação receptor-ADP secretado dos grânulos densos, durante o processo de agregação plaquetária. A hipótese mais provável para a inibição da segunda onda de agregação está relacionada à inibição da secreção ou por bloqueio do receptor.

Aparentemente, os eventos iniciais do processo de agregação plaquetária (Guglielmone *et al.*, 2000; Reed, Fitzgerald e Polgar, 2000; Li *et al.*, 2004) não foram afetados com adição da PMU (Figura 27).

Todas as ureases de plantas e bacterianas investigadas até agora parecem ativar plaquetas através das mesmas vias de sinalização, e esta rota de ativação parece ser a do colágeno (Wassermann *et al.*, 2010). Regiões homólogas foram identificadas entre a HPU (Scopel-Guerra, 2011) e um peptídeo derivado de colágeno responsável pela interação com o receptor plaquetário GPVI (Morton *et al.*, 1995; Polanowska-Grabowska, Gibbins e Gear, 2003), que poderiam estar envolvidas na ativação plaquetária produzida por ambas proteínas. Regiões homólogas entre PMU e o colágeno já foram anteriormente descritas (Wilson *et al.*, 1995; Ebringer, Rashid e Wilson, 2010), sendo que em função dessa homologia foi atribuída à PMU um papel em doenças autoimunes.

Nesse trabalho, fizemos alinhamentos da HPU, e PMU com o peptídeo de colágeno responsável pela sua interação com a proteína GPVI e a estrutura tridimensional dessas ureases foi modelada para localizar essas regiões (Figuras 29 e 30). A HPU é uma proteína dodecamérica (Ha *et al.*, 2001) em sua forma

nativa, mas a fim de compara-la com a forma $(\alpha\beta\gamma)_3$ da PMU, esta foi utilizada na forma do trímero $(\alpha\beta)_3$. A figura 30 mostra a face anterior, exposta ao meio, das ureases. A face posterior da HPU, na sua forma dodecamérica fica na interface com outro trímero, enquanto que na PMU, esta face também está exposta ao meio. A face frontal das ureases é mais rica em regiões homólogas ao peptídeo de colágeno, postulando-se que esta região seja mais importante para ativação das plaquetas. Estas regiões homólogas ao colágeno, presentes na HPU e na PMU, potencialmente poderiam interagir com os receptores de membrana responsáveis por iniciar o processo de agregação plaquetária (Wassermann *et al.*, 2010).

6 CONCLUSÕES

A PMU é um importante e fator crítico de virulência, sem o qual *P. mirabilis* não é capaz de estabelecer e manter a infecção. Neste estudo, a enzima recombinante foi obtida com um nível de purificação satisfatório, quando usado KCl como eluente nas cromatografias, com rendimento de 11 %, e um fator de purificação de 64 vezes.

A PMU recombinante, purificada neste estudo, apresenta comportamento similar a outras ureases já descritas, com estabilidade em mesma faixa de pH e temperatura, de 7,5 a 8,0. A PMU é relativamente termoestável, resistindo 12 h a 48 °C, e mantendo-se ativa por mais de um mês a 4°C .

O aumento em até aproximadamente 200 % da atividade ureásica da PMU na presença de sais que mimetizam a urina humana potencialmente contribui para a urolitíase, acelerando a precipitação dos sais que levam à formação de cálculos urinários.

A PMU não inibiu o crescimento de fungos filamentosos, mas semelhante a outras ureases, causou inibição no crescimento de leveduras, com indução da formação de pseudo-hifas. Sabe-se que grande parte das infecções urinárias são inicialmente multimicrobianas, e com a persistência da infecção, ocorre prevalência do *Proteus mirabilis* sobre outras bactérias e mesmo fungos, eventualmente presentes (Armbruster and Mobley, 2012; Nicolle, 2012; Vlamakis, 2011).

Proteus mirabilis é uma bactéria causadora de bacteremia, razão pela qual a bactéria pode ter desenvolvido a capacidade de ativar plaquetas humanas, o que levaria a formação de agregados no hospedeiro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armbruster, C.E. and Mobley, H.L.T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*, *Nature Reviews Microbiology*, **10**, (2012) 743-754.

Ajesh, K. and Sreejith, K. Peptide antibiotics: an alternative and effective antimicrobial strategy to circumvent fungal infections, *Peptides*, **30**, (2009) 999-1006.

Balasubramanian, A. and Ponnuraj, K. Crystal structure of the first plant urease from Jack bean: 83 years of journey from its first crystal to molecular structure, *Journal of Molecular Biology*, **400**, (2010) 274-283.

Barcellos, G.B.S., Almeida, L. M, Moreira, R. A., Cavada, B. S., Deoliveira, J. T. A., Carlini, C. R. Canatoxin cross reactive, concanavalin cross reactive and canavalin cross reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* (MART) seeds, *Planta*, **189**, (1993) 397-402.

Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J.A. and Carlini, C.R. Lipxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds, *Toxicon*, **29**, (1991) 453-459.

Blakeley, R.L., Hinds, J.A., Kunze, H.E., Webb, E.C., Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). Demonstration of a carbamoyl transfer reaction and inhibition by hydroxamic acids. *Biochemistry*, **8**, (1969) 1991-2000.

Becker-Ritt, A.B. and Carlini, C.R. Fungitoxic and insecticidal plant polypeptides, *Biopolymers*, **98**, (2012) 367-384.

Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A. H. S., Mitidieri, S., Feder, V., Wassermann, G. E., Santi, L., Vainstein, M. H., Oliveira, J. T. A., Fiuza, L. M., Pasquali, G., Carlini, C. R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon*, **50**, (2007) 971-983.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, **72**, (1976) 248-254.

Braun, V. and Focareta, T. Pore-forming bacterial protein helolysins (cytolysins), *Critical Reviews in Microbiology*, **18**, (1991) 115-158.

Breitenbach, J.M. and Hausinger, R.P. *Proteus mirabilis* urease: partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids, *Biochemical Journal*, **250**, (1988) 917-920.

Carlini, C.R., Barcellos, G. B. S., Baetaneves, A. D. V., Guimaraes, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin-A among proteins of leguminous seeds, *Phytochemistry*, **27**, (1988) 25-30.

Carlini, C.R., Gomes, C., Guimaraes, J. A., Markus, R. P., Sato, H., Trolin, G. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin, *Acta Pharmacologica Et Toxicologica*, **54**, (1984) 161-166.

Carlini, C.R. and Grossi-de-Sa, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides, *Toxicon*, **40**, (2002) 1515-1539.

Carlini, C.R. and Guimaraes, J.A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin-A, *Toxicon*, **19**, (1981) 667-675.

Carlini, C.R., Guimaraes, J.A. and Ribeiro, J.M.C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein – evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway, *British Journal of Pharmacology*, **84**, (1985) 551-560.

Carlini, C.R., Oliveira, A. E. A. Azambuja, P., Xavier, J., Wells, M. A., Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the

toxin by insect cathepsinlike enzymes, *Journal of Economic Entomology*, **90**, (1997) 340-348.

Cerletti, C., Tamburrelli, C. Izzi, B. Gianfagna, F. de Gaetano, G. Platelet-leukocyte interactions in thrombosis, *Thrombosis Research*, **129**, (2012) 263-266.

Chow, A.W., Taylor, P. R., Yoshikawa, T. T., Guze, L. B. Nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis* – role of intestinal colonization as a major reservoir, *Journal of Infectious Diseases*, **139**, (1979)621-627.

Cimmino, G. and Golino, P. Platelet biology and receptor pathways, *Journal of Cardiovascular Translational Research*, **6**, (2013) 299-309.

Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., Clemetson K.J. The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of immunoglobulin superfamily closely related to Fc α R and natural killer receptors. *Journal of Biological Chemistry* **274**, (1999) 29019-29024.

Coffey, M.J., Jarvis, G. E., Gibbins, J., M., Coles, B., Barrett, N. E., Wylie, O. R. E., O'Donnell, V. B. Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis, *Circulation Research*, **94**, (2004) 1598-1605.

Coker, C., Poore, C. A., Li, X., Mobley, H. L. T. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection, *Microbes and Infection*, **2**, (2000) 1497-1505.

Dattelbaum, J.D., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Mobley, H. L. T. UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections, *Infection and Immunity*, **71**, (2003) 1026-1030.

de Lima, C.J.B., Coelho, L.F. and Contiero, J. The Use of response surface methodology in optimization of lactic acid production: focus on medium supplementation, temperature and pH control, *Food Technology and Biotechnology*, **48**, (2010) 175-181.

Ebringer, A., Rashid, T. and Wilson, C. Rheumatoid arthritis, *Proteus*, anti-CCP antibodies and Karl Popper, *Autoimmunity Reviews*, **9**, (2010) 216-223.

Esposito, E. e Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. *EDUCS*. Caxias do Sul, 2004.

Farmer Iii, J.J., *et al.* Unusual enterobacteriaceae: “*Proteus rettgeri*” that “change” into *Providencia stuartii*, *Journal of Clinical Microbiology*, **6**, (1977) 373-378.

Feder, V. Purificação e caracterização de uma urease de *Cryptococcus gattii*. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, UFRGS. (2008) Porto Alegre.

Feder, V. Papel da urease e suas proteínas acessórias na virulência de *Cryptococcus gattii*. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, UFRGS. (2012) Porto Alegre.

