

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

KIYO COSTA HIGUCHI

**UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*: PRODUÇÃO, MARCAÇÃO FLUORESCENTE E
ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO POR IMAGEAMENTO ÓPTICO *IN VIVO***

Porto Alegre
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*: PRODUÇÃO, MARCAÇÃO
FLUORESCENTE E ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO POR
IMAGEAMENTO ÓPTICO *IN VIVO***

KIYO COSTA HIGUCHI
BACHARELA EM FÍSICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre
Agosto, 2021



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**UREASE DE *HELICOBACTER PYLORI*: PRODUÇÃO, MARCAÇÃO
FLUORESCENTE E ESTUDO DA BIODISTRIBUIÇÃO POR
IMAGEAMENTO ÓPTICO *IN VIVO***

KIYO COSTA HIGUCHI
BACHARELA EM FÍSICA

ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO
CO-ORIENTADORA: Prof.^a Dr.^a Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Trabalho vinculado ao Projeto Urease de Helicobacter pylori e hiperfosforilação da proteína tau – implicações para taupatias

Porto Alegre
Agosto, 2021



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**Urease de *Helicobacter pylori*: produção, marcação
fluorescente e estudo da biodistribuição por imageamento
óptico in vivo**

CANDIDATA: KIYO COSTA HIGUCHI

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.




DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR



DRA. CÉLIA REGINA RIBEIRO DA SILVA CARLINI - COORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA



DRA. ANA MARIA MARQUES DA SILVA - PPGE - PUCRS



DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

Ficha Catalográfica

H638u Higuchi, Kiyoko Costa

Urease de *Helicobacter pylori* : produção, marcação fluorescente e estudo da biodistribuição por imageamento óptico in vivo / Kiyoko Costa Higuchi. – 2021.

106 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo.

Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini.

1. Urease de *Helicobacter pylori*. 2. Imageamento óptico in vivo. 3. Fluoróforo. I. Papaléo, Ricardo Meurer. II. Carlini, Célia Regina Ribeiro da Silva. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

*Será que a senhora na verdade
não teme que, para quem não
sabe de nada, tudo parece
possível?*

Franz Kafka

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a todos que acreditam que a ciência e o conhecimento podem fazer desse mundo um lugar melhor.

AGRADECIMENTOS

A todos que possibilitaram esse mestrado.

Primeiramente, à minha família, por tudo que me foi e me é proporcionado para que eu possa seguir a carreira que escolhi. Mãe, Pai, Tei, nada disso teria sido possível sem vocês.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, minha segunda (primeira, em muitos momentos) casa há quase 9 anos, pelo acolhimento, reconhecimento e por todas as oportunidades.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida, que me permitiu cursar o mestrado.

Aos meus orientadores, Prof. Ricardo Papaléo e Prof.^a Célia Carlini, por todos os ensinamentos, pela imensa paciência e por me ajudar a tornar realidade o meu sonho de ser cientista. Por terem depositado tanta confiança em mim e acreditado em mim quando eu mesma não acreditei. Foi uma honra ser orientada por vocês, espero poder retribuir tudo o que me proporcionaram. A marca que deixaram em minha trajetória é permanente e levarei o título de mestra sob orientação de vocês com muito orgulho.

Aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Neurotoxinas e do Instituto do Cérebro, pelo companheirismo mesmo nos momentos mais difíceis; essa dissertação é um pouco de cada um de vocês! Ao Augusto, pela iniciação no mundo da HPU, toda a parceria e paciência, principalmente durante esses tempos pandêmicos. À Paula, por me salvar na Bioinformática e por todas as extensas conversas e conselhos. Ao Gabriel, por todos os ensinamentos que me iniciaram nesse universo da Biologia Molecular que tanto me encanta. Ao Matheus, por todas as frases motivacionais e incentivos à autoapreciação. Carlo, Natália, Angela Piovesan, Karine, Michelle, Adriele, Ana Paula, Fernanda, Evelin, Ângela Zanatta, Dani Vieira, Simone e Breda, minha passagem pelo LaNeurotox e pelo InsCer não teria sido a mesma sem cada um de vocês!

À Gianina, por toda a ajuda para a qual me faltam palavras para expressar minha gratidão, por sempre me acolher e me dizer o que preciso ouvir. Por todos os cafezinhos descontraídos e gerenciamentos de crise! Ao Samuel, que esteve comigo desde a transição da graduação para a pós, em todos os momentos mais críticos.

Por todos os conselhos e ensinamentos, que levo do laboratório para a vida. Foi uma honra imensa ter trabalhado com vocês.

À Anna Clara, por ter se deixado ser adotada como minha IC no momento mais periclitante do meu trabalho, e por tornar minhas últimas semanas no laboratório mais leves e cheias de risos e alegria.

Aos meus colegas e ex-colegas do Centro de Nanociência e Micro-nanotecnologia da PUCRS, que sempre me receberam e me acolheram tão bem, apesar de eu passar mais tempo “lá do outro lado”. Elisa e Dani, muito obrigada por todos os ensinamentos e pela oportunidade de conhecê-las melhor e poder levá-las como amigas para além do laboratório.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais e demais docentes com quem tive aulas durante o mestrado. Ao pessoal da secretaria do PGETEMA; Dayane e Cláudia, vocês me salvaram mais vezes do que imaginam!

Aos alunos de iniciação científica com quem tive a oportunidade de trabalhar durante o mestrado, espero ter contribuído para a formação de vocês como vocês contribuíram para a minha.

Ao pessoal do Laboratório de Biofísica Molecular da Universidade de Brasília, por todo o treinamento, que foi crucial para meu mestrado, e por tornar minha estada em Brasília inesquecível.

A cada um dos meus queridos amigos, que me acompanham nos melhores momentos – e também nos piores. Seria impossível citar todos e injusto citar apenas alguns, mas essa dissertação tem um pouquinho de cada um de vocês. Finalmente, à Madison, por tudo o que vivemos nesses dois anos, que ficará para sempre no meu coração.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	7
AGRADECIMENTOS.....	8
SUMÁRIO	10
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	19
LISTA DE QUADROS	20
LISTA DE SÍMBOLOS.....	21
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	24
1. INTRODUÇÃO	25
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos Específicos	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1. Ureases	28
3.1.1. Urease de <i>Helicobacter pylori</i> e seu papel na virulência bacteriana	31
3.1.2. <i>Helicobacter pylori</i> e doença de Alzheimer: uma possível conexão.....	33
3.2. Imageamento óptico <i>in vivo</i> de pequenos animais.....	36
3.3. Biodistribuição da HPU	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1. Materiais.....	43
4.2. Produção e caracterização da urease recombinante de <i>Helicobacter pylori</i>	46
4.2.1. Expressão heteróloga da HPU em <i>Escherichia coli</i> e purificação	46
4.2.1.1. Crescimento de cultivos bacterianos e indução da produção da HPU.....	46
4.2.2. Ensaio de atividade enzimática.....	50

4.2.3. Perfil eletroforético e Western blot para confirmação da expressão e purificação	50
4.2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE).....	50
4.2.3.2. Western blot.....	51
4.2.4. Determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford	52
4.2.5. Espectros de absorção e emissão da HPU	53
4.2.6. Medição do diâmetro hidrodinâmico da HPU por meio de espalhamento dinâmico de luz (<i>dynamic light scattering</i>, DLS).....	53
4.3. Marcação com fluoróforos	53
4.3.1. Estudos <i>in silico</i>	53
4.3.2. Ensaio preliminares com albumina do soro bovino	55
4.3.2.1. Espectros de absorção e emissão da BSA	55
4.3.2.2. Testes de sensibilidade no equipamento de imageamento óptico <i>in vivo</i>	55
4.3.3. Marcação da HPU com os fluoróforos Texas Red e Alexa Fluor 680 NHS Ester	56
4.3.4. Ensaio de atividade enzimática da HPU marcada	56
4.3.5. Espectros de absorção e emissão da HPU marcada	57
4.4. Ensaio <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	57
4.4.1. Procedimentos com animais	57
4.4.2. Testes de injeção e sensibilidade	58
4.4.3. Grupos experimentais para o imageamento com a HPU-AF680	58
4.4.4. Imageamento óptico <i>in vivo</i>	60
4.4.4.1. Processamento das imagens	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62

5.1. Produção e caracterização da urease recombinante de <i>Helicobacter pylori</i>	62
5.1.1. Produção da HPU	62
5.1.2. Purificação e caracterização da HPU	62
5.1.3. Perfil eletroforético e Western blot	67
5.1.4. Medição do diâmetro hidrodinâmico da HPU por meio de espalhamento dinâmico de luz	68
5.2. Estudos para marcação das proteínas com fluoróforos	70
5.2.1. Estudos <i>in silico</i>	70
5.2.2. Espectros de absorção e emissão e testes de injeção e sensibilidade	73
5.2.3. Ensaio de atividade enzimática após a marcação	76
5.3. Imageamento óptico <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	76
5.3.1. Animais injetados com HPU-AF680	76
5.3.2. Animais injetados com MSA-AF680	87
6. CONCLUSÕES	94
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Reação da hidrólise da ureia catalisada pela urease. Fonte: adaptado de Svane *et al.*, 2020.28
- Figura 3.2. Conservação estrutural das ureases. As unidades funcionais podem ser trímeros, como é o caso da urease de *Sporosarcina pasteurii* (superior à esquerda); dímeros, no gênero *Helicobacter* (superior no centro); ou um tipo único de cadeia, como em *C. ensiformis* (superior à direita). Esses monômeros funcionais (linha superior) formam oligômeros maiores (linha inferior) na conformação nativa da enzima. Fonte: adaptado de Kappaun *et al.*, 2018, p. 4.....29
- Figura 3.3. Diagrama de Jablonski ilustrando o fenômeno da fluorescência e os níveis de energia envolvidos no processo de absorção de um fóton e reemissão de um fóton de menor energia – e maior comprimento de onda. Da esquerda para a direita: um fóton é absorvido pelo sistema (seta roxa), levando-o do estado S0 para S3. Parte da energia é dissipada de maneira não radiativa (seta verde), e o sistema chega ao estado S1, do qual retorna ao estado fundamental S0 por meio de uma emissão fluorescente (seta vermelha). Fonte: McEwen, 2020.....37
- Figura 3.4. Espectros de absorção (curvas em vermelho, indicadas por A) e emissão (curvas em roxo, indicadas por E) dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em solução aquosa de pH 7.0. O deslocamento de Stokes de um composto é igual à diferença do comprimento de onda/frequência entre seu pico de absorção e de emissão. Fonte: adaptado de Lakowicz, 2006, p. 530.38
- Figura 3.5. Esquema ilustrando um sistema de imageamento óptico *in vivo*. A fonte luminosa é escolhida em função do espectro de absorção (excitação) do fluoróforo utilizado, e o filtro, do espectro de emissão. O animal é irradiado com luz do comprimento de onda igual (ou o mais próximo possível) ao comprimento de onda de excitação máxima do fluoróforo em uso. A luz reemitida é então filtrada e capturada por um detector do tipo dispositivo de carga acoplada. Fonte: Adaptado de Lakowicz, 2006, p. 658.39
- Figura 4.1. Ilustração da produção da HPU em sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli*. 1) Células de *E. coli* BL21(DE3)-RIL foram transformadas com o plasmídeo PGEM-T-easy contendo o operon da HPU. 2) O cultivo bacteriano foi feito em meio Luria Broth (LB). Foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e ampicilina para controle do crescimento de outros microrganismos e para seleção das células contendo o plasmídeo de interesse. 3) Concluído o crescimento do cultivo, foi feita a indução da produção de HPU com IPTG e NiCl₂. Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender.....47

- Figura 4.2. Ilustração das etapas de purificação da HPU recombinante produzida. 4) Após a indução, as células passaram por ruptura por meio de sonicação. 5) Visto que a HPU é expressa de forma solúvel, o produto da lise celular foi centrifugado e foi coletado o sobrenadante, que procedeu para as cromatografias. 6) Foram realizadas três cromatografias: duas de troca aniônica e uma de exclusão molecular. Fonte: a autora, figura criada com ferramenta BioRender. 49
- Figura 4.3. Ilustração dos ensaios de atividade ureolítica, SDS-PAGE e Western blot. 7) O ensaio de atividade ureolítica foi realizado após cada uma das cromatografias, para definir quais frações eluídas seriam encaminhadas para as etapas seguintes da purificação. 8.1) O perfil eletroforético das frações da SEC foi avaliado para selecionar as amostras utilizadas nos ensaios in vivo. 8.2) O ensaio de Western blot confirmou a presença da proteína de interesse (figura 5.7). Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender. 51
- Figura 4.4. Princípios de detecção da técnica Western blot. Fonte: adaptado de <https://www.elabscience.com/List-detail-306.html>. 52
- Figura 4.5. Ilustração de camundongo “nude” recebendo injeção intraperitoneal. Todas as injeções por essa via foram administradas no quadrante inferior direito do ventre do animal, como indicado na figura. Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender. 58
- Figura 5.1. Cromatograma de troca aniônica em Q-Sepharose realizada com eluição em gradiente contínuo de NaCl de 0 a 500 mM, em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.0 (indicado pela curva rosa). O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorbância a 280 nm (A_{280}). Ensaios de atividade ureolítica indicaram a presença de urease nas frações 19-26 em maior quantidade (assinaladas com dois asteriscos azuis) e nas frações 37-45, indicadas por um único asterisco. Resultados típicos. 63
- Figura 5.2. Cromatograma de troca aniônica em Q-Sepharose realizada com eluição em gradiente descontínuo de NaCl (0, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM, indicados pela linha rosa), em tampão 20 mM, pH 7.0. O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorbância a 280 nm (A_{280}). Frações com atividade ureolítica estão indicadas com asteriscos azuis. Resultados típicos. 63
- Figura 5.3. Cromatograma de troca aniônica em SOURCE 15Q realizada com gradiente contínuo de NaCl de 0 a 500 mM, em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.5 (indicado pela curva verde). O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorbância a 280 nm (A_{280}). Frações indicadas com asteriscos azuis (no eixo das abscissas) apresentaram atividade ureolítica, que foi avaliada qualitativamente. As frações com dois asteriscos apresentaram mais atividade ureolítica e foram encaminhadas para a SEC. Resultados típicos. 64

- Figura 5.4. Cromatograma de troca aniônica em SOURCE 15Q realizada com eluição em gradiente descontínuo de NaCl (0, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM, indicados pela linha verde), em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.5. Observou-se melhor separação da HPU em relação a outras proteínas utilizando esse protocolo, estando a proteína majoritariamente presente no pico proteico eluído com 200 mM NaCl, indicado com dois asteriscos no eixo das abscissas. O *pool* dessas frações procedeu para a última etapa da purificação. Resultados típicos. 65
- Figura 5.5. Cromatograma de exclusão molecular em Superdex 200. Ensaios de atividade ureolítica indicaram que a urease foi eluída entre 120 e 140 ml (vide asteriscos azuis no eixo das abscissas), volume que, segundo calibração da coluna, corresponde a massas condizentes com o esperado para a forma hexamérica da HPU (~540 kDa). Resultados típicos. 66
- Figura 5.6. Curva de calibração da coluna Superdex 200, utilizando proteínas de massas moleculares conhecidas, que correspondem aos pontos no gráfico. 66
- Figura 5.7. SDS-PAGE de frações coletadas ao longo do processo de purificação da HPU. A) 1. Após a segunda IEC; 2. Após a primeira IEC; 3. Extrato bruto (fração solúvel) de *Escherichia coli* transformada com o plasmídeo contendo a sequência da HPU; 4-8. Frações coletadas na SEC providas de atividade ureolítica. As Frações 4-7 apresentaram quantidade significativa de urease, como fica evidente com a presença das bandas próximas de ~70 kDa e abaixo de ~50 kDa (indicadas com tracejado), que correspondem às duas subunidades da HPU. B) 1-7 frações coletadas na SEC providas de atividade ureolítica. Todas as frações apresentaram excesso de contaminantes e pouca quantidade aparente de urease, portanto, foram descartadas. Resultados típicos..... 67
- Figura 5.8. Western blot de frações da SEC providas de atividade ureolítica, dentre elas, as que foram utilizadas em experimentos *in vivo* (4-8). As bandas próximas de ~70 kDa e abaixo de ~50 kDa nas frações 4-8, correspondem às mesmas destacadas com tracejado nos géis de SDS-PAGE (figura 5.6). Resultados típicos. 68
- Figura 5.9. Medidas de DLS de uma amostra de HPU purificada, obtidas 24 dias após a SEC. Resultados típicos. 69
- Figura 5.10. Representação em *cartoon* da estrutura terciária de uma unidade funcional (dímero AB) de HPU (código Protein Data Bank 1E9Z). Os resíduos de aminoácidos assinalados em rosa e azul são as lisinas potencialmente livres presentes nas cadeias A e B, respectivamente. ... 71
- Figura 5.11. Representação em *cartoon* da estrutura quaternária de um dodecâmero de HPU. Os resíduos de aminoácidos assinalados em diferentes cores

- correspondem às lisinas potencialmente livres de cada uma das unidades funcionais do oligômero (vide figura 5.10). 72
- Figura 5.12. Representação em *cartoon* da estrutura quaternária do dímero da albumina sérica de *Mus musculus* modelada. Os resíduos de aminoácidos em azul correspondem às lisinas potencialmente livres para ligação na superfície da proteína. 73
- Figura 5.13. Espectros de absorção e emissão da HPU-AF680. A) Espectro de absorção da HPU-AF680. O filtro de excitação do equipamento de imageamento óptico in vivo com valor mais próximo do pico de absorção medido foi o de 690 nm, portanto, utilizou-se esse comprimento de onda para medir o espectro de emissão da proteína marcada com o fluoróforo. B) Espectro de emissão da HPU-AF680 após excitação a 690 nm, com pico em 710 nm. Resultados típicos..... 74
- Figura 5.14. Teste de sensibilidade da BSA-AF680. A) Imagem adquirida no equipamento de imageamento óptico in vivo da placa contendo a solução BSA-AF680 distribuída seguindo diluição seriada, consistindo nos seguintes valores aproximados: 1) 0,30 mg/ml; 2) 0,15 mg/ml; 3) 0,08 mg/ml; 4) 0,04 mg/ml; 5) 0,02 mg/ml. B) Intensidade normalizada de fluorescência em função da concentração do composto (em mg/ml). Resultados típicos. 75
- Figura 5.15. Imagens do primeiro animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (HPU 1.1). 77
- Figura 5.16. Imagens do primeiro animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção (HPU 1.2). 78
- Figura 5.17. Imagens do primeiro animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a terceira injeção, administrada 48 h após a segunda (HPU 1.3). 78
- Figura 5.18. Imagem de fluorescência sobreposta com imagem de raios-X dos órgãos e outros materiais coletados do primeiro animal injetado com HPU-AF680, após a eutanásia..... 79
- Figura 5.19. Exemplo de ROIs traçadas para análise quantitativa. Os círculos tracejados correspondem às ROIs indicadas pelos nomes com as mesmas cores. 81
- Figura 5.20. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal próxima do fêmur (direito) do animal HPU 1.2 (vide Injeção na figura 5.16). O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um

comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).....	81
Figura 5.21. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 1.2, provida de sinal de fluorescência a partir de cerca de 30 min após a injeção.....	82
Figura 5.22. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal na lateral direita do corpo do animal HPU 1.3. O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).....	82
Figura 5.23. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 1.3, provida de sinal de fluorescência a partir de cerca de 30 min após a injeção.....	83
Figura 5.24. Imagens do segundo animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspensos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (HPU 2.1).....	84
Figura 5.25. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal na lateral direita do corpo do animal HPU 2.1, nos entornos do sítio de injeção. O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).....	84
Figura 5.26. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 2.1, provida de sinal de fluorescência a partir de 30 min após a injeção. O aumento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado por ajuste de curva (linha sólida).....	85
Figura 5.27. Imagens do terceiro animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspensos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (de duas; HPU 3.1).....	86
Figura 5.28. Imagens do terceiro animal injetado com 10 µg de HPU-AF680 ressuspensos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção, administrada 48 h após a primeira (HPU 3.2).....	87
Figura 5.29. Imagens do primeiro animal injetado com 10 µg de MSA-AF680 ressuspensos em 200 µl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 1.1). Observa-se, nessa sequência de imagens, sinal muito difuso até os 60 min após a injeção, permanecendo visível por cerca de 1 h e tornando-se quase indetectável em seguida.	88

- Figura 5.30. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção, administrada 1 semana após a primeira (MSA 1.2). Novamente, o sinal de fluorescência teve intensidade muito baixa para uma análise quantitativa adequada.88
- Figura 5.31. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a terceira injeção, administrada 48 h após a segunda (MSA 1.3). Devido à baixa intensidade do sinal de fluorescência medido, as imagens não foram quantificadas.89
- Figura 5.32. Imagens do segundo animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 2.1).....90
- Figura 5.33. Imagens do terceiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 3.1).....91
- Figura 5.34. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs traçadas sobre a região provida de sinal situada entre o sítio de injeção e a pelve do animal MSA 3.1.....91
- Figura 5.35. Imagens do quarto animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 4.1). Observa-se o decaimento do sinal de fluorescência sem a migração para fora dos entornos do sítio de injeção.92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1. Grupos experimentais dos ensaios de imageamento óptico *in vivo*, divididos de acordo com a injeção recebida..... 60
- Tabela 5.1. Relação do tempo após a SEC e o diâmetro hidrodinâmico expresso em distribuição de número (convertido a partir da distribuição de intensidade medida) das amostras analisadas por DLS..... 70

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1. Reagentes e materiais utilizados.....	43
Quadro 4.2. Equipamentos utilizados.....	44
Quadro 4.3. Ferramentas digitais utilizadas.	45

LISTA DE SÍMBOLOS

A_{595}	Absorbância a 595 nm	
OD_{600nm}	Densidade óptica a 600 nm	
τ_{out}	Tempo característico de <i>washout</i>	min
τ_{in}	Tempo característico de <i>uptake</i>	min

RESUMO

COSTA HIGUCHI, Kiyo. **Bacharela em Física**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. 2020. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A doença de Alzheimer (DA) tem a presença no cérebro de emaranhados neurofibrilares – depósitos da proteína tau hiperfosforilada – dentre seus marcadores histopatológicos. Pacientes com DA apresentam maior incidência de infecção por *Helicobacter pylori* (um patógeno gástrico) do que indivíduos saudáveis, e foi reportado que um filtrado da cultura de *H. pylori* induziu a hiperfosforilação da proteína tau *in vitro* e *in vivo*. O *H. pylori* infecta cerca de metade da população mundial, e sua sobrevivência no estômago humano só é viável graças à enzima urease (*H. pylori* urease, HPU), possivelmente envolvida na patogênese da DA, apesar de haver pouco conhecimento da sua biodistribuição *in vivo*. O presente trabalho teve como objetivo investigar a cinética de absorção e biodistribuição da HPU no modelo camundongo “nude” (*Mus musculus Foxn1nu*), utilizando imageamento óptico *in vivo*. Para isso, a HPU foi produzida, caracterizada, marcada com fluoróforos e administrada por via intraperitoneal nos animais. Os estados de oligomerização da proteína foram monitorados durante semanas, e ela se mostrou estável na forma dodecamérica. Estudos *in silico* indicaram a presença de resíduos de aminoácidos potencialmente livres na superfície da HPU para a marcação fluorescente, e essa não afetou sua atividade enzimática. A metodologia desenvolvida se mostrou eficiente na aquisição de imagens *in vivo* para monitorar a biodistribuição e cinética de absorção e excreção da HPU marcada. Observou-se sua rápida absorção pelo sistema circulatório a partir da cavidade peritoneal e excreção pelos rins, migrando para a bexiga – aproximadamente 40 min após a injeção. Estudos adicionais envolvendo tratamentos crônicos com a HPU são necessários a fim de buscar maior elucidação acerca dos mecanismos por meio dos quais a enzima, proveniente de um patógeno gástrico, pode estar envolvida em processos neuropatogênicos.

Palavras-Chaves: urease de *Helicobacter pylori*, imageamento óptico *in vivo*, biodistribuição, fluoróforo.

ABSTRACT

COSTA HIGUCHI, Kiyoko. **BSc. in Physics**. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. 2020. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Alzheimer's Disease (AD) has the presence of brain neurofibrillary tangles – deposits of the hyperphosphorylated tau protein – among its histopathological hallmarks. AD patients are more often infected with *Helicobacter pylori* (a gastric pathogen) than healthy individuals, and it has been reported that an *H. pylori* culture filtrate induced tau hyperphosphorylation *in vitro* and *in vivo*. *H. pylori* infects about half of the world's population, and its survival in the human stomach is only viable due to the enzyme urease (*H. pylori* urease, HPU), possibly involved in AD pathogenesis, although little is known about its *in vivo* biodistribution. The present work aimed to investigate HPU's absorption and biodistribution kinetics in the nude mouse (*Mus musculus Foxn1nu*) model using *in vivo* optical imaging. For this purpose, HPU was produced, characterized, labeled with fluorophores, and given intraperitoneally to the animals. The protein's oligomerization states were monitored during weeks, and it displayed stability in the dodecameric form. *In silico* studies indicated the presence of potentially free amino acid residues in HPU's surface for fluorescent labeling, and the latter did not affect HPU's enzymatic activity. The developed methodology was efficient in acquiring *in vivo* images to monitor the biodistribution and absorption and excretion kinetics of the labeled HPU. Rapid absorption of the protein by the circulatory system from the peritoneal cavity and later excretion by the kidneys was observed, followed by the migration to the bladder – approximately 40 min after the injection. Further investigations involving chronic treatment with HPU are required to seek deeper clarification on the mechanisms through which the enzyme, produced by a gastric pathogen, may be involved in neuropathogenic processes.

Key-words: *Helicobacter pylori* urease, *in vivo* optical imaging, biodistribution, fluoroprobe.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência em pacientes da terceira idade, acometendo cerca de 30 milhões de pessoas no mundo. Acredita-se que esse número se aproximará dos 100 milhões até 2050. Descrita pela primeira vez pelo médico alemão Alois Alzheimer em 1907, a DA é caracterizada por processos neuroinflamatórios que precedem déficits cognitivos e danos cerebrais, e pela presença no cérebro de placas senis e emaranhados neurofibrilares, constituídos, respectivamente, pelo peptídeo β amiloide e por agregados insolúveis da proteína tau hiperfosforilada (FORMAN *et al.*, 2004; PIKANÇO *et al.*, 2018).

Por ser uma doença de alta prevalência, além da relevância científica em elucidar os mecanismos fisiopatológicos que a deflagram, há grande interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de compostos para fins diagnósticos e/ou terapêuticos, assim como de métodos de diagnóstico antecipado, tanto da própria enfermidade, quanto de seus fatores de risco.

Nas últimas décadas, estudos epidemiológicos relacionaram a DA a doenças vasculares, e essas, à infecção por *Helicobacter pylori*, microrganismo classificado como carcinogênico pela OMS (IARC, 1994) e que infecta mais da metade da população mundial, sobretudo em países subdesenvolvidos, sendo uma das principais causas de gastrite crônica, úlceras pépticas, linfoma do tecido linfóide associado à mucosa e câncer gástrico (BIE *et al.*, 2019). A ocorrência de infecção por *H. pylori* é significativamente mais alta entre pacientes com DA do que na população em geral, e anticorpos anti-*H. pylori* foram detectados no líquido cefalorraquidiano de portadores dessa demência. Esses achados levaram ao questionamento acerca da possibilidade de haver uma conexão entre a infecção por *H. pylori* e a DA (MALAGUARNERA *et al.*, 2004).

O *H. pylori* é uma bactéria microaerófila Gram-negativa que coloniza a mucosa gástrica humana, e sua sobrevivência no meio ácido do estômago depende da enzima urease (EC 3.5.1.5), responsável por catalisar a hidrólise da ureia em

amônia e dióxido de carbono. Essas enzimas são produzidas por plantas, fungos e bactérias, mas não por animais. Além do seu papel enzimático, as ureases de diferentes organismos apresentam diversas propriedades não catalíticas, dentre elas, atividades neurotóxicas e pró-inflamatórias, o que as tornam importantes fatores de virulência em microrganismos (revisto em KAPPAUN *et al.*, 2018).

Wang *et al.* (2015) reportaram que um filtrado da cultura de *H. pylori* induziu a hiperfosforilação da proteína tau tanto *in vitro* (em células de neuroblastoma), como *in vivo* (injeção intraperitoneal em ratos). Ademais, relataram a ativação da glicogênio sintase-quinase 3 β , uma das enzimas responsáveis pela fosforilação da tau. No entanto, o tratamento com esse filtrado não induziu resposta inflamatória nos mesmos modelos, sugerindo que o aumento na fosforilação da tau não seria mediado por um processo inflamatório, e sim, por uma exotoxina bacteriana.

