

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Urease de *Helicobacter pylori*: interação com plaquetas e contribuições para inflamação.

Trabalho apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Doutora pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM - UFRGS

ADRIELE SCOPEL GUERRA

Orientadora: Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Porto Alegre

Dezembro de 2017

Banca Examinadora

Dra. Célia Regina Carlini
Orientadora

Dr. João Alfredo Moraes
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Maria Martha Campos
Centro de Toxicologia e Farmacologia
Escola de Ciências da Saúde
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Dr. Guido Lenz
Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rodrigo Ligabue-Braun
Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(Revisor)

Esse trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS, no Instituto do Cérebro (InsCer) e de Pesquisas Biomédicas (IPB) – PUC/RS, com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Ao meu pai, meu exemplo de vida,
meu herói! Tenho enorme orgulho de
ser tua filha! Obrigada por tudo e por
todos os momentos que tivemos
juntos, te amo muito, onde quer que
estejas agora!

Saudades!!

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Dra. Célia pela oportunidade de fazer parte do grupo, pelo apoio e pelos puxões de orelha. Obrigada pela incrível oportunidade de ser parte desse trabalho, conhecer e vivenciar os encantos e desafios da ciência!

Aos meus co-orientadores, que apesar de formalmente eu não ter nenhum, na prática tive dois. Obrigada Profa. Fernanda pelo companheirismo, pelas discussões, por ajudar com novas técnicas, pelos cafés, almoços e jantas. Obrigada Deiber, por não desistir de mim, nem desse trabalho, mesmo a muitos quilômetros de distância. Obrigada pela força e pela amizade, pelas conversas, brigas, discussões de trabalho, vida, carros, cachorros... Mesmo depois de me aturar durante todo o mestrado, ainda acreditou em mim e me deu muito apoio, principalmente nas horas mais complicadas. É bom se sentir acolhida por vocês e saber que levo mais que dois co-orientadores, levo dois amigos pra vida. Obrigada de coração, sem vocês esse trabalho não existiria.

Aos meus colegas e amigos de Laprotex Jozi, Anne, Vanessa, Ângela Piovesan, Ângela Menegassi, Michelle, Karine, Matheus, Ana, Leonardo, Natália Moyetta, Fernanda, Augusto, Rodrigo, Diogo, Rafael e Tinoko (Deiber e Fernanda também) pelas conversas, risadas, cafés e bolos. Natália Callai, obrigada por ser muito mais que minha IC, não sei o que seria dos meus dias no lab sem ti. Natália Jaeger pelas manhãs e tardes na frente do citômetro, pelos skypes e toda ajuda nas citometrias, foi muito bom te encontrar!! Obrigada flor!

Aos meus amigos de perto e de longe que sempre me apoiaram sempre, que trazem momentos de descontração, risadas, choros – de tanto rir, óbvio, conversas sem pé nem cabeça e, é claro, sobre as discussões sobre a vida, o universo e tudo mais.

À minha família, meu porto seguro, lugar aonde podemos voltar de um dia cheio e descansar, relaxar, rir, chorar e aliviar o dia. Foi difícil, nesses últimos anos a vida pegou pesado conosco, mas estamos firmes, fortes e mais unidos que nunca. Mãe, mano e cunha, amo vocês muito!! Meu marido, meu amor, meu companheiro incondicional, obrigada por me aguentar, por me amar, por me apoiar, sei que não foi fácil me aturar nesses anos de pós-graduação, obrigada por não desistir de mim, pelo carinho e pela segurança que me passa, TE AMO DEMAIS!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	<i>Helicobacter pylori</i>	11
1.2	Ureasas como fatores de virulência	15
1.3	Urease de <i>Helicobacter pylori</i>	17
1.4	Plaquetas na hemóstase, inflamação e sistema imune	22
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo geral:	25
2.2	Objetivos específicos:	25
3	MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS	26
	Supplementary Material	40
4	DISCUSSÃO.....	45
5	CONCLUSÕES.....	54
6	REFERÊNCIAS	55