Ferreira-DaSilva, C.T., Gombarovits, M. E. C., Masuda, H., Oliveira, C. M., Carlini, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **44**, (2000)162-171.

Follmer, C. Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections, *Journal of Clinical Pathology*, **63**, (2010) 424-430.

Follmer, C., Barcellos, G. B. S., Zingali, R. B., Machado, O. L. T., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., Guimaraes, J. A., Carlini, C. R. 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, *Biochemical Journal*, **360**, (2001)217-224.

Follmer, C. and Carlini, C.R. Effect of chemical modification of histidines on the copper-induced oligomerization of jack bean urease (EC 3.5.1.5), *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **435**, (2005) 15-20.

Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Olivera-Severo, D., Carlini, C. R. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases - Biological effects unrelated to ureolytic activity, *European Journal of Biochemistry*, **271**, (2004)1357-1363.

Ghazaleh, F.A., Francischetti, I. M. B., Gombarovits, M. E. C., Carlini, C. R. Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **339**, (1997)362-367.

Gibbs, K.A. and Greenberg, E.P. Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression, *Chemical Reviews*, **111**, (2011) 188-194.

Guglielmone, H.A., Daniele, J. J., Bianco, I. D., Fernandez, E. J., Fidelio, G. D. Inhibition of human platelet aggregation by gangliosides, *Thrombosis Research*, **98**, (2000) 51-57.

Ha, N.C., Oh, S. T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H., Oh, B. H. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease, *Nature Structural Biology*, **8**, (2001) 505-509.

Harizi, H., Corcuff, J.B. and Gualde, N. Arachidonic acid derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology, *Trends in Molecular Medicine*, **14**, (2008) 461-469.

Heimer, S.R. and Mobley, H.L.T. Interaction of *Proteus mirabilis* urease apoenzyme and accessory proteins identified with yeast two-hybrid technology, *Journal of Bacteriology*, **183**, (2001) 1423-1433.

Hu, L.T., Nicholson, E. B., Jones, B. D., Lynch, M. J., Mobley, H. L. T. *Morganella morganii* urease: purification, characterization and isolation gene sequences, *Journal of Bacteriology*, **172**, (1990) 3073-3080.

Hubbard, R. Absorption spectrum of rhodopsin: 280 nm absorption band, *Nature*, **221**, (1969) 435-437.

Irwin, N.J., McCoy, C. P., Jones, D. S., Gorman, S. P. Infection responsive drug delivery from urinary biomaterials controlled by a novel kinetic and thermodynamic approach, *Pharmaceutical Research*, **30**, (2013) 857-865.

Jacobsen, S.M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. T., Shirliff, M. E. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Clinical Microbiology Reviews*, **21**, (2008) 26-59.

Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., Le Couedic, J.P., Goodearl, A., Dussault, B., Fraser, C., Vainchenker, W., Villeval, J.L. Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* **96**, (2000) 1798-1807.

Johnson, D.E., Russell, R. G., Lockett, C. V., Zulty, J. C., Warren, J. W., Mobley, H. L. T. Contribution of *Proteus mirabilis* urease to persistence, urolithiasis, and acute pyelonephritis in a mouse model of ascending urinary tract infection, *Infection and Immunity*, **61**, (1993) 2748-2754.

Jones, B.D., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Warren, J. W., Mobley, H. L. T. Construction of a urease-negative mutant of *Proteus mirabilis* – analysis of virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection, *Infection and Immunity*, **58**, (1990) 1120-1123.

Jones, B.D. and Mobley, H.L.T. Genetic and biochemical diversity of ureases of *Proteus*, *Providencia* and *Morganella* species isolated from urinary tract infection, *Infection and Immunity*, **55**, (1987) 2198-2203.

Jones, B.D. and Mobley, H.L.T. *Proteus mirabilis* urease: genetic organization, regulation and expression of structural genes, *Journal of Bacteriology*, **170**, (1988) 3342-3349.

Jones, B.D. and Mobley, H.L.T. *Proteus mirabilis* urease: Nucleotide sequence determination and comparison with Jack bean urease, *Journal of Bacteriology*, **171**, (1989) 6414-6422.

Jones, D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices, *Journal of Molecular Biology*, **292**, (1999) 7.

Kirpatrick, C.H. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **31**, (1994) 14-17

Koronakis, V., Cross, M., Senior, B., Hughes, C. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*, *Journal of Bacteriology*, **169**, (1987) 1509-1515.

Krajewska, B. Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: a review, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, **59**, (2009) 9-21.

Kunin, C.M. Care of the urinary catheter. In urinary tract infections: detection, prevention and management. *Lippincott Williams & Wilkins*, (1997).