Estudos realizados no Laboratório de Neurotoxinas do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (LaNeurotox) demonstraram que ratos Wistar tratados por via intraperitoneal com a urease de *H. pylori* (*H. pylori urease*, HPU) tiveram aumento na fosforilação da proteína tau no hipocampo, sugerindo que a urease possa ser uma exotoxina envolvida nesse processo, ainda que a própria enzima não tenha sido detectada nos tecidos cerebrais dos animais tratados (CALLAI-SILVA, 2020).

Desses resultados, emergiu a pergunta: de que maneira a HPU, produzida por um patógeno gástrico, poderia estar atuando em processos neuropatogênicos? Estaria a enzima exercendo um efeito do tipo parácrino, modulando periféricamente a fosforilação da proteína tau no hipocampo, ou seria a própria proteína capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, atuando diretamente sobre o tecido cerebral? A literatura não foi capaz de responder tais questões.

Por conseguinte, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma metodologia visando à avaliação da biodistribuição e cinética de absorção e excreção da HPU injetada intraperitonealmente no modelo camundongo “nude” (*Mus musculus Foxn1nu*). Para isso, fez-se necessário produzir, purificar e caracterizar a HPU, para então marcá-la com fluoróforos e conduzir ensaios de imageamento óptico *in vivo*.

2. OBJETIVOS

Avaliar a cinética de absorção e biodistribuição da urease de *Helicobacter pylori* marcada com fluoróforos, no modelo *Mus musculus Foxn1nu*, utilizando imageamento óptico *in vivo* e *ex vivo*.

2.1. Objetivos Específicos

- Produzir a urease de *Helicobacter pylori* (HPU) em sistema de expressão *Escherichia coli*, purificá-la e caracterizar sua pureza e atividade enzimática;
- Caracterizar os oligômeros de HPU em solução por meio de espalhamento dinâmico de luz;
- Por meio de simulações computacionais, avaliar a distribuição espacial de resíduos de aminoácidos potencialmente livres para a ligação com fluoróforos;
- Marcar a HPU com diferentes fluoróforos e determinar suas características de excitação e emissão de luz, além da sua atividade enzimática;
- Investigar a cinética de biodistribuição e eliminação da HPU marcada em camundongos “nude”, utilizando imageamento óptico *in vivo*;
- Realizar caracterizações *ex vivo* complementares de órgãos e tecidos extraídos dos camundongos tratados com HPU.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Ureases

Ureases (*urea amidohydrolases*, EC 3.5.1.5) são metaloenzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da ureia em amônia e ácido carbâmico, que subsequentemente se decompõe em outra molécula de amônia e ácido carbônico.



Figura 3.1. Reação da hidrólise da ureia catalisada pela urease. Fonte: adaptado de Svane *et al.*, 2020.

Sendo as enzimas mais competentes já conhecidas, as ureases são sintetizadas por plantas, fungos e bactérias, mas não por animais, e mantêm cerca de 55% de identidade em suas sequências de aminoácidos nesses três grupos, sugerindo ancestralidade comum (LIGABUE-BRAUN *et al.*, 2013).

As ureases contribuíram para dois marcos na história da bioquímica. A natureza proteica das enzimas foi elucidada graças à cristalização da urease da planta *Canavalia ensiformis* (feijão de porco), a *Jack bean urease* (JBU), realizada pelo inglês James Batcheller Sumner, em 1926. Esse feito rendeu-lhe, vinte anos mais tarde, o Prêmio Nobel em Química, e levou à homologação das enzimas como proteínas. Em 1975, estudos realizados pelo grupo de Zerner revelaram a importância biológica do níquel – indispensável para a atividade catalítica da urease – ao investigar íons presentes no sítio ativo da JBU (revisto em KAPPAUN *et al.*, 2018).

Apesar de homólogas, ureases de diferentes fontes apresentam diferenças estruturais em suas unidades funcionais (figura 3.2). As ureases de plantas e fúngicas são constituídas por um tipo único de cadeia polipeptídica, denominada cadeia α . As bactérias, em contrapartida, apresentam ureases formadas por três subunidades, α , β e γ , com exceção do gênero *Helicobacter*, que produz uma urease composta por cadeias α e β . Essas cadeias se organizam formando oligômeros; em plantas, geralmente, dímeros de trimeros (α_3)₂, e em bactérias, trimeros de trimeros ($\alpha\beta\gamma$)₃, exceto em *Helicobacter pylori*, cuja urease foi cristalizada como tetrâmeros de trimeros de dímeros ($[\alpha\beta]_3$)₄. Foi proposto por Ha *et al.*, 2001 que essa organização quaternária diferenciada da urease de *H. pylori* (HPU) responda por sua elevada resistência a pHs ácidos (como o encontrado no estômago humano).

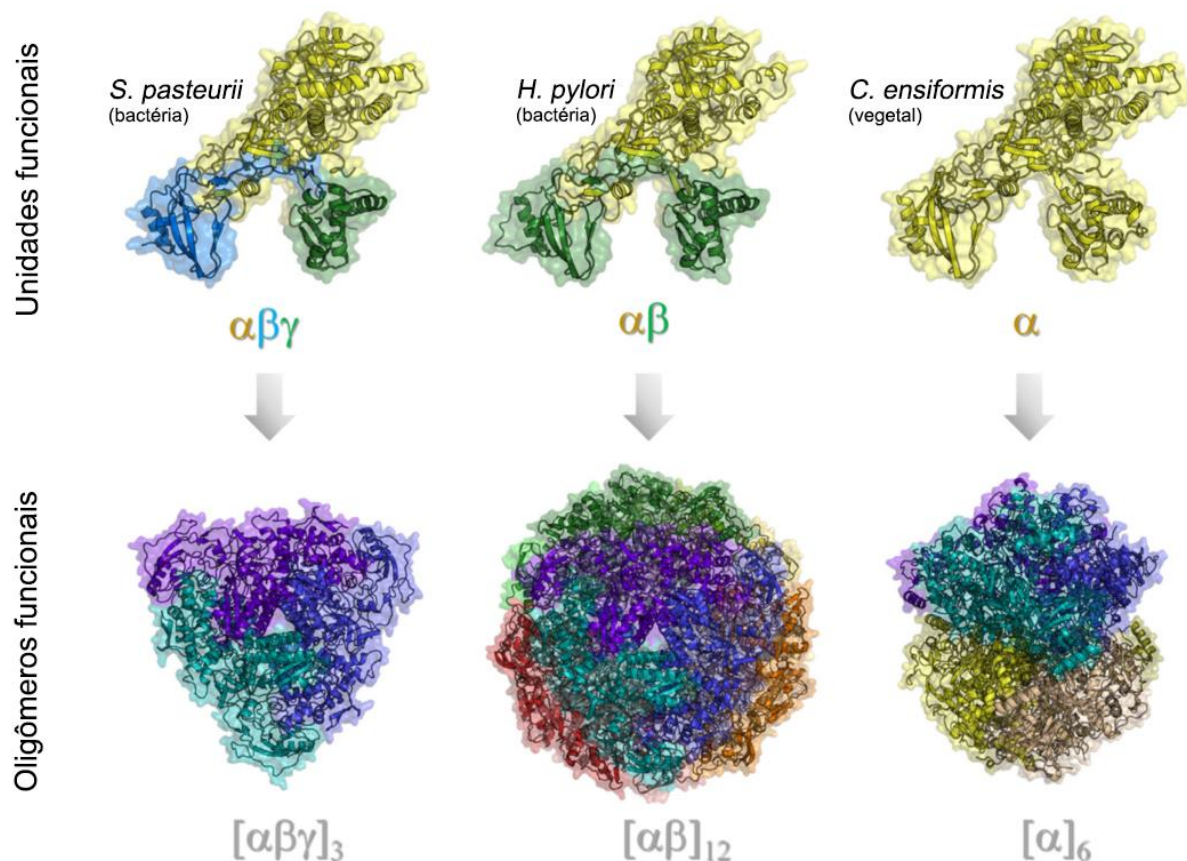


Figura 3.2. Conservação estrutural das ureases. As unidades funcionais podem ser trimeros, como é o caso da urease de *Sporosarcina pasteurii* (superior à esquerda); dímeros, no gênero *Helicobacter* (superior no centro); ou um tipo único de cadeia, como em *C. ensiformis* (superior à direita). Esses monômeros funcionais (linha superior) formam oligômeros maiores (linha inferior) na conformação nativa da enzima. Fonte: adaptado de Kappaun *et al.*, 2018, p. 4.

Um importante papel fisiológico das ureases está associado à sua atividade enzimática: em plantas, uma das principais funções da urease é disponibilizar nitrogênio para a planta, o que ocorre devido à hidrólise da ureia – graças às ureases, a ureia pode ser utilizada como fertilizante. Esse mecanismo é também utilizado por bactérias, permitindo que a ureia seja a única fonte de N necessária para a sobrevivência de microrganismos urease-positivos. Desse processo, por exemplo, decorrem relações simbióticas entre ruminantes e microrganismos que habitam seu sistema digestivo; a ureia clivada no trato digestivo por ureases microbianas libera N para a microbiota, que, por sua vez, fornece uma biomassa nutritiva para o animal.

Em humanos, a presença de microrganismos produtores de urease na cavidade oral auxilia na inibição de cáries dentárias e protege contra a formação de placa bacteriana, devido à alcalinização do meio consequente da clivagem da ureia da saliva. Contudo, a ocorrência de alcalinização, que não acontece apenas na boca, é uma das razões pelas quais ureases bacterianas são importantes fatores de virulência de microrganismos patogênicos (revisto em CARLINI e LIGABUE-BRAUN, 2016; KAPPAUN *et al.*, 2018).

A produção de urease por microrganismos patogênicos pode ser utilizada para fins de diagnóstico, como no caso patógeno gástrico *H. pylori*. O *urea breath test* (UBT), considerado padrão ouro para o diagnóstico de pacientes assintomáticos (ABADI, 2018), foi descrito pela primeira vez por Kornberg *et al.* (1954 a,b), em estudos para investigar a suposta capacidade de gatos de hidrolisar a ureia em seu trato digestivo, visto que a presença de urease em suspensões da mucosa gástrica de cães, gatos, ovinos, bovinos, sapos, ratos e porcos já havia sido relatada (KORNBERG *et al.*, 1954b).

O UBT consiste, basicamente, na ingestão de ureia marcada com o isótopo ¹³ ou ¹⁴ do carbono. Essa ureia é exposta à urease do *H. pylori*, que a hidrolisa, produzindo dióxido de carbono (com o respectivo isótopo), que, por sua vez, é exalado pelos pulmões e detectado no ar expirado. Por ser não-invasiva e ter um grau de confiabilidade alto, essa técnica vem substituindo biópsias tradicionalmente utilizadas para o diagnóstico da infecção com *H. pylori* (ABADI, 2018).

O papel desempenhado pelas ureases como enzimas é estudado há quase 150 anos. No entanto, elas possuem, também, propriedades não relacionadas a essa função (revisto em CARLINI e LIGABUE-BRAUN, 2016; KAPPAUN *et al.*,

2018). Em 1981, foi isolada uma proteína convulsivante presente nas sementes de *C. ensiformis*, que recebeu o nome de canatoxina (CNTX) (CARLINI e GUIMARÃES, 1981). Vinte anos depois, demonstrou-se que a CNTX é, na verdade, uma isoforma da JBU, de dimensão e atividade ureolítica reduzidas, porém, de maior potencial neurotóxico (FOLLMER *et al.*, 2001). Diferentemente da JBU, a CNTX induz convulsões tônico-clônicas letais em ratos e camundongos dentro de 0,5 a 6 horas após a administração por via intraperitoneal, ou de 10 a 20 minutos por via intravenosa. Quando injetadas por via intravenosa, ambas as isoformas de urease induzem convulsões nos roedores.

A identificação da CNTX como uma urease revelou que a função dessas enzimas na natureza vai além de sua atividade catalítica, e não somente em plantas. Como fatores de virulência, as ureases bacterianas promovem a sobrevivência dos microrganismos por meio da atividade enzimática, e contribuem para o desencadeamento de diversos processos patogênicos, que independem da geração de amônia (revisto em CARLINI e LIGABUE-BRAUN, 2016).

A maior parte dos casos de pielonefrite aguda em humanos é causada por *Escherichia coli*, microrganismo majoritariamente desprovido de urease (MOBLEY e HAUSINGER, 1989; KONIECZNA *et al.*, 2012). Entretanto, nos casos de infecção causada por patógenos produtores de urease – cepas de *E. coli* urease-positivas e outros patógenos, dentre eles, o *Proteus mirabilis*, observa-se maior dano tecidual aos rins, invasão celular e inflamação. A infecção de cultura tecidual *in vitro* foi agravada pelo aumento da concentração de ureia, e cepas mutantes urease-deficientes do mesmo microrganismo produziram menos abscessos renais (MOBLEY e HAUSINGER, 1989).

3.1.1. Urease de *Helicobacter pylori* e seu papel na virulência bacteriana

H. pylori é uma bactéria Gram-negativa que coloniza o epitélio da mucosa gástrica humana, infectando mais da metade da população mundial, sobretudo, em países subdesenvolvidos (PARKIN, 2004), e a maioria dos indivíduos é infectada ainda durante a infância. Todavia, a maneira como a infecção ocorre ainda carece de explicação (DEN HOED e KUIPERS, 2019).

Tendo sido a primeira bactéria classificada como carcinogênica, há mais de vinte anos, pela Organização Mundial de Saúde (IARC, 1994), o *H. pylori* é o

principal causador de doenças gastroduodenais, como gastrite, úlceras pépticas e câncer gástrico, e a colonização pelo microrganismo persiste na ausência de tratamento com antibióticos (DEN HOED e KUIPERS, 2019).

A sobrevivência do patógeno em um meio ácido como o estômago humano só é viável graças à síntese de altas quantidades de urease, cuja atividade enzimática acarreta a produção de amônia, criando um microambiente neutro. Cepas de *H. pylori* desprovidas de urease não são capazes de colonizar o epitélio gástrico (MOBLEY *et al.*, 1991; EATON *et al.*, 1991; SCHOEP *et al.*, 2010).

Por viabilizar a colonização do estômago, a urease de *H. pylori*, caracterizada pela primeira vez em 1988, é um importante fator de virulência desse microrganismo (KAPPAUN *et al.*, 2018; MOBLEY *et al.*, 1988). Em sua forma nativa, a HPU é um dodecâmero de ~1,2 MDa (HA *et al.*, 2001) e, poucos anos após seu isolamento, já se sabia que era nociva aos pacientes infectados com *H. pylori* devido à sua atividade enzimática (SMOOT *et al.*, 1990).

Não obstante, descobertas subsequentes demonstraram que sua contribuição à patogênese se devia, também, a outros mecanismos, independentes do seu papel como enzima: a HPU purificada induziu a ativação de monócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias, sugerindo contribuição da urease para a inflamação decorrente da infecção por *H. pylori* (HARRIS *et al.*, 1996).

Atualmente, sabe-se que, independentemente de sua ação enzimática, a HPU contribui para processos patogênicos por meio de diversos mecanismos, dentre eles; ativação e agregação plaquetária por intermédio de uma rota mediada pelas lipoxigenases (WASSERMANN *et al.*, 2010); ativação e transformação de plaquetas (SCOPEL-GUERRA *et al.*, 2017) e de células endoteliais (DE SOUZA *et al.*, 2019); para um fenotípico pró-inflamatório, indução de edema e ativação de neutrófilos (UBERTI *et al.*, 2013); atividade angiogênica, que é essencial para o crescimento tumoral (OLIVERA-SEVERO *et al.*, 2017); aumento da permeabilidade paracelular e afrouxamento das junções célula-célula (DE SOUZA *et al.*, 2019); ativação de células endoteliais com a indução da produção do *Hypoxia-Induced Factor-1 α* em células gástricas (VALENZUELA-VALDERRAMA *et al.*, 2019); dentre outros.

Apesar de o microrganismo ter sido descoberto por infectar o estômago, a elevada ocorrência da infecção por *H. pylori* na população mundial tem dado origem a conjeturas correlacionando o microrganismo à possível patogênese de diversas doenças extragástricas, como glaucoma (KONTOURAS *et al.*, 2001); isquemia

cerebral (GRAU *et al.*, 2001); cardiopatia isquêmica (SINGH *et al.*, 2002); esclerose múltipla; doença de Parkinson e síndrome das pernas inquietas (FRANCESCHI *et al.*, 2019).

Uma hipótese relativamente recente à qual tem-se dado particular atenção é a correlação entre a infecção por *H. pylori* e a doença de Alzheimer (DA). Essa especulação surgiu devido a evidências epidemiológicas relacionando a infecção por *H. pylori* a doenças vasculares, e essas, à DA. A essas evidências soma-se a detecção de anticorpos anti-*H. pylori*, inclusive no líquido cefalorraquidiano, em maior quantidade em pacientes acometidos com DA e demência vascular do que em indivíduos mentalmente saudáveis. Além disso, a HPU induziu *in vitro* a produção de citocinas pró-inflamatórias, também detectadas em cérebros de pacientes de DA, e já foram reportados efeitos positivos da erradicação do patógeno em portadores da demência (MALAGUARNERA *et al.*, 2004; HARRIS *et al.*, 1996; KONTOURAS *et al.*, 2009).

3.1.2. *Helicobacter pylori* e doença de Alzheimer: uma possível conexão

Em um breve relato de 1907, o médico alemão Alois Alzheimer reportou a presença de placas senis e emaranhados neurofibrilares (ENFs) no neocórtex e no hipocampo de uma paciente com déficits cognitivos e perda de memória. Essa foi a primeira descrição publicada da DA (FORMAN *et al.*, 2004), a principal causa de demência em pacientes com mais de 65 anos de idade. Dados epidemiológicos indicam que a DA acometerá, até 2050, um número de pacientes estimado em mais de 96 milhões de pessoas no mundo (PICANÇO *et al.*, 2016).

O principal fator de risco para a ocorrência da DA é a idade, portanto, o crescimento da população idosa acarreta aumento na sua incidência (QUERFURTH e LAFERLA, 2010). Apesar dos principais marcadores neuropatológicos da doença terem sido brevemente descritos pelo próprio Alzheimer há mais de cem anos, atualmente, não se tem total clareza acerca dos processos patogênicos envolvidos. A nível macroscópico, observa-se atrofia hipocampal e cortical em pacientes portadores de DA, e, a nível microscópico, a formação de placas senis, que consistem em acúmulos de peptídeos β amiloides (*amyloid- β* , $A\beta$), e ENFs, constituídos pela proteína tau hiperfosforilada e, portanto, insolúvel (PICANÇO *et al.*, 2016; QUERFURTH e LAFERLA, 2010).

Além das deposições que resultam na formação das placas senis e dos ENFs, outro processo patogênico característico da DA é a degeneração cerebrovascular, que ocasiona morte neuronal e declínio cognitivo. A presença de doenças cerebrovasculares está associada ao surgimento de demência e é considerada um dos principais fatores de risco para a DA (SWEENEY *et al.*, 2018), cujos pacientes apresentam maior prevalência dessas enfermidades do que portadores de outras doenças neurodegenerativas (TOLEDO *et al.*, 2013).

Malaguarnera *et al.* (2004), buscando conexões entre a infecção gástrica e demência vascular, que, por sua vez, contribui para a manifestação clínica e a agravamento da DA, propuseram a teoria sobre uma possível contribuição do microrganismo à patogênese da DA.

A partir daí, novos estudos trouxeram dados corroborando essa hipótese. Kontouras *et al.* (2006; 2009) demonstraram que, não somente a incidência de infecção por *H. pylori* é mais frequente em pacientes portadores de DA do que em pacientes mentalmente saudáveis, como a erradicação do microrganismo promoveu melhoras nos pacientes de DA, especialmente no que diz respeito ao declínio cognitivo. Outros marcadores inflamatórios, como interleucinas, e indícios relativos ao grau de demência de pacientes sugerem que a infecção por *H. pylori* pode acentuar a neurodegeneração por meio de mecanismos envolvendo os ENFs e lesões isquêmicas (ROUBAUD-BAUDRON *et al.*, 2012).

Assim como outras taupatias (doenças que envolvem a agregação da proteína tau em emaranhados insolúveis), a DA está intimamente ligada a processos inflamatórios que precedem a formação de ENFs (PICANÇO *et al.*, 2016). A HPU, por sua vez, além de ter as propriedades pró-inflamatórias já mencionadas, contribui para o comprometimento das junções oclusivas do epitélio gástrico, o que se observa em diversas doenças, inclusive cânceres no trato gastrointestinal (WROBLEWSKI *et al.*, 2009). Similarmente, em pacientes de DA, observa-se comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE), cujos principais elementos estruturais são junções entre as células endoteliais que constituem os capilares cerebrais (KOOK *et al.*, 2013). Estudo recente com participação do LaNeurotox mostrou o efeito da HPU em culturas de células de microvasculatura humana, observando-se aumento da fosforilação de E-caderina, desligamento dessa das junções célula-célula e conseqüente aumento da permeabilidade paracelular, contribuindo para edema e inflamação (DE SOUZA *et al.*, 2019).

As diversas hipóteses correlacionando a infecção por *H. pylori* às taupatias, principalmente à DA, levaram Wang *et al.* (2015) a conduzir um estudo que consistiu no tratamento de ratos e de uma cultura de neuroblastoma de camundongos com um “filtrado” da cultura de *H. pylori*, e na avaliação do efeito desse tratamento sobre a fosforilação da tau. Esse estudo demonstrou que, em três diferentes concentrações, o filtrado de *H. pylori* induziu hiperfosforilação tempo-dependente da tau nos sítios Thr205, Thr231 e Ser404, que são sítios da tau tipicamente encontrados fosforilados na DA.

Apesar do efeito persistente de hiperfosforilação da tau, o tratamento com o filtrado de *H. pylori* não alterou os níveis das citocinas inflamatórias IL-8 e TNF- α , e tampouco promoveu a ativação da micróglia, ou seja, não induziu resposta inflamatória significativa nos cérebros dos animais. Ademais, o mesmo filtrado não mostrou efeito sobre a viabilidade celular.

Esse mesmo estudo mostrou que o tratamento com o filtrado de *H. pylori* provocou a ativação da glicogênio sintase quinase 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β* , GSK-3 β), uma das enzimas responsáveis pela fosforilação da tau, cuja inibição foi capaz de abolir a hiperfosforilação suscitada pelo filtrado da cultura do microrganismo.

A ausência de resposta inflamatória sugeriu que o aumento na fosforilação da tau não seja mediado por uma reação inflamatória, e sim, induzido diretamente por alguma fração solúvel do filtrado, como exotoxinas bacterianas, mas os autores não fizeram identificação de qual/quais seria(m) este(s) fator(es) (WANG *et al.*, 2015). Considerando a abundância da HPU no *H. pylori*, que pode constituir de 10 a 15% do conteúdo proteico total da bactéria (HA *et al.*, 2001), é altamente provável que a HPU esteja presente em altas concentrações no filtrado da cultura da bactéria utilizado no referido estudo.

Visando a investigar a possibilidade de que a HPU fosse uma das exotoxinas propostas por Wang e colaboradores, foi realizado um estudo no LaNeurotox, que consistiu em tratar ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) por via intraperitoneal com HPU durante 7 dias. Concluído o tratamento, homogenizados dos cérebros dos animais foram analisados, por meio da técnica Western blot, quanto ao grau de fosforilação da tau. O estudo demonstrou um aumento no nível de fosforilação da proteína tau no hipocampo dos ratos tratados, sugerindo que a HPU possa estar envolvida no

processo. A proteína, porém, não foi detectada nos tecidos coletados (CALLAISILVA, 2020).

3.2. Imageamento óptico *in vivo* de pequenos animais

O imageamento óptico é, indubitavelmente, a modalidade de visualização mais versátil e vastamente utilizada na prática clínica e na pesquisa. O microscópio óptico, que data de quase 400 anos atrás e segue em constante evolução e aprimoramento, revolucionou as ciências da vida e da saúde, sendo padrão ouro para diversos procedimentos diagnósticos até os dias atuais. A nível macroscópico, a aplicação do imageamento óptico *in vivo* é mais recente, mas tem se revelado uma poderosa técnica analítica, principalmente em estudos pré-clínicos, que empregam estratégias de imageamento molecular para a investigação de processos biológicos e bioquímicos, no ambiente fisiologicamente autêntico de um organismo vivo intacto. Aplicações vão desde análises quantitativas de compostos antimetabólicos durante a Segunda Guerra Mundial (FERONE, 1984) a estudos de expressão gênica (LAKOWICZ, 2006), farmacocinética de compostos de interesse biomédico (DING e WU, 2012) e imagens funcionais (ENGELBRECHT *et al.*, 2008).

Uma das principais razões pelas quais o imageamento óptico é tão multifuncional é a gama de possibilidades investigativas e analíticas da luz na sua interação com a matéria. Um dos fenômenos explorados experimentalmente é a fluorescência (NTZIACHRISTOS, 2006). O fenômeno da fluorescência ocorre quando, após a excitação de um átomo ou molécula pela absorção de um fóton, o sistema reemite um fóton de energia menor – e, portanto, comprimento de onda maior – do que o fóton incidente, como ilustra a figura 3.3. Isso se deve ao fato de que, ao retornar ao estado fundamental, o sistema excitado sofre uma transição não radiativa até um estado intermediário, a partir do qual decai até o estado fundamental (LAVIS e RAINES, 2014).

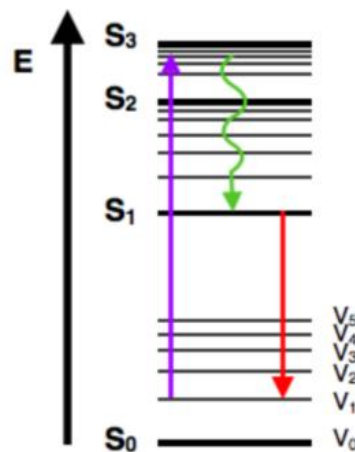


Figura 3.3. Diagrama de Jablonski ilustrando o fenômeno da fluorescência e os níveis de energia envolvidos no processo de absorção de um fóton e reemissão de um fóton de menor energia – e maior comprimento de onda. Da esquerda para a direita: um fóton é absorvido pelo sistema (seta roxa), levando-o do estado S₀ para S₃. Parte da energia é dissipada de maneira não radiativa (seta verde), e o sistema chega ao estado S₁, do qual retorna ao estado fundamental S₀ por meio de uma emissão fluorescente (seta vermelha). Fonte: McEwen, 2020.

Todos os sistemas de imageamento que empregam a fluorescência partem do princípio de que a luz emitida pelas moléculas após a excitação pode ser separada espectralmente da luz de excitação e de outros sinais luminosos (LEBLOND *et al.*, 2010). À diferença entre os comprimentos de onda nos quais ocorrem os picos de excitação e de emissão de uma molécula fluorescente, como exemplificado na figura 3.4, dá-se o nome de deslocamento de Stokes (LAKOWICZ, 2006).

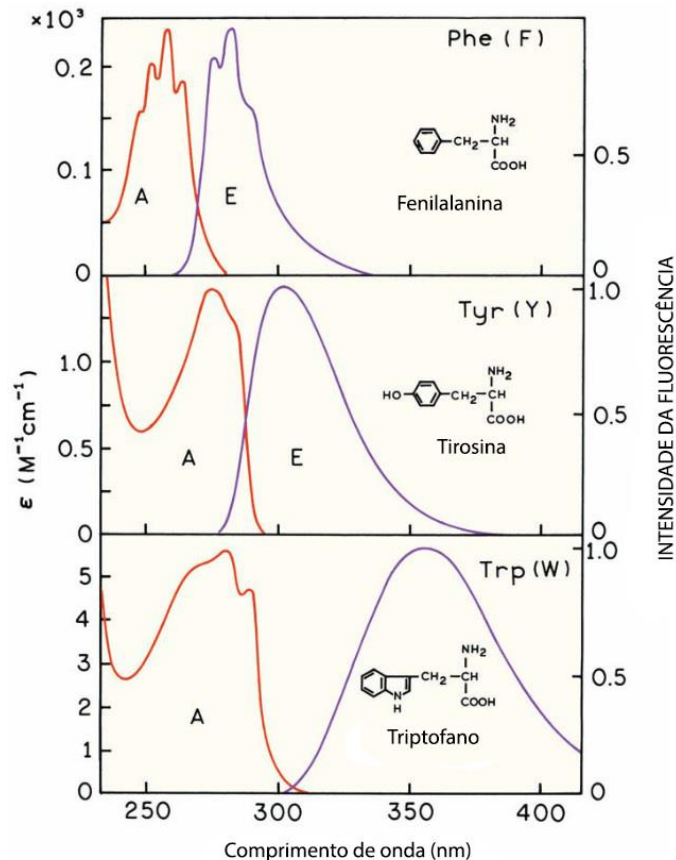


Figura 3.4. Espectros de absorção (curvas em vermelho, indicadas por A) e emissão (curvas em roxo, indicadas por E) dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano em solução aquosa de pH 7.0. O deslocamento de Stokes de um composto é igual à diferença do comprimento de onda/frequência entre seu pico de absorção e de emissão. Fonte: adaptado de Lakowicz, 2006, p. 530.

