



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Mariele de Jesus Souza

Efeito da urease de *Helicobacter pylori* em células endoteliais

Rio de Janeiro

2015

Mariele de Jesus Souza

Efeito da urease de *Helicobacter pylori* em células endoteliais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Thereza Christina Barja-Fidalgo

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S729 Souza, Mariele de Jesus.
Efeito da urease de *Helicobacter pylori* em células endoteliais /
Mariele de Jesus Souza. – 2015.
89 f.

Orientador: Thereza Christina Barja-Fidalgo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Bióciências.

1. Infecções por *Helicobacter* - Fisiopatologia. 2. *Helicobacter pylori*.
3. *Helicobacter pylori* - Patogenicidade. 4. Urease - Análise. 5. Células
endoteliais - Fisiologia. 6. Integrinas - Fisiologia. I. Barja-Fidalgo,
Thereza Christina. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.33

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mariele de Jesus Souza

Efeito da urease de *Helicobacter pylori* em células endoteliais

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 05 de março de 2015

Orientadora:

Prof.^a Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Celia Regina Ribeiro da Silva Carlini
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Julio Cesar Madureira de Freitas Junior
Instituto Nacional do Câncer

Dr. Markus Berger Oliveira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Clarinda e Emílio, simplesmente não há palavras para descrever o sentimento de gratidão que tenho por vocês.

À Prof^a. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, pelos conselhos, críticas e assistência que me fizeram amadurecer profissionalmente, e principalmente por confiar em mim e permitir o desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório.

Ao João Moraes, meu co-orientador, por todo o aprendizado técnico e teórico. Principalmente por seu incentivo e comprometimento com o projeto. Pela paciência nos dias mais complicados. E por seu bom humor presente em todos os momentos.

À Gabrielle Estevão e Genilson Rodrigues pela ajuda técnica, fundamental neste trabalho. Sempre muito atenciosos e dispostos a ajudar.

À Cristiane Pereira, que inicialmente me ensinou não apenas as técnicas, me ensinou a ser um bom profissional.

À Vany Silva, por ter me acolhido durante os primeiros meses de mestrado. Sempre passando seu conhecimento com muita didática e paciência.

Ao grupo do laboratório, pela convivência, momentos de descontração, e toda a ajuda nos momentos de dúvidas e contribuição para a realização deste trabalho.

Ao Douglas Fernandes, por esses quase 10 anos de amizade, escutando-me e me aconselhando sempre. Você é uma pessoa fundamental na minha vida.

À Tia Mônica, por todo carinho, força, apoio e confiança. E pelo abrigo dado por todos esses anos.

Ao Lucas Vellasco, meu grande amigo. Pelo seu carinho e preocupação, e principalmente pelo apoio em todos os momentos.

Ao Eric Aguiar, Leonardo Vieira, Cesar Augusto, Mariana Sales, Vinicius Abrantes. Pelas conversas, conselhos e dias e noites divertidas. Tenho certeza que muitas “histórias” ainda virão.

À Marta Rodrigues e ao Carlos Fernando Oliveira, atualmente doutorandos magias e amigos desde UNIRIO, e vão continuar por mais alguns anos.

Aos amigos Guedes, Gustavo, Cassiana, Ana, Igor, Pedro, Laura, Nathassya, por tornarem meus mais alegres durante esses dois anos.

A Deus, por todas as vitórias.

No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.

Albert Einstein

RESUMO

SOUZA, Mariele de Jesus. *Efeito da urease de Helicobacter pylori em células endoteliais*. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

A urease de *Helicobacter pylori* (HP) é um fator de virulência que permite a colonização e sobrevivência desta bactéria na mucosa gástrica do estomago, podendo levar ao desenvolvimento da úlcera gástrica e do adenocarcinoma. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a urease de HP (HPU) tem ação pró-inflamatória em neutrófilos humanos. Entretanto o envolvimento direto da HPU sobre os efeitos vasculares ainda é pouco compreendido. Nosso trabalho tem como objetivo investigar os efeitos da HPU sobre células endoteliais e as possíveis vias de sinalização envolvidas nestes processos. O tratamento com a HPU (10 nM) durante 24hs não afetou a viabilidade das células endoteliais. Entretanto, observamos que a HPU foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade e reduziu a resistência transendotelial. Corroborando estes dados, observamos que a HPU induziu a dispersão e a fosforilação de VE-caderina. Além disso, a HPU induziu o rearranjo do citoesqueleto de actina e a fosforilação da FAK. Em nosso estudo observamos também que a HPU induziu o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO), e estes efeitos foram inibidos após o pré-tratamento das células HMEC1 com LY294002, inibidor da via PI3K-AKT. A produção de ROS induzida pela HPU promoveu o aumento da atividade do fator nuclear κ B (NF- κ B). Além disso, a HPU também foi capaz de induzir a adesão de neutrófilos a células endoteliais, assim como a tubulogênese. Os efeitos da HPU sobre as células endoteliais são modulados por integrinas, já que estes efeitos foram inibidos quando as células foram pré-tratadas com o RGD, antagonista geral de integrinas. Nossos dados mostram que a HPU ativa células endoteliais, possivelmente, via sinalização regulada por integrinas, exercendo um efeito pró-inflamatório e pró-angiogênico, e tendo um papel fundamental na patogênese causada por *H.pylori*.

Palavras –chave: *Helicobacter pylori*. Urease. Células endoteliais. Integrinas.

ABSTRACT

SOUZA, Mariele de Jesus. *Effect of helicobacter pylori urease in endothelial cells*. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The urease of *Helicobacter pylori* (HP) has been extensively reported as an important bacterial product which enables HP to colonize and survive in the stomach, favoring the occurrence of gastric ulcer and adenocarcinoma. Recently, we demonstrated that HP urease (HPU) has a pro-inflammatory effect on human neutrophils. Although the effects of HP on endothelial cells (EC) have been early described, the direct involvement of HPU in the vascular effects is not completely understood. This study aims to investigate the effects of HPU on EC and the signaling pathways involved in these processes. The treatment of EC with HPU (10nM) did not affect cell viability. On the other hand, HPU enhanced EC permeability and reduced transendothelial resistance. Corroborating these data, HPU caused dissociation of cell-cell junctional cadherins, induced VE-cadherin phosphorylation, promoted alterations on the dynamics of actin cytoskeleton, and increased FAK phosphorylation. Additionally, HPU induced reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) production, that were impaired by LY294002, a PI3K-AKT pathway inhibitor. HPU-induced ROS production activated nuclear factor κ B (NF- κ B). HPU also increased adhesion of neutrophils to EC and tubulogenesis. The effects of HPU on EC are modulated by integrins, as they were attenuated in the presence of RGD peptides. Data presented here indicate that HPU activates EC, probably through an integrin-associated signaling, supporting its role as a pro-inflammatory and also pro-angiogenic key molecule in *H pylori*-related diseases.

Keywords: *Helicobacter pylori*. Urease. Endothelial cells. Integrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Envolvimento da infecção por <i>H. pylori</i> sobre a gastrite e ulcera gástrica	16
Figura 2 -	Via de sinalização regulada por integrina	26
Figura 3 -	Ativação do NFκB induzido por estímulo oxidativo.....	29
Figura 4 -	Complexo VE-caderina-cateninas	31
Figura 5 -	O processo angiogênico.....	33
Figura 6 -	HPU não afeta a viabilidade das HMEC1	47
Figura 7 -	HPU induz alterações na dinâmica de actina de HMEC1	49
Figura 8 -	HPU induz ativação fosforilação de FAK.....	51
Figura 9 -	Efeito do RGD sobre a alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina em HMEC1 induzida por HPU	53
Figura 10 -	HPU induz aumento da permeabilidade em culturas de HMEC1	55
Figura 11 -	HPU diminui a resistência transendotelial em HMEC1	56
Figura 12 -	Alterações na expressão da VE-caderina em HUVEC tratadas com HPU	58
Figura 13 -	Fosforilação da VE-caderina em HMEC1 tratadas com a HPU.....	58
Figura 14 -	HPU induz a fosforilação de AKT em HMEC1	59
Figura 15 -	Aumento na produção de ROS intracelular por HMEC1 tratadas com a HPU...	60
Figura 16 -	Aumento de NO em HMEC1 tratadas com a HPU	62
Figura 17 -	A ativação do NF-kB induzida por HPU é redox-sensível e dependente de integrinas.....	63
Figura 18 -	HPU induz tubulogênese em HMEC1: Envolvimentos de integrinas.....	65
Figura 19 -	HPU aumenta adesão de neutrófilos à HMEC1: Inibição pelo RGD ou Trolox.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
BSA	Albumina sérica bovina
Cag	Proteína associada à citotoxina
CEs	Células endoteliais
DO	Densidade óptica
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético dissódico
EGF	Fator de crescimento epidermal
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
FAK	Quinase de adesão focal
FBS	Soro fetal bovino
FITC	Isotiocianeto fluoresceína
HEPES	Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico)
HMEC1	Linhagem celular de endotélio de microvasculatura humano
HUVEC	Cultura primária de célula endotelial de cordão umbilical humano
HPU	Urease de <i>Helicobacter pylori</i>
ICAM-1	Molécula de adesão celular intercelular 1
NOS	Óxido nítrico sintase induzida
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MTT	3-(4,5 dimetiliazol-2-yl)- 2,5 difenil brometo tetrazolina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- κ B	Fator nuclear- κ B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato de sódio
PI3K	Fosfatidil inositol-3 quinase

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF	Polivinilideno difluorido
RGD	Sequência arginina-glicina-ácido aspártico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecilssulfato de sódio
SRC	Proteínas co-ativadora do receptor de esteróide
TNF	Fator de necrose tumoral
TSS4	Sistema de secreção tipo IV
VacA	Citotoxina vacuolizante A
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	<i>Helicobacter pylori</i>	15
1.2	Fatores de virulência da <i>Helicobacter pylori</i>	18
1.3	Ureases	20
1.4	Urease de <i>Helicobacter pylori</i>	21
1.5	Endotélio	23
1.6	Sinalização de integrinas	24
1.7	Espécies reativas de oxigênio (ROS)	27
1.8	Permeabilidade endotelial	30
1.9	Angiogênese	32
1.10	Óxido nítrico	34
2	OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo geral.	36
2.2	Objetivos específicos	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	Reagentes	37
3.2	Linhagens celulares	38
3.3	Purificação da urease de <i>Helicobacter pylori</i>	38
3.4	Cultura de células	38
3.5	Purificação de neutrófilos	39
3.6	Contagem de células	39
3.7	Ensaio de viabilidade MTT	40
3.8	Ensaio de permeabilidade celular	40
3.9	Ensaio de resistência elétrica transendotelial	41
3.10	Imunocitoquímica para VE-caderina	41
3.11	Citoquímica para F-actina	42
3.12	Obtenção de extrato celulares	42

3.13	Eletrforese e Western Blotting	43
3.14	Ensaio de tubulogênese das HMEC1 com matrigel	44
3.15	Ensaio de produção de ROS intracelular	44
3.16	Ensaio de produção de oxido nítrico	45
3.17	Ensaio de adesão de neutrófilos as HMEC1	45
3.18	Ensaio de atividade de NFκB	46
3.19	Análise estatística	46
4	RESULTADOS	47
4.1	Efeito da HPU sobre a viabilidade em HMEC1	47
4.2	Efeito da HPU sobre a dinâmica do citoesqueleto de actina de HMEC1	48
4.3	Efeito da HPU sobre a fosforilação da FAK em HMEC1	50
4.4	O Envolvimento de integrinas sobre o rearranjo do citoesqueleto de actina induzido pela HPU	52
4.5	O Envolvimento de integrinas no aumento da permeabilidade induzida pela HPU	54
4.6	Efeitos da HPU sobre a dispersão e fosforilação de VE-caderina em HMEC1 ...	57
4.7	Efeito da HPU sobre a fosforilação da AKT em HMEC1	59
4.8	O Envolvimento de integrinas e da via PI3K/AKT sobre a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela HPU	60
4.9	O Envolvimento de integrinas e da via PI3K/AKT sobre a produção de oxido nítrico induzida pela HPU	61
4.10	O Envolvimento de integrinas e da modulação redox-sensível na ativação de NFκB induzida pela HPU	63
4.11	HPU induz tubulogênese em HMEC1: Envolvimento de integrinas	64
4.12	O Envolvimento de integrinas e da modulação redox sobre a adesão de neutrófilos a monocamada endotelial	66
5	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

INTRODUÇÃO

A *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) é uma bactéria gram-negativa que coloniza a mucosa do estômago humano, podendo causar úlceras gástricas e adenocarcinoma gástrico por mecanismos não totalmente esclarecidos (Fischbac e col., 2005; Suzuki e col., 2007). Diferentes trabalhos mostram que os fatores de virulência da *H. pylori* são capazes de interagir com integrinas, que por sua vez podem ativar diferentes vias de sinalização, incluindo a FAK, Src, EGFR (Tegtmeyer e col., 2010; Kwok e col., 2007). Dentre os diversos fatores de virulência existentes nessa bactéria, a urease contribui para o seu sucesso na colonização do epitélio gástrico (Andruti e col., 1995).

A urease é uma enzima dependente de níquel que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. A urease da *H. pylori* (HPU) constitui cerca de 10% das proteínas totais da célula (Suzuki col., 2007). Bactérias *H. pylori* sem atividade ureásica não são capazes de colonizar o estômago (Tsuda e col., 1994). Estudos mostram que a HPU induz migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, induzindo quimiotaxia, ativando a produção de radicais livres de oxigênio e retardando a apoptose espontânea de neutrófilos (Uberti e col., 2013). Além disso, a HPU ativa plaquetas através de uma via mediada por lipoxigenase, desencadeando a agregação plaquetária dentro dos microvasos da mucosa gástrica que pode contribuir para o desenvolvimento da inflamação e ulceração característicos da infecção por *H. pylori* (Wassermann e col., 2010).

A bactéria *H. pylori* estimula as células endoteliais regulando a expressão da molécula de adesão, aumentando a produção de quimiocinas e o recrutamento de neutrófilos (Innocenti e col., 2002). A *H. pylori* atua tanto sobre mucosa gástrica epitelial, como sobre a microvasculatura gástrica, induzindo genes pró-inflamatórios e expressão de moléculas de adesão (Hatz e col., 1997). No entanto, a participação da HPU na ativação das células endoteliais ainda não está esclarecida. Assim a elucidação do mecanismo de ação da HPU sobre este processo é importante para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares e celulares que contribuem para o agravamento das úlceras e o surgimento do adenocarcinoma gástrico.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Helicobacter pylori*

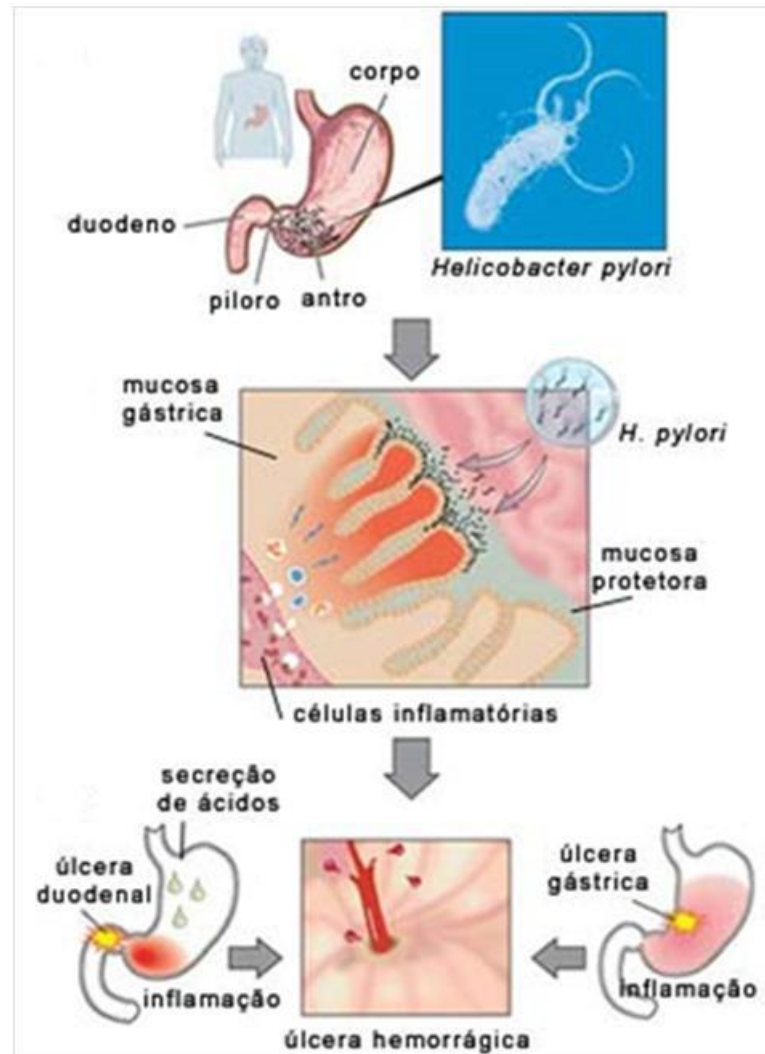
O epitélio gástrico é composto por uma única camada de células que invaginam para formar glândulas gástricas altamente organizadas. O epitélio gástrico é primariamente reconhecido por mediar processos digestivos, no entanto, uma função essencial ocorre através da mucosa gástrica que é coberta por uma camada de muco espesso que serve para proteger o epitélio tanto de enzimas proteolíticas quanto do ácido gástrico. A barreira de células epiteliais gástricas apresenta uma organização apical e basolateral, que é mantida principalmente pelas junções oclusivas, junções de adesão e regulação do citoesqueleto de actina. A principal função desta barreira é impedir a passagem do conteúdo luminal contendo microrganismos patogênicos, tais como a *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (Wessler e Backert, 2008; Wroblewski e Peek, 2011).

A *H. pylori* é uma bactéria flagelada gram negativa pertencente à classe epsilonproteobacteria. É microaerófila, com 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, possui de 4 a 6 flagelos com aproximadamente 30 µm de comprimento (Goodwin e col., 1990). A colonização gástrica por *H. pylori* é geralmente acompanhada por intensa infiltração de neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos. O grau de danos à mucosa correlaciona-se com a intensidade de neutrófilos infiltrados (D'Elis e col., 2007). Esta bactéria é reconhecida como o agente patológico da gastrite crônica e úlceras pepticas, estando sua presença associada também ao câncer gástrico duodenal e linfomas (Hopkins e col., 1996; Fischbach e col., 2005). A *H. pylori* foi identificada em cultura em 1984 por Robin Warren e Barry Marshall (Marshall e Warren, 1984), porém somente 10 anos mais tarde esta bactéria foi reconhecida pela Agência internacional para a Investigação do Câncer (IARC) como um carcinógeno tipo 1 (Wroblewski e Peek, 2011) (Figura 1).

A infecção por *H. pylori* mais comum é a gastrite crônica assintomática. Entre os indivíduos infectados, 10% desenvolvem úlceras duodenais, 1-3% desenvolvem o adenocarcinoma gástrico e menos de 0,1% apresentam o linfoma de MALT (tecido linfóide associado à mucosa) (Peek e Crabtree, 2006). Sabendo que a infecção por *H. pylori* é um importante fator de risco para o câncer gástrico estudos epidemiológicos têm estimado que na ausência de infecção por *H. pylori* 75% dos casos de câncer gástricos não existiriam (Herrera

e Parsonnet, 2009). Além disso, estima-se que a bactéria seja responsável por quase 5% de todos os casos de câncer gástrico no mundo (Parkin e col., 2005). Entretanto os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento desta doença em resposta a infecção por *H. pylori* não estão bem definidos (Blaser e Berg, 2001).

Figura 1 - Envolvimento da infecção por *H. pylori* sobre a gastrite e ulcera gástrica



Legenda: A bactéria *H.pylori* atinge, inicialmente, a porção inferior do estômago. A colonização gástrica por *H. pylori* é geralmente acompanhada por intensa infiltração de neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos. A inflamação da mucosa gástrica pode levar à úlcera gástrica ou duodenal, caracterizada por hemorragias em sua forma mais grave.

Fonte: Adaptado de http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html

Aproximadamente 50% da população global mundial pode estar infectada pela *H. pylori*, que é tipicamente adquirida nos primeiros cinco anos de vida (Suerbaum e Michetti, 2002). A prevalência da infecção varia de acordo com a idade, situação socioeconômica e regiões geográficas. Em países em desenvolvimento a prevalência da infecção por *H. pylori* é maior em crianças, provavelmente devido ao menor nível socioeconômico, higiene, superpopulação e falta de água potável (Nurgalieva e col., 2002), enquanto que nos países desenvolvidos a prevalência aumenta com a idade, provavelmente como um efeito de uma geração anteriormente exposta à falta de saneamento. A prevalência da infecção varia entre 7% e 87%, e apresentou menor prevalência em países europeus (Ford e Axon, 2010). Nos últimos anos a maioria dos estudos relataram o aumento da prevalência de infecção por *H. pylori* com a idade, chegando a 40-60% em indivíduos idosos assintomáticos, e mais de 70% em pacientes idosos com doenças gastroduodenais (Pilotto e Salles, 2002).

A evolução clínica da infecção pode envolver uma combinação de fatores bacterianos, do hospedeiro e ambientais. No processo de desenvolvimento da gastrite-ulceração-câncer várias etapas celulares e moleculares estão envolvidas. O processo de infecção, adesão, citotoxicidade epitelial, inflamação, regeneração, ulceração e tumorigênese podem ser observados a nível celular (Molnar e col., 2010). A infecção por *H. pylori* também pode promover a metilação de genes importantes na iniciação do câncer gástrico (CDH1, p16, APC, MLH1 e COX-2) (Perri e col., 2007). Corroborando esses dados, Sepulveda e colaboradores (2010) mostraram que esta infecção contribui para metilação da enzima O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase, o que resulta em uma hipo ou hipermetilação global das células infectadas.

Um mecanismo adicional pelo qual *H. pylori* pode desencadear a úlcera é através das alterações nos fatores protetores da mucosa. A integridade da mucosa gástrica requer um fluxo sanguíneo adequado para manter a viabilidade do tecido e suportar alterações da atividade fisiológica. O fluxo sanguíneo nos vasos maiores do estômago é importante, mas é a microcirculação que está intimamente envolvida na proteção da mucosa (Cheung e Ashley, 1987). Evidências mostram que a microcirculação gastrointestinal apresenta um papel importante para a fisiopatologia de várias outras condições relacionadas a doenças gastrointestinais, incluindo a gastrite induzida por agentes tóxicos, lesões induzidas por estresse e lesão de isquemia-reperfusão (Kurtel e col., 1991; Tachi e col., 1996). A diminuição do fluxo sanguíneo na mucosa gástrica permite o acúmulo de íons H⁺; deficiência na capacidade de neutralização de HCO₃⁻ e redução da remoção H⁺ e geração de resíduos de produtos tóxicos e metabólitos de oxigênio. A resposta da exposição prolongada da mucosa a

íons H^+ diminui o pH causando danos celulares subsequentes (Kalia e Bardhan, 2003). Além dos efeitos prejudiciais induzidos pela diminuição do fluxo sanguíneo, elementos celulares da microcirculação, incluindo leucócitos, plaquetas e células endoteliais (CEs), também podem contribuir para o dano tecidual através da liberação de substâncias citotóxicas (Granger e col., 1994; Mannaioni e col., 1997). Alguns estudos endoscópicos e histológicos relacionados com a infecção por *H. pylori* incluem eritema, edema e vasodilatação, bem como infiltração de células inflamatórias (Wyatt, 1995). Estas informações sugerem que o dano vascular induzido diretamente por produtos bacterianos ou como resultado da resposta inflamatória pode ser um importante mecanismo subjacente da lesão e um alvo chave de fatores produzidos pela *H. pylori*. Diversos processos da microcirculação podem ser alterados, incluindo o fluxo sanguíneo, diâmetro dos vasos, atividade dos leucócitos e de plaquetas e também alterações nas CEs (Kalia e Bardhan, 2003).