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4, *Nature*, **227**, (1970) 680-685.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T.J., Higgins, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics.*, **23**, (2007) 2.

Laskowski, R.A. Enhancing the functional annotation of PDB structures in PDBsum using key figures extracted from the literature, *Bioinformatics*, **23**, (2007) 4.

Li, Z., Zhang, G., Marjanovic, J. A., Ruan, C., Du, X. A platelet secretion pathway mediated by cGMP-dependent protein kinase, *Journal of Biological Chemistry*, **279**, (2004) 42469-42475.

Ligabue-Braun, R., Andreis, F. C., Verli, H., Carlini, C. R. 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases, *Naturwissenschaften*, (2013) 1-9.

Lopes, F.C., Tichota, D. M., Sauter, I. P., Meira, S. M. M., Segalin, J., Rott, M. B., Rios, A. O., Brandelli, A. Active metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* IFL1 growing on agro-industrial residues, *Annals of Microbiology*, (2012) 1-8.

Magliano, E., *et al.* Gender and age-dependent etiology of community-acquired urinary tract infections, *Scientific World Journal* (2012).

Manos, J. and Belas, R. The Genera *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. The prokaryotes. *Springer*, (2006).

Menegassi, A., Wassermann, G.E., Olivera-Severo, D., Becker-Ritt, A.B., Martinelli, A.H., Feder, V., Carlini, C., Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: isolation, physicochemical characterization and antifungal properties of the protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 2008, 4399-4405.

Mobley, H.L.T. and Belas, R. Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract, *Trends in Microbiology*, **3**, (1995) 280-284.

Mobley, H.L.T. and Hausinger, R.P. Microbial ureases: significance, regulations and molecular characterization, *Microbiological Reviews*, **53**, (1989) 85-108.

Mobley, H.L.T., Island, M.D. and Hausinger, R.P. Molecular biology of microbial ureases, *Microbiological Reviews*, **59**, (1995) 451-480.

Mobley, H.L.T. and Warren, J.W. Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters, *Journal of Clinical Microbiology*, **25**, (1987) 2216-2217.

Morton, L.F., Hargreaves, P. G., Farndale, R. W., Young, R. D., Barnes, M. J.,. Integrin $\alpha 2\beta 1$ -independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for $\alpha 2\beta 1$ -independent platelet reactivity, *Biochemical Journal*, **306**, (1995) 337-344.

Nicolle, L.E. Urinary catheter-associated infections, *Infectious Disease Clinics of North America*, **26**, (2012) 13-27.

Nieswandt, B. and Watson, S.P. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?, *Blood*, **102**, (2003) 449-461.

Oliveira, A.E.A., Sales, M. P., Machado, O. L. T., Fernandes, K. V. S., Xavier, J. The toxicity of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) cotyledon and seed coat proteins to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*), *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, **92**, (1999) 249-255.

Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E. and Carlini, C.R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **39**, (2006) 851-861.

Pastore, G.M., Macedo, G.A. Utilização de fungos na industria de alimentos. *In: Esposito, E., Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*, EDUCS. Caxias do Sul, 2004.

Pearson, M.M., Yep, A., Smith, S. N., Mobley, H. L. T. Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression, *Infection and Immunity*, **79**, (2011) 2619-2631.

Periroth, J.; Choi, B. e Spellberg, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Medical Mycology*. **45**, (2007), 321-346.

Polacco, J.C. and Holland, M.A. Roles of urease in plant-cells, *International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology, Vol 145*, **145**, (1993) 65-103.

Polacco, J.C., Mazzafera, P. and Tezotto, T. Opinion - Nickel and urease in plants: Still many knowledge gaps, *Plant Science*, **199-200**, (2013) 79-90.

Polanowska-Grabowska, R., Gibbins, J.M. and Gear, A.R.L. Platelet adhesion to collagen and collagen-related peptide under flow: roles of the $\alpha 2\beta 1$ integrin, GPVI, and Src tyrosine kinases, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **23**, (2003) 1934-1940.

Poore, C.A. and Mobley, H.L.T. Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by ureR and H-NS, *Microbiology-Sgm*, **149**, (2003) 3383-3394.

Popov, S., Rankovic, J., Dodic, J., Dodic, S., Jokic, A. Bioethanol production from raw juice as intermediate of sugar beet processing: a response surface methodology approach, *Food Technology and Biotechnology*, **48**, (2010) 376-383.

Postal, M., Martinelli, A. H. S., Becker-Ritt, A. B., Ligabue-Braun, R., Demartini, D. R., Ribeiro, S. F. F., Pasquali, G., Gomes, V. M., Carlini, C. R. Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides, *Peptides*, **38**, (2012) 22-32.