Amplamente aplicada, a fluorescência é utilizada em todas as áreas experimentais das ciências biológicas, permitindo a visualização de fenômenos biológicos em nível celular e sub-celular, com resolução espacial da ordem de nanômetros (LAVIS e RAINES, 2014; LEBLOND *et al.*, 2010). A microscopia de fluorescência é consolidada como um dos mais importantes métodos de imageamento em tempo real de células vivas e de amostras de tecidos *ex vivo*. Nas últimas décadas, o imageamento macroscópico de pequenos animais utilizando fluorescência vem sendo aperfeiçoado e explorado também em conjunto com outras técnicas (NTZIACHRISTOS, 2006; ZHAO *et al.*, 2018). Essa metodologia é eficiente em obter informações rápidas acerca da biodistribuição decorrente do comportamento farmacocinético, do acúmulo tecidual e da rota de excreção de diversos compostos (LIM *et al.*, 2020).

Um importante avanço do imageamento óptico *in vivo* em relação a outras técnicas que fornecem informações a nível molecular, como Western blot, RT-PCR e imuno-histoquímica, é a possibilidade de analisar processos fisiológicos e patológicos no animal vivo e realizar diversas medidas com o mesmo indivíduo, reduzindo o número de animais necessários para estudos de pesquisa básica e no desenvolvimento de drogas (PATTERSON *et al.*, 2014).

Observa-se, na figura 3.5, uma ilustração do arranjo experimental de um sistema de imageamento óptico *in vivo* utilizando um roedor como modelo.

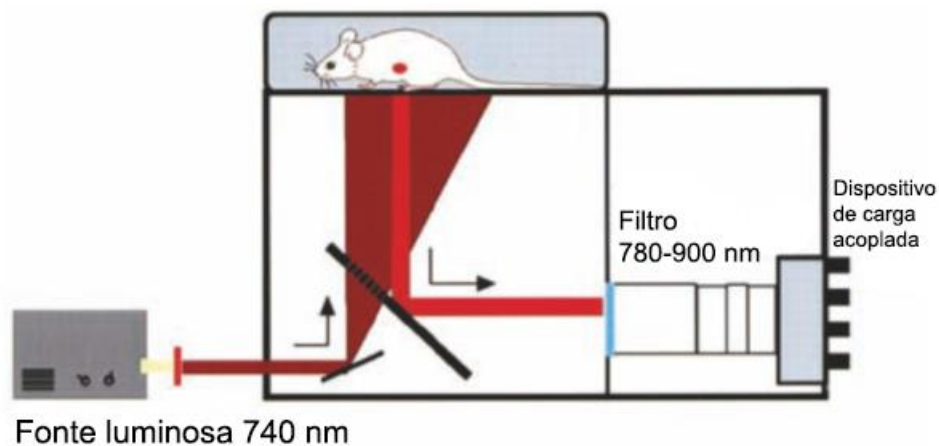


Figura 3.5. Esquema ilustrando um sistema de imageamento óptico *in vivo*. A fonte luminosa é escolhida em função do espectro de absorção (excitação) do fluoróforo utilizado, e o filtro, do espectro de emissão. O animal é irradiado com luz do comprimento de onda igual (ou o mais próximo possível) ao comprimento de onda de excitação máxima do fluoróforo em uso. A luz reemitida é então filtrada e capturada por um detector do tipo dispositivo de carga acoplada. Fonte: Adaptado de Lakowicz, 2006, p. 658.

O uso do espectro visível para o imageamento tem uma importante vantagem sobre metodologias que empregam raios-X e ressonância magnética nuclear: a faixa dinâmica de contrastes é riquíssima. Os próprios tecidos biológicos já são providos de contraste endógeno e muitos compostos neles presentes têm fluorescência própria, como a queratina, a elastina, os fosfolipídios, o triptofano e o retinol, dentre outros.

Além do contraste próprio, é possível utilizar moléculas exógenas desenvolvidas especificamente para essa finalidade, que são ligadas aos marcadores bioquímicos de interesse. Esses agentes de contraste podem ser corantes inorgânicos, nanopartículas, *quantum dots*, proteínas fluorescentes e

estruturas complexas que exploram mecanismos de ressonância a fim de fazê-las ativáveis ou moduláveis (HILLMAN *et al.*, 2011).

Entretanto, as emissões no espectro visível (400 – 650 nm) têm utilidade limitada para aplicações *in vivo* devido à atenuação e ao espalhamento que ocorrem nos tecidos biológicos, além da interferência causada pela fluorescência própria de estruturas e compostos presentes nos organismos, como citocromos e a hemoglobina. Os mais diversos componentes dos tecidos – de pequenas e grandes moléculas como açúcares, ácidos graxos, nucleotídeos, aminoácidos, íons, proteínas e ácidos nucleicos, a estruturas complexas como organelas e membranas celulares – absorvem a radiação eletromagnética da faixa compreendida entre o ultravioleta (UV) e o limite entre o espectro visível e o infravermelho (LEBLOND *et al.*, 2010). Em decorrência disso, agentes de contraste que emitem na faixa do infravermelho próximo (650 – 900 nm) se mostram vantajosos para o imageamento óptico *in vivo* (ZHAO *et al.*, 2018).

Geralmente, o parâmetro medido no imageamento óptico é a intensidade da fluorescência emitida, que, em concentrações razoavelmente baixas de fluoróforo, é monotonicamente relacionada ao produto das seguintes grandezas: concentração do fluoróforo; seu coeficiente de extinção molar (absortividade da luz de determinado comprimento de onda, característica de cada espécie química) e seu rendimento quântico (número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos).

Em casos de concentrações mais elevadas, deve-se levar em conta que a reabsorção da luz emitida e o *quenching* podem afetar o sinal. *Quenching* é a redução da intensidade da fluorescência e pode ocorrer por meio de diversos processos. Moléculas fluorescentes podem deixar de emitir fluorescência ao entrar em contato com outras moléculas, pela simples colisão ou ligando-se a elas. Esse fenômeno, apesar de parecer um empecilho para o imageamento, pode ser utilizado de maneira favorável, fornecendo informações sobre o ambiente em que o fluoróforo se encontra e as interações que realiza, além de detectar processos dinâmicos tanto em soluções quanto em sistemas vivos (LEBLOND, 2010; LAKOWICZ, 2006).

Sem embargo, o imageamento óptico *in vivo* apresenta limitações intrínsecas no que diz respeito às informações que pode extrair, independentemente da meticulosidade do desenho experimental e da construção instrumental. Embora os princípios básicos do imageamento óptico *in vivo* por fluorescência sejam os mesmos por trás das técnicas de microscopia que empregam o fenômeno, os

processos bioquímicos que se deseja visualizar podem estar ocorrendo no interior dos tecidos (LEBLOND *et al.*, 2010).

O imageamento óptico *in vivo* já é utilizado em estudos envolvendo doenças neurodegenerativas, dentre elas, a DA. A técnica se mostrou eficiente em detectar a deposição acelerada precoce de peptídeos A β em modelos animais da doença, assim como a expressão gênica de fatores determinantes para o desenvolvimento da esclerose lateral amiotrófica (PATTERSON *et al.*, 2014). Estudos relacionados à DA mostraram resultados positivos no desenvolvimento de marcadores emissores de luz da faixa do infravermelho próximo, eficientes para o monitoramento dos peptídeos A β , tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (ZHANG *et al.*, 2015; FU *et al.*, 2015).

3.3. Biodistribuição da HPU

Wang *et al.* (2015) observaram hiperfosforilação da proteína tau em ratos tratados com um filtrado de *H. pylori*, que seriam decorrentes de processos não-inflamatórios. Os autores apontaram para o provável envolvimento de exotoxinas bacterianas. Foi demonstrado no LaNeurotox que o tratamento de ratos com HPU por via intraperitoneal durante 7 dias induziu hiperfosforilação da tau no hipocampo dos animais, sugerindo que a urease pode ser uma dessas toxinas (CALLAI-SILVA, 2020).

A fim de investigar a maneira como a HPU, enzima proveniente de um microrganismo que coloniza a mucosa gástrica, poderia atuar em um processo neuropatogênico, faz-se necessário estudar sua biodistribuição e cinética de absorção e excreção. Ensaios de Western blot conduzidos com a finalidade de detectar a presença da HPU no cérebro dos animais tratados com a proteína durante 7 dias não foram capazes de detectá-la (CALLAI-SILVA, 2020), quiçá em função de a concentração de proteína ser inferior ao limite de detecção da técnica – ou porque a proteína, um dodecâmero de mais de 1 MDa (HA *et al.*, 2001), não consegue atravessar a BHE. Tampouco a literatura trouxe informações que pudessem elucidar essa questão.

Ainda que o efeito da HPU possa ser do tipo parácrino, modulando periféricamente os níveis de fosforilação de tau no hipocampo, também a hipótese de que a proteína possa atravessar a barreira hematoencefálica e, de fato, alcançar o tecido cerebral, merece ser explorada. De maneira urease-dependente, o *H. pylori*

ocasiona a desregulação das junções oclusivas do epitélio gástrico, condição associada a diversas doenças, incluindo cânceres do trato gastrointestinal (WROBLEWSKI *et al.*, 2009). Ademais, são conhecidas correlações entre a infecção por *H. pylori* e doenças vasculares, e entre essas e a DA (MALAGUARNERA *et al.*, 2004). O efeito da HPU observado em culturas de células de microvasculatura humana, desestabilizando junções célula-célula e causando aumento da permeabilidade paracelular, sugere que, em uma situação de infecção com o *H. pylori* e entrada da HPU na circulação sanguínea, a urease poderia provocar danos à BHE, (DE SOUZA *et al.*, 2019).

Assim sendo, o presente trabalho propõe um estudo longitudinal que visa a avaliar a biodistribuição e cinética de absorção e excreção da HPU em camundongos “nude”, utilizando imageamento óptico *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Quadro 4.1. Reagentes e materiais utilizados.

Nome (no idioma original)	Nome (em português)	Fabricante	Origem
Albumin from mouse serum	Albumina do soro de camundongo	Sigma-Aldrich	Missouri, EUA
Alexa Fluor 680 NHS Ester	Alexa Fluor 680 NHS Éster	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, EUA
Amicon® Ultra Centrifugal Filter	Ultra Filtro de Centrifuga Amicon®	GE Healthcare	Illinois, EUA
Bovine serum albumin	Albumina do soro bovino	Merck Millipore	Massachusetts, EUA
Coomassie Blue G	Azul de Coomassie G	Sigma-Aldrich	Missouri, EUA
DyLight 800 NHS Ester	DyLight 800 NHS Ester	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, EUA
Goat Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase Conjugate	Anti-IgG de Coelho produzido em Cabra conjugado com fosfatase alcalina	ZyMax	Califórnia, EUA
Nitrocellulose Membrane, 0,2 µm	Membrana de nitrocelulose de poro 0,2 µm	Bio-Rad	Califórnia, EUA
Pur-A-Lyzer™ Dialysis Tubes MWCO 6-8 kDa	Tubos de Diálise Pur-A-Lyzer™ MWCO 6-8 kDa	Sigma-Aldrich	Missouri, EUA
Rabbit anti-HpUreβ polyclonal IgG	IgG polyclonal anti-HpUreβ produzido em Coelho	Santa Cruz Biotechnology	Texas, EUA
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein	Marcador molecular	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, EUA

Ladder	Spectra™ Multicolor Broad Range		
Spectra/Por MWCO 12-14000 Da	Membrana de diálise Spectra/Por MWCO 12-14000 Da	Spectrum Manufacturing	Ontário, Canadá
Texas Red (Sulforhodamine Acid Chloride 101)	Vermelho Texas (cloreto de acila sulforodamina 101)	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, EUA

Todos os demais reagentes utilizados foram do maior grau de pureza possível.

Quadro 4.2. Equipamentos utilizados.

Descrição do equipamento/uso	Modelo	Fabricante	Origem
Centrífuga	Sorvall ST 16R	Thermo Fisher Scientific	Massachusetts, EUA
Coluna de exclusão molecular	Superdex 200 pg	GE Healthcare	Illinois, EUA
Coluna de troca aniônica	HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance	GE Healthcare	Illinois, EUA
Coluna de troca aniônica	SOURCE 15Q 4.6/100 PE	GE Healthcare	Illinois, EUA
Condutímetro	Oakton COM 500 Series	Oakton	Illinois, EUA
Cromatógrafo líquido	Äkta™ Purifier	GE Healthcare	Illinois, EUA
Cromatógrafo líquido	Äkta™ Start	GE Healthcare	Illinois, EUA
Disruptor de células ultrassônico	UltraSonic Mixing	Unique	São Paulo, Brasil
Espectrofluorímetro	SpectraMAX M2	Molecular Devices	Califórnia, EUA
pHmetro	DM-22	Digimed	São Paulo, Brasil
Scanner multiespectral <i>in vivo</i>	Bruker In-Vivo MS FX Pro	Bruker	Massachusetts, EUA
Sistema de cubas e cassetes para eletroforese	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad	Califórnia, EUA
Sistema de eletrotransferência para	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad	Califórnia, EUA

Western blot			
Sistema para medição de tamanho de partículas por espalhamento dinâmico de luz	Zetasizer Nano ZS	Malvern Pananalytical	Malvern, Reino Unido

Quadro 4.3. Ferramentas digitais utilizadas.

Nome	Descrição/uso	Desenvolvedor/proprietário/referência
BioRender App	Elaboração de figuras	BioRender
Bruker MI	Processamento e análise das imagens <i>in vivo</i>	Bruker (Massachusetts, EUA)
EMBOSS Needle	Alinhamento de sequências de aminoácidos	European Molecular Biology Laboratory (EMBL-EBI)
Origin	Análise de dados e elaboração de gráficos	OriginLab
Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB)	Banco de dados de estruturas de macromoléculas biológicas	BERMAN <i>et al.</i> , 2000
SoftMax® Pro	<i>Software</i> do SpectraMAX M2	Molecular Devices (Califórnia, EUA)
SWISS-MODEL	Modelagem de estrutura proteica por comparação	GUEx and PEITSCH, 1997
Swiss PDB Viewer	Simulação de moléculas proteicas	GUEx and PEITSCH, 1997
UNICORN	<i>Software</i> do Äkta Purifier	GE Healthcare (Illinois, EUA)
UNICORN Start	<i>Software</i> do Äkta Start	GE Healthcare (Illinois, EUA)
Zetasizer Software	<i>Software</i> do Zetasizer Nano ZS	Malvern Pananalytical (Malvern, Reino Unido)

4.2. Produção e caracterização da urease recombinante de *Helicobacter pylori*

4.2.1. Expressão heteróloga da HPU em *Escherichia coli* e purificação

A produção e purificação da HPU foi inteiramente conduzida no LaNeurotox. A HPU foi produzida por meio de expressão heteróloga em células de *Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIL, transformadas com o plasmídeo PGEM-T-easy contendo o operon da urease de *H. pylori*, gentilmente cedido pela Dra. Barbara Zambelli, da Università di Bologna, Itália. A expressão da urease é induzida pela presença de isopropil tiogalactosídeo (IPTG). A purificação a partir dos extratos bacterianos foi realizada por uma sequência de cromatografias, baseada em Olivera-Severo *et al.* (2017).

Uma alíquota foi coletada no fim de cada etapa do processo de expressão e purificação, e foram conduzidos ensaios de eletroforese e Western blot a fim de confirmar a presença e avaliar a eficiência da purificação da proteína de interesse (itens 4.2.3.1 e 4.2.3.2).

A HPU purificada foi armazenada a 4°C no tampão utilizado na última etapa de purificação, uma cromatografia de exclusão molecular (*size exclusion chromatography*, SEC). Para os ensaios *in vivo*, foi ressuspensa em salina tamponada com fosfato (*phosphate buffered saline*, PBS) pH 7.4 na concentração final de 0,3 mg/ml.

As figuras 4.1 e 4.2 (ver adiante) representam de maneira resumida e esquemática as etapas de produção e purificação da HPU recombinante. A figura 4.3 (ver adiante) ilustra alguns dos ensaios de caracterização realizados com as amostras ao longo da purificação e após a conclusão dela, descritos nos itens 4.2.2 e 4.2.3.

4.2.1.1. Crescimento de cultivos bacterianos e indução da produção da HPU

Todos os procedimentos aqui descritos foram realizados em capela de fluxo laminar, com materiais devidamente esterilizados. Tubos *Falcon* de 15 ml receberam 5 ml de meio Luria Broth (LB) estéril, aos quais foram adicionados os antibióticos cloranfenicol (para seleção da cepa bacteriana) e ampicilina (para seleção das

células contendo o plasmídeo de interesse), nas concentrações de 40 e 100 µg/ml, respectivamente, além de 200 µl de soluções estoque de células de *E. coli* BL21(DE3)-RIL transformadas com o plasmídeo com o operon da HPU. Um tubo adicional contendo apenas LB e os antibióticos e submetido às mesmas condições de crescimento foi utilizado como controle.

Após 15h horas de crescimento em agitação de 180 rpm e temperatura de 37°C, o conteúdo dos frascos foi transferido para Erlenmeyers contendo 500 ml de LB, com os mesmos antibióticos nas mesmas concentrações. Novamente, os frascos foram postos em agitação de 180 rpm e temperatura de 37°C, até que a densidade óptica a 600 nm (OD_{600nm} , medida por espectrofotometria) dos cultivos atingisse o valor de 0,7.

Atingida a densidade óptica desejada, foi induzida a produção de HPU por meio da adição 500 µM de IPTG e 500 µM de cloreto de níquel aos cultivos, que foram postos em agitação (180 rpm) outra vez, mas a 25°C.

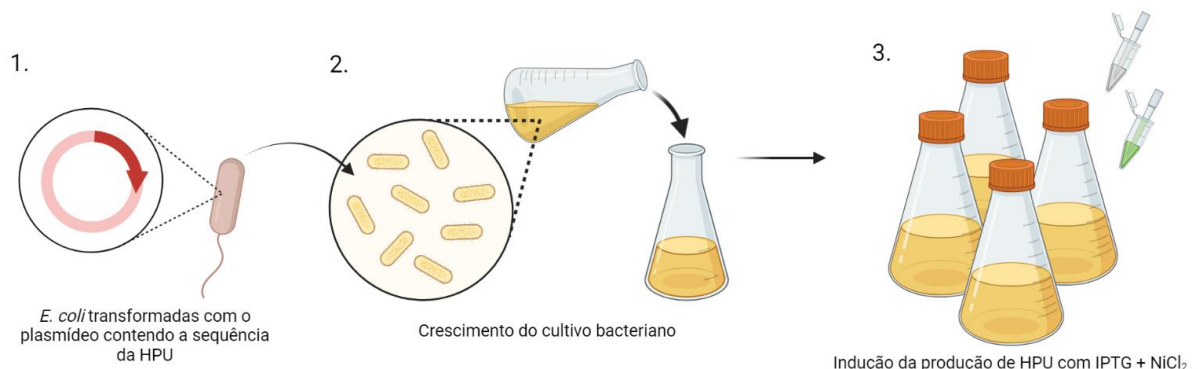


Figura 4.1. Ilustração da produção da HPU em sistema de expressão heteróloga *Escherichia coli*. 1) Células de *E. coli* BL21(DE3)-RIL foram transformadas com o plasmídeo PGEM-T-easy contendo o operon da HPU. 2) O cultivo bacteriano foi feito em meio Luria Broth (LB). Foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e ampicilina para controle do crescimento de outros microrganismos e para seleção das células contendo o plasmídeo de interesse. 3) Concluído o crescimento do cultivo, foi feita a indução da produção de HPU com IPTG e NiCl₂. Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender.

A partir dessa etapa, os procedimentos não foram realizados em capela de fluxo laminar, mas, sempre que possível, sob refrigeração (a 4°C). Os cultivos foram centrifugados a 8000 rpm em um rotor de ângulo basculante. Os sobrenadantes

foram descartados, e os pellets, ressuspensos em tampão fosfato de sódio (*sodium phosphate buffer*, NaPB) 20 mM, pH 7.0.

Uma vez ressuspensas, as amostras procederam para lise celular utilizando disruptor ultrassônico, que consistiu em 20 ciclos de 1 min, frequência de 20 kHz e intervalo de 4 min entre ciclos. Concluída a lise, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm em um rotor de ângulo fixo. Os pellets foram descartados, e os sobrenadantes, postos em diálise em membranas Spectra/Por de *cutoff* 12-14000 (Spectrum Manufacturing Inc., Ontário, Canadá), contra NaPB 20 mM, pH 7.0.

Após diálise *overnight*, o material foi filtrado em filtros de seringa de poros de 0,22 µm (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) e submetido a cromatografia de troca iônica (aniônica, nesse caso) (*ion exchange chromatography*, IEC) em uma coluna HiLoad 26/10 Q-Sepharose High Performance acoplada a um cromatógrafo líquido Äkta Start (ambos GE Healthcare, Illinois, EUA). Para essa cromatografia, foram utilizados os tampões NaPB 20 mM, pH 7.0, para lavagem da amostra não retida, e a eluição das proteínas retidas foi feita com um gradiente de 0 – 500 mM de NaCl no tampão NaPB 20 mM, pH 7.0, com um fluxo de 3 ml/min. Foram testados gradientes lineares e em degraus (descontínuos) para eluição. Foram coletadas frações de 10 ml durante a eluição das proteínas retidas.

Foi realizado um ensaio colorimétrico para avaliar a atividade ureolítica (item 4.2.2) das frações do material eluído, o que definiu quais delas foram encaminhadas para a etapa seguinte da purificação. Essas amostras foram reunidas em um *pool* (*pool* Q-Sepharose) e dialisadas contra NaPB 20 mM, pH 7.5, até atingir a mesma condutividade do tampão de diálise.

Com o *pool* Q-Sepharose, realizou-se nova cromatografia de troca aniônica, em uma coluna SOURCE 15Q 4.6/100 PE, ligada a um cromatógrafo líquido Äkta Purifier (ambos GE Healthcare). Foram utilizados, como tampão de lavagem e eluição, respectivamente, NaPB 20 mM, pH 7.5, e NaPB 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5, e um fluxo de 1 ml/min. Novamente, protocolos de eluição com gradiente contínuo e com gradiente em degraus foram testados. Foram coletadas frações de 2 ml, que tiveram sua atividade enzimática avaliada novamente. As frações enzimaticamente ativas foram reunidas no *pool* SOURCE 15Q, que foi concentrado em concentradores Amicon® (GE Healthcare, Illinois, EUA).

A última etapa da purificação da HPU recombinante foi uma cromatografia de exclusão molecular do *pool* SOURCE 15Q conduzida em uma coluna HiLoad

Superdex 200 pg conectada ao Äkta Start (ambos GE Healthcare). A eluição isocrática (mesma concentração de tampão de eluição ao longo de toda a corrida) com NaPB 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.0, foi realizada com o fluxo foi de 2 ml/min. As frações eluídas tiveram sua atividade ureolítica testada e sua pureza avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (item 4.2.3). Para os ensaios posteriores, foi utilizado o *pool* Superdex 200, constituído das frações providas de atividade ureolítica que demonstraram maior pureza nos ensaios de eletroforese.

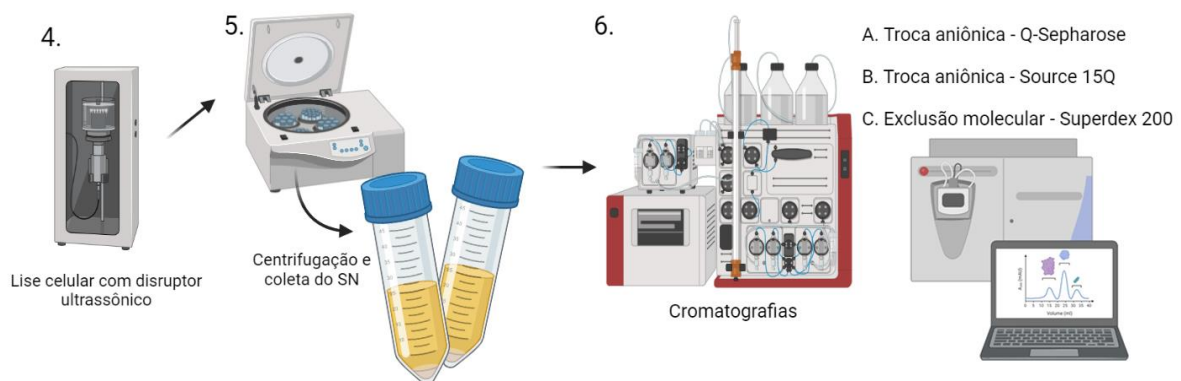


Figura 4.2. Ilustração das etapas de purificação da HPU recombinante produzida. 4) Após a indução, as células passaram por ruptura por meio de sonicação. 5) Visto que a HPU é expressa na forma solúvel, o produto da lise celular foi centrifugado e foi coletado o sobrenadante, que procedeu para as cromatografias. 6) Foram realizadas três cromatografias: duas de troca aniônica e uma de exclusão molecular. Fonte: a autora, figura criada com ferramenta BioRender.

4.2.2. Ensaios de atividade enzimática

A atividade enzimática das amostras coletadas após cada etapa da purificação foi medida utilizando um ensaio colorimétrico com reagente de fenol nitroprussiato, conforme Weatherburn (1967), para determinação de amônia gerada. Uma curva padrão foi construída com sulfato de amônio na faixa de 0,06 a 1,00 mg/ml. Alíquotas de 10 µl dos produtos das purificações foram incubadas com 100 mM de ureia em PBS em um volume final de 103 µl, em placas de 96 poços, por 15 min, a 37°C. Após a parada da reação e desenvolvimento de cor, a absorbância foi medida no espectrofluorímetro SpectraMAX M2 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

Apenas as frações com atividade ureolítica foram encaminhadas para as etapas seguintes de purificação. A amostra final, destinada ao uso nos ensaios *in vivo*, também teve sua atividade ureolítica medida.

4.2.3. Perfil eletroforético e Western blot para confirmação da expressão e purificação

4.2.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE)

As alíquotas de cada etapa do processo de expressão e purificação foram ressuspendidas em tampão de amostra Laemmli 5x (Tris-HCl 200 mM, SDS 10% (m/v), β-mercaptoetanol 10 mM, azul de bromofenol 0,05% (m/v), glicerol 40% (v/v), pH 6.8) (LAEMMLI, 1970). As amostras foram aquecidas a 99°C durante 5 min antes da aplicação nos géis de eletroforese.

Foram utilizados géis de 10% de poliacrilamida para todas as corridas, realizadas em sistema de cuba e cassetes Bio-Rad (Califórnia, EUA). Para estimar a massa molecular das proteínas, utilizou-se o marcador molecular Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Concluídas as corridas, os géis foram corados com solução Coomassie Blue G (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) e descorados com solução ácido acético 20%.

4.2.3.2. Western blot

Concluída a obtenção do perfil eletroforético da HPU purificada, realizou-se ensaios de Western blot (TOWBIN et al., 1979) para confirmação da identidade da proteína. As corridas de SDS-PAGE e a eletrotransferência foram feitas em sistema de cuba e cassetes Bio-Rad, utilizando-se membrana de nitrocelulose da mesma marca com poros de 0,2 μm .

Os anticorpos primário e secundário utilizados foram, respectivamente: Rabbit anti-HpUre β , polyclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) e Goat anti-rabbit IgG, conjugado com fosfatase alcalina (ZyMax, Califórnia, EUA). As bandas proteicas imunorreativas foram coradas com solução 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato/azul de nitrotetrazólio (BCIP/NBT). A figura 4.4 mostra um esquema dos princípios de detecção da técnica.