Innocenti e colaboradores (2002) mostraram que a *H.pylori* é capaz de ativar as CEs, levando ao aumento da expressão da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), da molécula de adesão intercelular1 (ICAM-1), E-selectina. As CEs vasculares, por sua vez, são importantes na resposta inflamatória, já que respondem rapidamente a diferentes estímulos, promovendo o recrutamento de leucócitos.

A *H. pylori* produz fatores de virulência que são importantes na patogênese da infecção por esta bactéria, incluindo a citotoxina A vacuolar (VacA), a proteína associada à citotoxina A (CagA) e a urease que neutraliza o meio ácido (através da conversão de uréia em amônia) permitindo a sua sobrevivência no estômago (Polisset e col., 2013).

1.2 Fatores de Virulência da *H. Pylori*

Para o estabelecimento da colonização da *H.pylori* na mucosa epitelial é necessário que ocorra a adesão celular, levando ao desenvolvimento de alterações patológicas. Este processo é caracterizado pelo movimento ativo de *H. pylori* através da superfície mucosa que recobre o epitélio (Clyne e col., 2007).

A adesão da *H. pylori* à mucosa gástrica representa o contato inicial entre a bactéria e as células do seu hospedeiro, considerada o primeiro passo importante na patogênese no estômago. As adesinas são proteínas bacterianas, glicoconjugados ou lipídeos envolvidos na fase inicial da colonização, medeiam a interação entre a bactéria e a superfície das células

epiteliais (Dubreuil e col., 2002). A *H.pylori* apresenta um grupo de proteínas associadas à membrana externa incluindo *blood-group-antigen-binding adhesin* (BabA), *sialic acid binding adhesin* (SabA), *adherence associated lipoprotein A e B* (AlpA/B), e *outer inflammatory protein A* (OipA) que medeiam a ligação de *H. pylori* à membrana das células epiteliais (Polssset e col., 2013). Estudos mostram que essas adesinas da *H. pylori* se ligam aos seus receptores contribuindo para ativação de diferentes vias de sinalização, incluindo a via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), estas adesinas também podem facilitar a interação de outros fatores bacterianos com seus receptores (Polssset e col., 2013).

Outro fator de virulência envolvido com os mecanismos patológicos da infecção por *H.pylori* é a citotoxina vacuolizante A (VacA), inicialmente identificada em experimentos utilizando meio filtrado de cultura de *H. pylori* (Leunk e col.,1988). Esta toxina induz a formação de vacúolos e estudos mais recentes mostraram que também está envolvida em outras respostas celulares, como a apoptose. Devido a estas diferentes respostas celulares, a VacA é considerada uma toxina multifuncional (Cover e Blanke, 2005; Rassow, 2011). O mecanismo exato da entrada da VacA em células alvo não esta muito claro, já que esta toxina pode se ligar a diferentes receptores. Em células epiteliais, a VacA pode se ligar ao receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) antes da sua internalização. Estudos mostram que esta toxina pode também se ligar à Proteína tirosina fosfatase tipo receptor α (RPTP α) e β (RPTP β) promovendo a vacualização celular (Yahiro e col., 2003; Yahiro, 1999). Também está bem estabelecido que a VacA é internalizada através da formação de poros em membranas plasmáticas (Rassow, 2011).

Outros fatores da *H. pylori* são translocados para o citoplasma da célula hospedeira através de um sistema de secreção tipo quatro (T4SS). A citotoxina associada ao gene A (CagA) e o peptidoglicano atuam como efetores e podem alterar ou ativar diferentes vias de sinalização (Polssset e col., 2013). Primariamente a CagA apresenta a função de regular a morfologia e a polaridade celular (Backert e col., 2011; Wessler e cl., 2011). O T4SS é codificado pela ilha de patogenicidade cag (PAI), que contém aproximadamente 30 genes que codificam proteínas relacionadas à formação do pilus e função do T4SS.

Trabalhos mostram que a interação com a integrina β 1 é essencial para a translocação da CagA (Jiménez-Soto e col., 2009; Kwok e col., 2007). Em células epiteliais gástricas, a interação entre CagL e a integrina α 5 β 1, dependente do T4SS, é a interação mais bem caracterizada em células hospedeiras. A CagL está localizada na superfície do T4SS, sendo importante na translocação da CagA. O CagL apresenta a sequência Arg-Gly-Asp (RGD),

bem caracterizada por se ligar a integrinas. Esta sequência é encontrada também em proteínas da matriz extracelular como fibronectina e vitronectina (Jiménez-Soto e col., 2009; Kwok e col., 2007; Ruoslahti, 1996).

Outro fator de virulência importante para colonização da *H.pylori* é a urease, que neutraliza o meio ácido permitindo a sua sobrevivência no estômago (Andrutis e col., 1995; Posselt e col., 2013). Após a autólise da bactéria, a urease é liberada e adsorvida na superfície extracelular das bactérias viáveis de onde representa cerca de 30% do teor total de urease celular (Montecuccio e col., 1999; Rieder e col., 2005).

1.3_Ureases

A urease é uma enzima dependente de níquel, que catalisa a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono. Pode ser encontrada em plantas, fungos e bactérias (Dixon e col., 1975; Mobley e col.,1995; Ha e col., 2001). As ureases de fungos e plantas possuem unidades funcionais compostas por uma única cadeia polipeptídica com aproximadamente 90 kDa. Já as ureases bacterianas possuem unidades funcionais compostas por duas ou três cadeias polipeptídicas diferentes, que são homólogas às cadeias únicas das proteínas vegetais ou fúngicas (Sirko e Brodzik, 2000). No entanto, a alta similaridade da sequência de todas as ureases indica que elas são variantes da mesma proteína ancestral e são susceptíveis a apresentar estruturas terciárias e mecanismos catalíticos semelhantes (Mobley e col., 1995, Sirko e Brodzik, 2000).

A urease é amplamente distribuída em sementes de leguminosas, bem como o padrão de acumulação de proteína durante a maturação da semente sugerem um papel fisiológico importante (Oliveira-Severo e col., 2006). Entretanto uma mutação que levou à perda da isoforma ativa da urease no embrião não provocou nenhuma alteração no seu desenvolvimento, sugerindo que a enzima não apresenta uma relação com papel fisiológico das plantas. Outro estudo realizado com culturas *in vitro* de desenvolvimento de cotilédones de soja indicou que a urease não desempenha um papel importante na nutrição do embrião. Um estudo propôs que as ureases de planta podem apresentar um papel na defesa das plantas contra predadores devido à alta toxicidade da amônia liberada (Polacco e Holland 1993). Posteriormente estudos mostraram que a canatoxina, isoforma da urease extraída da semente *Canavalia ensiformis*, apresentam propriedade inseticidas e fungicidas. Entretanto outra

urease extraída da bactéria do solo *Bacillus pasteurii* não apresenta propriedade inseticida (Follmer e col., 2004).

A canatoxina além de apresentar atividade inseticida, apresenta uma série de outros efeitos biológicos. A canatoxina quando administrada intraperitonealmente em ratos ou camundongos induz alterações respiratórias, convulsões e morte (Carlini e Guimaraes, 1981; Carlini e col., 1984). Em doses subconvulsivantes, a canatoxina promove o aumento dos níveis plasmáticos de gonadotropina (Ribeiro-DaSilva e col., 1989), insulina no plasma (Ribeiro-DaSilva e Prado, 1993) e também apresenta efeitos pró-inflamatórios em ratos (Benjamin e col., 1992). Um estudo *in vitro* mostrou que a canatoxina exibe uma potente atividade secretagoga em doses nanomolar em vários sistemas celulares isolados, induzindo a agregação plaquetária (Carlini e col., 1985; Barja-Fidalgo e col., 1991a), secreção de dopamina e serotonina em sinaptosomas de cérebro de rato (Barja-Fidalgo e col., 1991b), a liberação de histamina em mastócito (Grassi-Kassisse e Ribeiro-DaSilva, 1994) e a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas (Barja-Fidalgo e col., 1991).

A maioria destes efeitos descritos anteriormente induzidos pela canatoxina, tanto *in vivo* ou *in vitro*, parecem envolver a ativação por metabólitos do ácido araquidônico, principalmente através a via da lipoxigenase, uma vez que eles são bloqueados por inibidores de lipoxigenase (Benjamin e col., 1992; Carlini e col., 1985; Barja-Fidalgo e col., 1991; Barja-Fidalgo e col., 1991; Ribeiro-DaSilva e col., 1989).

A urease da *C. ensiformis* apresenta efeitos biológicos em comum com a canatoxina, incluindo a ativação de plaquetas, interação com gliconjugados polisialilados e atividade inseticida. Outros estudos mostraram que as várias atividades biológicas descritas para a canatoxina não são dependentes da atividade ureolítica da molécula (Follmer e col., 2001; Follmer e col., 2004).

Algumas ureases bacterianas desempenham um papel importante na patogênese de doenças humanas e de animais, incluindo as desencadeadas pela *H. pylori* e pela *Proteus mirabilis* (Fischbach e col., 2005).

1.4 Urease de *Helicobacter pylori*

A urease da *H. pylori* (HPU) constitui cerca de 10% das proteínas totais da célula (Suzuki col., 2007). Pelo menos sete genes estão envolvidos na produção da urease de *H.*

pylori. Os genes UreA e UreB codificam as subunidades estruturais do complexo enzimático hexamérico dependente de Ni_2^+ . Os genes UreE, UreF, UreG e UreH codificam proteínas acessórias envolvidas na incorporação de níquel e agrupamento da enzima. Junto com a arginase, a UreI é responsável por um fornecimento de uréia em condições ambientais ácidas (Zanotti e Cendron, 2010).

A urease pode interferir indiretamente em diferentes funções celulares. Lytton e colaboradores (2005) mostraram que a urease de *H. pylori* (HPU) através da sua ação ureásica contribui para a perda da integridade das junções *tight* no epitélio gástrico, desencadeando a diminuição da resistência elétrica transepitelial, aumento da permeabilidade e do processo de internalização de ocludinas *in vitro*. Corroborando este estudo, Wroblewski e colaboradores (2009) mostraram que a supressão da UreB anula o efeito da *H. pylori* sobre as junções oclusivas. Embora os mecanismos envolvidos na ativação desta via de sinalização induzida pela HPU não estejam claros, estes dados podem explicar como a ação da urease é importante nas respostas inflamatórias acompanhadas pelo dano epitelial (Posselt e col., 2013).

Além de apresentar um papel fundamental na produção de amônia e diminuição do pH da mucosa gástrica, a urease presente na lâmina própria de indivíduos infectados pela *H. pylori* apresenta atividade quimiotática para monócitos e neutrófilos (Mai e col., 1992). Além disso, a HPU e a urease recombinante enzimaticamente inativa estimulam a expressão da óxido nítrico sintase (NOS) induzida em macrófagos (Gobert e col., 2002). Estes dados sugerem que a urease pode exercer efeitos que não estão relacionados com o metabolismo da uréia em amônia.

Wassermann e colaboradores (2010) mostraram que a urease purificada de *H. pylori* ativa plaquetas através de uma via mediada por lipoxigenase. Além disso, a urease de *H. pylori* pode desencadear a agregação plaquetária, que dentro dos microvasos da mucosa gástrica pode contribuir para o desenvolvimento de inflamação e ulceração, processos característicos da infecção por *H. Pylori* (Gawaz, e col., 2005).

Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que a urease purificada de *H. pylori* é capaz de induzir edema de pata de camundongo *in vivo*, sugerindo envolvimento da imunidade inata neste processo. Além disso, já foi visto que a urease, independente de sua atividade ureásica, foi capaz de ativar diretamente neutrófilos *in vitro* induzindo a quimiotaxia, produção e liberação de ROS e retardando sua apoptose espontânea, e estes efeitos induzidos pela HPU são independentes da sua atividade ureásica (Uberti e col., 2013).

Tendo em foco que a *H. pylori* também afeta toda a microvasculatura adjacente ao epitélio gastrointestinal, alguns trabalhos tem mostrado seu efeito sobre CEs (Hatz e col.,

1997; Innocenti e col., 2002), entretanto o envolvimento direto da urease desta bactéria ainda não foi investigado. Portanto, são necessários estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão do envolvimento da urease de *H. pylori* na ativação de CEs.

1.5 Endotélio

O endotélio recobre a superfície interna dos vasos sanguíneos e linfáticos no organismo adulto. Esses vasos formam uma complexa rede que supre as necessidades de oxigênio e nutrientes dos tecidos (Franses e col., 2011). As CEs mantêm contato entre si e com células musculares lisas presentes na túnica íntima. Estas células estão associadas às células perivasculares denominadas pericitos, que servem como suporte para os vasos, (Collett e Canfield, 2005).

O endotélio vascular possui uma variabilidade fenotípica considerável, conforme a região anatômica e as adaptações aos desafios ambientais. As CEs também são heterogêneas em relação à expressão de proteínas. A heterogeneidade no desenvolvimento destas células deve-se aos estímulos liberados durante o seu desenvolvimento. Diversos fatores exógenos afetam o fenótipo destas células, incluindo força mecânica, promotores e inibidores de fatores solúveis de crescimento, citocinas, lipídeos plasmáticos e proteínas diversas (como trombina e plasmina) (Cines e col., 1998; Sumpio e col., 2002). Em adultos saudáveis, as CEs permanecem no estado quiescente por muitos anos. No entanto, estas células podem, prontamente, começar a migrar e proliferar para formar novos vasos em locais de lesão, inflamação, câncer, ou outras patologias (Potente e col., 2011).

Fatores importantes para a homeostase do endotélio incluem a integridade da membrana endotelial, e adesão às proteínas da cascata de coagulação e plaquetas (Harrison e col., 2009). Durante a inflamação, ocorre um rearranjo do citoesqueleto de actina com a formação de fibras de estresse que ocorrerem concomitantemente com a fosforilação da cadeia leve de miosina (Yuan, 2000). A homeostase do endotélio apresenta respostas agudas com a adaptação do fluxo para demanda dos tecidos e respostas a lesões que incluem brotamento de CEs e atração células angiogênicas circulantes, ambas as funções que são importantes para o reparo do dano tecidual (Heiss e col., 2014).

Além do seu papel como uma barreira permeável seletiva, a célula endotelial reage aos estímulos físicos e químicos no interior da circulação a regulação tônus vasomotor, e

respostas inflamatórias. Além disso, a célula endotelial é importante na angiogênese (Fagiani e Christofori, 2013). A lesão da célula endotelial, ativação ou disfunção é uma característica de muitos estados patológicos, incluindo a aterosclerose e trombose (Sumpio e col., 2002). O endotélio também tem a capacidade de produzir citocinas e moléculas de adesão que regulam processos inflamatórios e regenerativos, incluindo tráfego de leucócitos. (Heiss e col., 2014).

As CEs formam a principal barreira entre a circulação no sangue e tecido subjacente que os leucócitos enfrentam durante a sua transmigração (Butcher, 1991). O passo inicial durante a transmigração de leucócitos é o rolamento, que consiste de uma fraca adesão com o endotélio. Os leucócitos se ligam frouxamente a parede do vaso sanguíneo devido a interações fracas transientes entre selectinas e outras moléculas expressas nas CEs ativadas (Ley e col., 2007). A produção local de citocinas pelos leucócitos, como TNF- α , aumentam a expressão de moléculas de adesão de leucócitos e CEs, tais como ICAM e VCAM na superfície do endotélio. O aumento da expressão dessas moléculas de adesão associado ao rolamento dos leucócitos permitem que os leucócitos realizem a adesão firme, podendo assim transmigrar para o foco inflamatório (Cook-Mills e Deem, 2005; Wittchen e col., 2005).

As moléculas de adesão também apresentam grande importância na ativação de cascatas de sinalização intracelular. Dentre estas moléculas se destacam as integrinas que medeiam importantes funções das CEs, incluindo permeabilidade e angiogênese. Além disso, as integrinas proporcionam uma estrutura de ancoragem para a manutenção da barreira endotelial e coordenam as mudanças no citoesqueleto e nas junções (Calalb, e col., 1995; Mitra, e col., 2005; Hynes, 2007). Assim, integrinas regulam diferentes funções celulares responsáveis pela homeostase do endotélio assim como em respostas a condições inflamatórias.

1.6 Sinalização de integrinas

As integrinas são receptores heterodiméricos transmembranares que apresentam as subunidades α e β , um ectodomínio, e uma cauda citoplasmática geralmente curta. Existem ao menos 18 tipos de subunidades α e oito tipos de subunidade β , que podem se combinar e formar 24 heterodímeros já descritos (Baker e Hagg, 2007; Marelli e col., 2013). Estes receptores estão envolvidos com a interação célula-célula e célula matriz. As integrinas estão associadas ao citoesqueleto de actina e a diversas proteínas adaptadoras. Esses receptores

apresentam afinidade para proteínas da matriz extracelular, tais como fibronectina, fibrinogênio e colágeno (Hynes, 2002). As proteínas da matriz extracelular, embora estruturalmente diferentes, requerem sequências de reconhecimento semelhantes para se ligarem às integrinas. Estas proteínas possuem em comum uma sequência RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), também conhecida como sítio universal de reconhecimento de integrinas (Giancotti e Tarone, 2003; Marelli e col., 2013).

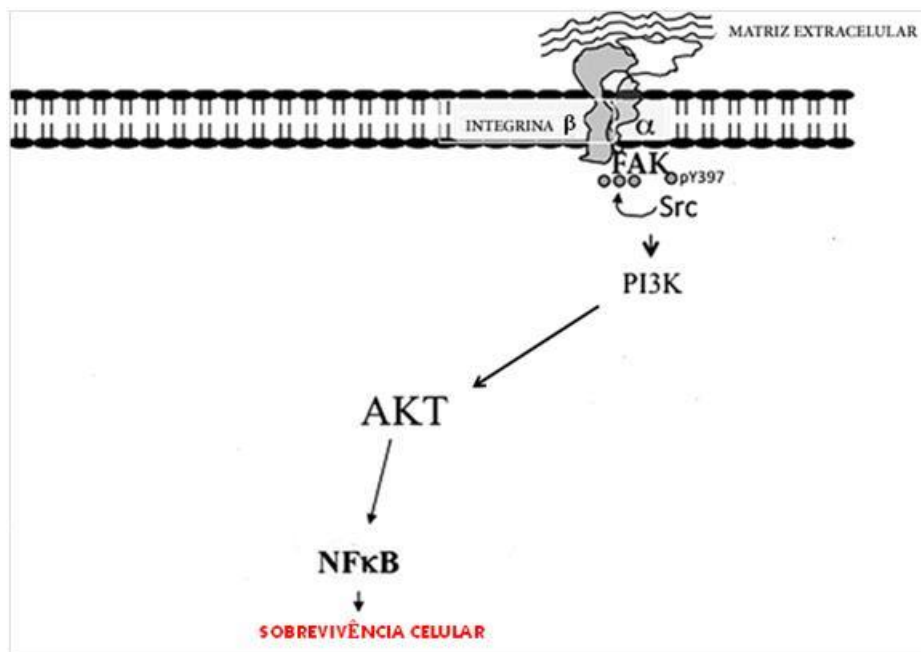
As integrinas podem desencadear vias de sinalização intracelulares que promovem a proliferação, migração e sobrevivência celular tanto em células normais quanto tumorais (Gabarra-Niecko e col., 2003). As integrinas não possuem atividade catalítica intrínseca, os sinais emitidos pelas interações ligante-integrina são repassados para o interior das células através da ativação de proteínas associadas a integrinas. Inicialmente, a quinase de adesão focal (FAK) é recrutada para locais de aglomeração (*clustering*) de integrinas através de interações entre o seu domínio C-terminal e proteínas associadas à integrina, tais como a talina e paxilina (Toutant e col., 2002, Shi e col., 2003). As integrinas, por sua vez, desencadeiam a ativação da FAK, estimulando a sua auto-fosforilação no resíduo Tyr 397, criando sítios de alta afinidade para o recrutamento e ligação de outras proteínas, incluindo as Rho GTPases, que levam a mudanças na organização do citoesqueleto de actina, na PI3K, na MAPK, na Src e em fosfatases e fatores de transcrição, podendo também afetar a transcrição gênica (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Bolós e col., 2010). Uma vez associada à FAK a SRC é capaz de induzir sua fosforilação no resíduo Tyr 577, promovendo sua atividade catalítica máxima (Calalb e col., 1995; Mitra e col., 2005). Quando ativada, a PI3K induz a liberação de mediadores lipídicos, como o fosfatidilinositol trisfosfato (PIP₃), que atuam como segundos mensageiros, ativando a AKT. Esta proteína, por sua vez, está envolvida tanto na sobrevivência como na migração celular (Cantley, 2002; Liu e col., 2009). A via da PI3K também pode ativar o fator nuclear κ B (NF- κ B) (Sudaram, 2006), que será discutido posteriormente (Figura 2).

Vários estudos também têm demonstrado um papel importante da FAK, ativada por integrinas, na modulação da permeabilidade vascular (Calalb e col., 1995; Mitra e col., 2005). Chen e colaboradores (2012) mostraram que a ativação da FAK está relacionada ao aumento de permeabilidade induzida por VEGF em CE's tanto *in vitro* como *in vivo*. Ainda, integrinas também proporcionam uma estrutura de ancoragem para a manutenção da barreira endotelial e coordenam as mudanças no citoesqueleto e nas junções (Guo e col., 2009). Corroborando esta informação, alguns membros da família de integrinas têm sido localizados nas interações célula-célula lateralmente (Manninen, 2015). Yuan e colaboradores (2012) também

mostraram que estas integrinas colaboram com outras moléculas para formar junções intercelulares laterais.

A fosforilação da FAK pode ser modulada por ROS, uma vez que estas regulam negativamente proteínas tirosinas fosfatases (Chiarugi, 2005). Natarajan e colaboradores (1998) mostraram que o tratamento com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi capaz de aumentar de maneira concentração-dependente a fosforilação da FAK, evidenciando assim uma ligação entre ROS e FAK.

Figura 2 - Via de sinalização regulada por integrina



Legenda: A ativação de integrinas é mediada por proteínas de matriz, que por sua vez desencadeiam a ativação da FAK, estimulando a sua auto-fosforilação no resíduo Tyr 397. Quando auto-fosforilada a FAK cria sítios de alta afinidade para o recrutamento e ligação de outras proteínas, incluindo a proteína SRC. A ativação desta proteína ativa diferentes vias de sinalização, incluindo a via PI3K/AKT, que por sua vez pode ativar fatores de transcrição, como o NF- κ B, que está envolvida com o processo de sobrevivência celular.

Fonte: Adaptado de Chhabra e col., 2009.

1.7 Espécies reativas de Oxigênio (ROS)

ROS podem ser geradas tanto a partir de fontes externas, como fumo, pesticidas, solventes orgânicos, poluição do ar e radiações, ou através do próprio metabolismo celular, no citoplasma, nas mitocôndrias e nas membranas. Seus alvos celulares podem ser proteínas, lipídeos, carboidratos e até o DNA (Cadenas, 1989; Anderson, 1996; Yu e Andreson, 1997). Classicamente, ROS são radicais livres, formados por moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, ocupando um orbital externo sozinho (Halliwell e Gutteridge, 1989). Este elétron livre favorece a recepção de outras moléculas, o que torna os radicais livres extremamente reativos. Estes têm meia-vida muito curta, mas eventualmente podem tornar-se mais estáveis (Halliwell, 1994). Dentre os exemplos de radicais livres, temos: o ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($OH\cdot$), óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$), dióxido de nitrogênio (NO_2) e o próprio átomo de hidrogênio, sendo este o radical livre mais simples, com um próton e um único elétron. No entanto, existem ROS que não possuem elétrons desemparelhados na última camada, se destacando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Cross, 1994).