Prywer, J. and Torzewska, A. Effect of curcumin against *Proteus mirabilis* during crystallization of struvite from artificial urine, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2012) 1-7.

Reed, G.L., Fitzgerald, M.L. and Polgar, J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the 'secrete' life of thrombocytes, *Blood*, **96**, (2000) 3334-3342.

Ribeiro, S.F.F., Taveira, G. B., Carvalho, A. O., Dias, G. B., Cunha, M. D., Santa-Catarina, C., Rodrigues, R., Gomes, V. M. Antifungal and other biological activities of two 2S albumin-homologous proteins against pathogenic fungi, *Protein Journal*, **31**, (2012) 59-67.

Rodloff, A.C., Koch, D. and Schaumann, R. (2011) Epidemiology and antifungal resistance in invasive candidiasis, *European Journal of Medical Research*, **16**, 187-195.

Rózalski, A., Sidorczyk, Z. and Kotelko, K. Potential virulence factors of *Proteus bacilli*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**, (1997) 65-89.

Schrödinger, L.L.C. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4, *Plos One*, (2011) **6**.

Scopel-Guerra, A. Urease de *Helicobacter pylori*: interação com membranas de plaquetas. Trabalho de conclusão de curso (Biologia) Instituto de Biologia, UFRGS. (2011) Porto Alegre.

Sharma, V., Chaudhary, R., Khurana, J. M., Muralidhar, K. In-gel detection of urease activity by nitroprusside-thiol reaction, *Phytochemical Analysis*, **19**, (2008) 99-103.

Sidrim, J.J.C., Rocha, M.G.F., *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro, *Guanabara Koogan*, 2004.

Sirko, A. and Brodzik, R. Plant ureases: roles and regulation, *Acta Biochimica Polonica*, **47**, (2000) 1189-1195.

Sriwanthana, B., Island, M.D. and Mobley, H.L.T. Sequence of the *Proteus mirabilis* urease accessory gene ureG, *Gene*, **129**, (1993) 103-106.

Stegmayr, B. Crystal formation induced by uropathogenic bacteria. An *in-vitro* study in human urine, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, **17**, (1983) 197-203. Stegmayr

Stickler, D.J. and Morgan, S.D. Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters, *Journal of Medical Microbiology*, **55**, (2006) 489-494.

Sumner, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease, *The Journal of Biological Chemistry* **69**, (1926) 435-441.

Tanaka, T., Kawase, M. and Tani, S. α -Hydroxyketones as inhibitors of urease, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **12**, (2004) 501-505.

Varga-Szabo, D., Pleines, I. and Nieswandt, B. Cell adhesion mechanisms in platelets, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **28**, (2008) 403-413.

Vlamakis, H. The world of biofilms, *Virulence*, **2**, (2011) 431-434.

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*, **14**, (2010) 2025-2034.

Weatherb. M. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Analytical Chemistry*, **39**, (1967) 971-974.

Wijeyeratne, Y.D. and Heptinstall, S. Anti-platelet therapy: ADP receptor antagonists, *British Journal of Clinical Pharmacology*, **72**, (2011) 647-657.

Wilson, C., Ebringer, A., Ahmadi, K., Wrigglesworth, J., Tiwana, H., Fielder, M., Binder, A., Ettelaie, C., Cunningham, P., Joannou, C., Bansal, S. Shared amino acid sequences between major histocompatibility complex class II glycoproteins, type XI collagen and *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis, *Annals of the Rheumatic Diseases*, **54**, (1995) 216-220.

Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., Hancock, R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, **118**, (1981) 197-203.

Zhao, L., Huang, Y., Gao, S., Cui, Y., He, D., Wang, L., Chen, Y. Comparison on effect of hydrophobicity on the antibacterial and antifungal activities of α -helical antimicrobial peptides, *Science China Chemistry*, (2013) 1-9.

Valquiria Broll
Curriculum Vitae

Julho/2013

Valquiria Broll

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome Valquiria Broll
Nome em citações bibliográficas Broll, V.
Sexo Feminino

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Avenida Bento Gonçalves
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33086062
URL da home page: <http://www.ufrgs.br/laprotox/>

Endereço eletrônico
E-mail para contato : valbroll@ufrgs.br
e-mail alternativo : valbroll@yahoo.com.br

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2013 Mestrado em Biologia Celular e Molecular.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Purificação e caracterização da urease recombinante de *Proteus mirabilis*, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Co-orientador: Diogo Ribeiro Demartini
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Palavras-chave: Urease de Proteus mirabilis (PMU), Proteus mirabilis, plaquetas
Áreas do conhecimento : Biofísica, Bioquímica, Química de Macromoléculas