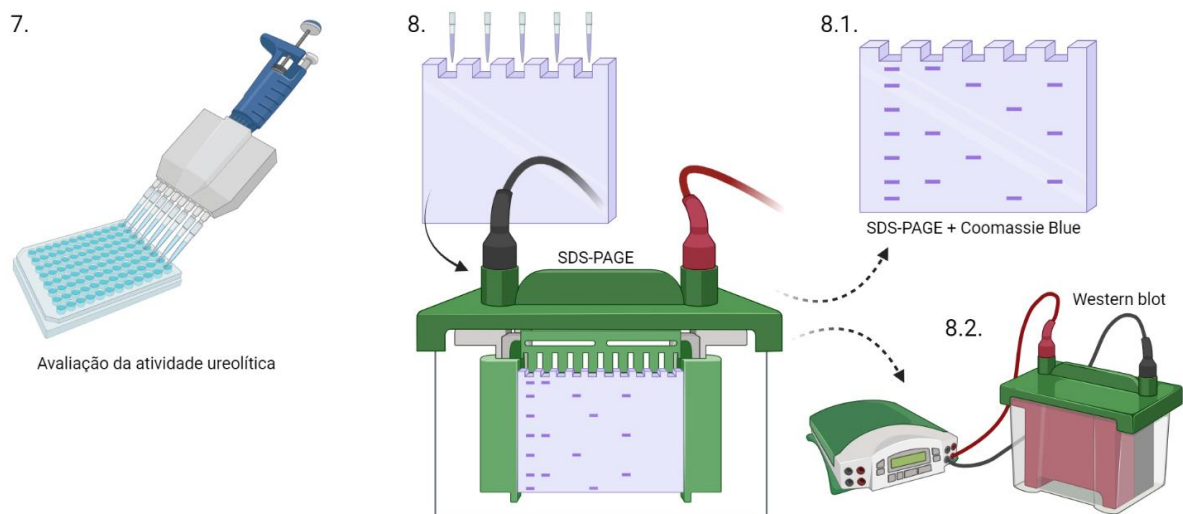


Figura 4.3. Ilustração dos ensaios de atividade ureolítica, SDS-PAGE e Western blot. 7) O ensaio de atividade ureolítica foi realizado após cada uma das cromatografias, para definir quais frações eluídas seriam encaminhadas para as etapas seguintes da purificação. 8.1) O perfil eletroforético das frações da SEC foi avaliado para selecionar as amostras utilizadas nos ensaios in vivo. 8.2) O ensaio de Western blot confirmou a presença da proteína de interesse (figura 5.7). Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender.

Detecção em Western blot

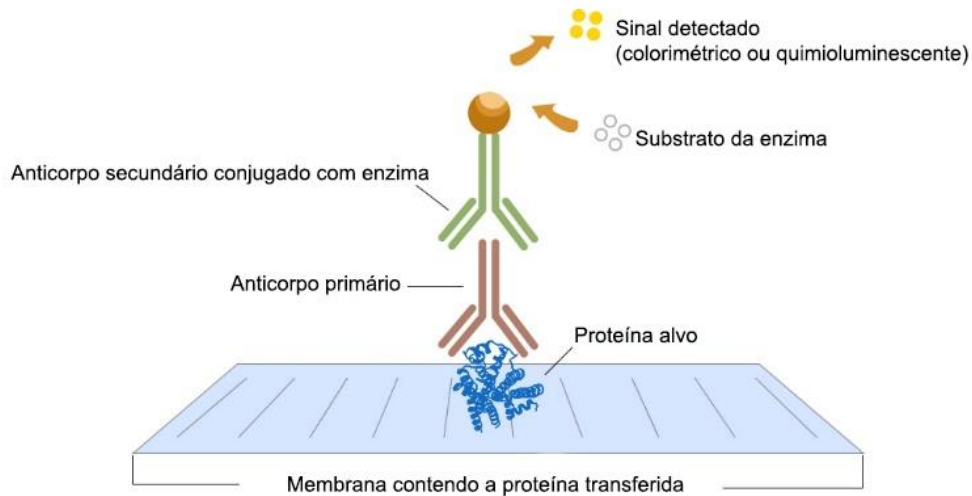


Figura 4.4. Princípios de detecção da técnica Western blot. Fonte: adaptado de <https://www.elabscience.com/List-detail-306.html>.

4.2.4. Determinação da concentração de proteína pelo método de Bradford

A concentração de proteína em solução foi medida pelo método de Bradford (1976). Antes de determinar a concentração de HPU em solução, estabeleceu-se uma curva padrão de absorbância a 595 nm (A_{595}) com soro albumina bovina em concentrações conhecidas, de 0,062 a 2,000 mg/ml. Essa curva conteve seis pontos, distribuídos segundo diluição seriada.

4.2.5. Espectros de absorção e emissão da HPU

A partir da concentração proteica estimada na etapa 4.2.4, preparou-se uma solução de 0,1 mg/ml de HPU purificada para a medição do espectro de absorção e emissão. Esse ensaio foi conduzido em um espectrofluorímetro SpectraMAX M2, com o objetivo de analisar a fluorescência intrínseca da proteína.

4.2.6. Medição do diâmetro hidrodinâmico da HPU por meio de espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*, DLS)

Os ensaios de DLS foram conduzidos no Centro de Nanociência e Micro-nanotecnologia da PUCRS (NanoPUCRS), em um aparelho Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Malvern, Reino Unido). Os dados obtidos nesses ensaios foram analisados no Zetasizer Software, também da Malvern Pananalytical. Três diferentes partidas (provindas de cultivos bacterianos diferentes) de HPU purificada tiveram seu diâmetro hidrodinâmico medido por meio de DLS, após diferentes intervalos de tempo a partir da última etapa de purificação (cromatografia de exclusão molecular), com o objetivo de monitorar o estado de oligomerização da proteína em função do tempo e condições de armazenamento (FOLLMER *et al.*, 2004).

As amostras foram depositadas em cubetas de quartzo e utilizou-se laser He-Ne de 633 nm e ângulo de 175° com detecção de retrodispersão para avaliar as populações da molécula em solução na temperatura ambiente (20°C), verificando-se a polidispersividade e o diâmetro hidrodinâmico e estimando-se a massa molecular. Cada amostra foi medida três vezes.

4.3. Marcação com fluoróforos

4.3.1. Estudos *in silico*

Os ensaios de DLS indicaram qual o oligômero de HPU predominante em solução. Utilizando dados do banco Protein Data Bank (PDB) (BERMAN *et al.*, 2000) e o software Swiss PDB Viewer (SPDBV) (GUEx e PEITSCH, 1997), foram feitas simulações da molécula de HPU (PDB 1E9Z) nas condições experimentais

planejadas, a fim de determinar o número de resíduos de lisina disponíveis para ligações, pois os fluoróforos utilizados se ligam a eles.

Para os experimentos de imageamento óptico *in vivo* (descritos em detalhe no item 4.4), estabeleceu-se um segundo grupo experimental, que recebeu, na mesma concentração (em mg/ml) e pela mesma via que os animais injetados com HPU, albumina sérica de camundongo (mouse serum albumin, MSA; GenBank ID: 11657) marcada com o mesmo fluoróforo. A finalidade desse grupo foi atuar como uma espécie de controle para o grupo HPU, no sentido de comparar a cinética de absorção e excreção de uma proteína exógena (HPU) com uma proteína naturalmente presente e abundante no organismo do animal, à qual não se espera resposta imunológica. Ademais, as albuminas séricas não apresentam função enzimática conhecida (revisto em FASANO *et al.*, 2005; ANAND e MUKHERJEE, 2013).

Na ausência de informações a respeito da estrutura cristalográfica dessa proteína, realizou-se alinhamento *pairwise* no *software online* EMBOSS Needle com a albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*, BSA; PDB 4F5S). Considerando-se a homologia entre as albuminas séricas das duas espécies, a MSA foi modelada por comparação utilizando a BSA como *template* no *software* SWISS-MODEL (GUEx e PEITSCH, 1997), e a estrutura resultante foi processada no SPDBV para detecção de resíduos de lisina potencialmente livres para ligação.

4.3.2. Ensaios preliminares com albumina do soro bovino

Devido a limitações na disponibilidade de HPU e MSA, realizou-se alguns ensaios preliminares com os fluoróforos marcando BSA (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Esses ensaios visaram a testar a sensibilidade do equipamento de imageamento óptico *in vivo* para escolher qual dos fluoróforos seria priorizado nos experimentos subsequentes.

Verificou-se, também por simulações computacionais, a disponibilidade de resíduos de lisina na superfície da BSA. A proteína foi dissolvida em PBS na concentração de 0,3 mg/ml. O protocolo de marcação da BSA foi baseado em Olivera-Severo *et al.*, 2017. Todos os procedimentos envolvendo fluoróforos foram realizados em abrigo da luz, sempre que possível.

Foi destinado 1 ml da solução de BSA para cada fluoróforo. Cada amostra foi incubada com um dos seguintes fluoróforos (um fluoróforo por amostra): Texas Red (Sulforhodamine 101 acid chloride) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA); Alexa Fluor 680 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) ou DyLight 800 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), durante 1h, em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram dialisadas em dialisadores Pur-A-Lyzer (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) contra tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.4, até não ser possível detectar fluorescência no tampão de diálise.

4.3.2.1. Espectros de absorção e emissão da BSA

Em um SpectraMAX M2, foram medidos os espectros de absorção e emissão da BSA, antes e depois da marcação com cada um dos fluoróforos. Determinou-se, assim, os filtros de excitação e emissão a ser utilizados no imageamento óptico *in vivo*.

4.3.2.2. Testes de sensibilidade no equipamento de imageamento óptico *in vivo*

Conhecendo os comprimentos de onda de excitação e emissão da BSA marcada, foi feito um teste preliminar no equipamento In-Vivo MS FX Pro (Bruker, Massachusetts, EUA) do Laboratório de Bioimagem do Centro de Pesquisa Pré-

Clínica do InsCer (CPPC), que consistiu na aquisição de imagens de amostras de BSA marcada em diferentes concentrações, a fim de verificar a detecção do sinal de fluorescência proveniente das amostras marcadas.

As amostras de BSA marcada foram depositadas em uma placa de acrílico de 96 poços e distribuídas em cinco pontos seguindo diluição seriada 1:2, partindo da concentração da solução mãe (0,3 mg/ml), que foi reduzida à metade em cada ponto, sucessivamente. As imagens foram adquiridas utilizando os filtros de excitação e emissão disponíveis com valores mais próximos dos medidos no item 4.3.2.1. A intensidade do sinal de fluorescência foi quantificada utilizando o *software* Bruker MI SE (Bruker, Massachusetts, EUA).

4.3.3. Marcação da HPU com os fluoróforos Texas Red e Alexa Fluor 680 NHS Ester

Inicialmente, foi feita uma tentativa de adquirir imagens de fluorescência utilizando o fluoróforo Texas Red para marcar a HPU. À HPU marcada com o Texas Red, referir-se-á como HPU-TR. O protocolo de marcação foi baseado em Olivera-Severo *et al.*, 2017 (item 4.2.2), e os procedimentos envolvendo fluoróforos foram realizados, sempre que possível, em abrigo da luz.

Porém, a partir dos resultados obtidos, optou-se por utilizar o fluoróforo Alexa Fluor 680 NHS Ester (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) no lugar do Texas Red. O protocolo de marcação foi idêntico ao descrito anteriormente. À HPU marcada com o Alexa Fluor 680, referir-se-á a partir daqui como HPU-AF680.

A MSA foi marcada com o Alexa Fluor 680 NHS Ester seguindo o mesmo protocolo, e, a partir daqui, referir-se-á à proteína conjugada como MSA-AF680.

4.3.4. Ensaios de atividade enzimática da HPU marcada

O efeito da marcação da HPU com fluoróforos na atividade enzimática foi analisado seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.2.2, utilizando-se as proteínas marcadas, a HPU-TR e HPU-AF680.

4.3.5. Espectros de absorção e emissão da HPU marcada

O efeito da marcação da HPU com fluoróforos nos espectros de excitação/emissão foi analisado seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.2.5, utilizando-se as proteínas marcadas, HPU-TR e HPU-AF680.

4.4. Ensaio *in vivo* e *ex vivo*

4.4.1. Procedimentos com animais

O presente trabalho consiste em um estudo longitudinal da biodistribuição da urease de *Helicobacter pylori* marcada com fluoróforos no modelo *Mus musculus Foxn1nu*, utilizando imageamento óptico *in vivo*. Essa atividade se enquadra no subprojeto de pesquisa “Urease de *Helicobacter pylori* e hiperfosforilação da proteína tau: implicações para taupatias”, cadastrado no Sistema de Pesquisas (SIPESQ) da PUCRS sob o número 8807 e vinculado ao projeto guarda-chuva “Multifuncionalidade de Ureasas: fator de virulência de microrganismos e papel na defesa de plantas”, cadastrado no SIPESQ sob o número 5789. Ambos os projetos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS (CEUA).

Camundongos “nude” (*Mus musculus Foxn1nu*), fornecidos pelo Centro de Modelos Biológicos Experimentais (CeMBE) da PUCRS, receberam, por via intraperitoneal ou endovenosa, injeções de 200 µl contendo proteínas marcadas com fluoróforos ressuspendidas em PBS pH 7.4.

Todos os procedimentos de imageamento foram realizados no Laboratório de Bioimagem do CPPC. Para a injeção e aquisição das imagens, os animais foram anestesiados com mistura gasosa de oxigênio e isoflurano (5% para indução, 2,5% para manutenção).

As eutanásias foram realizadas por meio de overdose de isoflurano. Foram coletados os seguintes órgãos para análises posteriores: encéfalo, fígado, rins, pulmões, coração, intestino, baço, estômago e bexiga, além de amostras de sangue e urina. A urina foi recolhida no meio externo com uma seringa, após a excreção que ocorreu no momento da eutanásia.

4.4.2. Testes de injeção e sensibilidade

Além do ensaio preliminar em placa realizado conforme item 4.3.2.2, realizou-se, também, testes *in vivo* com BSA marcada, para determinar qual seria a via de administração e o fluoróforo utilizado para marcar a HPU.

Os testes consistiram na injeção de 10 µg de BSA marcada, diluídos em 200 µl de PBS, pelas vias intraperitoneal (como ilustrado na figura 4.5) e endovenosa. Foram adquiridas imagens dos animais antes da injeção, imediatamente após e 5 minutos após. Nessa etapa, foram determinados os seguintes parâmetros de aquisição das imagens: filtros de excitação e emissão, tempo de exposição, tamanho do campo de visão (*field of view*, FOV), posição do animal, parâmetros de *binning* e tensão máxima (KVP) para as imagens de raios-X.

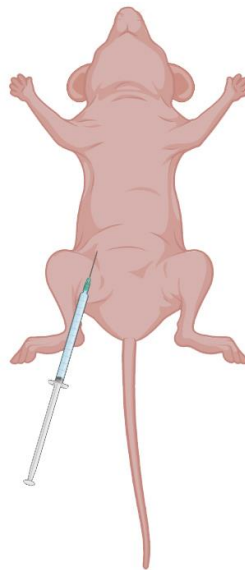


Figura 4.5. Ilustração de camundongo “nude” recebendo injeção intraperitoneal. Todas as injeções por essa via foram administradas no quadrante inferior direito do ventre do animal, como indicado na figura. Fonte: a autora, figura criada com a ferramenta BioRender.

4.4.3. Grupos experimentais para o imageamento com a HPU-AF680

Definidos o fluoróforo e a via de administração a serem utilizados, os animais foram divididos em dois novos grupos experimentais: HPU e MSA, que receberam, respectivamente, por via intraperitoneal, 10 µg de HPU-AF680 e albumina do soro de camundongo (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) marcada com o fluoróforo Alexa

Fluor 680 (MSA-AF680). Adicionalmente, foi feito um teste que consistiu na injeção em um animal de 200 µl do último tampão de diálise das amostras, a fim de descartar a possibilidade de que o sinal de fluorescência analisado fosse provindo de moléculas do fluoróforo não ligadas à proteína de interesse na ocasião da injeção.

Ao todo, foram adquiridas imagens de treze animais. Na tabela 4.1, consta a relação dos grupos experimentais de acordo com a injeção recebida.

Tabela 4.1. Grupos experimentais dos ensaios de imageamento óptico *in vivo*, divididos de acordo com a injeção recebida.

Grupo	Massa de proteína por injeção (µg)	Concentração de proteína por injeção (µg/µl)	Número de injeções	Intervalo entre injeções	Massa total de proteína (µg)	Número de animais
BSA-TR i.p.	10	0,05	1	--	10	1
BSA-TR i.v.	10	0,05	1	--	10	1
BSA-AF680 i.p.	10	0,05	1	--	10	2
BSA-AF680 i.v.	10	0,05	1	--	10	1
MSA-AF680 i.p.	10	0,05	1	--	10	2
MSA-AF680 i.p.	10	0,05	2	48 h	20	1
MSA-AF680 i.p.	10	0,05	3	1 semana; 48 h	30	1
HPU-TR i.p.	10	0,05	1	--	10	1
HPU-TR i.v.	10	0,05	1	--	10	1
HPU-AF680 i.p.	10	0,05	1	--	10	1
HPU-AF680 i.p.	10	0,05	2	48 h	20	1
HPU-AF680 i.p.	10	0,05	3	1 semana; 48 h	30	1
Tampão de diálise i.p.	--	--	1	--	--	1

4.4.4. Imageamento óptico *in vivo*

Foram adquiridas imagens de fluorescência dos animais nos seguintes tempos em relação à injeção: antes, imediatamente após, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min e 120 min após (LIM *et al.*, 2020). Excepcionalmente, em alguns ensaios, foram também adquiridas imagens 300 min após a injeção, mas estabeleceu-se como padrão encerrar as aquisições transcorridos 120 min desde a injeção do composto. O tempo durante o qual o animal fica dentro do aparelho para a aquisição das

imagens é de cerca de 60 s. Após cada imagem de fluorescência, foi adquirida uma imagem de raios-X (com os parâmetros estabelecidos no item 4.4.2), para fins de localização dos sinais de fluorescência medidos.

Após as eutanásias, os tecidos e materiais coletados foram depositados em placas de acrílico de 12 poços para a aquisição de novas imagens. Os parâmetros de aquisição foram os mesmos utilizados para as imagens *in vivo*.

4.4.4.1. Processamento das imagens

Todas as análises das imagens foram realizadas no *software* Bruker MI. A metodologia empregada permite uma análise semiquantitativa cujo parâmetro medido é a intensidade do sinal de fluorescência detectado pelo aparelho.

Cada imagem de fluorescência foi sobreposta com sua respectiva imagem de raios-X (adquirida como descrito no item 4.4.4), com a finalidade de localizar a origem do sinal medido em cada aquisição.

A intensidade do sinal de fluorescência medido foi ajustada na mesma escala (de mínimo e máximo) em todas as imagens, e expressa em intensidade relativa de fluorescência (IRF).

Para a análise semiquantitativa de cada imagem, foram desenhadas regiões de interesse (*region of interest*, ROI; *regions of interest*, ROIs) elípticas, que foram posicionadas sobre áreas que apresentaram, nas sequências temporais de imagens de cada animal, sinal de fluorescência (descrito e exemplificado no item 5.3.1), e puderam ser associadas (pelas imagens de raios-X) a órgãos ou outras regiões a ser analisadas.

A área de cada uma das ROIs foi mantida a mesma ao longo das sequências temporais de imagens de cada animal, e a intensidade do sinal de fluorescência dentro de cada ROI foi quantificada em cada imagem adquirida nos devidos intervalos de tempo em relação à injeção. O conjunto de valores adquiridos para cada ROI (ao longo do tempo) foi normalizado em uma escala de 0 a 100 para modelagem matemática do comportamento do sinal medido em relação ao tempo decorrido desde a injeção. Os valores foram expressos como intensidade normalizada (grandeza adimensional).

Os critérios para a definição das ROIs em cada imagem estão descritos em suas respectivas legendas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produção e caracterização da urease recombinante de *Helicobacter pylori*

5.1.1. Produção da HPU

A HPU foi produzida conforme descrito na seção 4.2. A expressão da proteína de interesse foi confirmada pela atividade enzimática medida nos ensaios (item 4.2.2.), e pela presença de bandas nas alturas esperadas para as duas subunidades da HPU em SDS-PAGE e Western blot (item 5.1.3).

5.1.2. Purificação e caracterização da HPU

A HPU produzida foi purificada por meio de três cromatografias, como descrito na seção 4.2. Visando a otimizar a purificação, foram testados diferentes protocolos de eluição nas cromatografias. Ingle e Lali (2018) reportaram maior eficiência de um gradiente descontínuo (em degraus) de eluente em cromatografia de troca iônica no lugar do gradiente linear.

Ambos os protocolos foram aplicados sobre frações da mesma amostra nas cromatografias de troca aniônica em Q-Sepharose (figuras 5.1 e 5.2) e SOURCE 15Q (figuras 5.3 e 5.4). A comparação dos resultados foi feita por meio da avaliação da atividade enzimática e por SDS-PAGE.

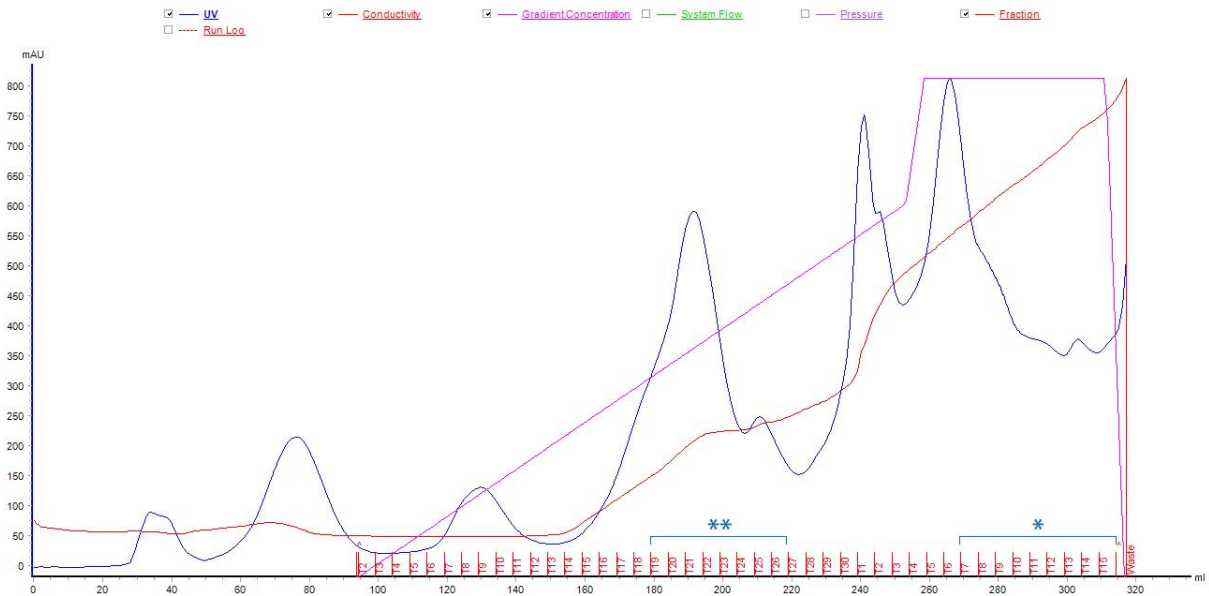


Figura 5.1. Cromatograma de troca aniônica em Q-Sepharose realizada com eluição em gradiente contínuo de NaCl de 0 a 500 mM, em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.0 (indicado pela curva rosa). O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorvância a 280 nm (A_{280}). Ensaio de atividade ureolítica indicaram a presença de urease nas frações 19-26 em maior quantidade (assinaladas com dois asteriscos azuis) e nas frações 37-45, indicadas por um único asterisco. Resultados típicos.

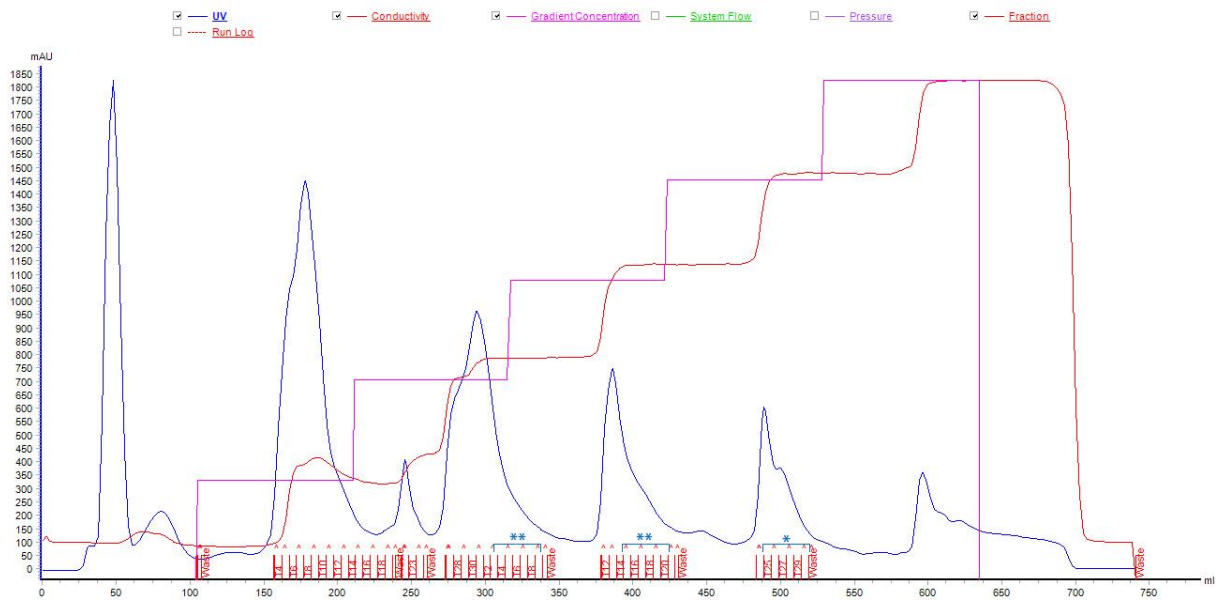


Figura 5.2. Cromatograma de troca aniônica em Q-Sepharose realizada com eluição em gradiente descontínuo de NaCl (0, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM, indicados pela linha rosa), em tampão 20 mM, pH 7.0. O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorvância a 280 nm (A_{280}). Frações com atividade ureolítica estão indicadas com asteriscos azuis. Resultados típicos.

Foram encaminhadas para as etapas seguintes de purificação as frações com maior “atividade específica” (com maior atividade enzimática e menores leituras de A_{280}), pois essa combinação indica maior quantidade de urease em relação a outras proteínas.

O protocolo de eluição descontínua (em degraus) na cromatografia realizada na coluna Q-Sepharose resultou em uma corrida de duração muito mais longa (cerca de 750 ml no lugar de cerca de 320 ml da corrida com gradiente contínuo, como pode ser verificado nas figuras acima). A presença de atividade ureolítica nos picos eluídos em 200, 300 e 400 mM de NaCl resultou em um volume muito maior de amostra para ser encaminhado à etapa seguinte. Demonstrou-se, por SDS-PAGE, que a mudança no protocolo, que trouxe diversos empecilhos – cromatografia mais demorada, maior gasto de soluções e maior volume para ser aplicado na cromatografia seguinte – não foi benéfica para o processo, e optou-se por continuar utilizando a eluição com gradiente contínuo de NaCl nessa etapa da purificação.

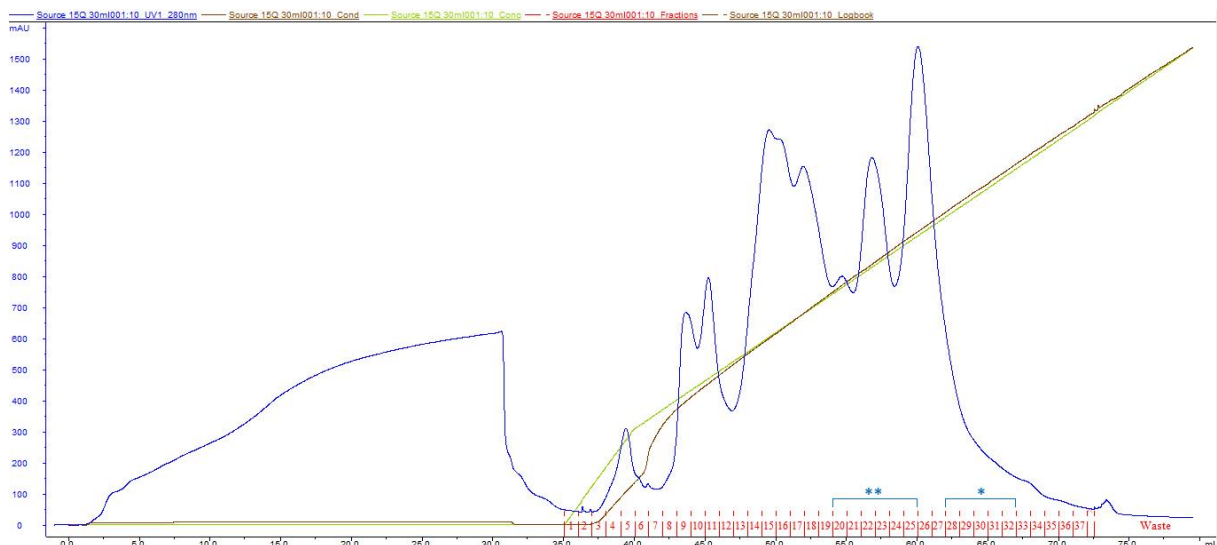


Figura 5.3. Cromatograma de troca aniônica em SOURCE 15Q realizada com gradiente contínuo de NaCl de 0 a 500 mM, em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.5 (indicado pela curva verde). O traçado em azul indica conteúdo proteico das frações medido por absorvância a 280 nm (A_{280}). Frações indicadas com asteriscos azuis (no eixo das abscissas) apresentaram atividade ureolítica, que foi avaliada qualitativamente. As frações com dois asteriscos apresentaram mais atividade ureolítica e foram encaminhadas para a SEC. Resultados típicos.