As ROS são geradas a partir de diferentes vias metabólicas, incluindo o transporte de elétrons na cadeia respiratória, sistema xantina oxidase, citocromo p450, via da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, desacoplamento da NOS, e a mieloperoxidase (em fagócitos) (Frey e col., 2009). Quando o nível de produção de ROS excede a capacidade antioxidante celular, ocorre o estresse oxidativo (Massaad, 2011). A presença deste estresse a longo prazo está associado a várias doenças inflamatórias humanas, incluindo a hepatite, asma, câncer, acidente vascular cerebral e aterosclerose (Lee e col., 2004).

As ROS desempenham um papel crucial nos processos patogênicos em muitas doenças, variando de respostas de estimulação de fatores de crescimento para a geração das respostas inflamatórias. Nas últimas décadas estudos têm levado a uma mudança na compreensão do papel das ROS em diferentes organismos e tecidos, já que não é mais visto apenas como moléculas envolvidas com o dano, ou seja, estresse oxidativo. Essas moléculas podem atuar na regulação de vias de sinalização que estão envolvidas com respostas fisiológicas e biológicas normais, mas também podem atuar como segundo mensageiros em vias de sinalização que regulam o estado de algumas doenças, incluindo a tumorigênese (Schieber e Chandel, 2014).

As CEs produzem ROS, tais como O_2^- e H_2O_2 semelhante a outros tipos celulares não fagocíticos. Nas CEs se destaca o complexo NADPH oxidase como uma importante fonte de produção de ROS (Fridovich, 1978; Frei e col., 2009). As ROS produzidas pela NADPH oxidase estão envolvidas na disfunção endotelial, permeabilidade, inflamação, remodelação vascular, crescimento celular e migração, apoptose e senescência. Quando alterados estes processos contribuem para o desenvolvimento da hipertensão, diabetes, e lesão pulmonar aguda / sepse (Frey e col., 2009).

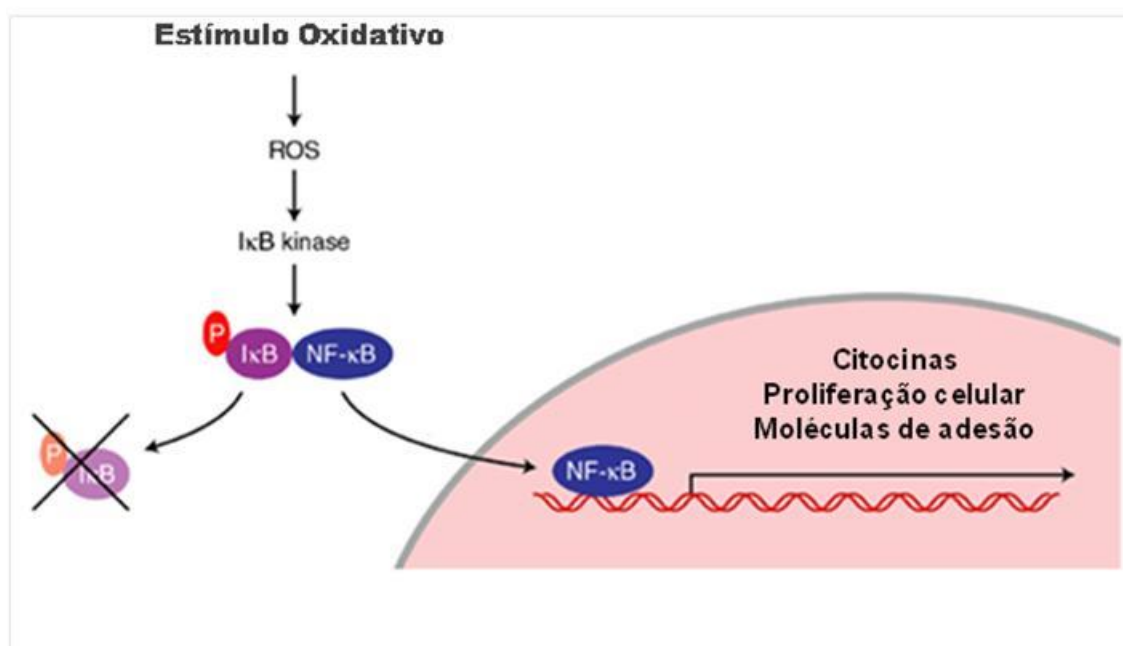
As ROS podem atuar como moléculas de sinalização para a ativação de diferentes vias de sinalização, tais como Akt, Src, e MAPKs, bem como fatores de transcrição, incluindo o NF- κ B, p53, e fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1), aumentando a expressão de genes redox-sensíveis (Schreck e col., 1991; Frei e col., 2009). Em relação ao fator de transcrição NF- κ B, existem cinco membros de sua família: p65 (rel-A), rel-B, citoplasmática rel (c-rel), p50 e p52. A fosforilação da I κ B pelo complexo IKK e o processo de degradação de I κ B libera o NF- κ B, que posteriormente é translocado para o núcleo e inicia a regulação da transcrição gênica. O NF- κ B é um regulador central da resposta imune e induz a expressão de genes de citocinas, como IL-2, IL-6, MCP-1 e CD40L. O NF- κ B também apresenta como alvo os genes envolvidos na proliferação ou sobrevivência celular (Clement, e col., 2008; Vallabhapurapu e Karin, 2009) (Figura 3). E o H_2O_2 induz a ativação do NF- κ B em CEs, e a superexpressão da catalase inibe a ativação deste fator de transcrição, induzido pelo TNF- α (True, e col., 2000). Além disso, a produção de H_2O_2 pela NADPH oxidase aumenta a atividade do NF- κ B, aumentando a expressão de ICAM-1 na superfície das CEs, permitindo a adesão firme de neutrófilos via integrinas β_2 (Fan e col., 2003). No entanto o mecanismo pelo qual H_2O_2 ativa NF- κ B não está totalmente esclarecido (Roebuck e col., 1995, True e col., 2000). Outro trabalho mostrou que H_2O_2 pode também aumentar a expressão de canais de cálcio TRPM2 na superfície das CEs, permitindo o aumento de cálcio nestas células e, conseqüentemente, aumentando a fosforilação da VE-caderina e β -catenina, proteínas importante na adesão célula-célula (Hecquet e col., 2008; Stevens e col., 2000).

Estudos mostram que as ROS também desempenham um papel crucial na angiogênese vascular. A angiogênese envolve uma combinação da migração das ECs e pericitos, proliferação e a orientação espacial apropriada para formar novos vasos sanguíneos para a passagem do sangue, importante em situações de isquemia crônica (Shweiki e col., 1992). Confirmando o papel de ROS na modulação da angiogênese Yasuda e colaboradores (1998) mostraram que o tratamento das CEs com o H_2O_2 , em baixa concentração, estimulou a

morfogênese tubular. ROS geradas a partir da NADPH oxidase também podem modular seletivamente alguns efeitos do VEGF sobre fenótipos de CEs (Abid e col., 2007).

O VEGF é um potente fator angiogênico envolvido no crescimento tumoral. A ligação do VEGF ao seu receptor na superfície da célula endotelial dispara várias vias de sinalização que conduzirão à proliferação, migração e reorganização do citoesqueleto de actina. As ROS produzidas pela NADPH oxidase tem um importante papel na resposta do VEGF em vários níveis. Similar a outros receptores tirosina quinases, a produção de ROS pela NADPH oxidase promove uma hiperfosforilação e ativação do receptor de VEGF (Colavitti e col., 2002; Ikeda e col., 2005; Blanchetot e Boonstra, 2008).

Figura 3 - Ativação do NF- κ B induzido por estímulo oxidativo



Legenda: O estímulo oxidativo aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultando na fosforilação do I κ B e posteriormente a sua proteólise, liberando o NF- κ B, que será translocado para o núcleo e inicia e regula a transcrição gênica. O NF- κ B é um regulador central da resposta imune e induz a expressão de genes que codificam citocinas e também apresenta como alvo genes envolvidos na proliferação e moléculas de adesão.

Fonte: Adaptado de http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_24/S1462399403006732sup004.htm

As ROS também estão envolvidas na integridade das junções endoteliais, já que estudos mostram que ROS é capaz de causar a desorganização de junções endoteliais, promovendo a fosforilação da VE-caderina e cateninas ou inibindo a atividades das fosfatases (Alexander e col., 2001; Sallee e col., 2006). Ainda, ROS são capazes de não apenas diminuir

a expressão de proteínas envolvidas na junção, mas também desencadear a formação de fibras de stress, que são denominados filamentos de actina que estendem por toda extensão da célula, e a contratilidade da actina-miosina (Boueiz e Hassoun, 2009; Burridge e Wittchen, 2013).

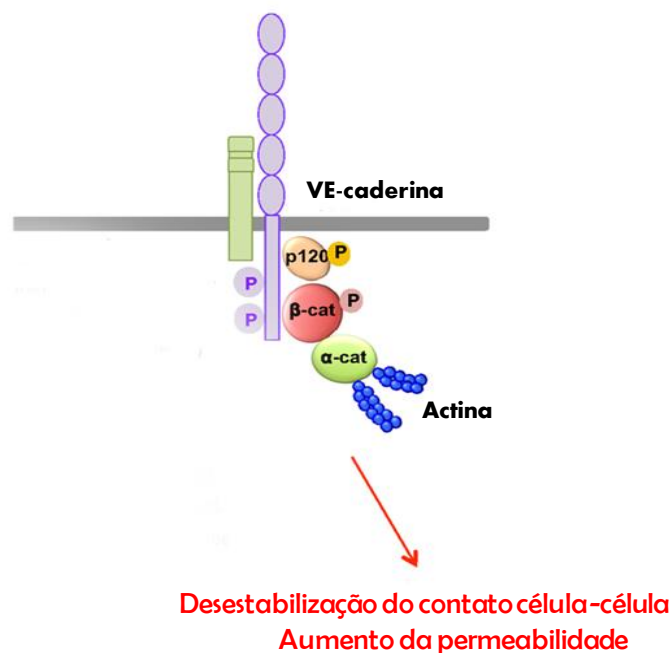
1.8 Permeabilidade Endotelial

O complexo juncional apical que desempenha um papel crucial na adesão célula-célula e regulação da função de barreira é composta por junções oclusivas e junções aderentes (McCole, 2013). Estas junções estão localizadas em posições seletivas na fenda juncional. Essa organização é descrita nas junções epiteliais, e geralmente mantida no endotélio. As junções oclusivas ocupam a posição mais apical, selando as bordas da fenda em direção à superfície luminal, e a sua principal função no endotélio é restringir a permeabilidade paracelular. As junções aderentes são localizadas em regiões mais basais, além de limitar a permeabilidade paracelular estas controlam a morfogênese e estabilidade do vaso (Dejana e col., 2009). Alterações na permeabilidade decorrentes de mudanças no domínio juncionais estão associados a estados patológicos, incluindo infecção, doenças inflamatórias crônicas, edema, epilepsia (Arrieta e col., 2006; Abbott e Friedman, 2012). As junções aderentes são necessárias para a montagem das junções oclusivas, selando o espaço paracelular (Gumbiner, 1996).

Essas junções aderentes regulam a adesão entre as CEs têm um papel crucial em diversos processos, além de manter a adesão entre as células também transferem sinais intracelulares que modulam contatos envolvidos com crescimento e polaridade celular; formação de lúmen; e interações com pericitos e células do músculo liso (Bazzoni e Dejana, 2004; Dejana e col., 2009). Portanto, as condições que levam ao rompimento das junções aderentes endoteliais não só aumentam a permeabilidade vascular através da abertura de espaços vazios intercelulares, mas também alteram as respostas dessas células (Giannotta e col., 2013). Nas junções aderentes a adesão é mediada pelas caderinas, que são moléculas de adesão dependentes de cálcio. As principais caderinas presentes em CEs são representadas pela caderina vascular endotelial (VE-caderina) (Navarro e col., 1998), que é um dos primeiros marcadores específicos a ser expresso por CEs durante o desenvolvimento da vascularização do embrião e diferenciação de células-tronco embrionárias para CEs *in vitro* (Breier e col.,

1996; Vittet col., 1996,1997). A organização de junções aderentes é constituída basicamente pela VE-caderina (Dejana e Vestweber, 2013). Intracelularmente a VE-caderina está ligada ao citoesqueleto de actina através de uma família de cateninas (α -, β -, γ -cateninas) (BurrIDGE e col., 2006). A conexão com o citoesqueleto de actina é estabilizada pela catenina p120 que se liga a proteínas quinases, incluindo as quinases da família Src e fosfatases, e que serve como um suporte para trazer essas moléculas sinalizadoras em para novas interações (Piedra e col., 2003; Reynolds e Rocznik-Ferguson, 2004) (Figura 4). Assim, as cateninas não apenas servem como uma ligação estrutural entre VE-caderina e o citoesqueleto, elas também podem regular a transdução de sinais bioquímicos para a comunicação célula-célula.

Figura 4 - Complexo Ve-caderina-cateninas



Legenda: Intracelularmente a VE-caderina está ligada ao citoesqueleto de actina através de uma família de cateninas (α -, β -, γ -cateninas). A conexão com o citoesqueleto de actina é estabilizada pela catenina p120 que se liga a proteínas quinases, servindo como um suporte para trazer essas moléculas sinalizadoras em proximidade com proteínas de junção aderentes para novas interações. A fosforilação da VE-caderina desencadeia alterações neste complexo, que por sua vez leva a desestabilização do contato célula-célula e aumento da permeabilidade.

Fonte: Adaptado de Azzi e col., 2013.

A fosforilação da VE-caderina e das cateninas é considerada um mecanismo que desencadeia alterações conformacionais ou rompimento das junções intercelulares (Esser e

col., 1998; Lampugnani e col.,1997; Young e col.,2003). A VE-caderina regula diferentes vias de sinalização, entretanto essa regulação pode variar de acordo com alterações nas condições funcionais da vasculatura (Dejana e Vestweber, 2013; Harris e Nelson, 2010). Esta proteína estabiliza a vasculatura, através da inibição do crescimento por contato, proteção da apoptose e controle da permeabilidade endotelial. Além disso, contribui para propriedades funcionais básicas e específicas, como o estabelecimento da polaridade celular, formação correta do lúmen, tubulogênese vascular, rearranjo do citoesqueleto de actina, remodelamento das junções oclusivas e transcrição gênica, levando à angiogênese (Taddei e col., 2008).

1.9 Angiogênese

A interação entre as CEs e outros tipos celulares durante o brotamento dos vasos, migração, proliferação, maturação e a ligação dos novos vasos recém formados geram uma rede de ramificações que permite o transporte de fluidos, nutriente, gases, hormônios e células circulantes em todo o organismo (Fagiani e Christofori, 2013).

O processo da angiogênese é definido como a formação de novos vasos a partir de outros vasos pré-existentes (Djonov e col., 2000; Folkman, 2004; Emmett e col., 2011). Em quadros onde existe uma deficiência na formação de novos vasos, o crescimento inadequado de capilares impede a circulação sanguínea apropriada, levando à morte tecidual (Powell, 1999).

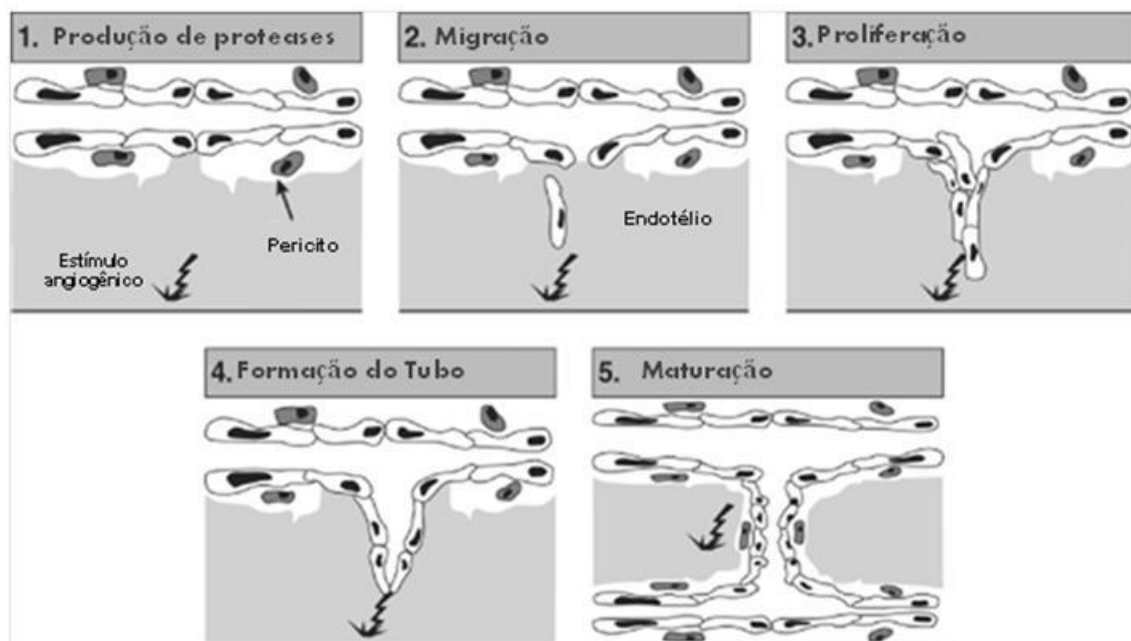
O processo de angiogênese é iniciado pelas CEs quiescentes, que são ativadas por estímulos angiogênicos. Quando ativadas, estas células podem alterar o equilíbrio proteolítico de degradação da membrana basal e promover a dissociação de pericitos do capilar. As CEs então proliferam, projetam filopódios para ganhar motilidade e invadem em direção ao estímulo angiogênico. Os brotamentos começam a formar menos filópodos, mas estabelecem um lúmen e proliferam para seu alongamento. Posteriormente as células se ligam para formação dos vasos (Gerhardt, e col., 2003) (Figura 5).

Em adultos, a rede vascular normalmente não forma novos vasos, contudo as CEs dos vasos sanguíneos quiescentes mantém uma elevada plasticidade para responder aos sinais angiogênicos. Os poucos tecidos adultos que realizam a angiogênese incluem o órgão reprodutor feminino e órgãos que são submetidos a crescimento fisiológico ou precisam

responder a lesões. Então, em adultos a angiogênese é estreitamente regulada através de um equilíbrio entre ativação e inibição de sinais (Asahara e col., 1997).

A perda do estado quiescente das células do endotélio é uma característica comum de várias condições patológicas, incluindo a inflamação, aterosclerose, restenose, vários tipos de patologias vasculares e câncer. A angiogênese patológica apresenta processos celulares e moleculares semelhante à angiogênese fisiológica, mas é caracterizada por uma falha na fase de resolução e pela geração de uma rede vascular altamente desorganizada. Além disso, o brotamento de novos vasos sanguíneos e recrutamento de células inflamatórias para locais de inflamação e angiogênese são características da inflamação aguda e crônica, sugerindo uma relação entre a inflamação e angiogênese (Grunewald e col., 2006; Fiedler e col., 2006; Fiedler e Augustin, 2006; Imhof e Aurrand-Lions, 2006).

Figura 5 - O processo angiogênico



Legenda: As CEs quiescentes são ativadas por estímulos angiogênicos. Este estímulo induz a produção de enzimas proteolíticas, que degradam a membrana basal e a matriz extracelular perivascular. As CEs proliferam e migram para dentro da área perivascular, formando brotamentos primários. Posteriormente há a formação do lúmen desses brotamentos primários, que é seguido da formação de uma nova membrana basal e maturação do vaso sanguíneo para completar a origem de estruturas tubulares, através do qual o sangue pode fluir.

Fonte: Adaptado de Koch e Distler, 2007

O aumento da permeabilidade endotelial é evento inicial e necessário para angiogênese mediada pelo VEGF. A ruptura entre as junções intracelulares entre as células endoteliais permite o aumento da passagem de macromoléculas através do endotélio, que contribui para o microambiente pró-angiogênico (Wallez e col., 2006; Dvorak, 2002). O VEGF, através da sua interação com o VEGFR-2, pode ativar a produção de NO pela oxido nítrico sintase endotelial (eNOS). O NO derivado da eNOS é essencial para atividade biológicas induzidas pelo VEGF, já que um estudo mostrou que aumento de permeabilidade e angiogênese induzidas pelo VEGF foram reduzidos em camundongos knockout para eNOS (Fukumura et al., 2001). Recentemente foi visto que o tratamento com a bradicinina estimulou o aumento da tubulogênese em células endoteliais no modelo *in vitro* e quando essas células foram tratadas com o inibidor da eNOS foi observado a diminuição deste processo (Moraes e col., 2014)

1.10 Oxido Nítrico

O endotélio mantém a homeostase vascular através de múltiplas interações com as células das paredes dos vasos e do lúmen. O endotélio regula o tônus vascular, equilibrando a produção de vasodilatadores e como mencionado anteriormente, o NO se destaca nesse processo. Porém, outras substâncias são importantes nestes processos como as prostaglandinas, fator hiperpolarizante derivado do endotélio e vasoconstritores, como endotelina-1 (Heiss e col., 2014). O NO derivado do endotélio também participa nas funções biológicas, incluindo a regulação da inflamação, angiogênese e progressão tumoral (Fukumura e col., 2006; Heiss e col., 2014).

A síntese de NO é realizada pela enzima NOS (nitric oxide synthase), utilizando L-arginase, oxigênio e a NADPH como um cofator. Existem três diferentes isoformas da NOS: a NOS neuronal (nNOS ou NOS 1), NOS induzida (iNOS ou NOS2) e NOS endotelial (eNOS ou NOS3). A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e já foram descritas em diferentes tipos celulares (Moncada e Higgs, 1993; Forstermann e Sessa, 2012). A eNOS foi originalmente reconhecida como um importante regulador do tônus vascular se destacando como um regulador importante no aumento da permeabilidade microvascular (Furchgott e col. 1980, Palmer e col., 1987, Mayhan, 1994, Yuan e col., 1993). Sob condições fisiológicas a eNOS produz NO, que é considerado um fator importante na função vasoprotetora do endotélio. (Li e Forstermann, 2000; Forstermann e Sessa, 2012). A eNOS é constitutivamente expressa no endotélio e é ativada por tensão de corte do fluxo sanguíneo ou por agonistas tais

com a bradicinina e acetilcolina. O NO derivado da eNOS pode difundir-se a partir de CEs e induzir vasodilatação, estimulando a guanilato ciclase sensível a NO. O NO endotelial pode também difundir-se no sangue e inibir a agregação e a adesão plaquetária (Li e col., 2014). Entretanto sob condições patológicas associadas com o estresse oxidativo a eNOS pode tornar-se disfuncional (Forstermann, 2008; Li e Forstermann, 2013; Lie col, 2004). O estresse oxidativo contribui significativamente para disfunções endoteliais, principalmente devido à rápida inativação oxidativa de NO pelo excesso de superóxido.