Lista de Abreviaturas

ADP	Adenosine Diphosphate
CagA	Cytotoxin antigen A
CAM	Chick Chorioallantoic Membrane
COX-2	Cyclooxygenase -2
DNA	Deoxyribonucleic Acid
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GP	Glycoprotein
HPU	<i>Helicobacter pylori</i> urease
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
ICAM	Intercellular Adhesive Molecule
IL	Interleukin
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
ROS	Reactive Oxygen Species
RNA	Ribonucleic Acid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
TLR	Toll-like receptor
VacA	Vacuolating Cytotoxin

Resumo

A bactéria Gram negativa *Helicobacter pylori*, além de estar associada ao câncer gástrico e duodenal, está relacionada a patologias extra gástricas. Entre essas estão as doenças cardiovasculares. Os mecanismos pelos quais o *H. pylori* pode causar, ou agravar essas doenças, ainda não são claros. A urease de *H. pylori* (HPU) é considerada um fator de virulência, visto que sua atividade catalítica cria um microambiente de pH mais elevado, possibilitando a sobrevivência do patógeno no estômago. A HPU é capaz de ativar plaquetas de coelho através da indução da secreção de seus grânulos densos com liberação de ADP, culminando na agregação plaquetária. Esse fenômeno ocorre via 12-lipoxigenase, rota de sinalização também utilizada pelo colágeno, um importante agonista intrínseco desse sistema. Demonstramos previamente que também as duas subunidades da HPU, HpUreB e HpUreA, interagem com membranas de plaquetas de coelho, sendo que a HpUreB contém o domínio da holoenzima responsável pela agregação plaquetária. Essa interação entre HPU e plaquetas pode ser mediada por GPVI, o principal receptor de colágeno dessas células. No presente trabalho, estudamos a interação da HPU e suas subunidades com plaquetas humanas, através de citometria de fluxo. Demonstramos que HPU ativa plaquetas humanas sem exposição significativa de P-selectina. O bloqueio com anticorpos específicos para o receptor de membrana GPIIb/IIIa, mas não para GPVI, interfere na ativação plaquetária induzida por HPU. Em plaquetas ativadas por HPU ocorrem modificações do processamento pré-mRNA de proteínas pró-inflamatórias, aumentando os níveis de mRNAs que codificam IL-1 β e CD14, indicando que plaquetas passam a apresentar um fenótipo pró-inflamatório após exposição à urease. No conjunto, nossos dados sugerem que a HPU, além de permitir a sobrevivência bacteriana na mucosa gástrica, pode ter um papel importante, e até agora negligenciado, nos estados inflamatórios associados com a infecção por *H. pylori*.

Abstract

The Gram negative bacterium *Helicobacter pylori*, besides its association with gastric and duodenal cancer, correlates positively to several extragastric diseases such as cardiovascular pathologies. However, the mechanisms by which *H. pylori* can cause or aggravate these diseases are still unclear. *H. pylori* urease (HPU) is considered a virulence factor, since its catalytic activity creates a microenvironment, of higher pH, that allows survival of the pathogen in the stomach. HPU is able to activate rabbit platelets by inducing the secretion of their dense granules with release of ADP, culminating in platelet aggregation. This phenomenon occurs with activation of the 12-lipoxygenase pathway, which is also used by collagen, an important intrinsic agonist of this system. We have previously demonstrated that both subunits of HPU, HpUreB and HpUreA, interact with rabbit platelet membranes, and that HpUreB contains the domain responsible for platelet aggregation. This interaction of HPU and platelets could be mediated by GPVI, the main collagen receptor in these cells. In this work, by using flow cytometry assay, we have studied the interaction of HPU and of its subunits with human platelets. HPU was shown to activate human platelets without significant P-selectin exposure. Blockage with antibodies against the membrane receptor GPIIb/IIIa, but not against GPVI, interfered on platelet activation induced by HPU. The processing of pre-mRNA of proinflammatory proteins was evaluated in HPU-activated platelets and increased levels of mRNAs encoding IL-1 β and CD14 were found, indicating that platelets acquire a pro-inflammatory phenotype when exposed to the urease. Altogether, our data suggest that *H. pylori* urease, besides allowing bacterial survival within the gastric mucosa, may have an important, and so far overlooked role in the inflammation associated to the infection by *H. pylori*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Helicobacter pylori*