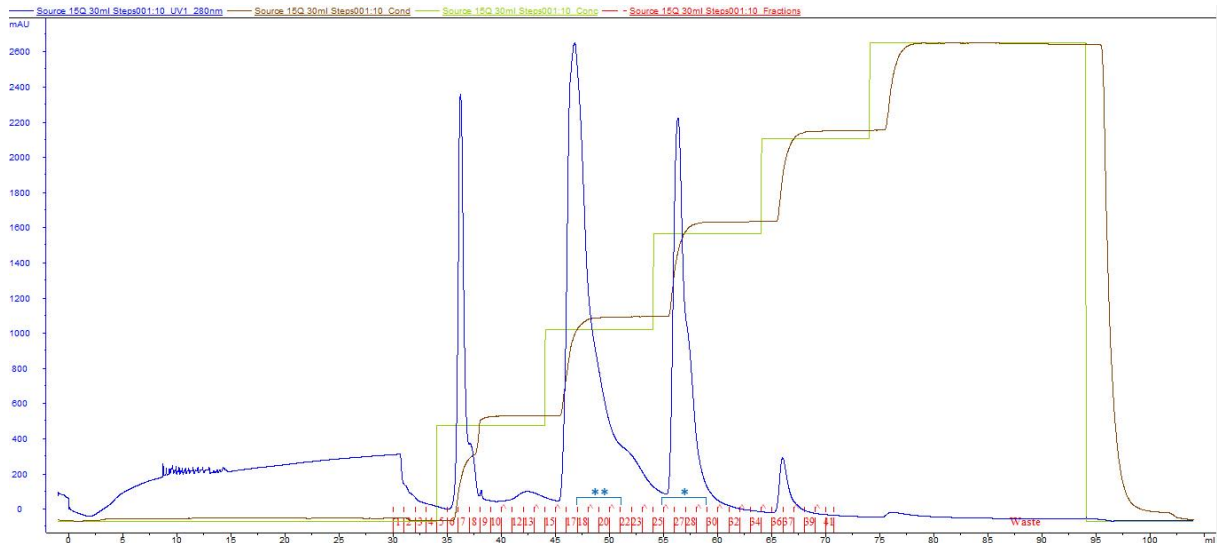


Figura 5.4. Cromatograma de troca aniônica em SOURCE 15Q realizada com eluição em gradiente descontínuo de NaCl (0, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM e 500 mM, indicados pela linha verde), em tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7.5. Observou-se melhor separação da HPU em relação a outras proteínas utilizando esse protocolo, estando a proteína majoritariamente presente no pico proteico eluído com 200 mM NaCl, indicado com dois asteriscos no eixo das abscissas. O *pool* dessas frações procedeu para a última etapa da purificação. Resultados típicos.

Seguindo o mesmo critério adotado anteriormente (mais atividade ureolítica e menor quantidade total de proteína), foram escolhidas as frações que procederam para a SEC. Diferentemente do observado na IEC em Q-Sepharose, a eluição descontínua (degraus com concentrações crescentes) de NaCl se mostrou vantajosa na IEC em SOURCE 15Q, o que foi confirmado por meio de SDS-PAGE dos *pools* de amostra resultantes de cada uma das cromatografias. Os géis revelaram a presença de menos bandas na fração do *pool* eluído com o gradiente descontínuo, indicando maior pureza da amostra, portanto, optou-se por adaptar o protocolo original de IEC realizada na coluna SOURCE 15Q para ter essa forma de eluição.

A última etapa da purificação da HPU foi uma cromatografia de exclusão molecular em uma coluna Superdex 200. Foi relatado na literatura que, em SEC, a HPU é eluída na forma de hexâmeros de ~540 kDa (HU e MOBLEY, 1990), sendo possível prever o volume aproximado de eluição da proteína, como foi confirmado e mostrado na figura 5.5. A figura 5.6 mostra a curva de calibração da coluna utilizando proteínas de massas moleculares conhecidas: tireoglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa) e ovalbumina (44 kDa). A partir dos volumes nos quais essas moléculas são eluídas, estabeleceu-se

uma curva que permite estimar a massa molecular de moléculas eluídas em ensaios posteriores com base no volume de eluição.

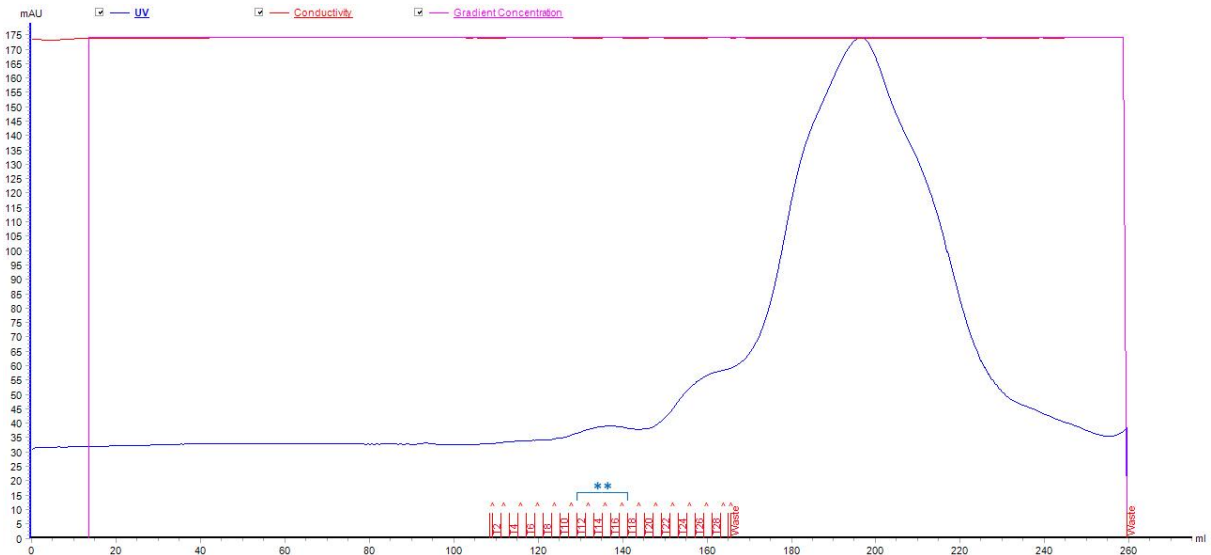


Figura 5.5. Cromatograma de exclusão molecular em Superdex 200. Ensaios de atividade ureolítica indicaram que a urease foi eluída entre 120 e 140 ml (vide asteriscos azuis no eixo das abscissas), volume que, segundo calibração da coluna, corresponde a massas condizentes com o esperado para a forma hexamérica da HPU (~540 kDa). Resultados típicos.

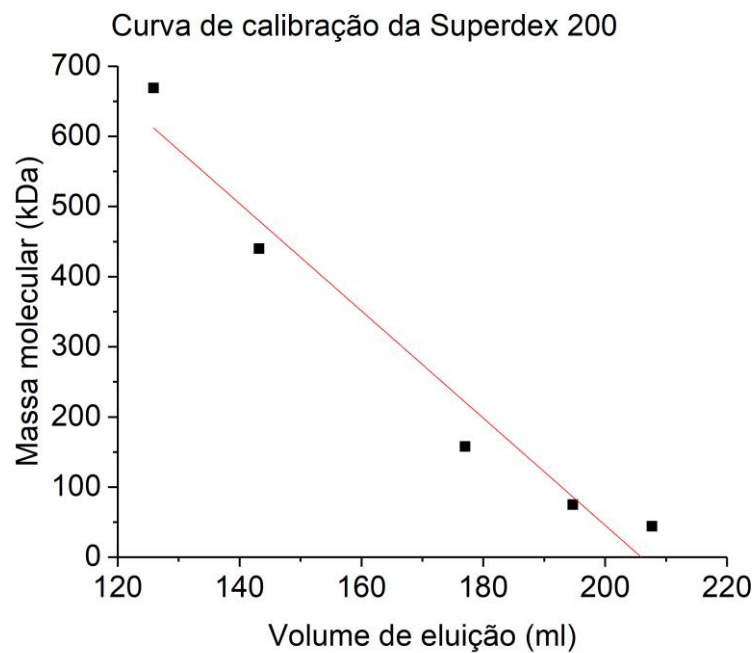


Figura 5.6. Curva de calibração da coluna Superdex 200, utilizando proteínas de massas moleculares conhecidas, que correspondem aos pontos no gráfico.

5.1.3. Perfil eletroforético e Western blot

Alíquotas de cada uma das etapas da purificação (de cada *pool* que procedeu para a etapa subsequente) e todas as frações providas de atividade enzimática eluídas na SEC foram submetidas a ensaios de SDS-PAGE, para que sua pureza fosse avaliada. Em condições desnaturantes (presença do detergente SDS), as duas cadeias polipeptídicas da HPU são separadas; subunidade α , de 62 kDa, e subunidade β , de 30 kDa (KAPPAUN *et al.*, 2018), como observado nas figuras 5.7 e 5.8.

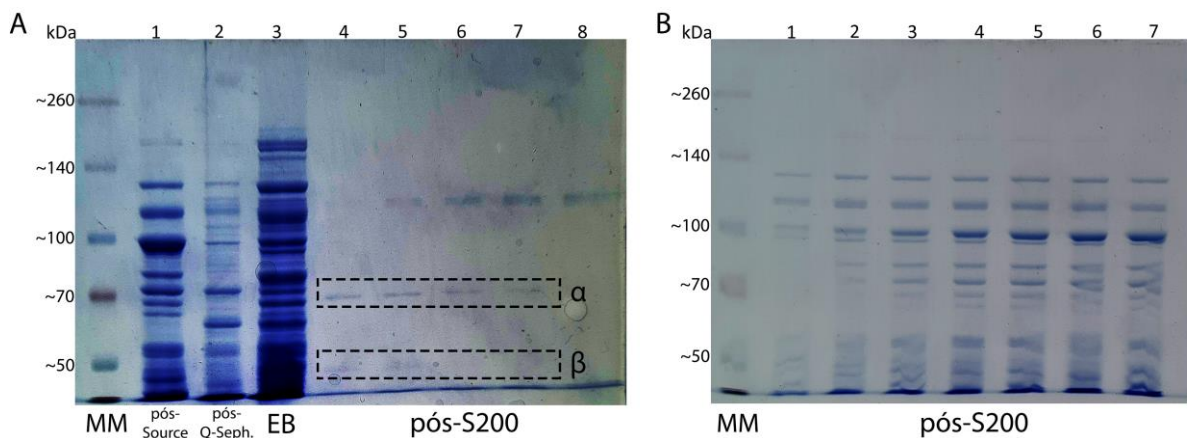


Figura 5.7. SDS-PAGE de frações coletadas ao longo do processo de purificação da HPU. A) 1. Após a segunda IEC; 2. Após a primeira IEC; 3. Extrato bruto (fração solúvel) de *Escherichia coli* transformada com o plasmídeo contendo a sequência da HPU; 4-8. Frações coletadas na SEC providas de atividade ureolítica. As Frações 4-7 apresentaram quantidade significativa de urease, como fica evidente com a presença das bandas próximas de ~70 kDa e abaixo de ~50 kDa (indicadas com tracejado), que correspondem às duas subunidades da HPU. B) 1-7 frações coletadas na SEC providas de atividade ureolítica. Todas as frações apresentaram excesso de contaminantes e pouca quantidade aparente de urease, portanto, foram descartadas. Resultados típicos.

A identidade da HPU purificada foi corroborada por Western blot (figura 5.8). A presença de bandas na membrana indica o reconhecimento da proteína de interesse pelo anticorpo primário (anti-subunidade α da HPU).

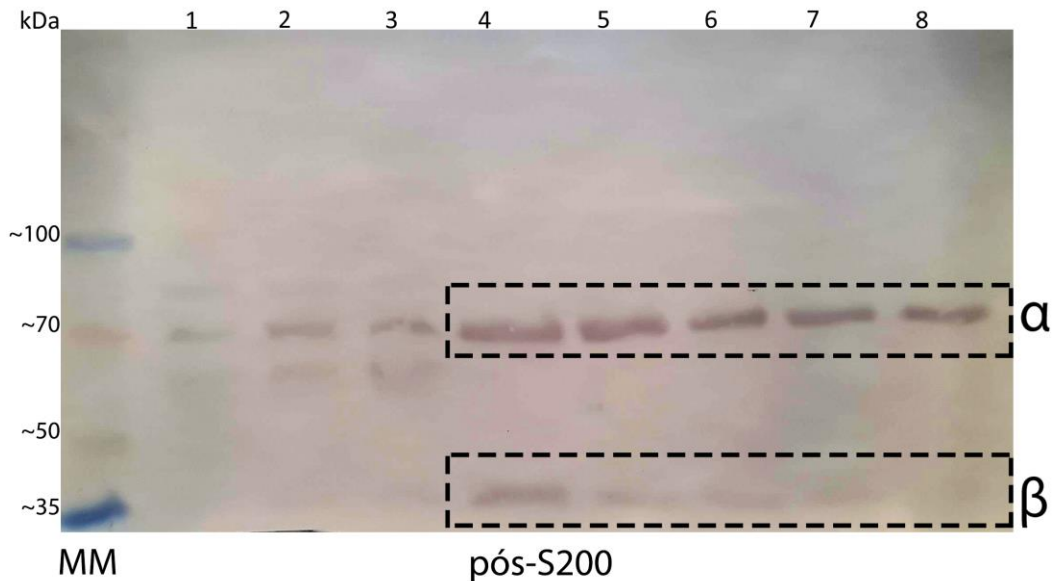


Figura 5.8. Western blot de frações da SEC providas de atividade ureolítica, dentre elas, as que foram utilizadas em experimentos *in vivo* (4-8). As bandas próximas de ~70 kDa e abaixo de ~50 kDa nas frações 4-8, correspondem às mesmas destacadas com tracejado nos géis de SDS-PAGE (figura 5.6). Resultados típicos.

5.1.4. Medição do diâmetro hidrodinâmico da HPU por meio de espalhamento dinâmico de luz

Embora o volume de eluição da HPU em SEC corresponda a uma massa de cerca de 540 kDa, compatível com a forma hexamérica, foi reportado na literatura (HA *et al.*, 2001) que esse achado resultaria de um comportamento anômalo da proteína nesse tipo de cromatografia, sendo a conformação real predominante em solução a forma dodecamérica, de 1,2 MDa e cerca de 13 nm de diâmetro.

Para estimar a quantidade de moléculas de fluoróforo que poderia se ligar a uma molécula de HPU, foi necessário determinar quais, e quantos, resíduos de aminoácidos disponíveis para ligação existem em sua superfície, e, para isso, medir as dimensões (massa molecular e diâmetro) dos oligômeros da proteína em solução, por meio de outra técnica além da SEC. A fim de medir o diâmetro hidrodinâmico da HPU em solução, foram feitas medidas de DLS de três amostras, providas de partidas distintas, em diferentes intervalos de tempo após a SEC, todas armazenadas no mesmo tampão, de pH 7.4, e a 4°C. As medidas foram realizadas três vezes em casa ensaio.

Na ocasião das medidas de DLS, as amostras mostraram-se enzimaticamente ativas. Ainda que as medidas tenham apresentado polidispersividade, indicando a presença de mais de uma população de moléculas em solução, todos os dados apontaram para a predominância de uma única população, cujo diâmetro hidrodinâmico foi medido com sucesso pelo Zetasizer, como mostram as figuras 5.9 e tabela 5.1.

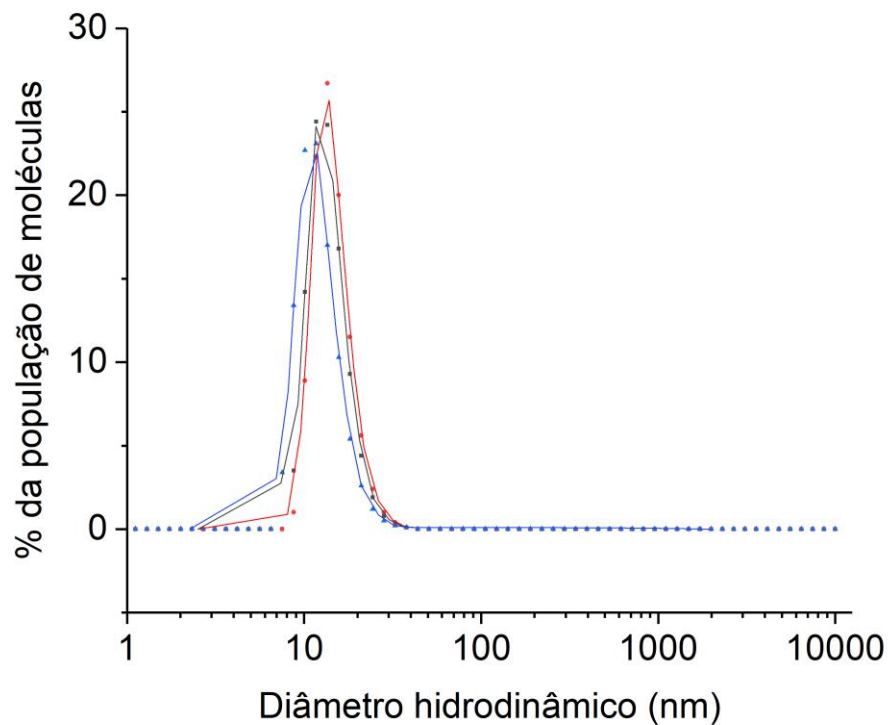


Figura 5.9. Medidas de DLS de uma amostra de HPU purificada, obtidas 24 dias após a SEC. Resultados típicos.

Tabela 5.1. Relação do tempo após a SEC e o diâmetro hidrodinâmico expresso em distribuição de número (convertido a partir da distribuição de intensidade medida) das amostras analisadas por DLS.

Amostra	Data do ensaio	Dias após SEC	Diâmetro hidrodinâmico medido	Desvio padrão (nm)
1	23/07/2020	6	13,60	± 3,70
1	23/07/2020	6	12,84	± 3,68
1	23/07/2020	6	14,76	± 3,74
2	28/07/2020	11	13,71	± 3,72
2	28/07/2020	11	12,59	± 3,68
2	28/07/2020	11	12,57	± 3,61
3	17/12/2020	24	13,98	± 3,88
3	17/12/2020	24	14,69	± 3,93
3	17/12/2020	24	12,44	± 3,78

Ha *et al.* (2001) reportaram que a HPU purificada havia sido tratada como um hexâmero com base no seu volume de eluição em cromatografia de exclusão molecular, possivelmente devido à sua forma compacta e esférica, mas que a real conformação da proteína seria um dodecâmero de cerca de 13 nm de diâmetro. Todos os resultados obtidos nas medidas de DLS apontaram para a predominância de moléculas de cerca de 13 nm de diâmetro em solução, portanto, considerou-se a forma dodecamérica da HPU para as simulações computacionais realizadas. Os dados sugeriram ainda que a HPU permanece no mesmo estado de oligomerização durante 24 dias nas condições de armazenamento utilizadas.

5.2. Estudos para marcação das proteínas com fluoróforos

5.2.1. Estudos *in silico*

O alinhamento *pairwise* das sequências das albuminas séricas murina e bovina resultou em 84,1% de similaridade e 69,5% de identidade entre resíduos de

aminoácidos. A identidade superior a 30% valida o uso da estrutura tridimensional da BSA como *template* para a modelagem da MSA (FISER, 2010). A modelagem a partir da BSA foi feita no *software* SWISS-MODEL.

Com base nas informações disponíveis na literatura e nos resultados obtidos nos ensaios de DLS, a HPU foi simulada em sua forma dodecamérica. As simulações computacionais das duas proteínas realizadas no SPBDV indicaram a presença de resíduos de lisina potencialmente disponíveis para ligação com fluoróforos nas condições experimentais planejadas (tampão PBS pH 7.4, temperatura ambiente), como mostram as figuras 5.10 a 5.12.

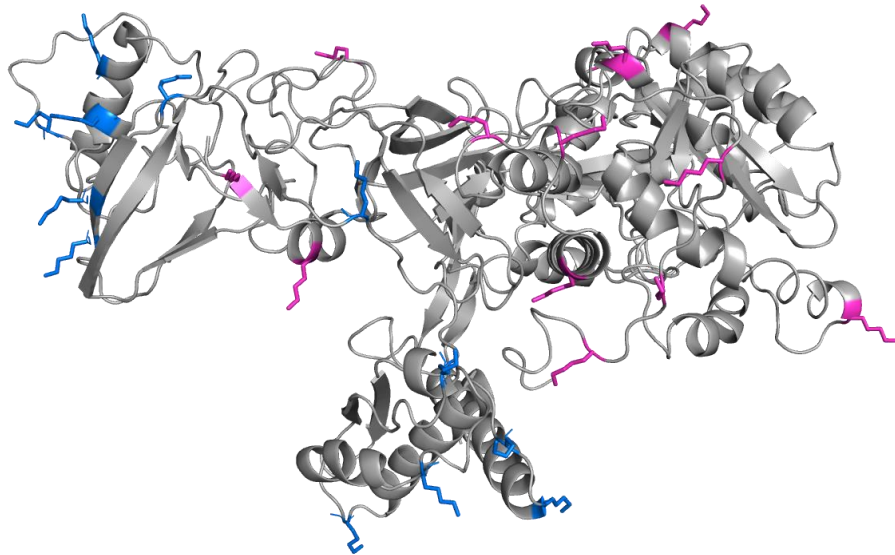


Figura 5.10. Representação em *cartoon* da estrutura terciária de uma unidade funcional (dímero AB) de HPU (código Protein Data Bank 1E9Z). Os resíduos de aminoácidos assinalados em rosa e azul são as lisinas potencialmente livres presentes nas cadeias A e B, respectivamente.

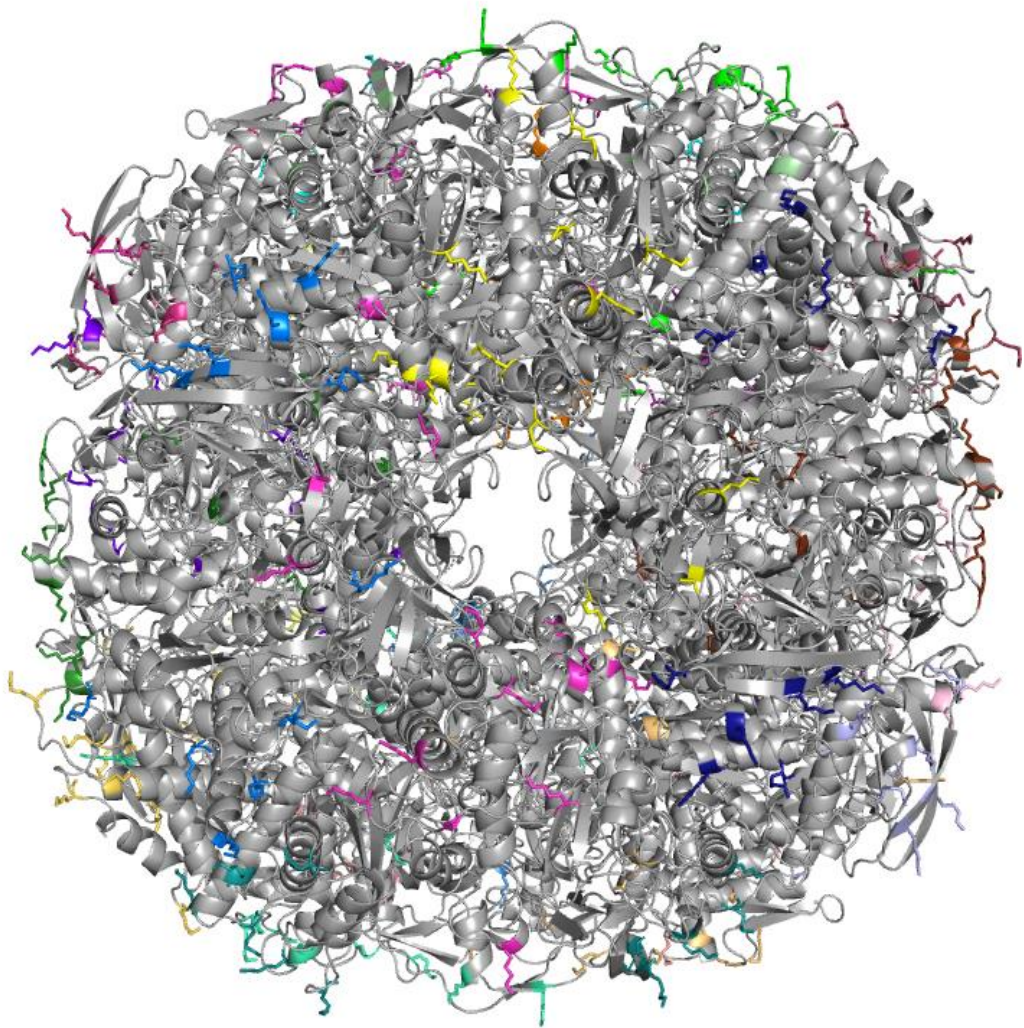


Figura 5.11. Representação em *cartoon* da estrutura quaternária de um dodecâmero de HPU. Os resíduos de aminoácidos assinalados em diferentes cores correspondem às lisinas potencialmente livres de cada uma das unidades funcionais do oligômero (vide figura 5.10).

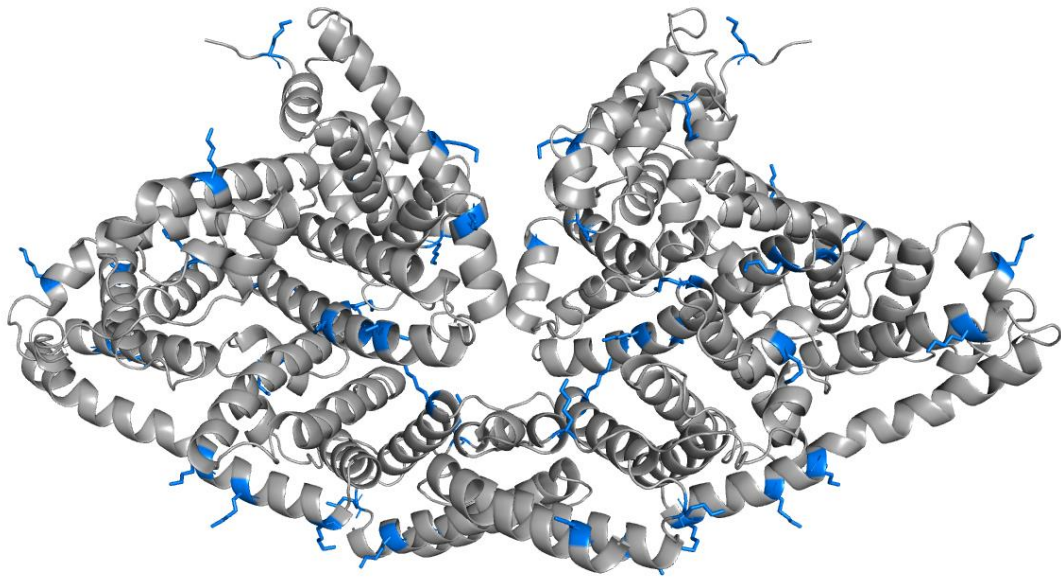


Figura 5.12. Representação em *cartoon* da estrutura quaternária do dímero da albumina sérica de *Mus musculus* modelada. Os resíduos de aminoácidos em azul correspondem às lisinas potencialmente livres para ligação na superfície da proteína.

Devido à presença de lisinas livres em ambas a HPU e a MSA, optou-se por utilizar fluoróforos com afinidade por esses resíduos.