Sob condições fisiológicas a iNOS esta ausente na vasculatura. No entanto sob condições de inflamação, sepse ou estresse oxidativo a expressão de iNOS é induzida em vasos sanguíneos (Pautz e col., 2010). A indução de iNOS na vasculatura também está associada com aumento da formação de peroxinitrito (Viridis e col., 2005; Xia e Zweier, 1997) um mecanismo patogênico chave em condições tais como choque séptico, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca crônica, diabetes e aterosclerose (Pacher, e col 2007; Liaudet e col., 2013). Diferente da produção regulada do NO pela eNOS, a iNOS pode produzir grandes quantidades de NO rapidamente e de forma prolongada. A produção em excesso de NO pela iNOS pode levar à disfunção vascular, comprometendo tanto a vasoconstrição e o vasorelaxamento dependente do endotélio (Gunnnett, e col., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sabemos que a HPU, importante fator de virulência da *H. Pylori*, possuiu efeitos pró-inflamatórios (Ding e Zheng, 2012, Uberti e col., 2013) e por isso hipotetizamos que poderia estar envolvida diretamente no desenvolvimento de doenças associadas à *H. pylori*, como gastrite, úlcera ou câncer. Por outro lado as células endoteliais tem um papel fundamental tanto em processos envolvidos com a resposta inflamatória como em diferentes processos patológicos (Potente e col., 2011). Tendo em conjunto estas informações, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da HPU sobre as células endoteliais humanas investigando, os mecanismos moleculares envolvidos nestes efeitos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em células endoteliais os efeitos da HPU sobre:

- a) A viabilidade celular;
- b) O rearranjo do citoesqueleto de actina;
- c) A ativação de FAK e AKT;
- d) A permeabilidade paracelular;
- e) A dispersão e ativação de VE-caderina;
- f) A produção de ROS e NO;
- g) A adesão de neutrófilos as células endoteliais HMEC1;
- h) A capacidade tubulogênica;

Avaliar o envolvimento de integrinas e da modulação redox nos efeitos da HPU sobre as CEs.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

HEPES, ácido etileno diamina tetra acético (EDTA), albumina de soro fetal bovino (BSA), penicilina, cloreto de sódio (NaCl), Pirofosfato de Sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$), DL-Ditiotreitol (DTT) ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), isopropanol P.A ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), leupeptina, ortovanadato de sódio (Na_3VO_4), azul de tripan ($\text{C}_{34}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{S}_4\text{Na}_4$), Trolox (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-Tetrametilcromano), lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, O isotiocianato de fluoresceína (FITC) - dextrano, RGD (Arginina – glicina – Ácido Aspártico), Alexa flúor 555, Tween 20, faloidina conjugada a rodamina, EGF (Fator de crescimento epidermal), hidrocortisona, L-glutamina, vermelho de fenol e tripsina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O matrigel® foi comprado na empresa Becton Dickinson Labware (Bedford, EUA). Triton X-100 e Azul de Bromofenol foram comprados da Amersham Pharmacia Biotech (São Francisco, EUA). Tris, dodecilssulfato de sódio (SDS), glicerol, membranas PVDF, RainbowTM, percoll foram adquiridos da GE Healthcare Life Sciences (CHALFONT ST GILES, Inglaterra). Soro fetal bovino (FBS) foi proveniente da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). MCDB-131, M199 e Streptavidina conjugated HRP (horseradish peroxidase - Estreptavidina conjugada a peroxidase), DAPI prolong, CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil-ester), DAF-FM DA (4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato), CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato), anticorpos anti-VE-caderina fosforilada no resíduo 658, anti-FAK fosforilada no resíduo Tyr 397 e 577 foram comprados da Invitrogen (Carlsbad, EUA). Os anticorpos anti-AKT, anti-VE-caderina e anti-FAK foram obtidos na Santa Cruz Biotechnology (Texas, EUA) e o anticorpo anti-AKT fosforilada no resíduo Ser 473 foram comprados na Cell Signaling Technology (Beverly, EUA). O kit de dosagem de proteína BCA e o kit de quimioluminescência Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL) foram provenientes da Thermo Scientific (Rockford, EUA). Fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), cloreto de potássio (KCL), β -mercaptoetanol, fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) foram comprados na Proquímios (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Bicarbonato de Sódio (NaHCO_3), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e D(+) glicose foram comprados da Merck (Darmstadt, Alemanha). O kit para avaliar a ativação de NF-kB Ready-To-Glow Secreted Luciferase Reporter foi comprado da empresa Clontech (Califórnia, EUA).

3.2 Linhagens celulares

Para a realização deste trabalho foi utilizada a linhagem celular de endotélio de microvasculatura humano (HMEC1) (Ades e col., 1992), obtida pelo Dr. Francisco Candal da Emory School of Medicine & CDC, Atlanta, GA e doada pela Dra Veronica Morandi (UERJ), Rio de Janeiro, RJ, Brasil. A HMEC1 está bem descrita como tendo a grande maioria das características de células endoteliais humanas, em alguns ensaios, foram utilizadas células endoteliais obtidas da cultura primária de cordão umbilical humano (HUVEC) (Jeffe e col., 1973), também doadas pela Profa. Dra. Verônica Morandi da UERJ. O uso dessa cultura de células primárias foi autorizado pelo comitê de ética (CAAE: 0086.0.314.325-10)

3.3 Purificação da urease de *Helicobacter Pylori*

A HPU foi produzida no Laboratório de Proteínas Tóxicas (UFRGS) e doada pela Dra Célia Carlini. O plasmídeo pHP8080 contendo o operon da urease de *H. Pylori* foi expresso na linhagem *Escherichia coli* SE5000. Esta linhagem foi utilizada como vetor de expressão da urease de *H. Pylori*, como descrito por Wassermann e col. (2010).

3.4 Cultura de células

As HMEC1 foram cultivadas sobre gelatina 1% em meio de cultura MCDB-131 suplementado com 14,04 mM de NaHCO_3 , 15 mM de HEPES, 60mg/mL de penicilina, 100 mg/mL de streptomomicina, 1µg/mL de hidrocortisona, 10 µg/mL de EGF, 2 mM de L-

glutamina e com 10% de FBS em pH 7,2. As células HUVEC foram cultivadas sobre a gelatina 2% em meio de cultura 199 suplementado com 26 mM de NaHCO_3 , 25,17 mM HEPES, 29,94 mg/mL penicilina, 15mg/mL streptomomicina, 8U/ml heparina e com 20% de FBS em pH 7,2. As células foram mantidas em cultura a 5% de CO_2 e temperatura constante de 37°C armazenadas em garrafas de cultura (Corning). O meio de cultura foi renovado ou as células foram repicadas, quando confluentes, a cada 2-3 dias. Para repicarmos a linhagem de HMEC1, foi utilizado uma solução Hank's EDTA (5 mM) para lavar as células, desfazendo as ligações adesivas dependentes de cátions (Ca^{2+} e Mg^{2+}), facilitando, assim, a atuação da tripsina para soltar esses tipos celulares do plástico. Para repicarmos a linhagem de HUVEC, foi utilizado uma solução de PBS (tampão fosfato de sódio, NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M) para lavar as células, e posteriormente adicionamos a tripsina para soltar esses tipos celulares do plástico. Depois de serem descoladas do plástico da garrafa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos. As células HMEC1 e HUVEC foram depois plaqueadas em novas garrafas de cultura. Utilizamos no máximo até 10 passagens da célula HMEC1 e 3 passagens das células HUVEC.

3.5 Purificação de Neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados de sangue periférico de doadores saudáveis, na presença de EDTA 5% em PBS, através de um gradiente descontínuo de Percoll, diluído em Hank's (KCl 5,4 mM; KH_2PO_4 0,44 mM; NaCl 13,7 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,33 mM; D(+) 5,5 mM glicose; vermelho de fenol 0,031 M; NaHCO_3 4 mM). As hemácias foram lisadas por solução salina hipotônica 0,2%. O procedimento para isolamento de neutrófilos está em conformidade com o comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE: 38257914.7.0000.5259).

3.6 Contagem de células

O número de células presentes na suspensão celular foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão por Azul de Tripán 0,2% em PBS.

3.7 Ensaio de viabilidade MTT

As HMEC1 ($1,5 \times 10^4$ células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 e foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, *overnight* para adesão na presença de meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. No dia seguinte estas células foram mantidas no meio MCDB-131 com ausência de soro durante 1 hora. Posteriormente as células foram estimuladas ou não com HPU (10nM) durante 24 horas. A viabilidade das células foi determinada através do ensaio de redução do MTT (brometo de 3-(4,5dimetil-tiazol-zil)-2,5-difeniltetrazólio) a formazan. O MTT diluído em PBS foi adicionado às células em uma concentração de 50 µg/ poço e as células foram incubadas no escuro, a 37° C por 4h. Posteriormente, a solução de MTT foi descartada e foi adicionado isopropanol (100 µL) para dissolver os cristais de formazan. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos e foi realizada a leitura a 570 nm em leitor de microplacas (En Vision® - Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).

3.8 Ensaio de Permeabilidade a macromoléculas

Os ensaios de permeabilidade foram realizados em câmaras de transwell (Becton Dickinson). Estas câmaras são constituídas de membranas de policarbonato na forma de insertos, que são colocadas no interior de poços de placa de cultura de 24 poços. As membranas dos insertos apresentavam porosidade de 0,4 µm. Primeiramente, as HMEC1 (5×10^4 células/inserto) foram plaqueadas nos insertos, que foram inseridos em placas de 24 poços. Estas células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ durante 72 horas, até formar 100% de confluência, em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram privadas de soro por 1 hora, mantidas em meio HBSS (solução-tampão salina de Hank's) (0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 1,3 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 4,2 mM NaHCO₃). Após este período as células foram pré-tratadas com RGD (Arginina – glicina – Ácido Aspártico) (1µM) durante 15 min. Posteriormente as células foram estimuladas ou não com a HPU (10nM) e TNF-alfa (25ng/mL). Após, Dextran FITC (1mg/mL), diluído em meio HBSS, foi adicionado dentro dos insertos. Após 30 e 60 minutos, 20µL foi retirado da solução do compartimento abaixo do inserto. A quantidade de

fluorescência emitida pelo Dextran FITC foi monitorada pela excitação e emissão de ondas entre 485/530 nm em leitor de microplacas (En Vision® - Perkin Elmer).

3.9 Ensaio de Resistência elétrica transendotelial

Os ensaios de permeabilidade celular foram realizados em câmaras de transwell (Becton Dickinson). As HMEC1 (5×10^4 células/inserto) foram plaqueadas nos insertos, que foram inseridos em placas de 24 poços. Estas células foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ durante 72 horas, até formar 100% de confluência, em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram mantidas no meio MCDB-131 com ausência de soro durante 1 hora. Após este período as células foram estimuladas ou não com a HPU (10nM). A resistência elétrica transendotelial foi medida imediatamente antes de colocar o tratamento, e 15, 30 e 45 min após o tratamento com o auxílio do instrumento Millicell-ERS. Os valores foram normalizados com base na área do filtro (0.6 cm²) e após a subtração do branco.

3.10 Imunocitoquímica para VE-caderina

As HUVEC (5×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro mantidas a 37°C e 5% de CO₂, *overnight* em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. No dia seguinte estas células foram mantidas no meio MCDB-131 com ausência de soro durante 1 hora. Posteriormente as células foram estimuladas ou não com HPU (10nM) durante 5 e 15 minutos. A seguir estas células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformolaldeído 4% de sacarose. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos, e, novamente lavadas com PBS. A seguir as células foram bloqueadas com PBS contendo 5% BSA durante 1 hora. Decorrido este período, as células foram incubadas com anticorpo primário *overnight* com anticorpo primário policlonal anti-VE-caderina (1:200). No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas com PBS e posteriormente incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado a biotina (1:200) por 1 hora. Após lavagem com PBS as células foram incubadas por 1 hora com estreptavidina conjugada a FITC (Alexa fluor

555) (1:200). Decorrido esse período, as lamínulas foram lavadas com PBS, e montadas sobre lâminas utilizando DAPI prolong, para a marcação nuclear. A distribuição da VE-caderina foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71, Tokyo, Japão) em aumento de 600 vezes. As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software adobe photoshop.

3.11 Citoquímica para F-actina

As HMEC1 (5×10^4 células/poço) foram distribuídas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e foram mantidas a 37°C e 5% de CO_2 , *overnight* para horas para adesão em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. No dia seguinte estas células foram mantidas no meio MCDB-131 com ausência de soro durante 1 hora. Posteriormente as células foram pré-tratadas ou não com RGD ($1\mu\text{M}$) durante 15 min e estimuladas ou não com HPU (10nM) por durante diferentes tempos (5, 15 e 30 min). A seguir, estas células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformolaldeído 4% de sacarose. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 5 minutos, e, novamente lavadas com PBS. Para a marcação da F-actina, as células foram incubadas, durante 2 horas, com faloidina conjugada a rodamina 1:500. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS, e, montadas sobre lâminas utilizando $20\mu\text{L}$ de DAPI prolong, para a marcação do núcleo celular. A distribuição de F-actina foi observada utilizando um microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX71) em aumento de 600 e 1000 vezes. As imagens foram então digitalizadas e processadas utilizando o software adobe photoshop.

3.12 Obtenção de extratos celulares

As HMEC1 (5×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO_2 , “overnight” em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. Após, as células foram mantidas em meio MCDB-131 sem soro por 1 hora. Após este período, as células foram tratadas ou não com a HPU (10 nM) por diferentes tempos (1,3,5,15

e 30 minutos), a 37°C e 5% de CO₂. Após as incubações, as células foram lisadas em tampão de lise RIPA (Tris 50 mM, pH 8; Triton X-100 1% (v/v); NaCl 150 mM; SDS 0,1%; EDTA 0,5 mM; NaF 50 mM; Na₃VO₄ 1mM; Pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇) 3mM; iodocetamina 10 nM; DTT 2 mM e inibidores de proteases: fluoreto de fenilmetil sulfonil 2 mM (PMSF), aprotinina 1 μM; leupeptina 1 μM e inibidor de tripsina (SBTI) 1 μM. O conteúdo de proteínas do extrato total foi determinado pelo método de BCA (Thermo Scientific).

3.13 Eletroforese e Western blotting

Aos extratos celulares foram adicionados 20% do seu volume de tampão de amostra 5x concentrado (SDS 1%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%; β-mercaptoetanol 5%) e as amostras foram fervidas em água por 5 minutos. O volume dos extratos celulares correspondentes a 20 μg de proteína foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) desnaturante a 8% para proteína de alto peso molecular (VE-caderina e FAK) e a 10% para proteína de médio peso molecular (AKT). O padrão de peso molecular correu em paralelo para estimar o peso molecular das amostras. Após 1 hora de eletroforese a 150 V e 25 mA, as proteínas no gel foram eletrotransferidas para membranas de PVDF durante 1 hora (15 V, 328 mA) em cuba de eletrotransferência semi-seca (Bio-Rad). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com TBS (NaCl, 0,5 M; Tris, 20 mM) contendo Tween 20 (0,1% v/v, T-TBS) contendo 5% BSA *overnight*, e em seguida, incubadas 4°C, *overnight* com anticorpo monoclonal anti-FAK, monoclonal anti-pFAK fosforilada no resíduo Tyr 397 e policlonal anti-pFAK fosforilada no resíduo Tyr 577, policlonal anti-VE-caderina, policlonal anti-pVE-caderina fosforilada no resíduo Tyr 658, policlonal anti-AKT e monoclonal anti-pAKT fosforilada no resíduo Ser 473 (1:1000). Após três lavagens com T-TBS, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-IgG específicos conjugado à biotina (1:10000), à temperatura ambiente e sob agitação por 1 hora; com subsequente, incubação com estreptavidina conjugada a peroxidase (1:10000). Para revelação, foi utilizado um kit de revelação por quimioluminescência (ECL - Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate). As membranas foram fotografadas utilizando o ChemiDoc*MP (Bio RAD, California, USA) e a densitometria analisada no programa Image Lab 4.0.

3.14 Ensaio de tubulogênese das HMEC1 com Matrigel®

O Matrigel® (11.46 mg/mL) foi adicionado em placas de 96 poços durante 30 minutos a 37°C para sua polimerização. Após este período as HMEC1 foram tripsinizadas e plaqueadas (3×10^4 células/poço) em duplicata diluídas em meio de cultura MCDB-131 suplementado com 1% de FBS sobre o Matrigel®. Após 30 minutos, as células foram pré-tratadas ou não com RGD (1µM) durante 15 min e posteriormente foram incubadas na presença ou ausência da HPU (10 nM) durante 6 horas. Após este período retiramos o sobrenadante e fixamos as células sobre o Matrigel® com gluteraldeído 1,1% em PBS durante 20 minutos em temperatura ambiente. A retirada do fixador foi feita por três lavagens com PBS. A análise do número total das ramificações (brotos ou prolongamentos celulares endoteliais, que resulta no aspecto em “rede” da diferenciação angiogênica) foi feita em campo claro, no microscópio invertido (Olympus IX71) em um aumento de 100 vezes. Foram capturadas imagens de pelo menos 4 campos aleatórios, que foram analisadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.1.

3.15 Ensaio de produção de ROS intracelular

A produção de ROS intracelular em HMEC1 foi verificada através da oxidação da sonda CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetil-ester). As HMEC1 (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placa de 96 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, *overnight* em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram privadas de soro por 1 hora, mantidas em meio HBSS. Posteriormente as células foram incubadas com sonda CM-H₂DCFDA (5µM) por 1 hora. Após este período as células foram pré-tratadas com RGD (1µM) e LY294002 (3µM) durante 15 min e a seguir foram estimuladas ou não com a HPU (10nM). A quantidade de fluorescência gerada pelo DCF é proporcional a taxa de oxidação da sonda CM-H₂DCFDA. A fluorescência foi monitorada em diferentes tempos pela excitação e emissão de ondas entre 485/530 nm em leitor de microplacas (En Vision®).

3.16 Ensaio de produção de óxido nítrico

A produção de NO em HMEC1 foi verificada através da oxidação da sonda DAF-FM DA (4-Amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato). As HMEC1 (3×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, *overnight* em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram privadas de soro por 1 hora, mantidas em meio HBSS. Posteriormente as células foram incubadas com sonda DAF-FM DA (5µM) por 1 hora. A seguir as células foram pré-tratadas ou não com RGD (1µM) e LY294002 (3µM) durante 15 minutos e estimuladas ou não com a HPU (10nM). A quantidade de fluorescência gerada foi monitorada em diferentes tempos pela excitação e emissão de ondas entre 495/530 nm em leitor de microplacas (En Vision®).

3.17 Ensaio de adesão de neutrófilos as HMEC1

As HMEC1 (5×10^4 células/poço) foram colocadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, “overnight” em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram privadas de soro por 1 hora, mantidas em meio HBSS. Posteriormente as células foram pré-tratadas com RGD (1µM) e Trolox (100 µM) durante 15 min e a seguir estimuladas ou não com a HPU (10nM) por diferentes tempos (15, 30, 45, 60, 180, 240 minutos). Os neutrófilos (1×10^5) foram carregados com a sonda CMFDA (5-clorometilfluoresceína diacetato) (5µM) por 1 hora. Após este período estes neutrófilos foram colocados para aderir sobre as HMEC1 tratadas ou não com a HPU durante 30 min. Foram realizadas duas lavagens para remover os neutrófilos que não aderiram as HMEC1. A quantidade de fluorescência gerada pelo CMFDA dos neutrófilos que permaneceram aderidos as células foi monitorada através da excitação e emissão de ondas entre 492/517 nm em leitor de microplacas (En Vision®).

3.18 Ensaio de atividade de NF- κ B

As HMEC1 (2×10^5 células/poço) foram colocadas em placas (preta) de 24 poços e mantidas a 37°C e 5% de CO₂, “overnight” em meio MCDB-131 suplementado com 10% de FBS. As células foram mantidas em meio MCDB-131 suplementado com 1% de FBS por 1 hora. Após este período as HMEC1 foram transfectadas com o plasmídeo que contem o gene repórter da luciferase que responde a ativação do NF- κ B (NF- κ B pMetLuc 2) e plasmídeo controle (pMetLuc 2) em meio MCDB-131 suplementado com 1% FBS durante 24 horas. No dia seguinte as células foram pré-tratadas ou não com Trolox (100 μ M) durante 15 min e estimuladas ou não com HPU (10nM) ou LPS (10 μ g/mL) durante 3 horas,. O meio foi coletado de todos os grupos e incubado na presença de luciferina pela luciferase. A luminescência emitida pela quebra da luciferina foi monitorada em diferentes tempos pela emissão do comprimento de ondas de 530nm em leitor de microplacas (En Vision®).

3.19 Análise estatística

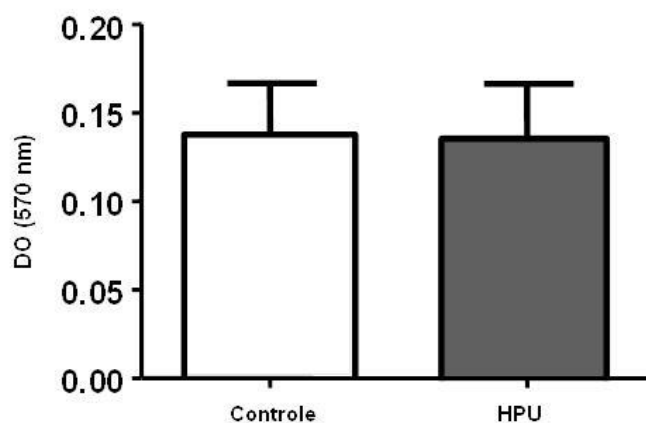
Os resultados obtidos são expressos como média e desvio padrão da média. Os dados foram analisados por teste t de Student ou teste one-way ANOVA, com auxílio do programa GraphPad Prism 4 para Windows e do Microsoft Excel 2007, sendo $p < 0.05$ considerado estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito da HPU sobre a viabilidade de HMEC1

Trabalhos anteriores mostraram que tanto a *H. pylori* (Cover e col., 2003) como a HPU (Smoot e col.1990) podem alterar a viabilidade de células epiteliais gástricas . Por este motivo, resolvemos avaliar o efeito da HPU sobre a viabilidade das HMEC1. Nas condições utilizadas neste estudo a HPU (10 nM) não foi capaz de alterar a viabilidade das HMEC1 no tempo de 24 horas (figura 6).

Figura 6 - A HPU nao afeta a viabilidade das HMEC1

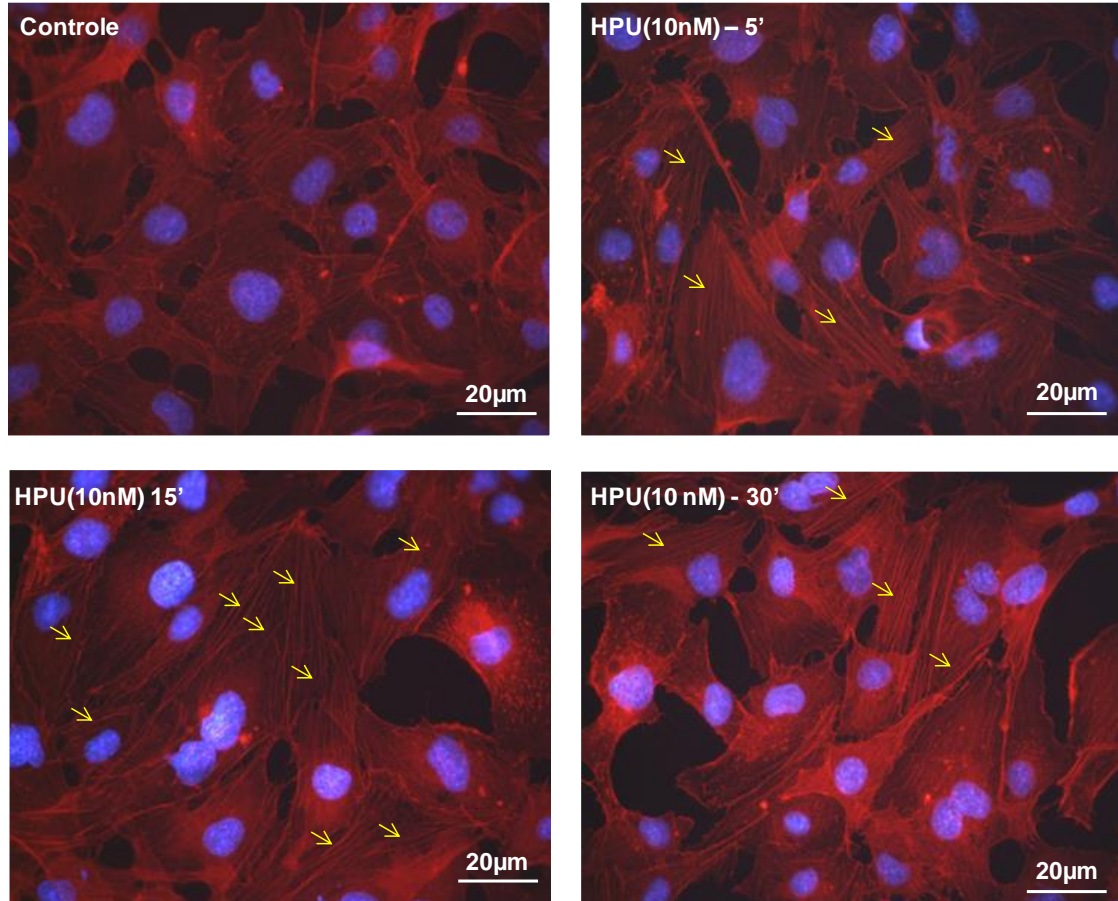


Legenda: As HMEC1 ($1,5 \times 10^3$) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) durante 24 horas. Após este tempo, a viabilidade celular foi determinada por ensaio de MTT. Os resultados são referentes à média e desvio-padrão de três experimentos independentes.