A bactéria *Helicobacter pylori* microaerófila, Gram negativa, possui de 2,5 a 5,0 µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura, com até 6 flagelos de aproximadamente 30 µm de comprimento (Goodwin e Armstrong, 1990). Esse microrganismo coloniza a mucosa estomacal de humanos (Yoshiyama e Nakazawa 2000), tendo sido isolada pela primeira vez, em 1982, por Marshall e Warren (Marshall e Warren, 1984). Relatos do século XIX, como o de Bizzozero em 1893, que descreveu uma espiroqueta colonizando células gástricas de cães, já indicavam a existência de uma bactéria capaz de colonizar o ambiente ácido do estômago de mamíferos. Essa bactéria é encontrada na mucosa estomacal, e por conta de sua alta motilidade, ela penetra a fina camada de muco e adere às células do epitélio gástrico, de modo a impedir que as mesmas sejam lavadas pelo estômago.

A infecção por *H. pylori* tende a persistir por toda a vida do hospedeiro; por isso, não é surpresa que essa bactéria tenha evoluído juntamente com populações humanas (Covacci et al., 1999). Estudos indicam que, há pelo menos 60 mil anos, antes das primeiras migrações, o estômago do *Homo sapiens* moderno estava infectado com *Helicobacter pylori* (Linz et al, 2007). Essa interação tão antiga resultou em distintos padrões filogeográficos, a que possibilitou estudos das migrações das populações humanas (Burucoa e Axon, 2017). Como exemplo disso, um estudo recente comparativo entre populações portuguesas e outras populações não europeias que falam português,

mostrou que 25% das cepas de *H. pylori* presentes nos brasileiros é de origem europeia, assim como em metade da população de Cabo Verde (Oleastro et al, 2017).

Ainda se discute como se dá a transmissão desse agente entre as pessoas. Estudos sugerem que a contaminação por *H. pylori* pode ocorrer basicamente de duas formas: através da saliva de portadores e através da água contaminada com matéria fecal (Burucoa e Axon, 2017), justificando o porquê desta bactéria ser mais prevalente em populações menos desenvolvidas. Estima-se que mais da metade da população mundial está infectada por esse patógeno, sendo que em países pobres ou em desenvolvimento, com más condições sanitárias, a infecção por *H. pylori* pode atingir 90% da população (Hopkins et al., 1996, Fischbach et al., 2005). Atualmente, o *H. pylori* é reconhecido como um agente etiológico de gastrite crônica, úlcera péptica, e de câncer gástrico e duodenal (IARC, 1994). Muito embora alguns autores considerem que a simples presença da bactéria não seria suficiente para causar câncer (Brenner et al., 2004), existem estudos com a população japonesa que mostraram que todos os casos de câncer de estômago estavam ligados à presença de *H. pylori* (Uemura et al., 2001). Entre europeus e australianos, 89% dos casos de câncer gástrico estavam associados a esse patógeno (de Martel et al., 2012). Roberts e colaboradores, em 2016, descreveram que, entre 1993 e 2007, ocorreu um decréscimo de 3,1% dos casos de infecções por *H. pylori* anualmente na população europeia, acompanhando uma diminuição de 2,1% nos casos de câncer gástrico registrados no mesmo período. Assim como já descrito para outras regiões do mundo, a prevalência da infecção por *H. pylori* é variável entre as regiões da Europa conforme as condições sanitárias, sendo maior nas regiões com piores condições sanitárias (Roberts et al., 2016). Em média, 20% da população infectada pela espiroqueta apresenta sintomas clínicos, sendo essa baixa casuística atribuída a variações de

virulência entre as cepas de *H. pylori* (Yamaoka et al., 2010; Peek et al, 2010), presença ou ausência de fatores de virulência da bactéria, e pelos hábitos alimentares dos indivíduos.