5.2.2. Espectros de absorção e emissão e testes de injeção e sensibilidade

Foram medidos os espectros de absorção e emissão de cada uma das proteínas antes e depois da marcação fluorescente. Verificou-se que os comprimentos de onda de excitação e emissão medidos para as proteínas após a marcação foram quase idênticos (com diferença de menos de 10 nm) aos dos fluoróforos livres, conforme indicado pelos fabricantes.

Foram utilizados os filtros disponíveis no equipamento de imageamento *in vivo* com os valores mais próximos dos picos de excitação/emissão medidos, contanto que o uso de cada combinação de filtros de excitação e emissão não inviabilizasse a aquisição de imagens de fluorescência (figuras 5.13 e 5.14). Nos casos em que os picos de absorção e emissão medidos eram próximos demais,

inviabilizando a aquisição de imagens, utilizou-se o filtro de emissão seguinte (em ordem crescente de comprimento de onda).

Todas as proteínas marcadas com fluoróforos produziram sinais detectáveis pelo In-Vivo MS FX Pro, quando depositadas em placa de acrílico de 96 poços, nas concentrações planejadas para os experimentos in vivo (0,05 mg/ml), e em concentrações de até cerca de 0,02 mg/ml (figura 5.14).

Apesar dos resultados promissores em placa, as proteínas marcadas com o fluoróforo Texas Red não produziram sinal detectável quando injetadas em camundongos, muito possivelmente em virtude da atenuação do sinal sofrida nos tecidos dos animais.

Para contornar esse obstáculo, buscou-se utilizar fluoróforos com pico de emissão na faixa do infravermelho próximo. Dentre os fluoróforos disponíveis (Alexa Fluor 680 e DyLight 800), optou-se pelo Alexa Fluor 680 devido à maior intensidade do sinal de fluorescência medido, utilizando a combinação de filtros de excitação e emissão mais próxima dos valores medidos experimentalmente.

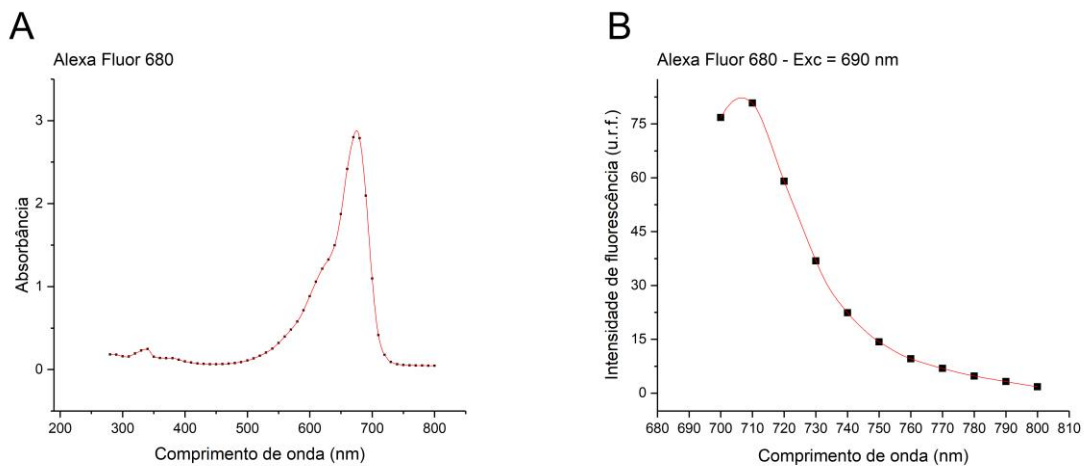


Figura 5.13. Espectros de absorção e emissão da HPU-AF680. A) Espectro de absorção da HPU-AF680. O filtro de excitação do equipamento de imageamento óptico in vivo com valor mais próximo do pico de absorção medido foi o de 690 nm, portanto, utilizou-se esse comprimento de onda para medir o espectro de emissão da proteína marcada com o fluoróforo. B) Espectro de emissão da HPU-AF680 após excitação a 690 nm, com pico em 710 nm. Resultados típicos.

O filtro de emissão disponível de comprimento de onda mais próximo do medido foi o de 700 nm, no entanto, devido à proximidade do comprimento de onda de excitação (690 nm), essa combinação não pôde ser utilizada, pois inviabilizou a

distinção dos sinais produzidos pela própria luz utilizada para excitar o fluoróforo daqueles emitidos pelo fluoróforo após a excitação. Utilizou-se, portanto, o filtro de emissão seguinte, de comprimento de onda de 750 nm.

A figura 5.14 mostra os resultados do teste de sensibilidade realizado com a BSA marcada com o fluoróforo Alexa Fluor 680 NHS Ester (BSA-AF680) e os filtros de excitação e emissão acima mencionados. A solução foi diluída nos poços 1-5 identificados na figura, em concentração decrescente. Assim como nas imagens *in vivo* apresentadas no item 5.3, o sinal de fluorescência medido foi ajustado por valores de mínimo e máximo em uma escala de intensidade relativa de fluorescência (IRF), que consta à direita da imagem adquirida (figura 5.14A).

A figura 5.14B expõe o comportamento linear da relação entre concentração do composto e intensidade (normalizada) do sinal de fluorescência medido. Apesar de diminuir linearmente com a diluição do composto, o sinal de fluorescência foi detectado em todas as concentrações utilizadas.

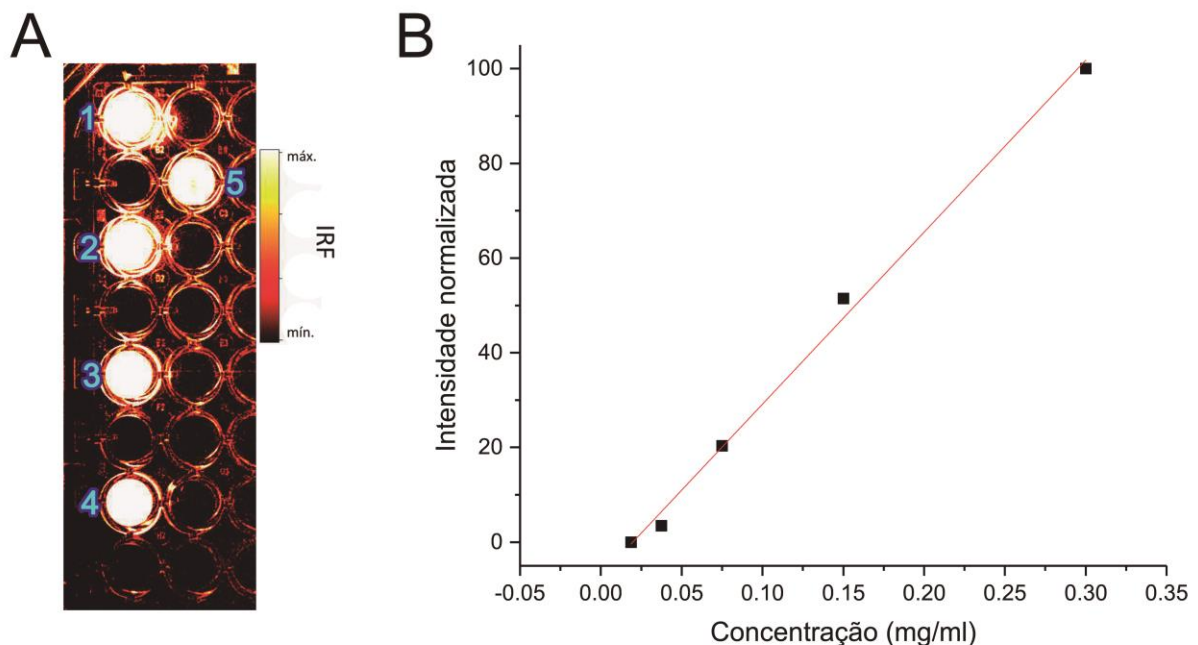


Figura 5.14. Teste de sensibilidade da BSA-AF680. A) Imagem adquirida no equipamento de imageamento óptico *in vivo* da placa contendo a solução BSA-AF680 distribuída seguindo diluição seriada, consistindo nos seguintes valores aproximados: 1) 0,30 mg/ml; 2) 0,15 mg/ml; 3) 0,08 mg/ml; 4) 0,04 mg/ml; 5) 0,02 mg/ml. B) Intensidade normalizada de fluorescência em função da concentração do composto (em mg/ml). Resultados típicos.

Com ambos os fluoróforos Texas Red e Alexa Fluor 680, foram realizadas injeções teste com a BSA marcada pelas vias intraperitoneal e endovenosa. O calibre da veia da cauda do modelo utilizado inviabilizou o emprego da rota endovenosa de injeção.

5.2.3. Ensaios de atividade enzimática após a marcação

A HPU conjugada, tanto com o fluoróforo Texas Red, quanto com o Alexa Fluor 680, apresentou atividade ureolítica, indicando que a ligação com esses fluoróforos não afetou sua capacidade de catalisar a hidrólise da ureia.

5.3. Imageamento óptico *in vivo* e *ex vivo*

5.3.1. Animais injetados com HPU-AF680

Três animais foram injetados com HPU conjugada com Alexa Fluor 680 (HPU-AF680). Desses animais, um deles recebeu três injeções com intervalo de uma semana entre a primeira e a segunda injeção e 48 h entre a segunda e a terceira); um recebeu duas (com intervalo de 48 h entre injeções) e um, apenas uma dose da HPU marcada.

Nas imagens a seguir, estão indicados os tempos de aquisição em relação ao tempo da injeção. O sinal de fluorescência nas imagens foi ajustado por valores de mínimo e máximo, em uma escala de intensidade apresentada à direita de cada imagem (idem figura 5.14A).

As imagens assinaladas com “Antes” são imagens de fluorescência adquiridas anteriormente à injeção, sobrepostas com imagens de raios-X adquiridas posteriormente (a fim de minimizar a exposição dos animais à radiação ionizante). As imagens anteriores às injeções dos compostos conjugados não apresentaram sinal de fluorescência. As imagens assinaladas com “Injeção” foram adquiridas imediatamente após a injeção (menos de 1 min), e as seguintes estão identificadas de acordo com o tempo transcorrido após a injeção.

As sequências temporais de imagens *in vivo* de fluorescência do primeiro animal, que recebeu três injeções (ao qual referir-se-á como “HPU 1”), são mostradas nas figuras 5.15 (HPU 1.1 – após a 1ª injeção); 5.16 (HPU 1.2 – após a 2ª injeção) e 5.17 (HPU 1.3 – após a 3ª injeção). O animal foi eutanasiado 2 h após a

terceira injeção e dissecado para a aquisição de imagens *ex vivo* dos tecidos e materiais coletados (figura 5.18).

Na figura 5.15, verifica-se sinal de fluorescência na pata do animal e na sua cauda, o que foi possivelmente ocasionado por contaminação ao manuseá-lo para a injeção. Por esse motivo, estas imagens não foram analisadas quantitativamente.

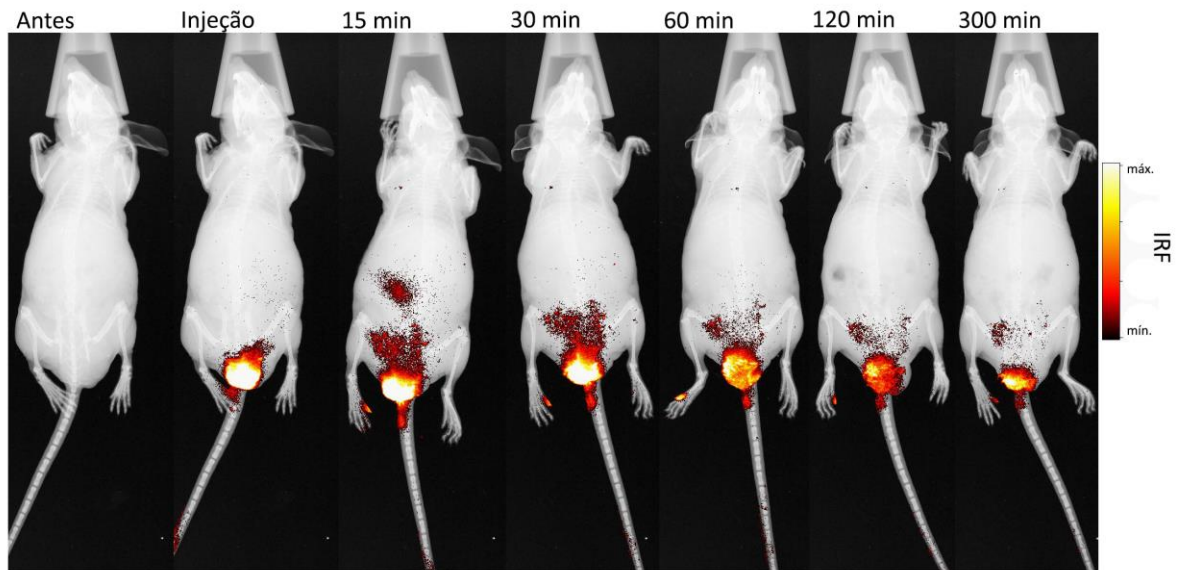


Figura 5.15. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (HPU 1.1).

Nas imagens da segunda (figura 5.16) e terceira (figura 5.17) injeção, observa-se um padrão similar de evolução da biodistribuição da HPU-AF680. Até 15 min após a injeção, o sinal de fluorescência se distribui pelo corpo do animal, e, a partir de 30 min transcorridos desde o momento da injeção, o sinal passa a se concentrar na região pélvica. A fluorescência nesse local aumenta em tempos subsequentes, sugerindo a migração do composto para a bexiga e, portanto, a rápida excreção de ao menos parte do composto injetado.

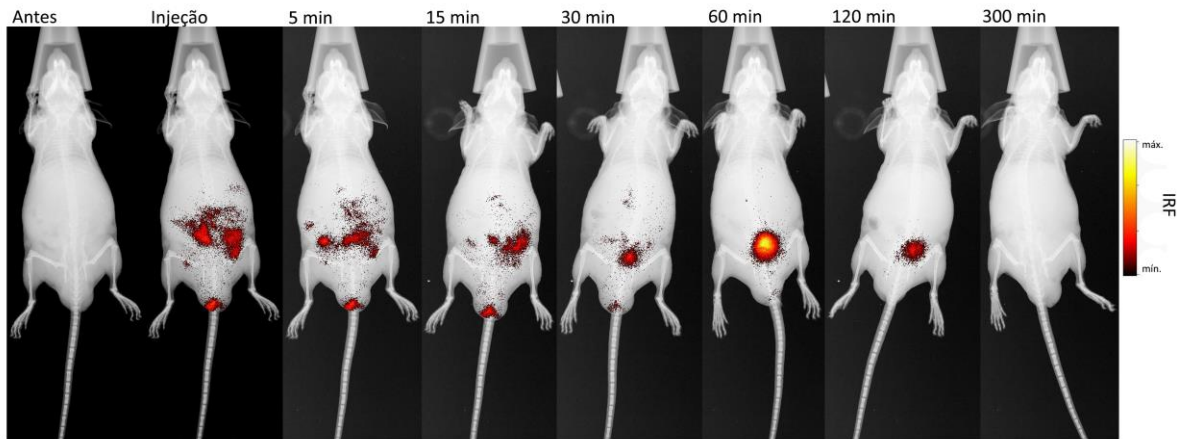


Figura 5.16. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção (HPU 1.2).

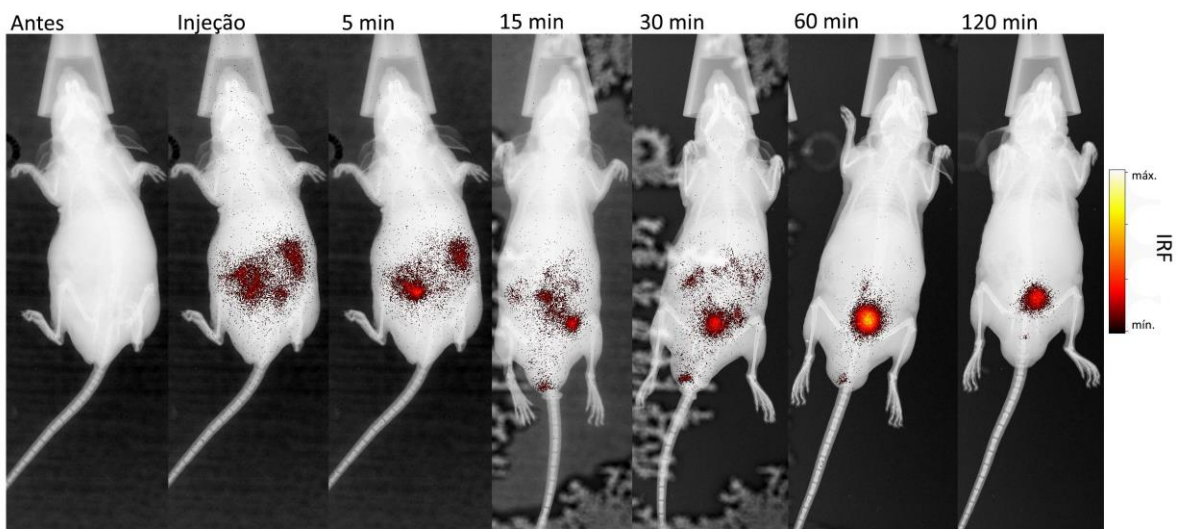


Figura 5.17. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a terceira injeção, administrada 48 h após a segunda (HPU 1.3).

Essa cinética (migração para a bexiga) é confirmada por imagens *ex vivo* dos órgãos do animal 1.3 (figura 5.18), eutanasiado 2 h após a terceira injeção.

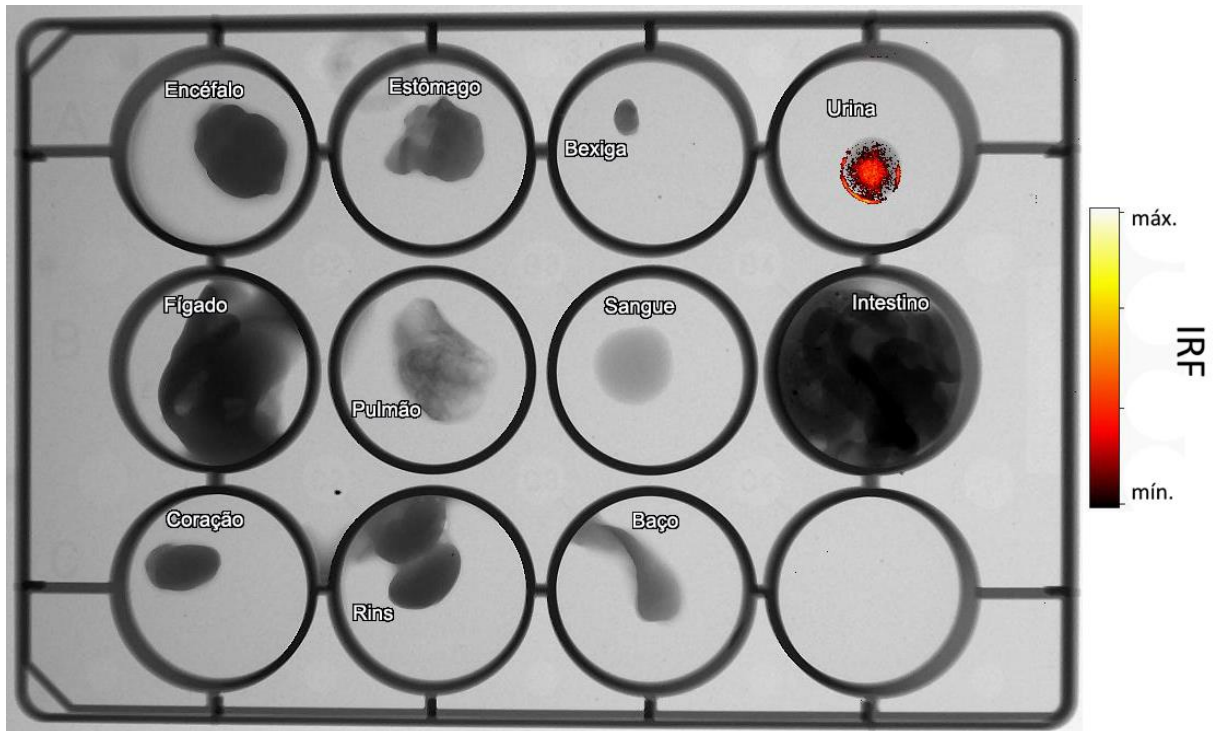


Figura 5.18. Imagem de fluorescência sobreposta com imagem de raios-X dos órgãos e outros materiais coletados do primeiro animal injetado com HPU-AF680, após a eutanásia.

O sinal de fluorescência medido na figura 5.18 aparece apenas na urina, corroborando a hipótese da migração do composto para a bexiga para a excreção. A fim de demonstrar de maneira semiquantitativa a migração do composto de uma região situada na cavidade abdominal no animal – podendo corresponder ao rim – rumo à bexiga, foram desenhadas regiões de interesse (ROIs) sobre as áreas providas de sinal de fluorescência mais intenso, como mostrado na figura 5.19. O sinal foi quantificado e analisado ao longo do tempo (figuras 5.20 e 5.21). A área de cada ROI foi mantida para todos os tempos analisados. Os sinais medidos foram normalizados em uma escala de 0 a 100 e expressos como intensidade normalizada. Os mesmos procedimentos foram repetidos nas sequências de imagens de outros animais.

Os gráficos da figura 5.20 (que correspondem ao animal HPU 1.2) expõem, de maneira semiquantitativa, o decaimento do sinal de fluorescência da região inicial de acúmulo (ROIs 1 e 2 indicadas na figura 5.19). O decaimento do sinal nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha vermelha sólida). Os tempos característicos de *washout* (τ_{out}) e *uptake* (τ_{in}) foram extraídos, respectivamente, das equações de ajuste

$$I(t) = I_{m\acute{a}x}e^{-t/\tau_{out}} + BG \quad (5.1)$$

$$I(t) = I_{m\acute{a}x}(1 - e^{-t/\tau_{in}}) + BG \quad (5.2)$$

Sendo $I(t)$ a intensidade do sinal de fluorescência em função do tempo (medida); $I_{m\acute{a}x}$, a intensidade máxima; t , o tempo, e BG , o sinal de *background*.

Observa-se, concomitantemente ao declínio do sinal nas ROIs 1 e 2, o seu aumento nas ROIs 3 e 4. Isso ocorre de maneira particularmente acentuada 60 min após a injeção, quando chega ao ápice do seu acúmulo na região pélvica, sugerindo a migração do composto dos rins para a bexiga. Após esse processo, a intensidade volta a decrescer, indicando a gradual eliminação do composto.

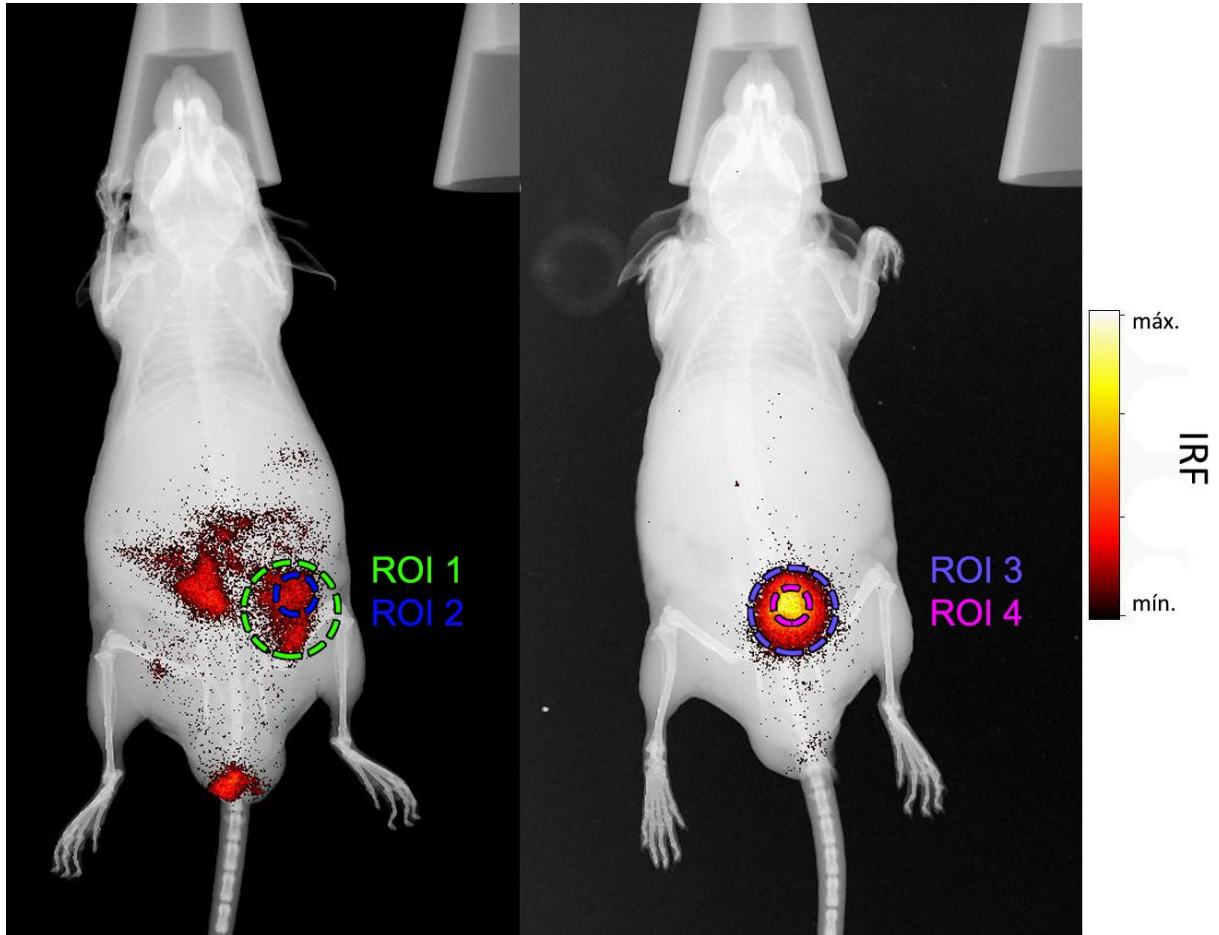


Figura 5.19. Exemplo de ROIs traçadas para análise quantitativa. Os círculos tracejados correspondem às ROIs indicadas pelos nomes com as mesmas cores.

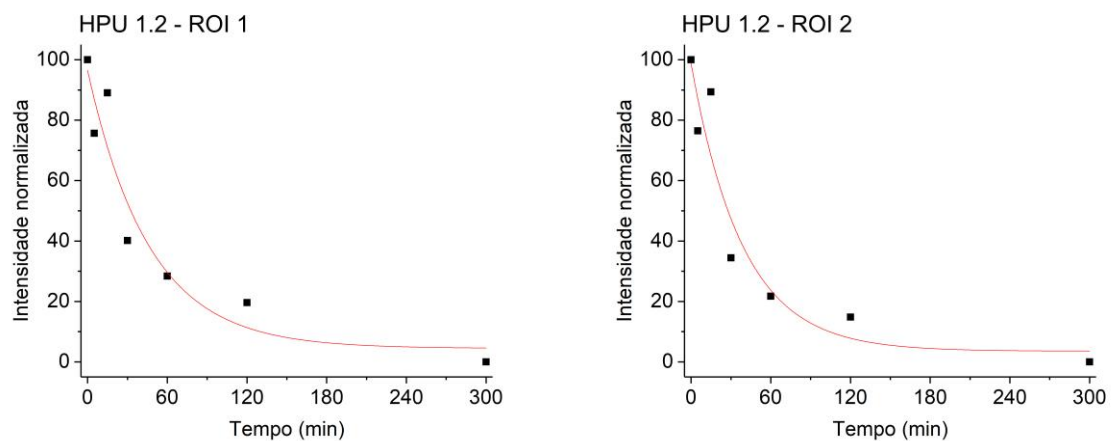


Figura 5.20. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal próxima do fêmur (direito) do animal HPU 1.2 (vide Injeção na figura 5.16). O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).