2006 - 2011 Graduação em Química Bacharelado.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Estudos proteômicos da semente de *Canavalia ensiformis*
Orientador: Tânia Mara Pizzolato, Célia Regina Carlini e Diogo Demartini
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2011 - 2011 Curso de curta duração em Espectroscopia de massas de proteínas.
Fundação Oswaldo Cruz - Bahia, FIOCRUZ-BA, Brasil

Palavras-chave: Espectrometria de massas, proteômica

2010 - 2010 Curso de curta duração em Capacitação para monitoria acadêmica a distância.
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

Palavras-chave: MOODLE

2008 - 2008 Curso de curta duração em A química analítica forense de traços.
Conselho Regional de Química da 5ª Região, CRQ-V, Porto Alegre, Brasil

Palavras-chave: Química forense, Química analítica

2008 - 2008 Curso de curta duração em Produtos naturais: estudos químicos e biológicos.
Universidade Estadual do Ceará, UECE, Fortaleza, Brasil

Palavras-chave: Produtos naturais, Purificação, Síntese orgânica

Atuação profissional

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: mestrado acadêmico , Enquadramento funcional: aluna de mestrado,
Regime: Dedicção exclusiva

Outras informações:

Mestrado junto ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM), com o provável título de tese:
Proteus mirabilis urease: biological activities not related to ureolysis and effects on lymphocytes

2010 - 2011 Vínculo: Aluna de graduação , Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações:

Aluna de iniciação científica junto ao laboratorio de proteínas toxicas, tendo como orientadores a Dra Celia Carlini, o Dr Diogo Demartini e a Dra Tania Pizzolato em projetos de pesquisa a fim de construir o trabalho de conclusao de curso.

2010 - 2010 Vínculo: Aluna de graduação , Enquadramento funcional: monitora , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações:

Monitoria academica a distância da disciplina de Química organica de biomoléculas, tendo a professora Leandra Campos Franciscato como orientadora e supervisão do professor Dennis Russowsky.

2009 - 2010 Vínculo: Aluna de graduação , Enquadramento funcional: Aluna de iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações:

Aluna de Iniciação científica, ligada a projetos de pesquisa junto ao laboratorio de proteínas toxicas (LAPROTOX) do centro de biotecnologia da UFRGS.

2007 - 2009 Vínculo: Aluno de graduação , Enquadramento funcional: Aluno de Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Outras informações:

1. Projeto de pesquisa junto ao laboratorio de sintese organica do Instituto de Química da UFRGS, tendo o professor Dennis Russowsky como orientador2. Monitoria academica em Química Organica II, tendo o professor Dennis Russowsky como professor orientador.

Projetos

Projetos de pesquisa

2011 - Atual Urease de *Proteus mirabilis*: atividades biológicas independentes de ureólise e efeitos sobre linfócitos

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Valquiria Broll; Diogo Ribeiro Demartini; Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini (Responsável)

Financiador(es): CAPES - Centro Anhanguera de Promoção e Educação Social-CAPES

2010 - 2011 Proteômica de *Canavalia ensiformis*

Descrição: As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis* contém isoformas da enzima urease presente na mesma semente, e são foco de estudo. Estas isoformas possuem atividades que independentes da atividade enzimática, entre elas a toxicidade para insetos de diferentes classes e ordens. Esta toxicidade está relacionada à hidrólise das isoformas de urease por enzimas acídicas tipo aspártico e cisteíno peptidases, e conseqüente liberação de um peptídeo entomotóxico. O mecanismo de ação do peptídeo no inseto também é alvo de estudo pelo grupo. O crescente avanço nas tecnologias relacionadas às pesquisas no campo do proteoma tem proporcionado a identificação e caracterização de um número cada vez maior de proteínas. Isto se deve particularmente às condições de extração, pré-fracionamento das amostras e equipamentos de espectrometria de massas utilizados, que proporcionam a identificação de um número maior de íons e conseqüentemente, de proteínas. O objetivo do trabalho é a caracterização do proteoma da *Canavalia ensiformis*, em dois momentos de desenvolvimento da planta. As sementes quiescentes serão utilizadas como controle, onde será caracterizado o proteoma da semente quiescente. O segundo ponto serão plântulas em desenvolvimento inicial (3°, 4° ou 5° dias de germinação), onde a cromatografia bi-dimensional será utilizada como técnica de pré-fracionamento do material (extratos proteicos tripsinizados) e posteriormente analisados por LC-MS/MS.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Valquiria Broll; Diogo Ribeiro Demartini; Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini (Responsável); Tania Pizzolato