No mundo, o câncer gástrico é o quinto tipo de câncer mais comum, sendo que em 2012 foram diagnosticados 953 mil novos casos (IARC 2014), destacando o *H. pylori* como um importante problema para a saúde mundial. No Brasil, são estimados 20 mil novos casos de câncer gástrico anualmente, a maioria dos casos associados ao *H. pylori*, o que gera um alto impacto para a saúde pública (INCA 2016).

A infecção por *H. pylori* caracteriza-se pela associação dessa bactéria às células da mucosa gástrica, mas não ao epitélio do intestino delgado ou em metaplasia intestinal. Outras espécies do gênero *Helicobacter* já foram descritas como capazes de colonizar o intestino, fígado e pâncreas humanos, sendo responsáveis por gastroenterites, pelas doenças inflamatórias intestinais (*inflammatory bowel diseases*) e alguns casos de colangiocarcinoma (Malfertheiner et al., 2016). A infecção é acompanhada de inflamação crônica, infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares no epitélio, sem associação específica com modificações metaplásicas e formação de granuloma (Dixon, 1995). Em geral há degeneração das células epiteliais, com depleção de mucina, vacuolização citoplasmática e desorganização de glândulas da mucosa. A infecção por *H. pylori* pode induzir a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, RANTES, TNF- α e NF- κ B (Lamb e Chen 2013). A infiltração do tecido gástrico por neutrófilos é uma marca característica das doenças inflamatórias agudas e crônicas causadas pela persistência de *H. pylori* na mucosa gástrica (Elliott e Wallace 1998). O grau dos danos na mucosa, correlaciona-se com o grau de infiltração de neutrófilos

(D'Elíos et al., 2007), prolongando a inflamação e podendo levar à formação de tumores (Mantovani et al., 2008).

Muitos fatores de virulência estão envolvidos no mecanismo patogênico da infecção por *H. pylori*, entre os quais destacam-se: urease, catalase, lipopolissacarídeo (LPS), citotoxina vacuolizante (VacA), citotoxina associada a ilha de patogenicidade CagPAI (CagA) e os flagelos (Yamaoka et al., 2010). Mais de 32 genes responsáveis pela virulência do *H. pylori* estão localizados na cagPAI, entre estes, os que codificam a expressão de um conjunto de proteínas formadoras de um sistema de secreção do tipo IV (T4SS). A proteína CagA é codificada pelo gene *cagA*, localizado na ilha de patogenicidade. Injetada pelo T4SS dentro das células do epitélio gástrico, a CagA induz a expressão de IL-8 (Censini et al., 1996; Figueiredo et al., 2005), e causa uma série de outras modificações que danificam as junções célula-célula, levando a alterações do crescimento e da motilidade das células epiteliais (Peek, 2016). Cepas cagPAI-positivas são mais virulentas (Parsonnet et al., 1997), e estão fortemente associadas ao desenvolvimento de doenças mais severas, como o câncer gástrico (Peek, 2016). A citotoxina VacA induz vacuolização citoplasmática nas células epiteliais gástricas, o que aciona mecanismos de apoptose, inflamação, e modulação de funções das células T (Yamaoka, 2010), sendo considerada outro fator associado ao desenvolvimento de câncer (Peek Jr, 2016). Ao contrário de CagA, todas as cepas de *H. pylori* são VacA positivas; porém, existem grandes diferenças na região 5' do gene de VacA, diferenças essas relacionadas ao potencial de virulência da bactéria, com algumas variantes com maior capacidade de induzir metaplasias e câncer (Peek 2016).

Estudos epidemiológicos correlacionam ainda a infecção por *H. pylori* com patologias não relacionadas ao trato gastrointestinal, como doenças cardiovasculares e

cerebrovasculares, neurodegenerativas, hepatológicas, de cavidade oral e uro-ginecológicas (Goni 2016; Franceschi 2015; Kyburz 2017; Goni e Franceschi 2016). A infecção por *H. pylori* está correlacionada ao linfoma gástrico (MALT) e patologias hematológicas como púrpura trombocitopênica idiopática, anemia por deficiência de ferro, leucemia infantil e aumento de risco de hemorragia em pacientes com problemas de coagulação (Papagianakins et al., 2013).