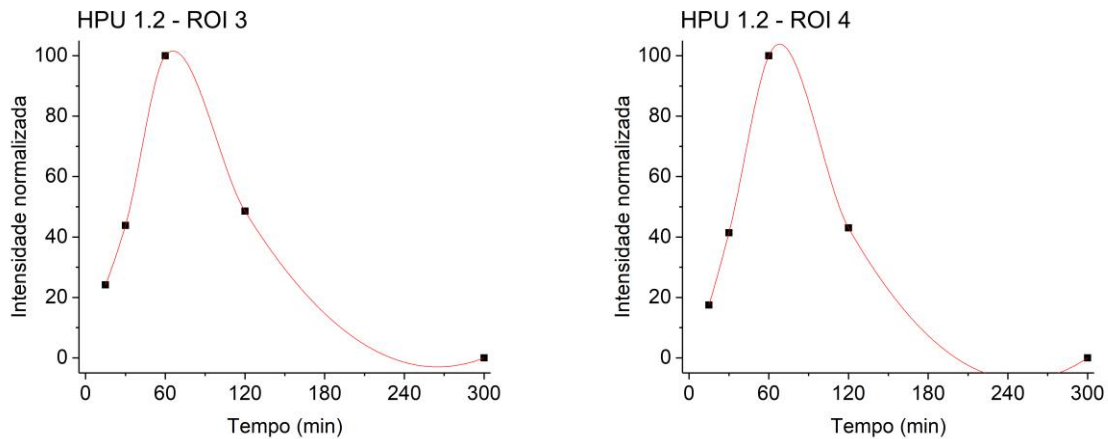


Figura 5.21. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 1.2, provida de sinal de fluorescência a partir de cerca de 30 min após a injeção.

As ROIs traçadas para análise quantitativa das imagens do animal HPU 1.3 seguiram a mesma lógica das do animal HPU 1.2. Nas figuras 5.22 e 5.23 são apresentados os gráficos da análise.

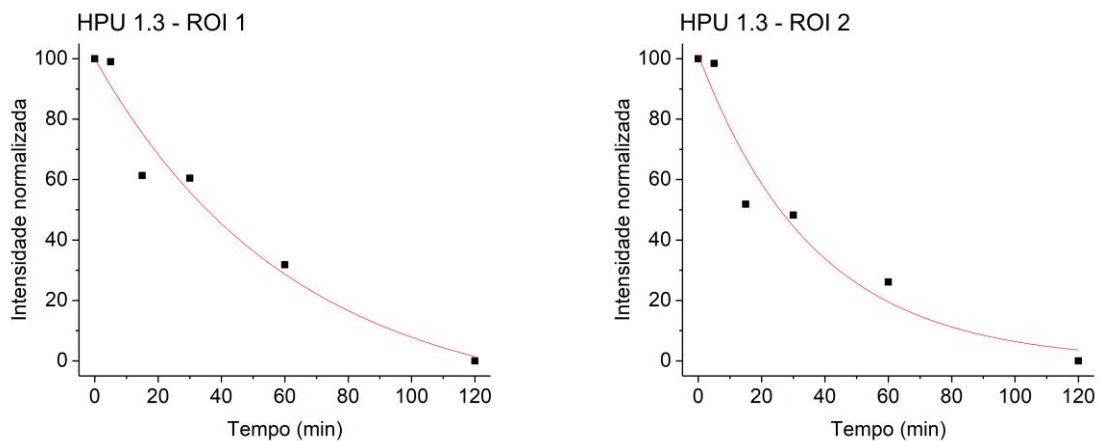


Figura 5.22. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal na lateral direita do corpo do animal HPU 1.3. O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).

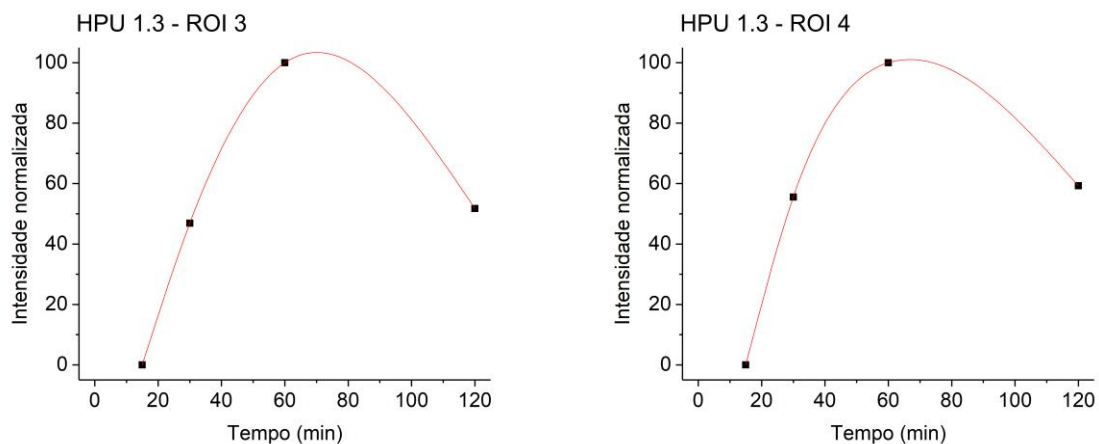


Figura 5.23. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 1.3, provida de sinal de fluorescência a partir de cerca de 30 min após a injeção.

O sinal medido após a terceira injeção comportou-se de maneira semelhante à observada após a segunda: decaimento exponencial na região inicial de *uptake*, associada ao rim direito, seguido de translocação para a região correspondente à bexiga e subsequente decaimento dessa última região.

A constante τ_{out} extraída dos ajustes corresponde a uma aproximação do tempo característico de excreção do composto na região analisada. Particularmente, o ajuste realizado com os dados da ROI 2 (em ambas as sequências de imagens), que diz respeito à região em torno dos pixels com maior intensidade do sinal de fluorescência, produziu as constantes $\tau_{out} = 39$ min e $\tau_{out} = 37$ min, apontando para um tempo característico de *washout* do composto rumo à bexiga de valor próximo de 40 min.

Os gráficos das figuras 5.21 e 5.23 expressam o aumento do sinal na região pélvica, supostamente correspondente à bexiga. Analisando-se simultaneamente as figuras 5.20 e 5.21, assim como 5.22 e 5.23, infere-se a migração do composto dos rins para a bexiga, sustentada pelo observado nas imagens *ex vivo*.

Diferentemente do observado no primeiro animal injetado, no segundo (figura 5.24), não é possível discernir uma região supostamente correspondente ao rim do sítio de injeção. Contudo, assim como no primeiro animal injetado, observa-se migração do composto da região inicial de maior sinal rumo ao centro da pelve.

Novamente, foram traçadas ROIs sobre os locais providos de maior intensidade do sinal de fluorescência. Mediu-se o sinal proveniente da região

circundante ao local de injeção (ROIs 1 e 2, figura 5.25) e na área à qual, a partir dos 30 min, mas mais nitidamente a partir dos 60 min, observou-se deslocamento do sinal, insinuando, outra vez, acúmulo na bexiga (ROIs 3 e 4, figura 5.26).

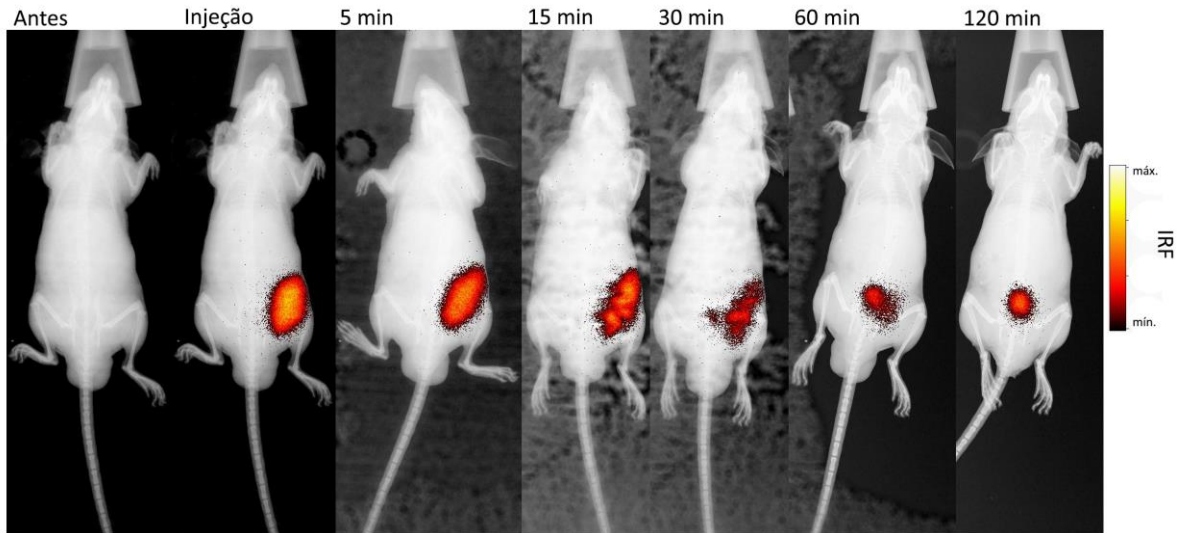


Figura 5.24. Imagens do segundo animal injetado com 10 μg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (HPU 2.1).

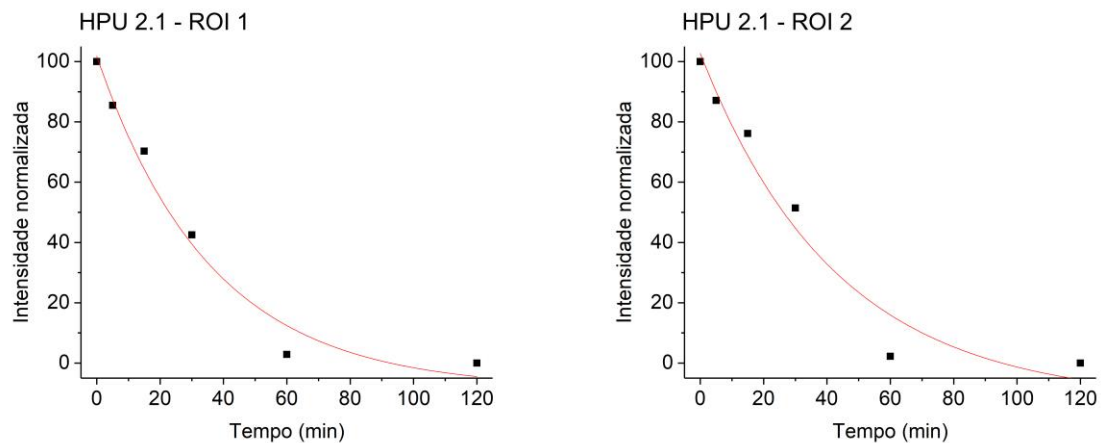


Figura 5.25. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida nas ROIs 1 e 2, traçadas sobre a região provida de sinal na lateral direita do corpo do animal HPU 2.1, nos entornos do sítio de injeção. O decaimento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado pelo ajuste de curva (linha sólida vermelha).

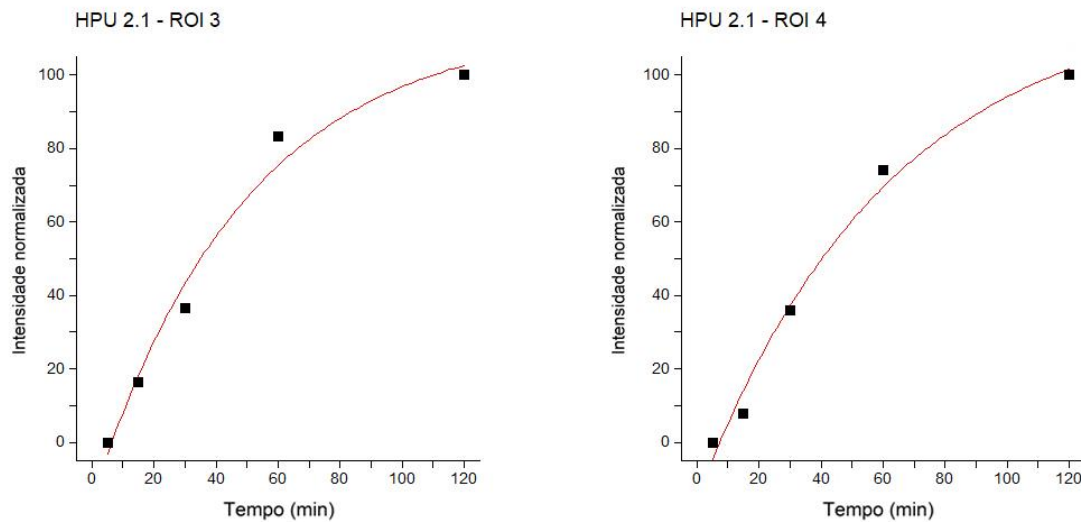


Figura 5.26. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs 3 e 4, traçadas sobre a região pélvica do animal HPU 2.1, provida de sinal de fluorescência a partir de 30 min após a injeção. O aumento do sinal de fluorescência nas regiões medidas é bem descrito por um comportamento exponencial, corroborado por ajuste de curva (linha sólida).

Da análise mostrada na figura 5.25, extraiu-se as constantes de *washout* $\tau_{out} = 36$ e $\tau_{out} = 42$, valores novamente próximos de 40 min, sustentando o que foi observado no animal HPU 1, nas análises da segunda (HPU 1.2) e terceira (HPU 1.3) injeção. Similarmente, os valores ajustados para τ_{in} da análise das ROIs 3 e 4, (figura 5.26), que correspondem à constante de *uptake* na região da bexiga, foram $\tau_{in} = 49$ e $\tau_{in} = 62$. Esses valores reforçam a hipótese da migração do composto para a bexiga ao longo do tempo.

O sinal de fluorescência medido nos mesmos intervalos de tempo no terceiro animal injetado com HPU (HPU 3.1, figura 5.27) não demonstrou o mesmo padrão de comportamento observado nos dois outros animais. Nessa sequência, observa-se intenso sinal espalhado em torno do sítio de injeção. Em até 1 h após a injeção, o composto aparenta deslocar-se dentro do corpo do animal sem acumular-se em nenhuma região definida. 2 h após a injeção, observa-se decaimento da intensidade do sinal medido e o que poderia ser a migração do composto para os rins do animal. Especula-se que, transcorrido mais tempo após a injeção, em intervalos não acessados nesse experimento, poderia ocorrer a concentração do composto na

bexiga, como observado nos outros animais injetados com HPU-AF680. Nesse indivíduo, a cinética de translocação do composto aparenta ser mais lenta.

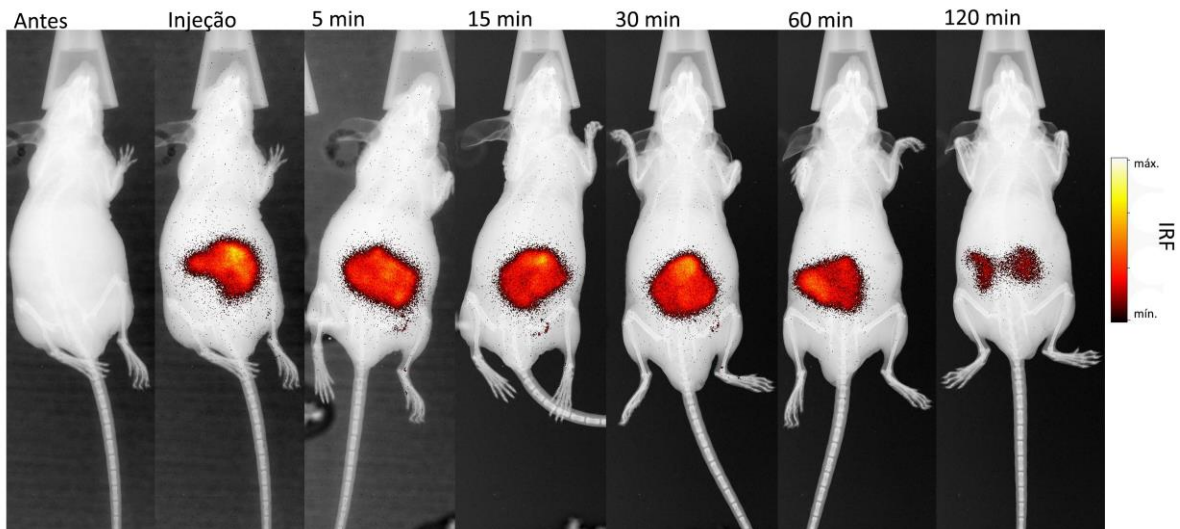


Figura 5.27. Imagens do terceiro animal injetado com 10 μ g de HPU-AF680 ressuspensos em 200 μ l de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (HPU 3.1).

Além de possíveis diferenças morfofisiológicas entre animais, deve-se levar em consideração que variações na proteína purificada em diferentes partidas e ao longo do tempo podem ocorrer e impactar a variabilidade dos resultados. Apesar de a urease ter mantido sua atividade enzimática (verificada antes dos ensaios *in vivo*) e os ensaios de DLS terem demonstrado estabilidade em seus estados de oligomerização após semanas armazenada em geladeira, amostras providas de partidas diferentes têm variações intrínsecas que podem ter contribuído para as mudanças no comportamento do composto injetado.

Tentou-se comparar a primeira injeção de HPU no mesmo animal com uma segunda. No entanto, as imagens adquiridas após a administração da segunda injeção no terceiro animal (HPU 3.2, figura 5.28) apresentaram pouco sinal de fluorescência, impossibilitando a identificação de um padrão de absorção e excreção e, após algumas aquisições, o equipamento acusou erro na calibração, inviabilizando a conclusão do experimento. Essas imagens, portanto, não foram analisadas quantitativamente.

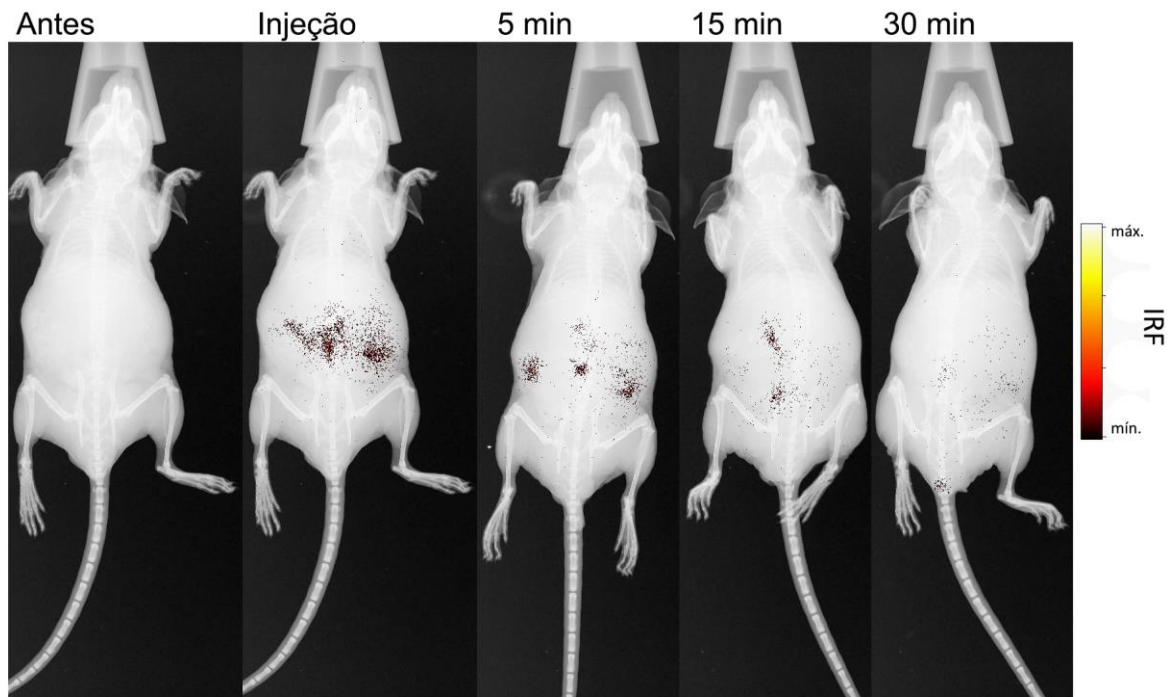


Figura 5.28. Imagens do terceiro animal injetado com 10 μg de HPU-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção, administrada 48 h após a primeira (HPU 3.2).

5.3.2. Animais injetados com MSA-AF680

Buscou-se comparar a cinética de absorção e excreção observada para a HPU com a da albumina sérica murina conjugada com o fluoróforo Alexa Fluor 680 (MSA-AF680). Os animais desse grupo “controle” receberam a mesma quantidade (10 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) de proteína, e as imagens foram adquiridas seguindo o mesmo protocolo utilizado para os animais injetados com HPU-AF680, com aquisições nos mesmos intervalos de tempo em relação às injeções. Quatro animais foram testados.

No primeiro animal (MSA 1), como é possível observar nas figuras 5.29 a 5.31, apesar de haver sinal de fluorescência, o comportamento da MSA-AF680 não seguiu um padrão nítido que permitisse a identificação de regiões de acúmulo do composto e sua associação a órgãos específicos. Em um dos animais (MSA 1.1, figura 5.29), o acúmulo de marcação no tórax aos 60-120 min sugere localização cardíaca da proteína marcada, e observa-se ainda a presença na região baixa da pelve, onde estaria localizada a bexiga, bem como no saco escrotal.

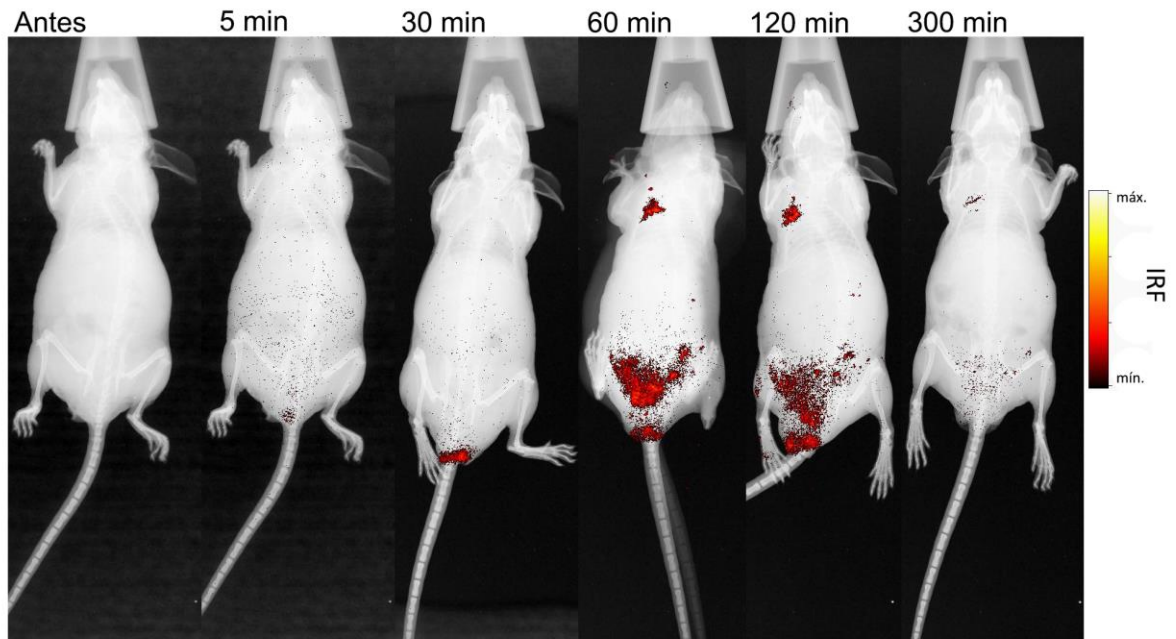


Figura 5.29. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspensos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 1.1). Observa-se, nessa seqüência de imagens, sinal muito difuso até os 60 min após a injeção, permanecendo visível por cerca de 2 h e tornando-se quase indetectável em seguida.

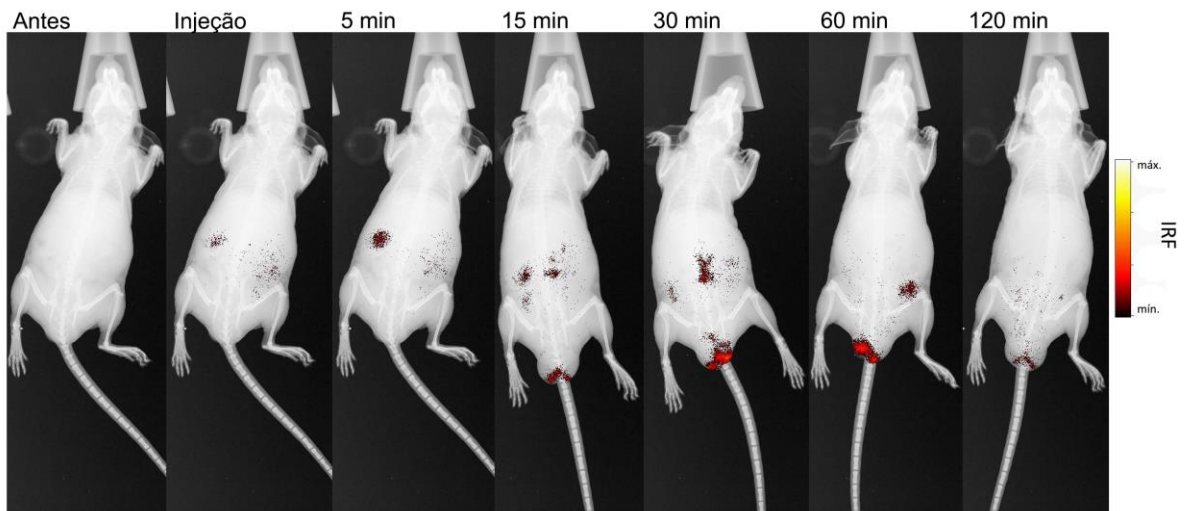


Figura 5.30. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspensos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a segunda injeção, administrada 1 semana após a primeira (MSA 1.2). Novamente, o sinal de fluorescência teve intensidade muito baixa para uma análise quantitativa adequada.

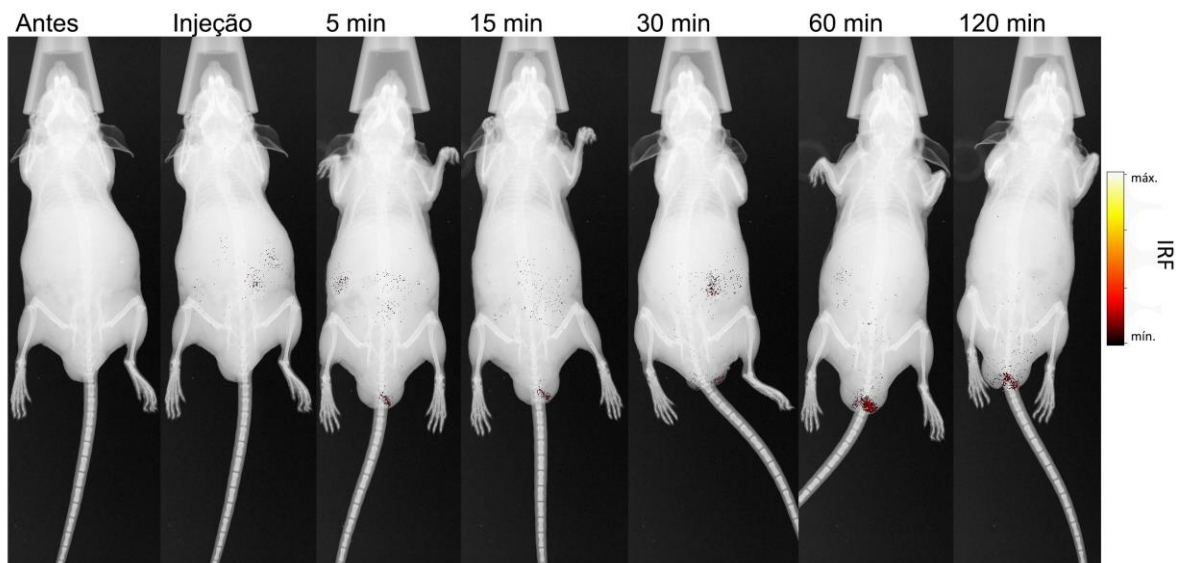


Figura 5.31. Imagens do primeiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspensos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a terceira injeção, administrada 48 h após a segunda (MSA 1.3). Devido à baixa intensidade do sinal de fluorescência medido, as imagens não foram quantificadas.

Visando a comparar os resultados obtidos com o animal injetado com HPU três vezes (HPU 1.3), o animal MSA 1.3 foi eutanasiado 2 h após a terceira injeção. Porém, não foi detectado sinal de fluorescência em nenhum dos órgãos ou materiais coletados.

Imagens de fluorescência *in vivo* do segundo animal injetado com MSA-AF680 são mostradas na figura 5.32. Observa-se sinal de fluorescência intenso, mas com distribuição espacial pouco característica, sugerindo acúmulo inicial na posição dos rins e, posteriormente, na região dos testículos.