4.2 Efeito da HPU sobre a dinâmica do citoesqueleto de actina de HMEC1

A reorganização do citoesqueleto de actina é um processo fundamental na regulação de importantes processos celulares, incluindo adesão célula-célula e célula- matriz extracelular e migração celular (Wessler e col., 2011). A colonização da bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica induz alterações na barreira epitelial, incluindo o rearranjo do citoesqueleto de actina destas células (Wessler e col., 2008). Schneider e colaboradores (2008) mostraram que a *H. pylori* induz a formação de protusões e fibras de estresse em células epiteliais gástricas *in vitro*. Entretanto a participação dos fatores de virulência da *H. pylori*, como a urease, sobre a reorganização do citoesqueleto de actina não é totalmente compreendida. Inicialmente, investigamos o efeito da HPU sobre o rearranjo do citoesqueleto de actina através do ensaio de citoquímica para analisar a organização de actina filamentosa (F-actina) nas HMEC1. Podemos observar que a incubação das HMEC1 com a HPU (10 nM) induziu o aumento das fibras de stress e sua redistribuição no citoplasma, assim como diminuiu a presença actina cortical nos tempos de 5 e 15 minutos. Observamos também um fenótipo transitório no tempo de 30 minutos, com células que apresentavam F-actina cortical e ainda algumas células com fibras de estresse no citoplasma (figura 7).

Figura 7 - A HPU induz alterações na dinâmica do citoesqueleto de actina de HMEC1

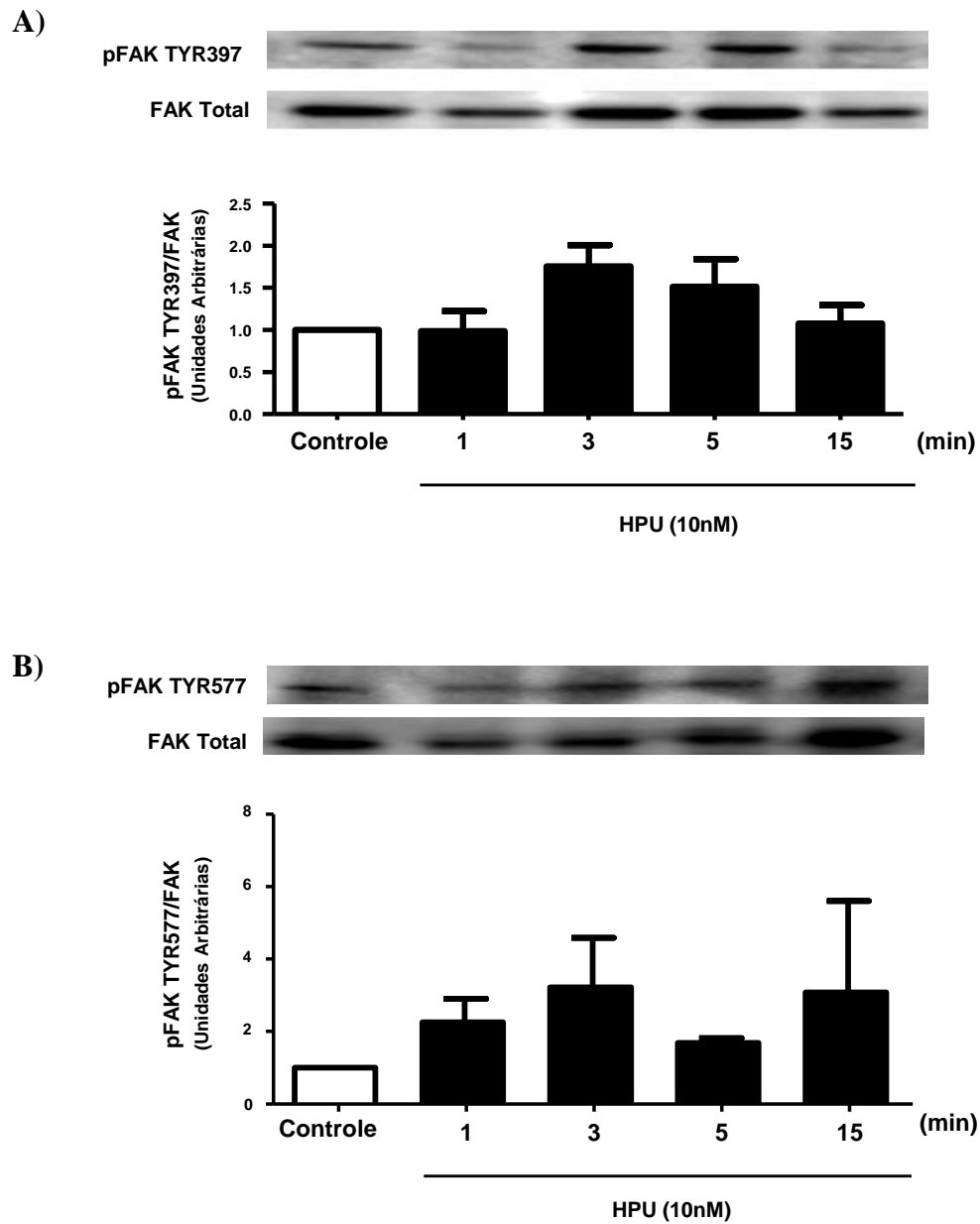


Legenda: As HMEC1 (5×10^4) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 5, 15 e 30 minutos. As células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 600 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

4.3 Efeito da HPU sobre a fosforilação da FAK em HMEC1

Uma vez que a HPU foi capaz de modificar a dinâmica do citoesqueleto de actina, a FAK tornou-se uma interessante candidata a ser investigada uma vez que sua ativação depende de integrinas, podendo promover a reorganização dos filamentos de actina, reforçando a ligação com a MEC e formando os pontos de adesões focais (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010). Assim, analisamos através de *western blotting*, a fosforilação da FAK nos resíduos Tyr397 e 577. Para tanto, as HMEC1 foram incubadas na presença ou ausência da HPU (10nM) por diferentes intervalos de tempo (1, 3, 5 e 15 minutos). Observamos que a HPU induziu uma tendência ao aumento da fosforilação da FAK (Tyr 397) nas CEs que culmina 3 a 5 minutos após a adição de HPU (figura 8, painel A). A auto-fosforilação no resíduo Tyr 397 da FAK cria sítios de alta afinidade para o recrutamento e ligação de outras proteínas, incluindo a proteína Src. Uma vez associada à FAK a Src induz sua fosforilação no resíduo Tyr 577, aumentando sua atividade catalítica (Calalb, e col., 2005). Em nosso estudo observamos que a HPU (10 nM) também foi capaz de induzir uma tendência ao aumento, nas células endoteliais, da fosforilação da FAK em Tyr 577 no tempo de 3 minutos (figura 8, painel B).

Figura 8 - A HPU induz a ativação de FAK

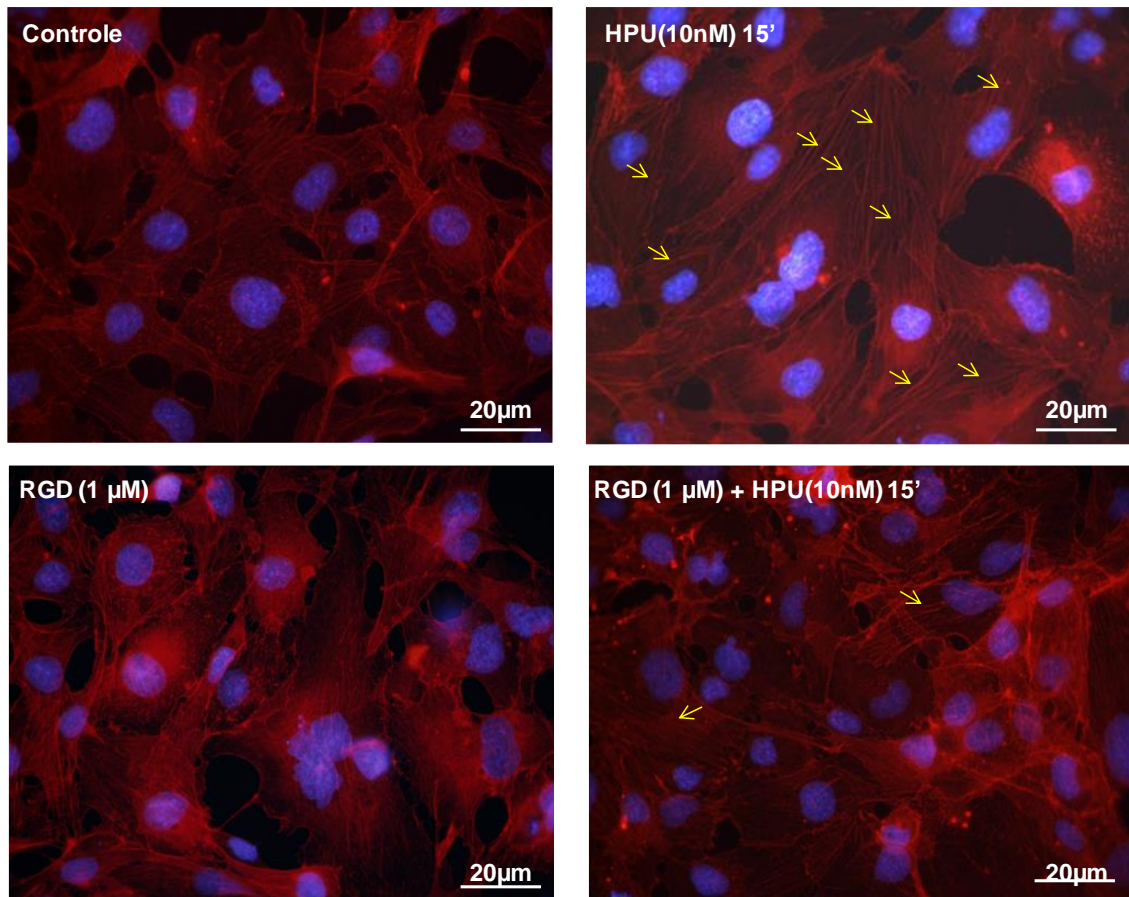


Legenda: As HMEC1 (5×10^5) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 1, 3, 5 e 15 minutos e a fosforilação da **(A)** FAK (Tyr 397) e **(B)** FAK (Tyr 577) foram avaliadas por *imunoblotting*. As imagens foram analisadas pelo programa Image Lab 4.0. As imagens são representativas e os gráficos representam a média \pm D.P. de pelo menos 3 experimentos independentes. $P < 0,05$.

4.4 Envolvimento de integrinas no rearranjo do citoesqueleto de actina induzido pela HPU

A FAK tem um envolvimento chave na sinalização mediada por integrinas e também por receptores de fatores de crescimento (Guan, 2010). Para investigar a possível participação de integrinas sobre a organização do citoesqueleto de actina, pré-tratamos as células endoteliais HMEC1 com RGD (1 μ M) , antagonista geral de integrinas. A Figura 9 mostra que o RGD inibiu parcialmente a reorganização do citoesqueleto de actina induzida pela HPU (10 nM). Podemos observar que no tempo de 15 min, as células endoteliais estimuladas com HPU e pré-tratadas com RGD, apresentaram uma distribuição de actina mais cortical e, em algumas células, as fibras de F- actina condensaram-se mais no citoplasma (figura 9).

Figura 9 - Efeito do RGD sobre a alteração na dinâmica do citoesqueleto de actina em HMEC1 induzida por HPU



Legenda: As HMEC1 (5×10^4) foram pré-tratadas com o RGD ($1 \mu\text{M}$) durante 15 minutos e posteriormente incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 15 minutos. As células foram fixadas e marcadas com faloidina conjugada a rodamina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 60 vezes. As imagens são representativas de 3 experimentos independentes.

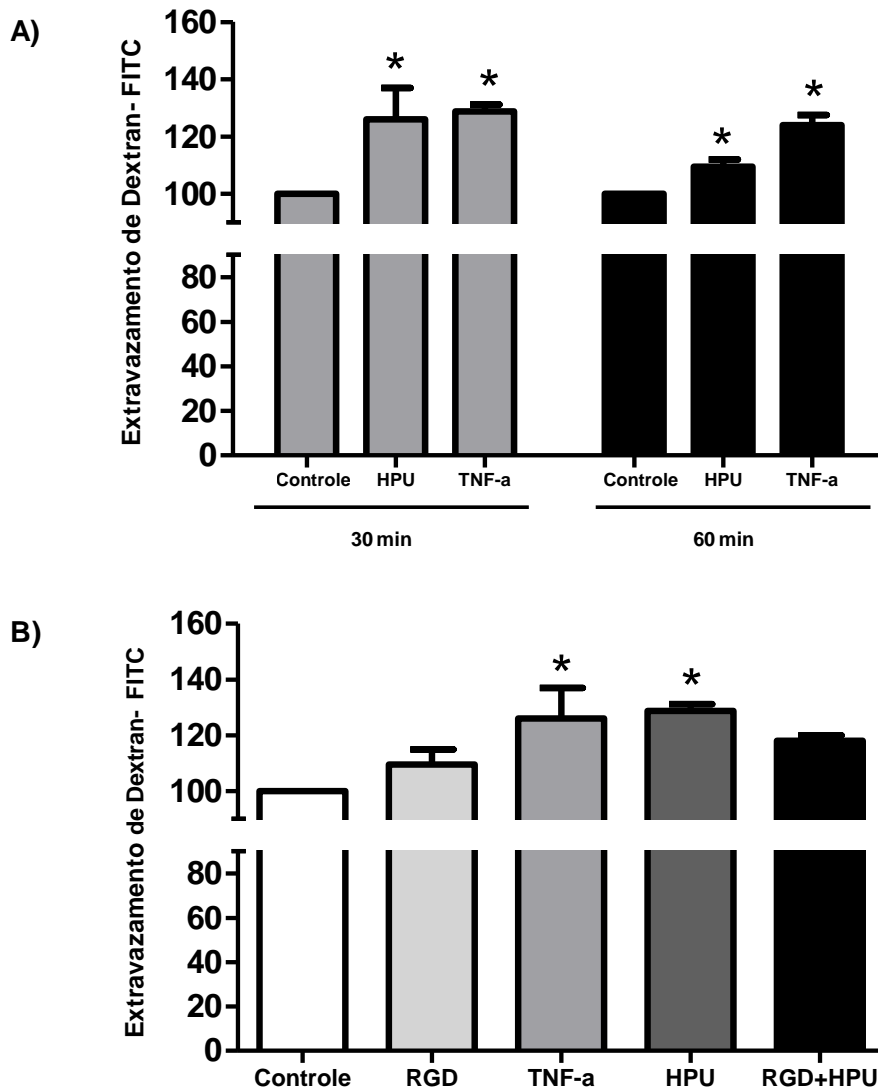
4.5 Envolvimento de integrinas no aumento da permeabilidade paracelular endotelial induzida pela HPU

A FAK medeia vias de sinalização que estão envolvidas com adesão, crescimento, proliferação, sobrevivência, e migração celular. Trabalhos anteriores mostraram que a FAK também apresenta um papel importante na modulação da permeabilidade vascular (Lee e col., 2010; Chen e col., 2012).

Avaliamos o efeito da HPU sobre a permeabilidade das HMEC1 através dos ensaios de extravasamento de Dextran-FITC e também alterações na resistência elétrica transendotelial. A figura 10 (painel A) mostra que a HPU (10 nM) induziu o aumento da permeabilidade nos tempos de 30 e 60 minutos, tendo efeito similar ao controle positivo TNF- α (25ng/mL) no tempo de 30 min, e efeito superior ao do TNF- α no tempo de 60 min. O tratamento com HPU induziu a tendência de redução na resistência elétrica transendotelial nas HMEC1, levando a um aumento de passagem de corrente elétrica pela monocamada de células, confirmando assim seu efeito em aumentar a permeabilidade endotelial (figura 11).

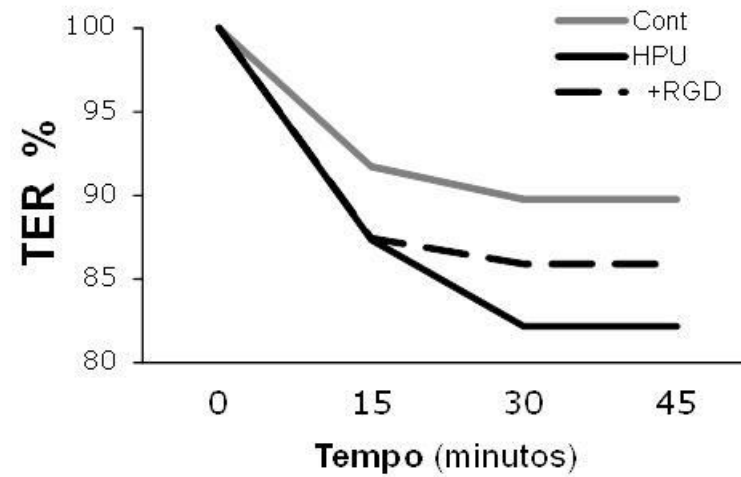
Para avaliar o envolvimento de integrinas no efeito da HPU sobre a permeabilidade celular, as HMEC1 foram pré-tratadas com RGD. Houve uma tendência a diminuição da permeabilidade (figura 10 painel B) e da resistência elétrica (figura 11) induzida pela HPU após 30 minutos.

Figura 10 - A HPU induz aumento da permeabilidade ao Dextran em culturas de HMEC1



Legenda: As HMEC1 (5×10^4) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) ou TNF-alfa (25ng/mL) na presença de Dextran FITC (1mg/mL) (**A**) durante 30 e 60 minutos. (**B**) As células foram pré-tratadas com o RGD (1 μ M) durante 15 minutos e posteriormente foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) ou TNF-alfa (25ng/mL) na presença de Dextran FITC durante 30 minutos. Posteriormente foi retirada a solução de Dextran FITC que extravasou para o interior da placa através da monocamada. A quantidade de fluorescência emitida pelo Dextran FITC foi monitorada pela excitação e emissão de ondas entre 485/530 nm em leitor de microplacas (En Vision - Perkin Elmer). Os gráficos representam a média \pm D.P. de 2 a 3 experimentos independentes. * $P < 0,05$ vs HMEC1 não tratadas; # $P < 0,05$ vs HMEC1 tratadas com a HPU.

Figura 11 - A HPU diminui a resistência transendotelial em HMEC1



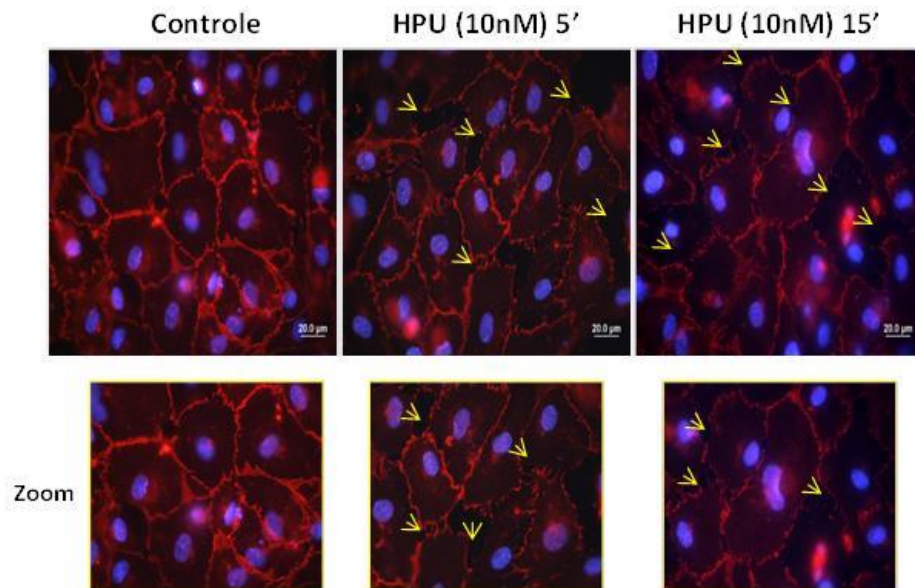
Legenda: As HMEC1 (5×10^4) foram pré-tratadas com o RGD ($1 \mu\text{M}$) durante 15 minutos e posteriormente foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM). A resistência elétrica transendotelial foi medida com o auxílio do instrumento Millicell-ERS. O gráfico representa um experimento.

4.6 Efeitos da HPU sobre a dispersão e fosforilação de VE-caderina em HMEC1

A permeabilidade celular é regulada por alterações nas proteínas de adesão que mantêm o contato célula-célula. No endotélio este contato intercélulas é mediado por um membro específico da família das caderinas, a VE-caderina (Dejana e col., 2009; Oda e Takeichi, 2011). O rompimento destas junções aderentes leva ao aumento da permeabilidade. Tendo em vista que a HPU foi capaz de induzir o aumento da permeabilidade, resolvemos avaliar a expressão de VE-caderina em HUVEC por imunocitoquímica. Na Figura 12, observa-se que o tratamento com HPU (10 nM) induziu uma maior dispersão da VE-caderina nas células HUVEC, levando a um aumento de perda de contato entre as células (Fig. 12: setas amarelas), nos tempos de 5 e 15 minutos após o tratamento.

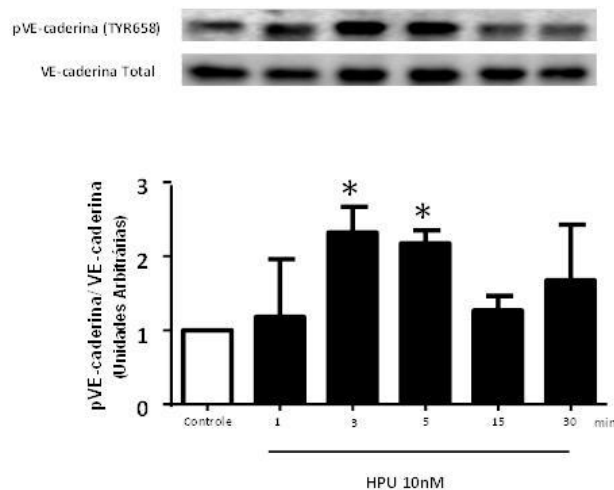
A fosforilação da VE-caderina e das cateninas desencadeia o rompimento das junções aderentes e diminuição do contato célula-célula (Dejana e col., 2009). Portanto, a seguir avaliamos a fosforilação da VE-caderina no resíduo Tyr 658, já que durante o rompimento da barreira endotelial pode ocorrer a fosforilação deste resíduo. As células HMEC1 foram incubadas na presença ou ausência da HPU (10 nM) por diferentes intervalos de tempo (1, 3, 5, 15 e 30 minutos) e, através de análises por *western Blotting*, observamos que a HPU foi capaz de induzir fortemente a fosforilação da VE-caderina nas células endoteliais, exercendo o maior efeito no tempo de 3 minutos (figura 13).