2009 - Atual Aspártico-proteases em sementes de *Canavalia ensiformis*

Descrição: As sementes da leguminosa *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida por “feijão-de-porco” contém a canatoxina, uma proteína inseticida, e são ricas em proteases acídicas, que podem estar envolvidas na mobilização desta proteína e formação de seus peptídeos entomotóxicos. Dados anteriores de trabalhos do grupo evidenciam que enzimas tipo cisteíno e aspártico endopeptidases são responsáveis pela hidrólise da canatoxina. Estas enzimas estão presentes no sistema digestivo dos insetos vulneráveis aos efeitos da proteína. Também é conhecida a presença de enzimas tipo aspártico endopeptidase em sementes quiescentes e plântulas de *C. ensiformis*. Com o intuito de purificar esta (s) atividade (s), extrato das sementes quiescentes (em NaAc 20mM pH 5.6) foi preparado para as análises. O extrato e as demais frações do processo de purificação foram ensaiados para a atividade proteolítica sobre o substrato fluorogênico Abz-AIAFFSQR-EDDnp (10mM ou 20mM) em pH 4.0, na ausência e na presença de diferentes inibidores enzimáticos. O extrato de sementes quiescentes foi submetido à fracionamento por precipitação por sulfato de amônio, onde a atividade foi recuperada entre 30 % e 60% de saturação (p30/60). Em seguida, p30/60 foi aplicado em uma coluna de troca catiônica Source-STM, onde foi recuperada a atividade de interesse na fração retida na coluna. A atividade recuperada no material retido foi concentrada em cartuchos Centriprep™ (*cut off* 30 kDa) e em seguida aplicada em coluna de gel filtração Superdex 75. Análises preliminares indicam que a proteína tipo aspártico endopeptidase seja multimérica, ou que durante as etapas de purificação, inibidores de outras enzimas sejam removidos. Ensaio de ponto de hidrólise do substrato utilizado na purificação estão em andamento, através do fracionamento dos peptídeos gerados por

cromatografia de fase reversa em HPLC, e medida da massa dos peptídeos por MALDI-TOF. A enzima parcialmente purificada também demonstrou considerável estabilidade

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Valquiria Broll; Diogo Ribeiro Demartini; Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini (Responsável); Daniel Barleta Sulis

2007 - 2009 Adição Tipo Michael de Compostos 1,3-Dicarbonílicos à Nitroestirenos Catalisadas por Hidrotalcitas

Descrição: Hidrotalcitas (HTs) ou Hidróxidos Duplos Lamelares (LDH) são compostos argilo-minerais (Clays) aniônicos derivados do mineral lamelar Brucita - $Mg(OH)_2$ – onde os cátions Mg^{2+} estão centrados em uma estrutura octaédrica com ânions OH^- ocupando os vértices do octaédro. A substituição parcial de cátions Mg^{2+} por cátions metálicos trivalentes produz lamelas positivamente carregadas que são compensadas pela presença de ânions nas camadas interlamelares. O material que contém Mg^{2+} e Al^{3+} na lamela correspondente a Brucita e ânions carbonato nos espaços interlamelares é conhecido como Hidrotalcita. Devido ao arranjo estrutural característico destes materiais, sua superfície exibe propriedades básicas de Bronsted e por isso é considerado um material básico sólido podendo atuar em reações orgânicas catalisadas por bases

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Valquiria Broll; Dennis Russowsky (Responsável); Celso Camilo Moro

2007 - 2009 Síntese Multicomponente de Octahidroquinazolinonas. Análogos dos Agentes Antimitóticos Enastron e Dimetilenastron

Descrição: Octahidroquinazolinonas e seus tio-derivados que são compostos heterocíclicos análogos às 3,4-dihidropirimidin-2-(1H)-onas e apresentam diversas atividades farmacológicas como antivirais, anti-bactericidas, atividade anti-hipertensiva ou ainda como agentes antimitóticos e antiproliferativos. O monastrol foi identificado como uma das primeiras moléculas de baixo peso molecular com forte atividade anti-mitótica e recentemente o Piperastrol mostrou-se cerca de 8 vezes mais potente. As octahidroquinazolinonas Enastron e o Dimetilenastron mostraram-se cerca de 100 vezes mais potentes.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Valquiria Broll; Dennis Russowsky (Responsável)

Produção

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. Broll, V., Russowsky, Dennis, MORO, C. C.

Adição Tipo Michael de Compostos 1,3-Dicarbonílicos à Nitroestirenos Catalisadas por Hidrotalcitas., 2007. (Relatório de pesquisa)

Palavras-chave: Reação de Michael, Nitroestirenos, Hidrotalcitas

Áreas do conhecimento : Síntese Orgânica

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Educação e Popularização de C&T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. CARLINI, C. R. R. S., Broll, V., BRAUN, R. L., LOPES, F. C., VERLI, H., SILVA, A. O., MAHL, C. D., BEHLING, C. S., CHIODI, C. G., BALAGUEZ, C., CHIELA, E. C. F., REDER, G. M., MEJIA, G.