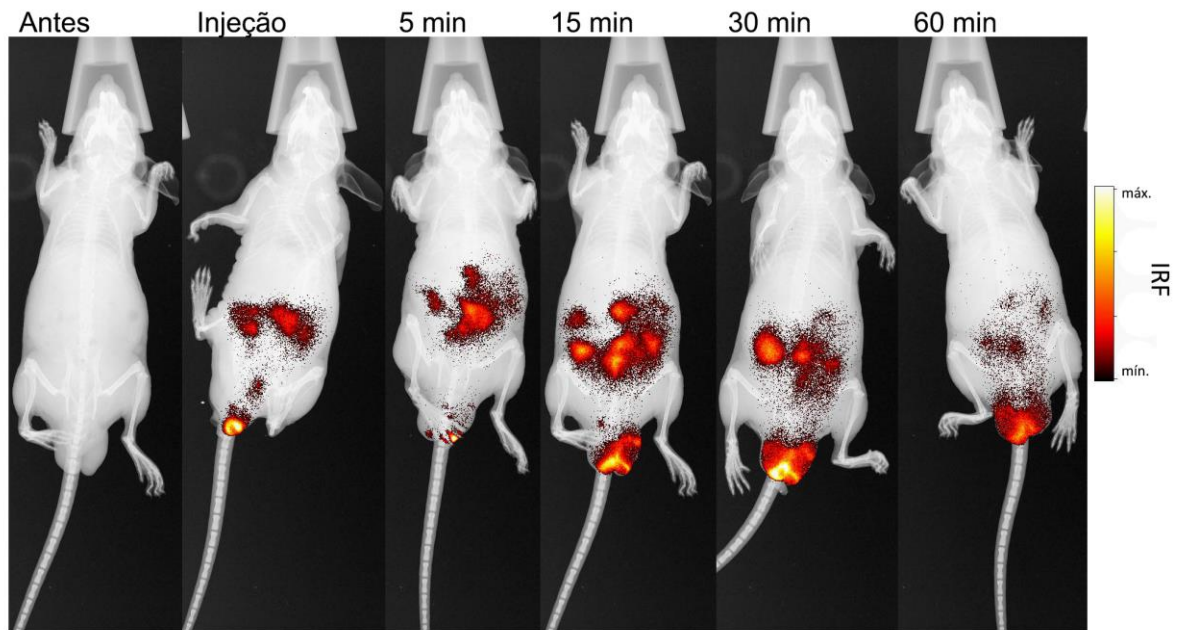


Figura 5.32. Imagens do segundo animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 2.1).

No caso do terceiro animal (figura 5.33) observa-se acúmulo do sinal de fluorescência em uma região situada entre o sítio de injeção e a pelve do animal e com acúmulo subsequente no que aparenta corresponder aos testículos. Buscou-se fazer uma análise quantitativa desses dados para avaliação da cinética desse composto. Do ajuste da exponencial aos valores de intensidade média medidos nas ROIs traçadas sobre a região provida de sinal no abdômen do animal (figura 5.34), extraiu-se as constantes de decaimento $\tau_{\text{out}} = 26 \text{ min}$ (ROI 1) e $\tau_{\text{out}} = 32 \text{ min}$ (ROI 2), que estão em ordens de grandeza semelhante às obtidas para o decaimento da HPU. Sem embargo, o ajuste exponencial não foi tão satisfatório quanto nos experimentos com a urease.

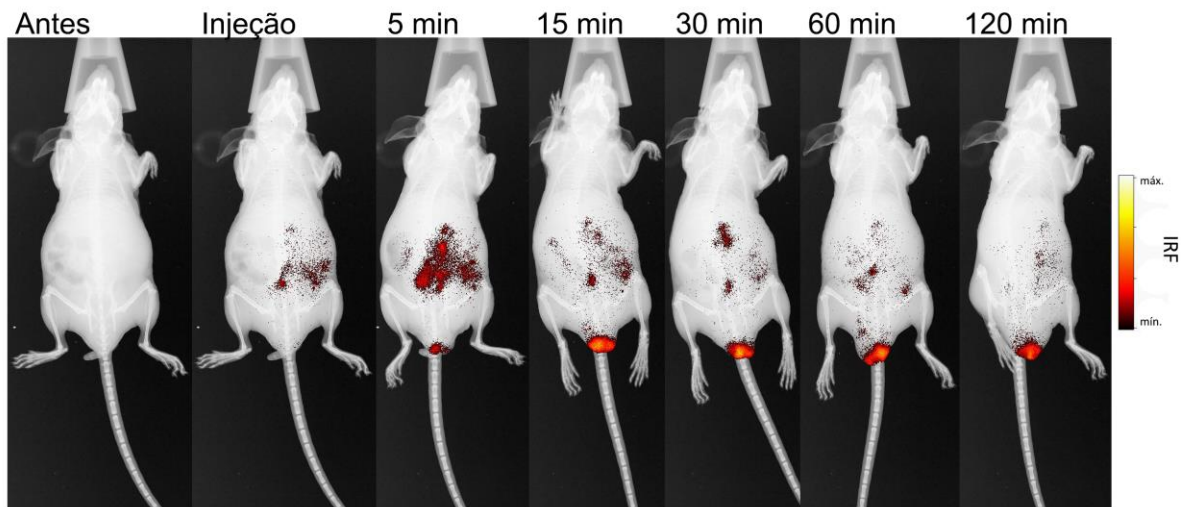


Figura 5.33. Imagens do terceiro animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspendidos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 3.1).

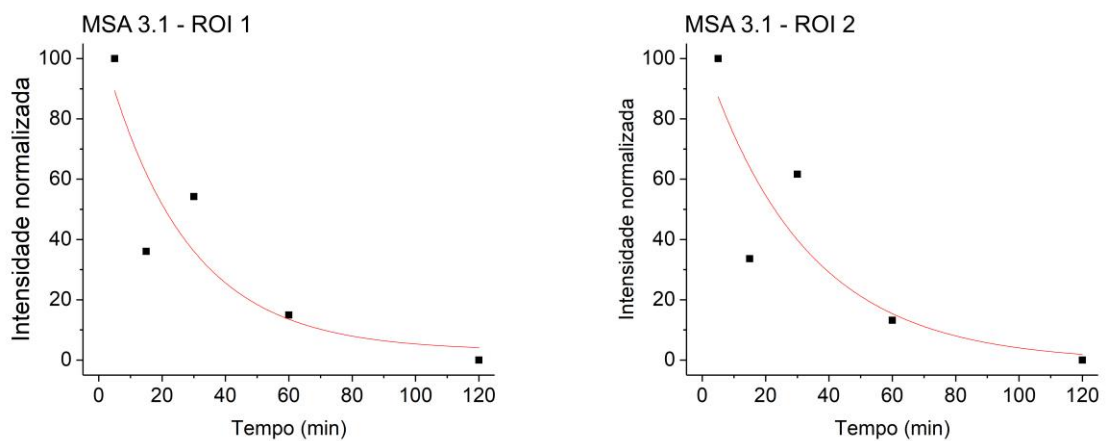


Figura 5.34. Intensidade normalizada do sinal de fluorescência medida em ROIs traçadas sobre a região provida de sinal situada entre o sítio de injeção e a pelve do animal MSA 3.1.

A figura 5.35 mostra a sequência de imagens adquiridas do último animal injetado com MSA-AF680 (MSA 4.1). Nesse indivíduo, não foi possível detectar migração do sinal de fluorescência para fora dos entornos do sítio de injeção. Além disso, o decaimento do sinal não apresentou comportamento passível de ser satisfatoriamente modelado por uma curva exponencial.

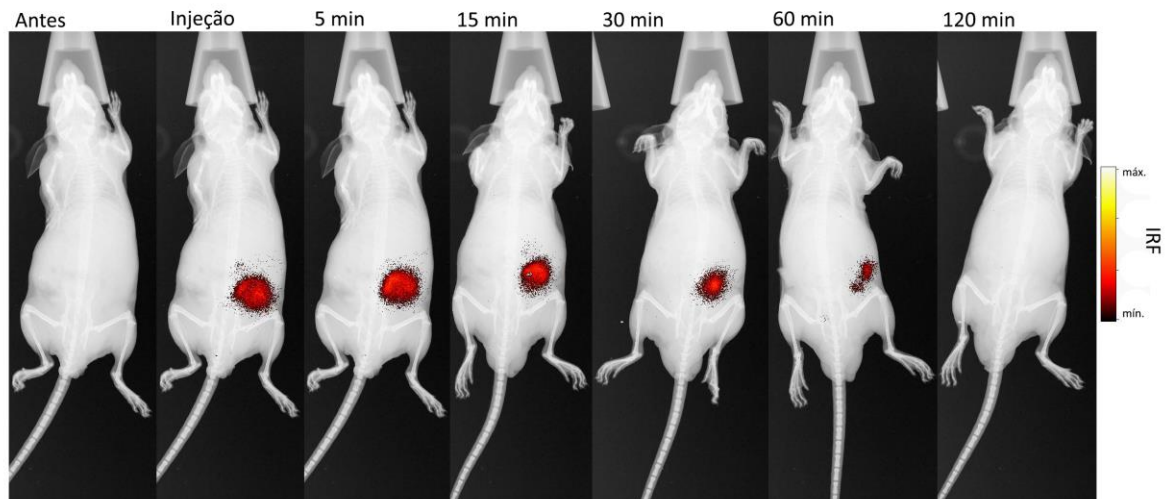


Figura 5.35. Imagens do quarto animal injetado com 10 μg de MSA-AF680 ressuspensos em 200 μl de PBS pH 7.4, antes e após a primeira injeção (MSA 4.1). Observa-se o decaimento do sinal de fluorescência sem a migração para fora dos entornos do sítio de injeção.

Os resultados aqui observados sugeriram diferença no comportamento da HPU e da MSA marcadas quando injetadas em camundongos. Evidentemente, essa hipótese preliminar carece de verificação com a ampliação do experimento para um número maior de animais, além da extração de mais dados quantitativos e padronização dos tempos de eutanásia para estudos *ex vivo*.

O presente estudo de imageamento óptico *in vivo* dos animais injetados com HPU indicou que a urease foi rapidamente absorvida pelo sistema circulatório e depois excretada pelos rins, sendo detectada na bexiga e na urina. Possivelmente, o composto injetado na cavidade peritoneal é absorvido, entrando na circulação sanguínea pelas veias mesentéricas, de onde é drenado para a veia porta-hepática e, subsequentemente, vai diretamente ao coração por meio da veia cava inferior. Após oxigenação nos pulmões, o sangue irriga os rins – nesse momento, o sinal de fluorescência da HPU-AF680, concentrada nos rins, é detectado nas imagens. Nos rins, o sangue é filtrado pelos glomérulos e o composto segue para a bexiga (DRAKE, VOGL e MITCHELL, 2015; FARQUHAR *et al.*, 1961; VENTUROLI e RIPPE, 2005).

No entanto, é provável que parte da HPU-AF680 injetada – em concentração baixa demais para ter seu sinal de fluorescência detectado pelo equipamento utilizado – siga outra rota de excreção, ligando-se a células como plaquetas (WASSERMANN *et al.*, 2010; SCOPEL-GUERRA *et al.*, 2017), neutrófilos (UBERTI

et al., 2013) e células endoteliais (DE SOUZA *et al.*, 2019), como já foi demonstrado no LaNeurotox. Cabe salientar que, apesar de que, em placa de acrílico, o composto foi detectado pelo equipamento em concentrações inferiores às utilizadas nos experimentos *in vivo*, a atenuação do sinal de fluorescência pelos tecidos do animal pode ter inviabilizado sua detecção em tecidos específicos.

Outra hipótese que foi aventada é a de que, dentro do corpo do animal, a ligação entre o fluoróforo e a proteína possa ter sido desfeita em uma parte das moléculas e o sinal medido provenha, em parte, do fluoróforo livre ou ligado a alguma outra molécula. Segundo o fabricante, as ligações formadas entre o Alexa Fluor 680 NHS Ester e as aminas primárias de peptídeos e proteínas são tão estáveis quanto ligações peptídicas em pH inferior a 8.0 (BANKS e PAQUETTE, 1995). No entanto, se, acidentalmente, a injeção da proteína marcada atingir uma alça intestinal, cujo conteúdo é bastante alcalino (pH 8.5-9.0), poderia ocorrer a liberação do fluoróforo, bem como hidrólise da proteína marcada, afetando o padrão do sinal medido no imageamento *in vivo*. Nessa situação, esperar-se-ia que as injeções com HPU e MSA produzissem sinais com padrão similar de comportamento, fazendo-se necessário investigar a cinética de biodistribuição do próprio fluoróforo.

Para melhor compreender a biodistribuição e cinética de absorção e excreção da HPU e seu envolvimento em processos neurodegenerativos, é necessário expandir o presente estudo, utilizando um número maior de animais, além de uma investigação ao longo de períodos mais prolongados para simular uma infecção crônica com *H. pylori* – animais injetados diversas vezes e analisados após semanas e meses de tratamento com HPU.

6. CONCLUSÕES

A metodologia desenvolvida no presente trabalho foi eficiente em aprimorar a produção e purificação da HPU recombinante e enzimaticamente ativa. A proteína obtida teve seus estados de oligomerização monitorados semanas após a conclusão da purificação e se mostrou estável na forma dodecamérica, de cerca de 13 nm de diâmetro, nas condições experimentais utilizadas. Por conseguinte, a hipótese aventada na literatura de que a eluição em forma hexamérica é artefato da própria cromatografia de exclusão molecular foi corroborada pelos ensaios de espalhamento dinâmico de luz, validando o uso da forma dodecamérica para os estudos *in silico*.

As simulações computacionais realizadas, que apontaram para a presença de resíduos de lisina livres para ligação na superfície tanto da HPU quanto da MSA, se mostraram válidas, visto que ambas as proteínas foram conjugadas com o fluoróforo Alexa Fluor NHS Ester com sucesso, como mostraram as medidas dos espectros de emissão e absorção de luz.

A conjugação das proteínas com o fluoróforo acima mencionado se mostrou eficiente em produzir agentes de contraste para o imageamento óptico *in vivo* nas condições estabelecidas para o presente trabalho. A metodologia desenvolvida se mostrou satisfatória para a realização de um estudo longitudinal da biodistribuição e cinética de absorção e excreção da HPU-AF680.

Foi feita a comparação do padrão de biodistribuição e da cinética de absorção/excreção da HPU-AF680 com os de uma proteína endógena do modelo utilizado, marcada com o mesmo fluoróforo (MSA-AF680) e administrada nas mesmas condições experimentais. Observou-se diferença nos padrões de biodistribuição e na cinética das proteínas utilizadas, sugerindo que, nas condições experimentais do presente trabalho, elas se comportam de maneira diferente quando injetadas nos camundongos. Foi possível, também, detectar sinal de fluorescência provindo do fluoróforo em materiais coletados após a eutanásia dos animais.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugeriram que a HPU foi rapidamente absorvida pelo sistema circulatório dos animais injetados intraperitonealmente, para depois ser excretada pelos rins. Não tendo sido possível detectar a HPU-AF680 nos cérebros dos animais, tanto nas imagens *in vivo* quanto *ex vivo*, não se pode afirmar, com base nos presentes resultados, que seu envolvimento com a hiperfosforilação da proteína tau se dê diretamente pelo contato da urease com os tecidos cerebrais, fazendo-se necessárias investigações posteriores.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos apontaram para a rápida excreção da HPU injetada intraperitonealmente pelo sistema urinário. Apesar de ser provável que parte da amostra injetada seja excretada por outras vias, as quantidades possivelmente envolvidas nesse processo são baixas demais para ser detectadas utilizando a técnica empregada no presente trabalho, fazendo-se necessário o uso de outras metodologias para tais investigações.

Visando a esclarecer mais detalhes a respeito do possível envolvimento do *H. pylori* em doenças extragástricas, principalmente considerando-se o contexto de pacientes crônicos, é essencial acompanhar a absorção e excreção da HPU ao longo de períodos mais prolongados.

Propõe-se como continuação do presente trabalho uma investigação, utilizando a mesma metodologia, de um número maior de animais, a fim de sustentar (ou descartar) hipóteses aqui aventadas, além de um estudo com animais tratados com a HPU durante 60-90 dias, com a finalidade de analisar possíveis mudanças no padrão de biodistribuição da proteína injetada pela via intraperitoneal.

A fim de minimizar possíveis efeitos decorrentes de interações com o fluoróforo, pode-se realizar a maior parte tratamento com a proteína livre, utilizando a HPU conjugada apenas para o imageamento. Cabe, também, desenvolver meios de estudar a cinética de absorção e excreção do próprio Alexa Fluor 680, além de utilizar outro(s) fluoróforo(s) para a marcação da HPU e comparar os padrões de biodistribuição com os obtidos para a HPU-AF680. É também válido estudar possibilidades de administrar a proteína por outras vias.

Além disso, pretende-se realizar, com materiais coletados no presente estudo e em estudos posteriores, ensaios de Western blot para avaliar o grau de fosforilação da proteína tau e a presença de HPU nos encéfalos dos animais tratados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, A. T. B. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Using Invasive and Noninvasive Approaches. **Journal of Pathogens**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

ANAND, U., Mukherjee, S. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. **Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects**, v. 1830(12), p. 5394-5404, 2013.

ARMBRUSTER, C. E.; Mobley, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10(11), p. 743-754, 2012.

BAHASHWAN, S. A.; El Shafey, H. M. Antimicrobial Resistance Patterns of *Proteus* Isolates from Clinical Specimens. **European Scientific Journal**, v. 9(27), p. 188-202, 2013.

BANKS, P. R.; Paquette, D. M. Comparison of Three Common Amine Reactive Fluorescent Probes Used for Conjugation to Biomolecules by Capillary Zone Electrophoresis. **Bioconjugate Chem.**, v. 6, p. 447-458, 1995.

BERMAN, H. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242.

BIE, Mingjiang *et al.* Phylogenetic analysis of clinical strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with gastric diseases in Tibet. **Annals of Translational Medicine**, v. 7, p. 320-330, 2019.

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**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CALLAI-SILVA, N. Urease de *Helicobacter pylori* e taupatias: abordagens *in vivo* e *in vitro*. Dissertação (Medicina e Ciências da Saúde), PUCRS, 2020.

CARLINI, C. R.; Guimarães, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from Concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, p. 667-675, 1981.

CARLINI, C. R. *et al.* Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models: Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsinlike Enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90(2), p. 340-348, 1997.

CARLINI, C. R.; Ligabue-Braun, R. Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. **Toxicon**, v. 110, p. 90-109, 2016.

DE SOUZA, M. J. *et al.* *Helicobacter pylori* urease induces pro-inflammatory effects and differentiation of human endothelial cells: Cellular and Molecular Mechanism. **Helicobacter** v. 24(3), p. e12573, 2019.

DEN HOED, C. M.; Kuipers, E. J. In: **Elsevier**. Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases, 10th Edition. 2020, p. 476-480.

DING, H.; Wu, F. Image Guided Biodistribution and Pharmacokinetic Studies of Theranostics. **Theranostics**, v. 2(11), p. 1040-1053, 2012.

DRAKE, R. L.; Vogl, A. W.; Mitchell, A. W. M. **Churchill Livingstone**. Gray's Anatomy for Students (3rd ed.) Philadelphia, PA, 2015.

EATON, K. A. *et al.* Essential Role of Urease in Pathogenesis of Gastritis Induced by *Helicobacter pylori* in Gnotobiotic Piglets. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 59, p. 2470-2475, 1991.

ENGELBRECHT, C. J. *et al.* Ultra-compact fiber-optic two-photon microscope for functional fluorescence imaging *in vivo*. **Optics Express**, v. 16(8), 2008.

FARQUHAR, M. G. *et al.* Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. **Journal of Experimental Medicine**, v. 113, p. 47-66, 1961.

FASANO, M. *et al.* The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. **IUBMB Life**, v. 57, p. 787-796, 2005.

FERONE, F. In: **Springer-Verlag**. Antimalarial Drugs II: Current Antimalarials and New Drug Developments, Vol. 68/II.1984, p. 207-221.

FISER, A. Template-Based Protein Structure Modeling. **Methods Mol Biol.**, v. 673, p. 73-94, 2010.

FOLLMER, C. *et al.* 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**, v. 360, p. 217-224, 2001.

FOLLMER, C. *et al.* Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering. **Biophysical Chemistry**, v. 111, p. 79-87, 2004.

FORMAN, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M-Y. Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. **Nature Medicine**, v. 10(10), p. 1055-1064, 2004.

FOX, J. G. *et al.* *Campylobacter mustelae*, a New Species Resulting from the Elevation of *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae* to Species Status. **International Journal of Systematic Microbiology** v. 39(3), p. 301-303, 1989.

FRANCESCHI, F. *et al.* Review: *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. **Helicobacter**, v. 24, p. 1-7, 2019.

FU, H. *et al.* Highly Sensitive Near-Infrared Fluorophores for in Vivo Detection of Amyloid- β Plaques in Alzheimer's Disease. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 6972-6983, 2015.

GIBBS, K. A.; Greenberg, E. P. Territoriality in *Proteus*: advertisement and aggression. **Chemical Reviews**, v. 111(1), p. 188-194, 2011.

GOODWIN, C. S. *et al.* Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov., Respectively. **International Journal of Systematic Microbiology**, v. 39(4), p. 397-405, 1989.

GRAU, A. J. *et al.* *Helicobacter pylori* infection as an independent risk factor for cerebral ischemia of atherothrombotic origin. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 186, p. 1-5, 2001.

GUERX, N., Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

HA, J. S. *et al.* Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. **Nature Structural Biology**, v. 8, p. 505-509, 2001.

HARRIS, P. R. *et al.* *Helicobacter pylori* Urease Is a Potent Stimulus of Mononuclear Phagocyte Activation and Inflammatory Cytokine Production. **Gastroenterology**, v. 111, p. 419-426, 1996.

HILLMAN, E. M. C. *et al.* *In vivo* optical imaging and dynamic contrast methods for biomedical research. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 369, p. 4620-4643, 2011.

HU, L-T.; MOBLEY, H. L. T. Purification and N-Terminal Analysis of Urease from *Helicobacter pylori*. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 992-998, 1990.

INGLE, U.; LALI, A. Development and optimization of a single-step cation

chromatographic Whey Protein fractionation process: evaluation and comparison of scale-up strategies. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 35, p. 805-818, 2018.

JACOBSEN, S. M. *et al.* Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections Due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21(1), p. 26-59, 2008.

KAPPAUN, K. *et al.* Ureases: Historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – A review. **Journal of Advanced Research**, v. 13, p. 3-17, 2018.

KONIECZNA, I. *et al.* Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. **Current Protein and Peptide Science**, v. 13, p. 789-806, 2012.

KONTOURAS, J. *et al.* Relationship between *Helicobacter Pylori* Infection and Glaucoma. **Ophthalmology**, v. 108(3), p. 599-604, 2001.

KONTOURAS, J. *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* may be beneficial in the management of Alzheimer's disease. **Journal of Neurology**, v. 256, p. 758-767, 2009.

KOOK, S-Y. *et al.* Disruption of blood-brain barrier in Alzheimer disease pathogenesis. **Tissue Barriers**, v. 1, p. 1-5, 2013.

KUSTERS, J. G.; van Vliet, A. H. M.; Kuipers, E.J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19(3), p. 449-490, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** v.227, p. 680-685, 1970.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd ed. Springer, 2006. 961p.

LAVIS, L. D.; Raines, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. **ACS**

Chemical Biology, v. 9, p. 855-866, 2014.

LEBLOND, F. *et al.* Pre-Clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 98, p. 77-94, 2010.

LIGABUE-BRAUN, R. *et al.* 3-to-1: unravelling structural transitions in ureases. **Naturwissenschaften** v. 100(5), p. 459-467, 2013.

LIM, E. W. K.; Brolin, C.; Nielsen, P. E. In: **Humana Press**. Peptide Nucleic Acids Methods and Protocols, 3rd Edition. 2020, p. 251-260.

MALAGUARNERA, M. *et al.* *Helicobacter pylori* and Alzheimer's disease: a possible link. **European Journal of Internal Medicine**, v. 15, p. 381-386, 2004.

MCEWEN, Jordan. Jablonski Diagram. **Chemistry LibreTexts**, May 18, 2020. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram)>.

MOBLEY, H. L. T. *et al.* Characterization of Urease from *Campylobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26(5), p. 831-836, 1988.

MOBLEY, H. L. T.; Hausinger, R. P. Microbial Ureases: Significance, Regulation, and Molecular Characterization. **Microbiological Reviews**, v. 53, p. 85-108, 1989.

MOBLEY, H. L. T. *et al.* *Helicobacter pylori* Urease: Properties and role in pathogenesis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 26, p. 39-46, 1991.

MOBLEY, H. L. T.; Island, M. D.; Hausinger, R. P. Molecular Biology of Microbial Ureases. **Microbiological Reviews**, v. 59(3), p. 451-480, 1995.

NTZIACHRISTOS, V. Fluorescence Molecular Imaging. **The Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 1-33, 2006.

OLIVERA-SEVERO, D. *et al.* A New Role for *Helicobacter pylori* Urease: Contributions to Angiogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8:1883, 2017.

PARKIN, D. M. International variation. **Oncogene**, v. 23, p. 6329-6340, 2004.

PATTERSON, A. P.; Booth, S. A.; SABA, R. The Emerging Use of *In Vivo* Optical Imaging in the Study of Neurodegenerative Diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PICANÇO, L. C. S. *et al.* Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 3141-3159, 2016.

QUERFURTH, H. W., LaFerla, F. M. Alzheimer's Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 329-344, 2010.

ROUBAUD-BAUDRON, C. *et al.* Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. **Neurobiology of Aging**, v. 33, p. 1009.e11 – 1009e19, 2012.

SCOPEL-GUERRA, A. *et al.* The Impact of *Helicobacter pylori* Urease upon Platelets and Consequent Contributions to Inflammation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8:2447, 2017.

SCHOEP, T. *et al.* Surface properties of *Helicobacter pylori* urease complex are essential for persistence. **PLoS One**, v.5 p. 1-8, 2010.

SINGH, R. K. *et al.* Prospective analysis of the association of infection with CagA bearing strains of *Helicobacter pylori* and coronary heart disease. **Heart**, v. 88, p. 43-46, 2002.

SMOOT, D. T. *et al.* *Helicobacter pylori* Urease Activity Is Toxic to Human Gastric Epithelial Cells. **Infection and Immunity**, v. 58(6), p. 1992-1994, 1990.

SVANE, S. *et al.* Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1-14, 2020.

SWEENEY, M. *et al.* Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer’s disease and other neurodegenerative disorders. **Nat Rev Neurol.**, v. 14, p. 133-150, 2018.

TOLEDO, J. *et al.* Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. **Brain**, v. 136, p. 2697-2706, 2013.

TOWBIN, H. *et al.* Electrophoretic transfer of proteins form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.76(9), p. 4350-4354, 1979.

UBERTI, A. F. *et al.* Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. **Toxicon**, v. 69, p. 240-249, 2013.

VALENZUELA-VALDERRAMA, M. *et al.* The *Helicobacter pylori* Urease Virulence Factor Is Required for the Induction of Hypoxia-Induced Factor-1 α in Gastric Cells. **Cancers**, v. 11, 799-813, 2019.

VENTUROLI, D.; Rippe, B. Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity: effects of molecular size, shape, charge and deformability. **American Journal of Physiology – Renal Physiology**, v. 288, p. F605-F613, 2005.

WANG, X-L. *et al.* *Helicobacter pylori* Filtrate Induces Alzheimer-Like Tau Hyperphosphorylation by Activating Glycogen Synthase Kinase-3 β . **Journal of Alzheimer’s Disease**, v. 45, p. 153-165, 2015.

WASSERMANN, G. E. *et al.* *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. **J. Cell. Mol. Med.** v. 14(7), p. 2025-2034,

2010.

WEATHERBURN, M. W. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. **Analytical Chemistry**, v. 39(8), p. 971-974, 1967.

WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v.61 Schistosomoses, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, 1994.

WROBLEWSKI L. *et al.* *Helicobacter pylori* Dysregulation of Gastric Epithelial Tight Junctions by Urease-Mediated Myosin II Activation. **Gastroenterology**, v. 136, p. 236-246, 2009.

ZHANG, X. *et al.* Near-Infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease. **PNAS**, v. 112(31), p. 9734-9739, 2012.

ZHAO, J. *et al.* Recent developments in multimodality fluorescence imaging probes. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8(3), p. 320-338, 2018.

ZHOU, C. *et al.* Urease is an essential component of the acid response network of *Staphylococcus aureus* and is required for a persistent murine kidney infection. **PLOS Pathogens**, v. 15(1): e1007538, 2019.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br