Figura 12 - Alterações na expressão da VE-caderina em HUVEC tratadas com HPU



Legenda: As HUVEC ou HMEC1 (2×10^5) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 5 e 15 min. As células foram fixadas e marcadas com o anticorpo anti-VE-caderina. As imagens foram capturadas em microscópio invertido em aumento de 600 vezes. As imagens são representativas de 2 experimentos independentes.

Figura 13 - Fosforilação da VE-caderina em HMEC1 tratadas com a HPU

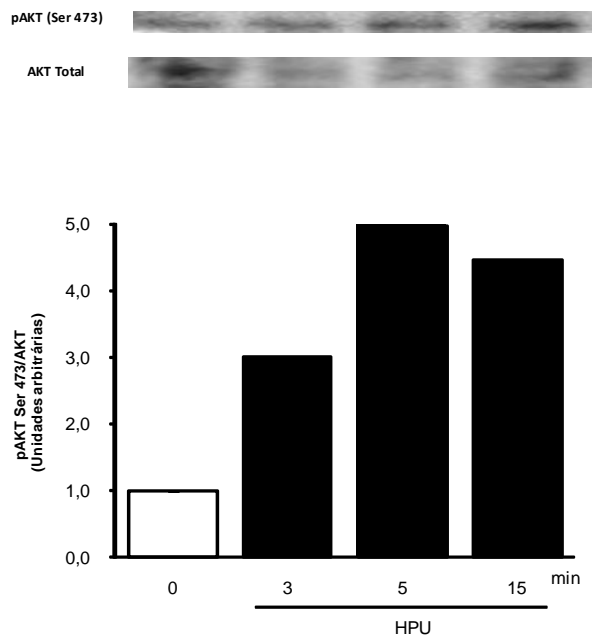


Legenda: **A)** As HMEC1 (5×10^5) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 1, 3, 5, 15 e 30 minutos e a fosforilação da VE-caderina (Tyr 658) foi avaliada por imunoblotting. As imagens foram analisadas pelo programa Image Lab 4.0. As imagens são representativas e os gráficos representam a média \pm D.P. de pelo menos 3 experimentos independentes. $P < 0,05$.

4.7 Efeito da HPU sobre a fosforilação de AKT em HMEC1

A fosforilação de FAK leva à ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, como por exemplo, a via da PI3K/AKT, que está relacionada tanto com a migração e proliferação, como com a sobrevivência celular (Chhabra e col., 2009). Assim, avaliamos nas HMEC1, o efeito da HPU sobre a fosforilação de AKT no resíduo Ser 473 que é um indicador da ativação desta via de sinalização. A figura 14 mostra que a HPU (10 nM) foi capaz de induzir uma tendência ao aumento da fosforilação de AKT nas células endoteliais já em 3 minutos, com o pico de fosforilação ocorrendo em 5 minutos após o tratamento com HPU (figura 14).

Figura 14: O Tratamento com HPU induz a Fosforilação de AKT em HMEC1.



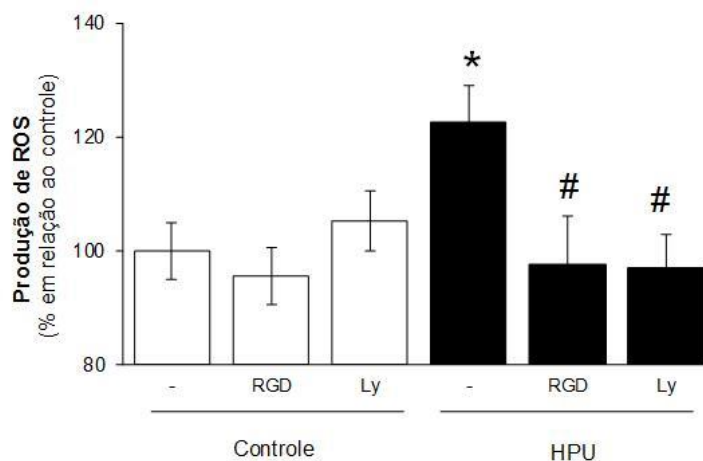
Legenda: As HMEC1 (5×10^5) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) por 3, 5 e 15 minutos e a fosforilação de AKT foi avaliada por imunoblotting. As imagens foram analisadas pelo programa Image Lab 4.0. A imagem e os gráficos são representativos de um experimento típico.

4.8 Envolvimento de integrinas e da via PI3K/AKT sobre a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela HPU

As células endoteliais produzem uma concentração fisiológica de ROS que, em geral, atuam como moléculas sinalizadoras para mediar diversas respostas biológicas (Frei e col., 2009). Nossos dados mostram de forma interessante que a HPU (10 nM) induziu um aumento da produção de ROS intracelular pelas HMEC1 (figura 15), detectado após 10 min de incubação.

Avaliamos se o aumento na produção de ROS induzida pela HPU seria dependente de integrinas e da via PI3K/AKT. Para tanto, pré-tratamos as HMEC1 com o LY294002 (3 μ M), um inibidor da via PI3K/AKT, e com RGD (1 μ M), o pan-inibidor de integrinas. O aumento da produção de ROS induzido pela HPU foi inibido quando as células foram pré-tratadas com LY294002 ou com RGD (figura 15), indicando a dependência da ativação de integrinas e da via PI3K/AKT para a produção de ROS pelas HMEC1.

Figura 15 – Aumento na produção de ROS Intracelular por HMEC1 tratadas com a HPU



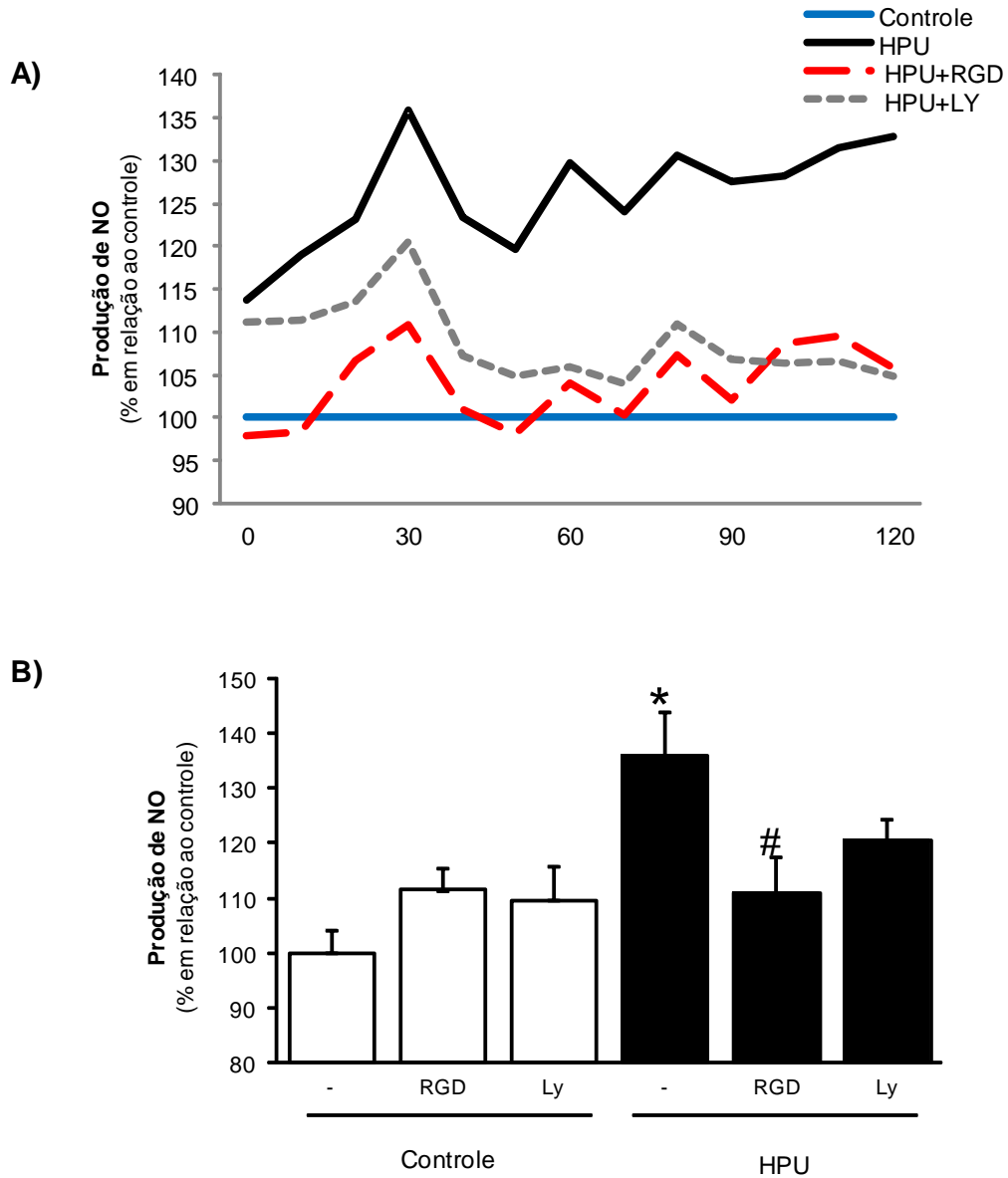
Legenda: As HMEC1 (5×10^5) foram incubadas com a sonda CM-H₂DCFDA (10 mM) por 1 hora. Em seguida, as células foram pré-tratadas com o RGD (1 μ M) ou com o Ly294002 (3 μ M) durante 15 minutos e posteriormente incubadas ou com HPU (10 nM). A fluorescência gerada pelo DCF foi monitorada após 10 minutos de incubação pela excitação e emissão de ondas entre 485/530 nm. Os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. P<0,05 vs HMEC1 não tratadas; # P<0,05 vs HMEC1 tratadas com a HPU.

4.9 Envolvimento de integrinas e da via PI3K/AKT no aumento da produção de óxido nítrico induzida pela HPU

O NO atua como mensageiro em diferentes vias inflamatórias e contribui nos mecanismos de defesa contra microrganismos (Fu e col., 1999). Gobert e colaboradores (2002) mostraram que urease de *H. pylori* induz em macrófagos a expressão de iNOS e a produção de NO. Avaliamos o efeito da HPU (10 nM) sobre a produção de NO pelas células endoteliais através do ensaio de oxidação da sonda intracelular DCF-FMDA. Na figura 16, painel A, observamos que a HPU induziu um aumento na produção de NO pelas HMEC1, sendo observados ao menos 3 pulsos na produção de NO ao longo dos 120 min de análise.

Tem sido reportado que a sinalização da via PI3K/AKT é capaz de regular a produção de NO, via ativação de eNOS (Dimmeler e col., 1999). A fim de confirmar o envolvimento da via PI3K/AKT e de integrinas nesse efeito da HPU, pré-tratamos as HMEC1 com LY294002 (3 μ M) ou com RGD (1 μ M). O RGD inibiu a produção de NO em todos os tempos analisados. O LY294002, por outro lado inibiu apenas parcialmente a produção de NO até 30 min (figura 16, painel B), bloqueando parcialmente os outros picos de produção a partir deste tempo figura 16, painel A.

Figura 16 – A produção de NO por HMEC1 tratadas com HPU



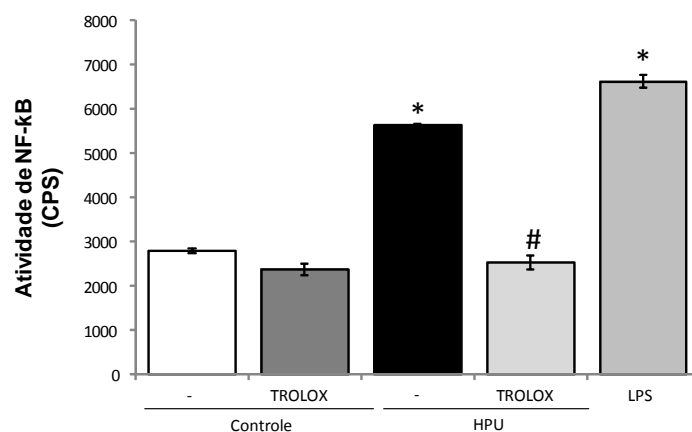
Legenda: As HMEC1 (5×10^5) foram incubadas com a sonda DCF-FMDA (10 mM) por 1 hora. Em seguida as células foram pré-tratadas com RGD (1 μ M) ou LY294002 (3 μ M) durante 15 minutos e posteriormente foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM). A fluorescência gerada foi monitorada (A) ao longo de 120 min (B) ou analisada no tempo 30 minutos de incubação. Os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. $P < 0,05$ vs HMEC1 não tratadas; # $P < 0,05$ vs HMEC1 tratadas com a HPU.

4.10 Envolvimento de integrinas e da modulação redox-sensível na ativação de NF- κ B induzida pela HPU em HMEC1

Beswick e colaboradores (2006) mostraram que a Ure-B da *H. pylori* ativou o NF- κ B em células epiteliais gástricas. Em nosso trabalho, avaliamos o efeito da HPU sobre a ativação dessa via em HMEC1, através do uso de um gene *reporter* para NF- κ B, determinado através da atividade da luciferase. A Figura 17 mostra que a HPU (10 nM) induziu a ativação do NF- κ B, após 3 horas de tratamento.

Dentre as vias de sinalização redox-sensíveis e envolvidas com a sobrevivência e proliferação celular, destaca-se a do NF- κ B (Poser e Bosserhoff, 2004, Nakano e col., 2004). Uma vez que a HPU induziu aumento da produção de ROS, avaliamos o envolvimento da produção de ROS na ativação de NF- κ B. As HMEC1 foram pré-tratadas com o antioxidante Trolox (100 μ M) ou com RGD (1 μ M) e posteriormente incubadas com a HPU. Observamos que a atividade de NF- κ B induzida pela HPU foi inibida quando as células foram pré-tratadas com o antioxidante Trolox e o efeito foi parcialmente inibido pelo pré-tratamento com o RGD (figura 17).

Figura 17 - A ativação do NF- κ B induzida pela HPU é redox-sensível e dependente de integrinas.



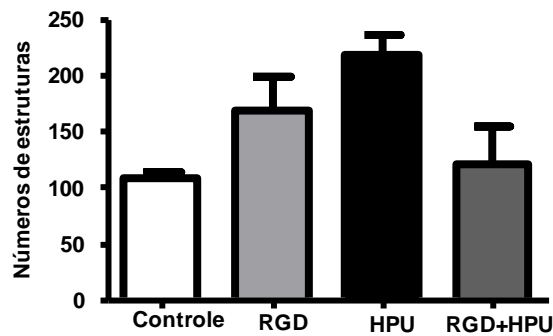
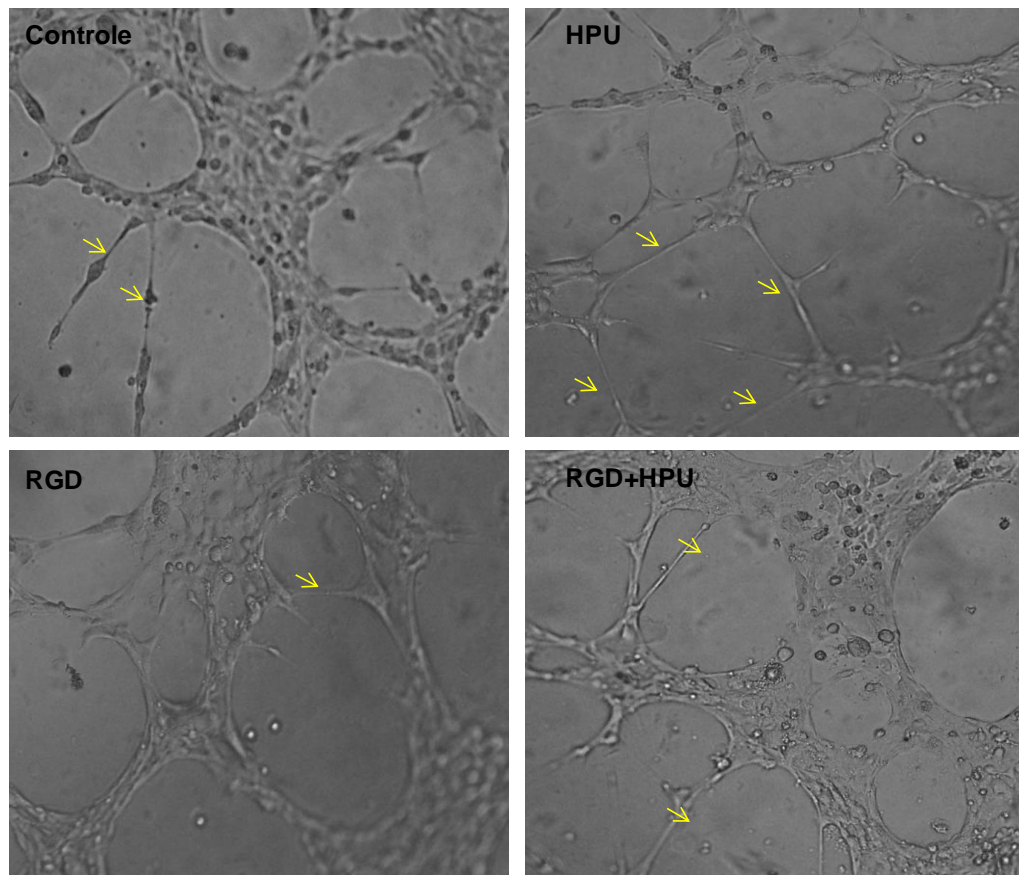
Legenda: As HMEC1 (5×10^5), foram transfectadas com gene *reporter* do NF- κ B, responsivo a ativação do NF- κ B (NF- κ B pMetLuc 2). Após 24 horas as células foram pré-tratadas com RGD (1 μ M) ou trolox (100 μ M) e posteriormente tratadas ou não com a HPU (10nM). A atividade de luciferase foi mensurada através do sobrenadante das culturas após 3h de tratamento. Os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. *P<0,05 vs HMEC1 não tratadas; # P<0,05 vs HMEC1 tratadas com a HPU

4.11 HPU induz tubulogênese em HMEC1: Envolvimento de integrinas

A ativação de FAK mediada por integrinas regula a migração de células endoteliais, sugerindo uma participação importante dessa quinase na angiogênese. Já tem vários trabalhos que mostram o papel de FAK direto na diferenciação e sobre o VEGF (Polte e col. 1995, Shi e col., 2003). Estudos mostram que a HPU exerce um efeito pró-inflamatório e este processo está fortemente associado ao desenvolvimento do câncer gástrico (Ding e Zheng, 2012, Uberti e col., 2013). Com base nesses dados investigamos se a HPU, que mostrou ser uma potente ativadora de células endoteliais, poderia contribuir como um fator angiogênico relacionado a *H. pylori*. Para tanto, as HMEC1 foram incubadas com HPU (10 nM) para a realização do ensaio de tubulogênese em matrigel. Observamos que a HPU (10 nM) induziu uma tendência ao aumento do número das estruturas tubulares feitas pelas HMEC1, quando comparadas com o controle, onde as células tendem a se organizar, com maior frequência, em monocamadas (figura 18).

A fim de confirmar o envolvimento de integrinas neste processo, as células foram pré-tratadas com RGD (1 μ M). Na figura 18 observamos uma tendência à diminuição da formação das estruturas tubulares induzidas pelo HPU quando estas células foram pré-tratadas com o RGD, sugerindo o envolvimento de integrinas neste processo.

Figura 18: A HPU induz tubulogênese em HMEC1: Envolvimento de integrinas.



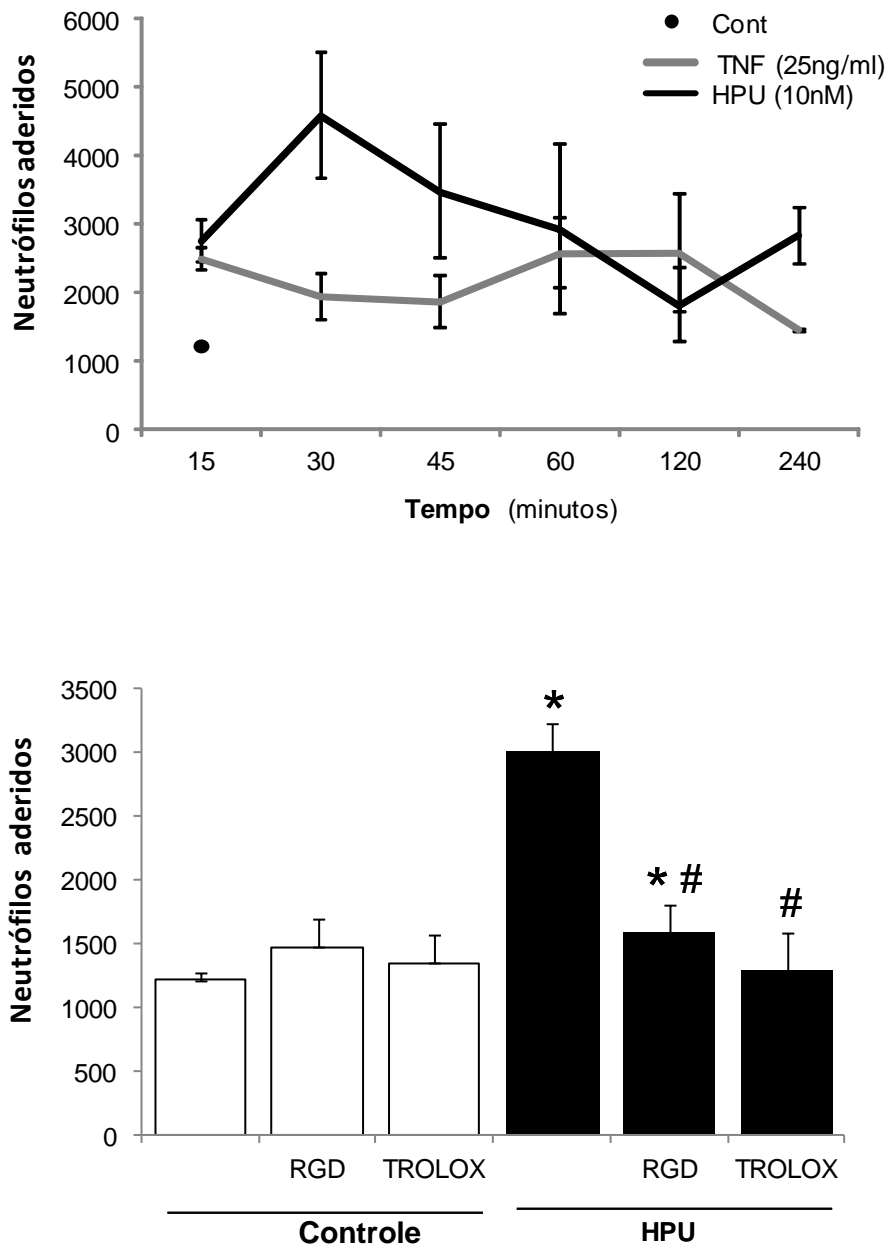
Legenda: As HMEC1 foram plaqueadas (3×10^4 células/poço) sobre o Matrigel, pré-tratadas com RGD ($1 \mu\text{M}$) durante 15 min e incubadas na presença de HPU (10nM) por 6 horas. O número de estruturas tubulares formadas pelas células endoteliais foi quantificado avaliando o poço inteiro em um aumento de 10x. A imagem é representativa e os gráficos representam a média \pm D.P. de 2 experimentos independentes.