L., ESTANISLAU, J. F. R., KAPPAUN, K., FLACH, K., SOUZA, L. M., REIS, S. V.
Curso de Férias - "Você conhece a célula?", 2013. (Outro, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : *Bioquímica, Biofísica*
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

2. CARLINI, C. R. R. S., LOPES, F. C., **Broll, V.**, GUERRA, A. S., SOUZA, A. F. D., VERLI, H., TICHOTA, D. M., KIPPER, F. C., GIESEL, G. M., DEBARBA, J. A., FACHIN, L. P., COSTA, L. L., RITT, A. B., VAINSTEIN, M. H., LEDUR, P. F., MEIRA, S. M. M., GONCHOROSKI, T., ALMEIDA, V. R.

Curso de Férias - "Alimentos", 2012. (Outro, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : *Bioquímica, Biofísica, Nutrição*
Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Daniel Barletta Sulis. **Endopeptidases ácidas a partir de sementes da *Canavalia ensiformis***. 2013. Iniciação científica (Biotecnologia Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-chave: *Canavalia ensiformis*, ureases, aspártico proteases, cisteíno proteases
Referências adicionais : *Brasil/Português. . Home page: http://www.sbbq.org.br/evento/2013/listatrab_soc.php*

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2013. (Congresso).
Acidic Endopeptidases from *Canavalia ensiformis* Seeds..
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2013. (Congresso)
Urease from *Proteus mirabilis*.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Latinoamericano de Microbiologia - XXI ALAM**, 2012. (Congresso)
Urease de *Proteus mirabilis*: Efeitos sob modelos celulares.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Reunião anual do programa de pos-graduação em biologia celular e molecular da UFRGS**, 2012. (Encontro)
Urease de *Proteus mirabilis*: Efeitos sob modelos celulares.
5. **III Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica**, 2012. (Simpósio)

6. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XII Reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular da UFRGS**, 2011. (Encontro)
Urease de *Proteus mirabilis*: Efeitos sob modelos celulares.
7. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010. (Congresso)
Acidic Endopeptidases from *Canavalia ensiformis* Seeds.
8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XI Reunião anual do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular da UFRGS**, 2009. (Encontro)
Aspártico-proteases em sementes de *Canavalia ensiformis*.
9. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008. (Congresso)
Adição Tipo Michael de Compostos 1,3-Dicarbonílicos à Nitroestirenos Catalisadas por Hidrotalcitas.
10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **31ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008. (Congresso)
Síntese Multicomponente de Octahidroquinazolinonas. Análogos dos Agentes Antimitóticos Enastron e Dimetilenastron.
11. Apresentação Oral no(a) **Salão de Iniciação científica**, 2008. (Seminário).
12. Apresentação Oral no(a) **Salão de Iniciação Científica**, 2007. (Oficina)
Adição Tipo Michael de Compostos 1,3-Dicarbonílicos à Nitroestirenos Catalisadas por Hidrotalcitas.

Organização de evento

1. CARLINI, C. R. R. S., **Broll, V.**, BRAUN, R. L., LOPES, F. C., VERLI, H., SILVA, A. O., MAHL, C. D., BEHLING, C. S., CHIODI, C. G., BALAGUEZ, C., CHIELA, E. C. F., REDER, G. M., MEJIA, G. L., ESTANISLAU, J. F. R., KAPPAUN, K., FLACH, K., SOUZA, L. M., REIS, S. V.

Curso de Férias - "Você conhece a célula?", 2013. (Outro, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : *Bioquímica, Biofísica*

Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

2. CARLINI, C. R. R. S., LOPES, F. C., **Broll, V.**, GUERRA, A. S., SOUZA, A. F. D., VERLI, H., TICHOTA, D. M., KIPPER, F. C., GIESEL, G. M., DEBARBA, J. A., FACHIN, L. P., COSTA, L. L., RITT, A. B., VAINSTEIN, M. H., LEDUR, P. F., MEIRA, S. M. M., GONCHOROSKI, T., ALMEIDA, V. R.

Curso de Férias - "Alimentos", 2012. (Outro, Organização de evento)

Áreas do conhecimento : *Bioquímica, Biofísica, Nutrição*

Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro*

Outras informações relevantes

1. Particpei da atividade de monitoria acadêmica da disciplina de Química Orgânica II, pela UFRGS no período de abril a setembro de 2009, tendo o professor Dennis Russowsky como Professor Orientador.
2. Particpei da atividade de monitoria acadêmica da disciplina de Química Orgânica de biomoléculas, pela UFRGS no período de março a julho de 2010, tendo a professora Leandra Campo Franciscato como Professora Orientadora.