4.12 O Envolvimento de integrinas e da modulação redox sobre a adesão de neutrófilos a monocamada endotelial

A *H. pylori* ativa as células endoteliais aumentando a expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina, induzindo assim o aumento da adesão de neutrófilos às mesmas (Byrne e col., 2002; Innocenti e col., 2002). Ainda, a produção de ROS modula a expressão de moléculas de adesão (refer). Por este motivo avaliamos uma possível indução da adesão de neutrófilos à monocamada endotelial tratada com HPU seria dependente de mecanismos redox-sensíveis e também de integrinas, de acordo com o racional de nosso trabalho. Em nosso estudo avaliamos o efeito da HPU sobre a adesão de neutrófilos à HMEC1. A Figura 19A mostra um aumento da adesão dos neutrófilos humanos às HMEC1 ativadas pela HPU (10 nM) em diferentes tempos, observando-se um maior efeito após 15 min de tratamento.

A Figura 19B mostra que quando as HMEC1 foram pré-tratadas com RGD (1 μ M) ou com Trolox (100 μ M) durante 15 min, ocorreu uma inibição da adesão de neutrófilos induzida pela HPU.

Figura 19 - A HPU aumenta adesão de neutrófilos à HMEC1: Inibição pelo RGD ou Trolox



Legenda: As HMEC1 (3×10^4) foram incubadas na presença ou na ausência da HPU (10 nM) (A) por 15-240 minutos. (B) as células foram pré-tratadas com RGD (1 μ M) ou trolox (100 μ M) durante 15 min posteriormente tratadas ou não com a HPU (10nM) durante 30 min. Posteriormente os neutrófilos (1×10^5) foram colocados para aderir sobre as células endoteliais durante 30 min. A quantidade de fluorescência gerada pelo CMFDA dos neutrófilos que permaneceram aderidos às CEs foi monitorada em diferentes tempos Os gráficos representam a média \pm D.P. de 3 experimentos independentes. $P < 0,05$ vs HMEC1 não tratadas; # $P < 0,05$ vs HMEC1 tratadas com a HPU.

5 DISCUSSÃO

A bactéria *H. pylori* é reconhecida como um agente patológico da gastrite crônica, úlceras pepticas, câncer gástrico duodenal e linfomas (Hopkins e col., 1996; Fischbach e col., 2005). Esta bactéria apresenta diversos fatores de virulência, incluindo a urease, que contribui na colonização do epitélio gástrico. Inicialmente os trabalhos da literatura mostraram que a urease tinha o papel de neutralizar o meio ácido, permitindo a sobrevivência desta bactéria no estômago (Andrutis e col., 1995). Contudo, trabalhos recentes mostraram que esta enzima pode interferir em diferentes funções de vários tipos celulares, incluindo células epiteliais gástricas e células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos (Wroblewski e col., 2009; Uberti e col., 2013; Gobert e col., 2002). Já foi descrito que a *H. pylori* é capaz de ativar células endoteliais (Inocenti e col., 2002), no entanto nenhum estudo mostrou como a urease produzida pela bactéria poderia contribuir para a ativação do endotélio. Investigamos, portanto o efeito da HPU sobre células endoteliais *in vitro*.

Os primeiros estudos que investigaram as alterações morfológicas e o rearranjo do citoesqueleto de actina induzidas pela *H. pylori* em células epiteliais gástricas se mostraram controversos (Dytoc e col., 1993; Ismaili e col., 1996). Posteriormente, Palovuori e colaboradores (2000) mostraram que a *H. pylori* induziu alterações no citoesqueleto de actina em células de adenocarcinoma gástrico. Além disso, a colonização da bactéria *H. pylori* na mucosa gástrica induziu alterações na barreira epitelial, incluindo o rearranjo do citoesqueleto de actina destas células (Wessler e col., 2008). Neste trabalho mostramos que a HPU é capaz de induzir alterações no citoesqueleto de actina de células endoteliais, reorganizando a distribuição da F-actina, diminuindo sua localização cortical e levando a um aumento na formação de fibras de stress que se redistribuem ao longo da célula, formando, aparentemente, mais pontos de adesão focal.

Nas últimas décadas houve um progresso notável na compreensão da patogenia associada aos fatores de virulência da *H. pylori*, assim como na compreensão da interação desses fatores com células epiteliais gástricas. Estes fatores de virulência podem ser secretados, associados à membrana ou translocados para o citosol de células hospedeiras, onde podem interferir diretamente nas funções dessas células. A *H. pylori* é capaz de regular diferentes cascatas de sinalização, incluindo vias reguladas por integrinas (Posselt e col., 2013). As integrinas desencadeiam a ativação da FAK estimulando a sua auto-fosforilação no resíduo TRY 397, criando sítios de alta afinidade para o recrutamento e ligação de outras

proteínas são capazes de induzir sua fosforilação no resíduo TYR 577, promovendo sua atividade catalítica máxima (Calalb, e col., 1995; Mitra, e col., 2005). A ativação de integrinas e a posterior ativação de FAK promovem a reorganização dos filamentos de actina, formam os pontos de adesões focais e reforçam a ligação com a matriz extracelular (Hynes, 2002; Bolós e col., 2010). Corroborando esta premissa, observamos que a HPU induz fosforilação da FAK em Tyr397 e Tyr577 nas HMEC1, sugerindo fortemente a ativação de vias de sinalização associadas à integrinas (Lim e col., 2008). O envolvimento da ativação de integrinas nos efeitos da HPU sobre o citoesqueleto de actina foi então confirmado ao mostrarmos que o RGD, um antagonista de integrinas, diminui a formação de fibras de stress em células endoteliais tratadas com HPU.

Tem sido mostrado que fatores de virulência da *H. pylori* são capazes de interagir com a integrinas, o que pode levar a ativação de diferentes vias de sinalização. Em vários estudos *in vitro*, a interação dos componentes estruturais do sistema de secreção tipo IV (TSS4) com a β 1-integrina provou ser essencial para a translocação do CagA, um fator de virulência que está envolvido com diversas alterações celulares, incluindo a ruptura de junções celulares, polarização e proliferação celulares, e na inflamação (Jiménez-Soto e col., 2009; 2007; Backert e col., 2010). Trabalhos também mostram que ligação de CagL, componente do TSS4, à integrina- β 1 leva à ativação desta integrina e, subsequentemente, à ativação de várias quinases, incluindo a FAK, Src, EGFR e HER3 (receptor de heregulina 3) / ErbB3 (Tegtmeyer, e col., 2010 Kwok e col., 2007). Além disso, a interação da *H. pylori* com as integrinas pode desencadear alterações da morfologia e migração celular, o que pode contribuir para a ruptura do epitélio gástrico *in vivo* (Schneider e col., 2008). A ruptura das junções intercelulares é uma estratégia usada por diversos microrganismos como uma forma de aderir, colonizar e alterar a sinalização da célula do hospedeiro para sua sobrevivência. As junções oclusivas da mucosa gástrica previnem a penetração de microrganismo nos tecidos mais profundos, entretanto alguns microrganismos atravessam a barreira chegando às junções aderentes. Quando presentes nas junções aderentes, a E-caderina é usada como um receptor de adesão por diferentes microrganismos, permitindo a persistência no hospedeiro e aumento da patogênese (Costa e col., 2013). Demonstramos que a HPU é capaz de induzir o aumento da permeabilidade endotelial e diminuir a resistência transendotelial nas células endoteliais. Estes resultados estão em conformidade com um estudo anterior que mostrou que a subunidade UreB da *H. pylori* induziu a progressiva perda resistência transepitelial em células gástricas (Wroblewski e col., 2009). Esses processos estão estreitamente ligados tanto com alterações nas junções intercelulares, como com processos de adesão focal.

Evidências mostram que FAK é essencial na manutenção das propriedades da barreira endotelial. Como vimos que a HPU foi capaz de induzir a ativação da FAK e que este efeito pode estar relacionado à ativação de integrinas, avaliamos o envolvimento de integrinas sobre a permeabilidade e a resistência transendotelial. Vimos que o tratamento com RGD foi capaz de inibir parcialmente o aumento da permeabilidade celular induzida pela HPU. Corroborando com este dado, observamos também que o RGD foi capaz de aumentar a resistência transendotelial nas células endoteliais.

A permeabilidade vascular é regulada principalmente por alterações nas junções aderentes. A organização das junções aderentes é constituída basicamente pela VE-caderina nas células endoteliais (Dejana e Vestweber, 2013). A VE-caderina promove a adesão endotelial homotípica célula-célula, contribuindo para a manutenção da integridade vascular (Dejana, em Vestweber, 2013). A fosforilação da VE-caderina e das cateninas leva a alterações conformacionais ou até rompimento das junções intercelulares (Esser e col., 1998; Lampugnani e col., 1997; Young e col., 2003). . A HPU induziu nas células endoteliais a fosforilação da VE-caderina, acompanhada de um aumento da perda de contato célula-célula.

A perda de contato célula-célula das células endoteliais e o aumento da permeabilidade dos vasos são alterações importantes que podem contribuir para o processo de angiogênese (Jain, 2005; Casanovas e col., 2005; Dvorak e col., 2002). Mostramos aqui, pela primeira vez na literatura, que a HPU induz a tubulogênese de células endoteliais *in vitro*, sugerindo que a urease poderia ser um fator pró-angiogênico. A formação dos novos vasos inclui adesão, migração, proliferação e diferenciação celular, processos que podem ser regulados pela ativação de FAK dependente de integrinas (Jain, 2003). O envolvimento de integrinas na tubulogênese estimulada pela HPU se confirma ao mostrar que o RGD inibiu esse processo.

Assim, nossos dados mostram que a HPU induz nas células endoteliais a fosforilação da VE-caderina e o rompimento do contato célula-célula levando, conseqüentemente, ao aumento da permeabilidade celular. Através de vias de sinalização associadas à integrinas, induz a fosforilação da FAK e o rearranjo do citoesqueleto de actina, o que permitiria a diferenciação celular para iniciar o processo de formação de novos vasos. Isso poderia indicar a HPU como mais um fator angiogenico da *H. pylori*.

A autofosforilação da FAK ativa diferentes vias de sinalização, incluindo as Rho GTPases, PI3K/AKT, MAPK, Src, fosfatases, e fatores de transcrição (Giancotti e Ruoslatti, 1999; Bolós e col., 2010;). Nossos resultados mostram que a HPU é capaz de ativar uma sinalização *downstream* à FAK, levando ao aumento da fosforilação da AKT em células

endoteliais. Além de seu conhecido papel na migração e sobrevivência celular (Cantley, 2002; Liu e col., 2009), a via PI3K/AKT pode modular a ativação da NADPH oxidase, um complexo fundamental na produção de ROS (Frey e col., 2009). O tratamento com o inibidor desta via de PI3K pode inibir a translocação da subunidade p47^{phox} da NOX2, reduzindo a produção de ROS em monócitos presentes no ventrículo de camundongos (Ren e col., 2008). Portanto, neste trabalho, avaliamos o efeito da HPU sobre a produção de ROS, que em baixas concentrações essas espécies atuam como moléculas sinalizadoras (Frei e col., 2009). Observamos que a HPU induziu a produção de ROS em células endoteliais. Interessantemente, demonstramos que a produção de ROS induzida pela HPU nas células endoteliais é dependente da ativação de integrinas e da via da PI3K/AKT, elucidando melhor os mecanismos moleculares por trás do efeito da HPU em células endoteliais.

Estudos mostram que a produção de ROS, incluindo a produção de H₂O₂ endógeno é importante na sinalização da eNOS (Drummond e col., 2000). Além disso, as alterações na atividade da eNOS podem ser reguladas pela ativação e fosforilação da proteína quinase ativada por AMP e a AKT (Maron e Michel, 2012). Como em nosso trabalho observamos o aumento da produção de ROS e a fosforilação de AKT induzida pela HPU, avaliamos também o efeito da HPU sobre a produção de NO pelas células endoteliais. Nossos dados mostraram que a HPU induziu o aumento da produção de NO de maneira dependente da ativação de integrinas e da via PI3K/AKT. Corroborando estes resultados, Gorbert e colaboradores (2002) mostraram que urease de *H. pylori* foi capaz de induzir a expressão de iNOS e aumento da produção de NO em macrófagos.

As ROS produzidas em excesso contribuem para o dano tecidual e para a instalação, manutenção e amplificação do processo inflamatório (Frei e col., 2009). A produção exacerbada de ROS não apenas pode levar à disfunção endotelial, mas pode também ativar vias de sinalização envolvidas com o aumento de expressão de genes pró-inflamatórios, através da ativação do NF-κB (Schreck e col., 1991). Mostramos que a HPU ativou a via do NF-κB, sendo este efeito dependente da produção de ROS,. Estes dados corroboram estudos prévios de Beswick e colaboradores (2006) em células epiteliais gástricas, mostrando que a UreB induziu a translocação do NF-κB para o núcleo.

A produção de ROS dependente da atividade da NADPH oxidase pode estimular a vias de sinalizações envolvidas na ativação de NF-κB, que por sua vez leva à expressão de moléculas de adesão (como a ICAM-1), amplificando a resposta inflamatória (Al-Mehdi e col., 1998; Frey e col., 2002). Estudos anteriores mostraram que a bactéria *H. pylori* ativa células endoteliais aumentando a expressão de moléculas de adesão, promovendo a adesão de

neutrófilos (Byrne e col., 2002; Innocenti e col., 2002). Mostramos neste trabalho que a HPU pode ser um importante fator de virulência envolvido na patogênese causada pela *H. pylori*, uma vez que vimos que a HPU foi capaz de induzir o aumento da adesão de neutrófilos às células endoteliais. Interessantemente, o tratamento com RGD ou com Trolox inibiu totalmente a adesão dos neutrófilos às células endoteliais tratadas com HPU, evidenciando assim que este efeito é modulado por integrinas e por ROS.

CONCLUSÃO

Em conjunto nossos dados mostram que a HPU é um fator bacteriano capaz de ativar células endoteliais, levando-as para um perfil pró-inflamatório e pró-angiogênico e que esses efeitos são modulados pela ativação de vias de sinalização associadas à integrinas e pela modulação redox. Como conclusão, sugerimos que a HPU seria um importante fator patogênico, que vai além de sua atividade ureasica, em doenças relacionadas à *H pylori*.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N.J.; FRIEDMAN, A. Overview and introduction: the blood–brain barrier in health and disease. *Epilepsia*, v. 53, n. s6, p. 1-6, Nov 2012.

ABID, M.R. e col. NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 48, p. 35373-35385, Nov 2007.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 350, n. 1, p. 103-108, Feb 1996.

ALEXANDER, J.S. e col. Reciprocal regulation of endothelial substrate adhesion and barrier function. *Microcirculation*, v. 8, n. 6, p. 389-401, Dec 2001.

AL-MEHDI, A.B. e col. Endothelial NADPH oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K⁺. *Circulation Research*, v. 83, n. 7, p. 730-737, Oct 1998.

ARRIETA, M. C.; BISTRITZ, L.; MEDDINGS, J. B. Alterations in intestinal permeability. *Gut*, v. 55, n. 10, p. 1512-1520, Oct 2006.

ASAHARA, T. e col. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, v. 275, n. 5302, p. 964-966, Feb 1997.

AZZI, S.; HEBDA, J.K.; GAVARD, J. Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in oncology*, v. 3, Aug 2013.

BACKERT, S. e col. Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*, v. 9, n. 1, p. 28, Nov 2011.

BACKERT, S.; TEGTMEYER, N.; SELBACH, M. The versatility of *Helicobacter pylori* CagA effector protein functions: The master key hypothesis. *Helicobacter*, v. 15, n. 3, p. 163-176, Jun 2010.

BAKER, K. A.; HAGG, T. Developmental and injury-induced expression of $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 6\beta 1$ integrins in the rat spinal cord. *Brain research*, v. 1130, p. 54-66, Jan 2007.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARAES, J.A.; CARLINI, C.R. Canatoxin, a Plant Protein, Induces Insulin Release from Isolated Pancreatic Islets*. *Endocrinology*, v. 128, n. 2, p. 675-679, Feb 1991.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARAES, J.A.; CARLINI, C.R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seeds. *Toxicon*, v. 29, n. 4, p. 453-459, 1991a.

- BARJA-FIDALGO, C. e col. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. *Inflammation*, v. 16, n. 1, p. 1-12, Feb 1992b.
- BAZZONI, G.; DEJANA, E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews*, v. 84, n. 3, p. 869-901, Jul 2004.
- BENJAMIN, C.; CARLINI, C.; BARJA-FIDALGO, C. Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon*, v. 30, n. 8, p. 879-885, Aug 1992.
- BESWICK, E.J. e col. The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF- κ B activation and interleukin-8 production. *Infection and immunity*, v. 74, n. 2, p. 1148-1155, Feb 2006.
- BLANCHETOT, C.; BOONSTRA, J. The ROS-NOX connection in cancer and angiogenesis. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, v. 18, n. 1, 2008.
- BLASER, M.J.; BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *Journal of clinical investigation*, v. 107, n. 7, p. 767-773, Apr 2001.
- BOLÓS, V. e col. The dual kinase complex FAK-Src as a promising therapeutic target in cancer. *OncoTargets and therapy*, v. 3, p. 83, Jun 2010.
- BOUEIZ, A.; HASSOUN, P.M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. *Microvascular research*, v. 77, n. 1, p. 26-34, Jan 2009.
- BREIER, G. e col. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*, v. 87, n. 2, p. 630-641, Jan 1996.
- BURRIDGE, K.; SASTRY, S.K.; SALLEE, J.L. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases I. *Cell-matrix adhesion. Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15593-15596, Jun 2006.
- BURRIDGE, K.; WITTCHEN, E. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *The Journal of cell biology*, v. 200, n. 1, p. 9-19, Jan 2013.
- BUTCHER, E. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, v. 67, n. 6, p. 1033-1036, Dec 1991.
- BYRNE, M.F. e col. Stimulation of adhesion molecule expression by *Helicobacter pylori* and increased neutrophil adhesion to human umbilical vein endothelial cells. *FEBS letters*, v. 532, n. 3, p. 411-414, Dec 2002.
- CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual review of biochemistry*, v. 58, n. 1, p. 79-110, 1989.
- CALALB, M.B.; POLTE, T.R.; HANKS, S.K. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and cellular biology*, v. 15, n. 2, p. 954-963, Feb 1995.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, v. 296, n. 5573, p. 1655-1657, May 2002.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J. M. C. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *British journal of pharmacology*, v. 84, n. 2, p. 551-560, Feb 1985.

CARLINI, C.R. e col. Central Nervous Effects of the Convulsant Protein Canatoxin*. *Acta pharmacologica et toxicologica*, v. 54, n. 3, p. 161-166, Mar 1984.

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, n. 5, p. 667-675, 1981.

CASANOVAS, O. e col. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer cell*, v. 8, n. 4, p. 299-309, Oct 2005.

CHEN, X.L. e col. VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK. *Developmental cell*, v. 22, n. 1, p. 146-157, Jan 2012.

CHEUNG, L.Y.; ASHLEY, S.W. Gastric blood flow and mucosal defense mechanisms. Clinical and investigative medicine. *Medecine clinique et experimentale*, v. 10, n. 3, p. 201-208, May 1987.

CHHABRA, A.; VERMA, A.; MEHTA, K. Tissue transglutaminase promotes or suppresses tumors depending on cell context. *Anticancer research*, v. 29, n. 6, p. 1909-1919, Jun 2009.

CHIARUGI, P.; TADDEI, M.L.; RAMPONI, G. Oxidation and tyrosine phosphorylation: synergistic or antagonistic cues in protein tyrosine phosphatases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, v. 62, n. 9, p. 931-936, May 2005.

CINES, D.B. e col. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*, v. 91, n. 10, p. 3527-3561, May 1998.

COLAVITTI, R. e col. Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 5, p. 3101-3108, Feb 2002.

COLLETT, G.D.M.; CANFIELD, A.E. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circulation research*, v. 96, n. 9, p. 930-938, May 2005.

COOK-MILLS, J.M.; DEEM, T.L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of leukocyte biology*, v. 77, n. 4, p. 487-495, Apr 2005.

COSTA, A.M. e col. Adherens junctions as targets of microorganisms: a focus on *Helicobacter pylori*. *FEBS letters*, v. 587, n. 3, p. 259-265, Jan 2013.

COVER, T.L.; BLANKE, S.R. Helicobacter pylori VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 4, p. 320-332, Apr 2005.

COVER, T.L. e col. Induction of gastric epithelial cell apoptosis by Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin. *Cancer research*, v. 63, n. 5, p. 951-957, Mar 2003.

CLEMENT, J.F.; MELOCHE, S.; SERVANT, M.J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell research*, v. 18, n. 9, p. 889-899, Sep 2008.

CLYNE, M.; DOLAN, B.; REEVES, E.P. Bacterial factors that mediate colonization of the stomach and virulence of Helicobacter pylori. *FEMS microbiology letters*, v. 268, n. 2, p. 135-143, Mar 2007.

D'ELIOS, M.M. e col. The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 50, n. 2, p. 157-164, Jul 2007.

DEJANA, E. e col. Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees. *Cell and tissue research*, v. 335, n. 1, p. 17-25, Jan 2004.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B.M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Developmental cell*, v. 16, n. 2, p. 209-221, Feb 2009.

DEJANA, E.; VESTWEBER, D. The role of VE-cadherin in vascular morphogenesis and permeability control. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci*, v. 116, p. 119-144, Mar 2013.

DJONOV, V. e col. Intussusceptive angiogenesis its role in embryonic vascular network formation. *Circulation Research*, v. 86, n. 3, p. 286-292, Feb 2000.

DIMMELER, S. e col. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, v. 399, n. 6736, p. 601-605, Jun 1999.

DING, S.Z; ZHENG, P.Y. Helicobacter pylori infection induced gastric cancer; advance in gastric stem cell research and the remaining challenges. *Gut Pathog*, v. 4, n. 1, p. 18, Dec 2012.

DIXON, N.E. e col. Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, v. 97, n. 14, p. 4131-4133, Jul 1975.

DRUMMOND, G.R. e col. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circulation Research*, v. 86, n. 3, p. 347-354, Feb 2000.

DUBREUIL, J.D.; DEL GIUDICE, G.; RAPPUOLI, R. Helicobacter pylori interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 4, p. 617-629, Dec 2002.

DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology*, v. 20, n. 21, p. 4368-4380, Nov2002.

DYTOC, M. e col. Comparison of *Helicobacter pylori* and attaching-effacing *Escherichia coli* adhesion to eukaryotic cells. *Infection and immunity*, v. 61, n. 2, p. 448-456, Feb 1993.

EMMETT, M.S.; DEWING, D.; PRITCHARD-JONES, R.O. Angiogenesis and melanoma-from basic science to clinical trials. *American journal of cancer research*, v. 1, n. 7, p. 852, Aug 2011.

ESSER, S. e col. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science*, v. 111, n. 13, p. 1853-1865, Jul 1998.

FAGIANI, E.; CHRISTOFORI, G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters*, v. 328, n. 1, p. 18-26, Jan 2013.

FAN, J.; FREY, R.S.; MALIK, A.B. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *Journal of Clinical Investigation*, v. 112, n. 8, p. 1234, Oct 2003.

FIEDLER, U.; AUGUSTIN, H.G. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology*, v. 27, n. 12, p. 552-558, Dec 2006.

FIEDLER, U. e col. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- α and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine*, v. 12, n. 2, p. 235-239, Feb 2006.

FISCHBACH, W.; CHAN, A.O.; WONG, B.C.. *Helicobacter pylori* and gastric malignancy. *Helicobacter*, v. 10, n. s1, p. 34-39, Sep 2005.

FOLKMAN, J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *Apmis*, v. 112, n. 7-8, p. 496-507, Jul 2004.

FOLLMER, C. e col. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5. 1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J*, v. 360, p. 217-224, Nov 2001.

FOLLMER, C. e col. Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases. *European Journal of Biochemistry*, v. 271, n. 7, p. 1357-1363, Apr 2004.

FOLLMER, C.; WASSERMANN, G.E.; CARLINI, C.R. Separation of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease isoforms by immobilized metal affinity chromatography and characterization of insecticidal properties unrelated to ureolytic activity. *Plant science*, v. 167, n. 2, p. 241-246, Aug 2004.

FORD, A.C.; AXON, A.T. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications. *Helicobacter*, v. 15, n. s1, p. 1-6, Sep 2010.

FÖRSTERMANN, U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, v. 5, n. 6, p. 338-349, Jun 2008.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. *European heart journal*, v. 33, n. 7, p. 829-837, Apr 2012.

FRANSES, J.W. e col. Stromal endothelial cells directly influence cancer progression. *Science translational medicine*, v. 3, n. 66, p. 66ra5-66ra5, Jan 2011.

FREY, R.S. e col. PKC ζ regulates TNF- α -induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circulation research*, v. 90, n. 9, p. 1012-1019, May 2002.

FREY, R.S.; USHIO-FUKAI, M.; MALIK, A.B. NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxidants & redox signaling*, v. 11, n. 4, p. 791-810, Apr 2009.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, v. 201, n. 4359, p. 875-880, Sep 1978.

FU, S. e col. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology*, v. 116, n. 6, p. 1319-1329, Jun 1999.

FURCHGOTT, R.F. e col. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, v. 288, n. 5789, p. 373-376, Nov 1980.

FUKUMURA, D. e col. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 5, p. 2604-2609, Feb 2001.

FUKUMURA, D.; KASHIWAGI, S.; JAIN, R.K. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 7, p. 521-534, Jul 2006.

GABARRA-NIECKO, V.; SCHALLER, M.D.; DUNTY, J.M. FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, v. 22, n. 4, p. 359-374, Dec 2003.

GAWAZ, M.; LANGER, H.; MAY, A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 115, n. 12, p. 3378, Dec 2005.

GERHARDT, H. e col. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*, v. 161, n. 6, p. 1163-1177, Jun 2003.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. *Science*, v. 285, n. 5430, p. 1028-1033, Aug 1999.

GIANCOTTI, F.G.; TARONE, G. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 19, n. 1, p. 173-206, Nov 2003.

- GIANNOTTA, M.; TRANI, M.; DEJANA, E.. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Developmental cell*, v. 26, n. 5, p. 441-454, Sep 2013.
- GOBERT, AP. e col. Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *The Journal of Immunology*, v. 168, n. 12, p. 6002-6006, Jun 2002.
- GOODWIN, C. S.; ARMSTRONG, J. A. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 9, n. 1, p. 1-13, Jan 1990.
- GRANGER, D. N.; GRISHAM, M. B.; KVIETYS, P. R. Mechanisms of microvascular injury. *Physiology of the gastrointestinal tract*, v. 3, p. 1693-1722, 1994.
- GRASSI-KASSISSE, D. M.; RIBEIRO-DASILVA, G. Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells. *Agents and actions*, v. 37, n. 3-4, p. 204-209, Nov 1992.
- GROENEVELD, A,B. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Vascular pharmacology*, v. 39, n. 4, p. 247-256, Nov 2002.
- GRUNEWALD, M.e col. VEGF-induced adult neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*, v. 124, n. 1, p. 175-189, Jan 2006.
- GUAN, J.L. Integrin signaling through FAK in the regulation of mammary stem cells and breast cancer. *IUBMB life*, v. 62, n. 4, p. 268-276, Apr 2010.
- GUMBINER, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, v. 84, n. 3, p. 345-357, Feb 1996.
- GUNNETT, C.A. e col. Mechanisms of Inducible Nitric Oxide Synthase–Mediated Vascular Dysfunction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 25, n. 8, p. 1617-1622, Aug 2005.
- GUO, M. e col. Fibrinogen- γ C-terminal fragments induce endothelial barrier dysfunction and microvascular leak via integrin-mediated and RhoA-dependent mechanism. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 29, n. 3, p. 394-400, Mar 2009.
- HA, N.C. e col. Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 8, n. 6, p. 505-509, Jun 2001.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, v. 52, n. 8, p. 253-265, Aug 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. NY: Oxford University Press.–1999.–968 p, 1989.

HALLIWELL, Barry; CROSS, Carroll E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, v. 102, n. Suppl 10, p. 5, Dec 1994.

HARRIS, E.S.; NELSON, W.J. VE-cadherin: at the front, center, and sides of endothelial cell organization and function. *Current opinion in cell biology*, v. 22, n. 5, p. 651-658, Oct 2010.

HARRISON, M. e col. The endothelial microparticle response to a high fat meal is not attenuated by prior exercise. *European journal of applied physiology*, v. 106, n. 4, p. 555-562, Jul 2009.

HATZ, R. A. e col. Pattern of adhesion molecule expression on vascular endothelium in Helicobacter pylori-associated antral gastritis. *Gastroenterology*, v. 112, n. 6, p. 1908-1919, Jun 1997.

HECQUET, C.M. e col. Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circulation research*, v. 102, n. 3, p. 347-355, Feb 2008.

HEISS, C.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; KELM, M. Central Role of eNOS in the Maintenance of Endothelial Homeostasis. *Antioxidants & redox signaling*, Dec 2014.

HERRERA, V.; PARSONNET, J. Helicobacter pylori and gastric adenocarcinoma. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 11, p. 971-976, Nov 2009.

HOPKINS, R.J.; GIRARDI, L.S.; TURNEY, E.A. Relationship between Helicobacter pylori eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. *Gastroenterology*, v. 110, n. 4, p. 1244-1252, Apr 1996.

HYNES, R.O. Cell–matrix adhesion in vascular development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 5, n. s1, p. 32-40, Jul 2007.

HYNES, Richard O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, v. 110, n. 6, p. 673-687, Sep 2002.

IKEDA, S. e col. IQGAP1 regulates reactive oxygen species–dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, v. 25, n. 11, p. 2295-2300, Nov 2005.

IMHOF, B.A.; AURRAND-LIONS, M. Angiogenesis and inflammation face off. *Nature medicine*, v. 12, n. 2, p. 171-172, Feb 2006.

INNOCENTI, M. e col. Helicobacter pylori-induced activation of human endothelial cells. *Infection and immunity*, v. 70, Aug 2002.

ISMAILI, A. e col. Heterogeneity in phenotypic and genotypic characteristics among strains of Hafnia alvei. *Journal of clinical microbiology*, v. 34, n. 12, p. 2973-2979, Dec 1996.

JAIN, R.K. Molecular regulation of vessel maturation. *Nature medicine*, v. 9, n. 6, p. 685-693, Jun 2003.

JAIN, R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, v. 307, n. 5706, p. 58-62, Jan 2005.

JIMÉNEZ-SOTO, L.F. e col. Helicobacter pylori type IV secretion apparatus exploits β 1 integrin in a novel RGD-independent manner. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 12, p. e1000684, Dec 2009.

KALIA, N.; BARDHAN, K.D. Of blood and guts: association between Helicobacter pylori and the gastric microcirculation. *Journal of gastroenterology and hepatology*, v. 18, n. 9, p. 1010-1017, Sep 2003.

KOCH, A.E.; DISTLER, O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Research and Therapy*, v. 9, n. 2, p. S3, Aug 2007.

KURTEL, H.e col. Ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction: role of neutrophils. *Am J Physiol*, v. 261, n. 3 Pt 1, p. G490-6, Sep1991.

KWOK, T.e col. Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*, v. 449, n. 7164, p. 862-866, Oct 2007.

LAMPUGNANI, M.G. e col. Cell confluence regulates tyrosine phosphorylation of adherens junction components in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, v. 110, n. 17, p. 2065-2077, Sep 1997.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 3, n. 1, p. 21-33, Jan 2004.

LEE, J. e col. Conditional deletion of the focal adhesion kinase FAK alters remodeling of the blood-brain barrier in glioma. *Cancer research*, v. 70, n. 24, p. 10131-10140, Dec 2010.

LEUNK, R. D. e col. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of Campylobacter pylori. *Journal of medical microbiology*, v. 26, n. 2, p. 93-99, 1988.

LEY, Klaus e col. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, v. 7, n. 9, p. 678-689, Jun 2007.

LI, H.; FÖRSTERMANN, U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *The Journal of pathology*, v. 190, n. 3, p. 244-254, Feb 2000.

LI, H; FÖRSTERMANN, U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current opinion in pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 161-167, Apr 2013.

LI, H.; HORKE, S.; FÖRSTERMANN, U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 237, n. 1, p. 208-219, Nov 2014.

LIAUDET, L.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PACHER, P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock. *Current vascular pharmacology*, v. 11, n. 2, p. 196-207, Mar 2013.

LIM, S. e col. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, v. 7, n. 15, p. 2306, Aug 2008.

LIU, P. e col. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews Drug discovery*, v. 8, n. 8, p. 627-644, Aug 2009.

LYTTON, S.D. e col. Production of ammonium by *Helicobacter pylori* mediates occludin processing and disruption of tight junctions in Caco-2 cells. *Microbiology*, v. 151, n. 10, p. 3267-3276, Oct 2005.

MAI, U. E. e col. Surface proteins from *Helicobacter pylori* exhibit chemotactic activity for human leukocytes and are present in gastric mucosa. *The Journal of experimental medicine*, v. 175, n. 2, p. 517-525, Feb 1992.

MANNAIONI, P.F.; DI BELLO, M.G.; MASINI, E. Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*, v. 46, n. 1, p. 4-18, Jan 1997.

MANNINEN, A. Epithelial polarity—generating and integrating signals from the ECM with integrins. *Experimental cell research*, Jan 2015.

MARELLI, U.K. e col. Tumor targeting via integrin ligands. *Frontiers in oncology*, v. 3, Aug 2013.

MARON, B.A.; MICHEL, T. Subcellular localization of oxidants and redox modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation Journal*, v. 76, n. 11, p. 2497-2512, Oct 2012.

MARSHALL, B.J.; WARREN, J. R.. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *The Lancet*, v. 323, n. 8390, p. 1311-1315, Jun 1984.

MASSAAD, C.A. Neuronal and vascular oxidative stress in Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, v. 9, n. 4, p. 662, Dec 2011.

MAYHAN, W.G. Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macromolecular extravasation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 35, n. 6, p. H2369, Jun 1994.

MCCOLE, D.F. Phosphatase regulation of intercellular junctions. *Tissue barriers*, v. 1, n. 5, Dec 2013.

MITRA, S.K.; HANSON, D.A.; SCHLAEPFER, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 6, n. 1, p. 56-68, Jan 2005.

MOBLEY, H.L.; ISLAND, M.D.; HAUSINGER, R.P. Molecular biology of microbial ureases. *Microbiological reviews*, v. 59, n. 3, p. 451-480, Sep 1995.

MOLNAR, B. e col. Molecular pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: the role of bacterial virulence factors. *Digestive Diseases*, v. 28, n. 4-5, p. 604-608, Nov 2010.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*, v. 329, n. 27, p. 2002-2012, Dec 1993.

MORAES, M.S. e col. Endothelium-derived nitric oxide (NO) activates the NO-epidermal growth factor receptor-mediated signaling pathway in bradykinin-stimulated angiogenesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 558, p. 14-27, Sep 2014.

MONTECUCCO, C. e col. Molecular and cellular activities of *Helicobacter pylori* pathogenic factors. *FEBS letters*, v. 452, n. 1, p. 16-21, Jun 1999.

NAKANO, H. Signaling crosstalk between NF- κ B and JNK. *Trends in immunology*, v. 25, n. 8, p. 402-405, Aug 2004.

NATARAJAN, V. e col. Reactive oxygen species signaling through regulation of protein tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Environmental health perspectives*, v. 106, n. Suppl 5, p. 1205, Oct 1998.

NAVARRO, P.; RUCO, L.i; DEJANA, E.. Differential localization of VE- and N-cadherins in human endothelial cells: VE-cadherin competes with N-cadherin for junctional localization. *The Journal of cell biology*, v. 140, n. 6, p. 1475-1484, Mar 1998.

NURGALIEVA, Z.Z. e col. *Helicobacter pylori* infection in Kazakhstan: effect of water source and household hygiene. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 67, n. 2, p. 201-206, Aug 2002.

ODA, H.; TAKEICHI, M. Structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *The Journal of cell biology*, v. 193, n. 7, p. 1137-1146, Jun 2011.

OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G.E.; CARLINI, C.R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria?. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 39, n. 7, p. 851-861, Jul 2006.

PALMER, R. M. J. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v. 327, p. 525, Jun 1987.

PALOVUORI, R. e col. *Helicobacter pylori* Induces Formation of Stress Fibers and Membrane Ruffles in AGS Cells by rac Activation. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 269, n. 1, p. 247-253, Mar 2000.

PARKIN, D.M. e col. Global cancer statistics, 2002. CA: a cancer journal for clinicians, v. 55, n. 2, p. 74-108, Mar 2005.

- PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological reviews*, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.
- PAUTZ, A. e col. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, v. 23, n. 2, p. 75-93, Sep 2010.
- PEEK, R.M.; CRABTREE, Jean E. Helicobacter infection and gastric neoplasia. *The Journal of pathology*, v. 208, n. 2, p. 233-248, Dec 2006.
- PERRI, F. e col. Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. pylori infected patients and effect of eradication. *The American journal of gastroenterology*, v. 102, n. 7, p. 1361-1371, Jul 2007.
- PIEDRA, J.e col. p120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate β -catenin Tyr-142 phosphorylation and β -catenin- α -catenin Interaction. *Molecular and cellular biology*, v. 23, n. 7, p. 2287-2297, Apr 2003.
- PILOTTO, A.; SALLES, N. Helicobacter pylori infection in geriatrics. *Helicobacter*, v. 7, n. s1, p. 56-62, Oct 2002.
- POLACCO, J.C.; HOLLAND, M.A. Roles of urease in plant cells. *International review of cytology*, v. 145, p. 65-103, 1993.
- POLTE, T.R.; HANKS, S.K.; NAFTILAN, A.J. Focal adhesion kinase is abundant in developing blood vessels and elevation of its phosphotyrosine content in vascular smooth muscle cells is a rapid response to angiotensin II. *Journal of cellular biochemistry*, v. 55, n. 1, p. 106-119, May 1994.
- POSER, I.; BOSSERHOFF, A.K. Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histol Histopathol*, v. 19, p173-88, Jan 2004.
- POSSELT, G.; BACKERT, S.; WESSLER, S. The functional interplay of Helicobacter pylori factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun Signal*, v. 11, p. 77, Oct 2013.
- POTENTE, M.; GERHARDT, H.; CARMELIET, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, v. 146, n. 6, p. 873-887, Sep 2011.
- POWELL, J. Update on hemangiomas and vascular malformations. *Current opinion in pediatrics*, v. 11, n. 5, p. 457-463, Oct 1999.
- RASSOW, Joachim. Helicobacter pylori vacuolating toxin A and apoptosis. *Cell Commun Signal*, v. 9, p. 26, Nov 2011.
- REYNOLDS, A.B.; ROCZNIAK-FERGUSON, A. Emerging roles for p120-catenin in cell adhesion and cancer. *Oncogene*, v. 23, n. 48, p. 7947-7956, Oct 2004.
- REN, Z. e col. Regulation of swelling-activated Cl⁻ current by angiotensin II signalling and NADPH oxidase in rabbit ventricle. *Cardiovascular research*, v. 77, n. 1, p. 73-80, Jan 2008.

RIBEIRO-DASILVA, G.; PIRES-BARBOSA, R.; CARLINI, C.R. Effect of canatoxin on the circulating levels of gonadotropins and prolactin in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, v. 22, n. 3, p. 387-395, 1988.

RIBEIRO-DASILVA, G. e col. Convulsions induced by canatoxin in rats are probably a consequence of hypoxia. *Brazilian journal of medical and biological research*.v,22, n. 7, p. 877-880, 1988.

RIBEIRO-DASILVA, G.; PRADO, J. F. Increased insulin circulating levels induced by canatoxin in rats. *Toxicon*, v. 31, n. 9, p. 1131-1136, Sep 1993.

RIEDER, G.; FISCHER, W.; HAAS, R. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Current opinion in microbiology*, v. 8, n. 1, p. 67-73, Feb 2005.

ROEBUCK, K.A. e col. H₂O₂ and tumor necrosis factor- α activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 32, p. 18966-18974, Aug 1995.

RUOSLAHTI, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual review of cell and developmental biology*, v. 12, n. 1, p. 697-715, Nov 1996.

SALLEE, Je.L.; WITTCHEN, E.S.; BURRIDGE, K. Regulation of cell adhesion by protein-tyrosine phosphatases II. Cell-cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 24, p. 16189-16192, Jan 2006.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current Biology*, v. 24, n. 10, p. R453-R462, May 2014.

SCHNEIDER, S.; WEYDIG, C.; WESSLER, S. Targeting focal adhesions: *Helicobacter pylori*-host communication in cell migration. *Cell Commun Signal*, v. 6, n. 2, Aug 2008.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *The EMBO journal*, v. 10, n. 8, p. 2247, Aug 1991.

SEPULVEDA, A.R. e col. CpG Methylation and Reduced Expression of O 6-Methylguanine DNA Methyltransferase Is Associated With *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology*, v. 138, n. 5, p. 1836-1844. e4, May 2010.

SHEN, Q.; WU, M.H.; YUAN, Sarah Y. Endothelial contractile cytoskeleton and microvascular permeability. *Cell health and cytoskeleton*, v. 2009, n. 1, p. 43, Jul 2009.

SHI, Q.; BOETTIGER, D. A novel mode for integrin-mediated signaling: tethering is required for phosphorylation of FAK Y397. *Molecular biology of the cell*, v. 14, n. 10, p. 4306-4315, Oct 2003.

SHWEIKI, D. e col. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, v. 359, n. 6398, p. 843-845, Oct 1992.

SIRKO, A.; BRODZIK, R. Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica*, v. 47, n. 4, p. 1189-1195, Oct 1999.

SMOOT, D.T. e col. Helicobacter pylori urease activity is toxic to human gastric epithelial cells. *Infection and immunity*, v. 58, n. 6, p. 1992-1994, Jun 1990.

STEVENS, T. e col. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 279, n. 3, p. L419-L422, Sep 2000.

SUERBAUM, S.; MICHETTI, P. Helicobacter pylori infection. *New England Journal of Medicine*, v. 347, n. 15, p. 1175-1186, Out 2002.

SUNDARAM, M.V. RTK/Ras/MAPK signaling. *WormBook*, v. 11, p. 1-19, Feb 2006.

SUMPIO, B.E.; RILEY, J.T.; DARDIK, A. Cells in focus: endothelial cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 34, n. 12, p. 1508-1512, Dec 2002.

SUZUKI, H.; HIBI, T.; MARSHALL, B. J. Helicobacter pylori: present status and future prospects in Japan. *Journal of gastroenterology*, v. 42, n. 1, p. 1-15, Jan 2007.

TACHI, K. e col. Prevention of water immersion stress-induced gastric lesions through the enhancement of nitric oxide synthase activity in rats. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, v. 10, n. 1, p. 97-103, Feb 1996.

TADDEI, A. e col. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nature cell biology*, v. 10, n. 8, p. 923-934, Aug 2008.

TEGTMAYER, N. e col. A small fibronectin-mimicking protein from bacteria induces cell spreading and focal adhesion formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 30, p. 23515-23526, Jul 2010.

TOUTANT, M. e col. Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Molecular and cellular biology*, v. 22, n. 22, p. 7731-7743, Nov 2002.

TRUE, A.L.; RAHMAN, A.; MALIK, A.B. Activation of NF- κ B induced by H₂O₂ and TNF- α and its effects on ICAM-1 expression in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 279, n. 2, p. L302-L311, Aug 2000.

TSUDA, M. e col. A urease-negative mutant of Helicobacter pylori constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infection and immunity*, v. 62, n. 8, p. 3586-3589, Aug 1994.

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

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annual review of immunology*, v. 27, p. 693-733, Apr 2009.

VIRDIS, A. e col. Cyclooxygenase-2 inhibition improves vascular endothelial dysfunction in a rat model of endotoxic shock: role of inducible nitric-oxide synthase and oxidative stress. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 312, n. 3, p. 945-953, Mar 2005.

VITTET, D. e col. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 12, p. 6273-6278, Jun 1997.

VITTET, D. e col. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*, v. 88, n. 9, p. 3424-3431, Nov 1996.

XIA, Y.; ZWEIER, J.L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 13, p. 6954-6958, Jun 1997.

ZANOTTI, G.; CENDRON, L. Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB life*, v. 62, n. 10, p. 715-723, Oct 2010.

WALLEZ, Y.; VILGRAIN, I.; HUBER, P. Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends in cardiovascular medicine*, v. 16, n. 2, p. 55-59, Feb 2006.

WASSERMANN, G.E. e col. *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, v. 14, n. 7, p. 2025-2034, Jul 2010.

WESSLER, S.; BACKERT, S. Molecular mechanisms of epithelial-barrier disruption by *Helicobacter pylori*. *Trends in microbiology*, v. 16, n. 8, p. 397-405, Aug 2008.

WESSLER, S.; GIMONA, M.; RIEDER, G. Regulation of the actin cytoskeleton in *Helicobacter pylori*-induced migration and invasive growth of gastric epithelial cells. *Cell Commun Signal*, v. 9, n. 1, p. 27, Nov 2011.

WITTCHEN, E.S. e col. Trading spaces: Rap, Rac, and Rho as architects of transendothelial migration. *Current opinion in hematology*, v. 12, n. 1, p. 14-21, Jan 2005.

WROBLEWSKI, L.E. e col. *Helicobacter pylori* dysregulation of gastric epithelial tight junctions by urease-mediated myosin II activation. *Gastroenterology*, v. 136, n. 1, p. 236-246, Jan 2009.

WROBLEWSKI, L.E.; PEEK, R.M. Targeted disruption of the epithelial-barrier by *Helicobacter pylori*. *Cell Commun Signal*, v. 9, n. 1, p. 29, Nov 2011.

WYATT, J.I. Histopathology of gastroduodenal inflammation: the impact of *Helicobacter pylori*. *Histopathology*, v. 26, n. 1, p. 1-15, Jan 1995.

YAHIRO, K. e col. Activation of *Helicobacter pylori* VacA toxin by alkaline or acid conditions increases its binding to a 250-kDa receptor protein-tyrosine phosphatase β . *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 51, p. 36693-36699, Dec 1999.

YAHIRO, K. e col. Protein-tyrosine phosphatase α , RPTP α , is a *Helicobacter pylori* VacA receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 21, p. 19183-19189, Sep 2003.

YASUDA, M. e col. Stimulation of in vitro angiogenesis by hydrogen peroxide and the relation with ETS-1 in endothelial cells. *Life sciences*, v. 64, n. 4, p. 249-258, Apr 1998.

YOUNG, B.A. e col. Protein tyrosine phosphatase activity regulates endothelial cell-cell interactions, the paracellular pathway, and capillary tube stability. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 285, n. 1, p. L63-L75, Jul 2003.

YU, T.W.; ANDERSON, D.. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 379, n. 2, p. 201-210, Oct 1997.

YUAN, S.Y. Signal transduction pathways in enhanced microvascular permeability. *Microcirculation*, v. 7, n. 6, p. 395-403, Dec 2000.

YUAN, S.Y. e col. Neutrophil transmigration, focal adhesion kinase and endothelial barrier function. *Microvascular research*, v. 83, n. 1, p. 82-88, Jan 2012.

YUAN, Y. e col. Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 264, n. 5, p. H1734-H1739, May 1993.