1.2 Ureases como fatores de virulência

Ureases (ureia amidohidrolases, EC 3.5.1.5) são enzimas níquel-dependentes que catalisam a hidrólise da uréia em amônia e dióxido de carbono (Riddles et al., 1991), a uma taxa 10^{14} vezes mais rápida que a reação não catalisada (Andrews et al., 1984; Mobley et al., 1995). Ureases bacterianas, ao contrário das ureases vegetais e fúngicas, são multímeros formados por complexos de 2 ou 3 subunidades (Mobley et al., 1995 e Sirko e Brodzik, 2000)(Figura1).

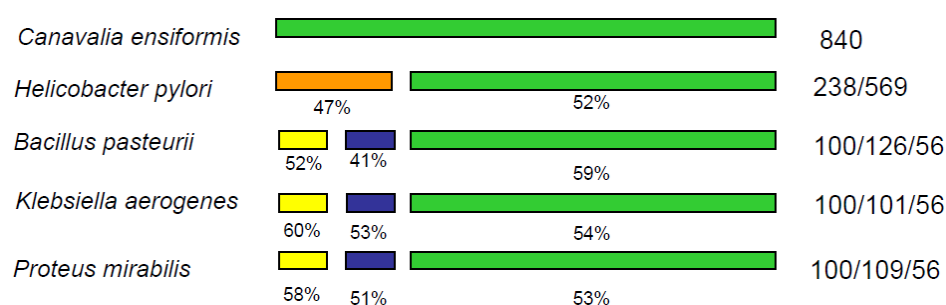


Figura 1. Estrutura das ureases: Ureases vegetais, como a de *Canavalia ensiformis*, possuem apenas um tipo de subunidade, enquanto que as ureases bacterianas possuem dois (*H. pylori*) ou três (*K. aerogenes*; *P. mirabilis*; *B. pasteurii*). O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado ao lado direito. A percentagem de identidade em relação à região correspondente da urease de *C. ensiformis* está indicada abaixo das barras. Adaptado de Scopel-Guerra (2013)

As ureases bacterianas, vegetais e fúngicas possuem estrutura terciária e mecanismo catalítico semelhante, evidenciando a evolução de todas ureases a partir de uma mesma proteína ancestral (Mobley et al., 1995; Sirko e Brodzik, 2000; Ligabue-Braun et al., 2013).

Em bactérias, estas enzimas estão envolvidas em vários processos patogênicos (Mobley et al., 1995). Konieczna e colaboradores, em 2012, revisaram o papel das ureases como fatores de virulência, e observaram que, entre os microrganismos, as cepas produtoras de ureases são consideradas mais virulentas e infecciosas que as não produtoras. Assim, cepas de *Clostridium* sp., *Vibrio* sp. e *Escherichia coli* urease-positivas são mais infecciosas e virulentas que as negativas. *Proteus mirabilis* é um exemplo de microrganismos patogênico que tem a urease como importante fator de virulência, sendo que esta atua na formação de cálculos urinários a partir da precipitação de íons na urina alcalinizada, contribuindo assim para o desenvolvimento da pielonefrite (Follmer, 2010; Konieczna et al., 2012). Além disso, a urease de *Mycobacterium bovis* (Rutherford, 2014) diminui a internalização (*cell surface trafficking*) desses microrganismos por macrófagos. Também em fungos patogênicos, a presença da urease é um reconhecido fator de virulência. No gênero *Cryptococcus*, por exemplo, a urease pode causar danos a junções célula-célula, possivelmente facilitando a passagem de *C. neoformans* através da barreira hematocefálica, e também aumentando a dispersão dessa levedura pelos demais órgãos do hospedeiro (Rutherford, 2014). Em *C. gatti* somente as cepas urease positivas são capazes de se multiplicar dentro de fagossomos (Feder et al., 2015).

1.3 Urease de *Helicobacter pylori*

Em *H. pylori*, a urease é abundante, podendo compor de 10% a 15% das proteínas totais dessa bactéria. Possui massa molecular de aproximadamente 1,1 MDa, e uma organização quaternária dodecamérica, formada por heterodímeros compostos de uma subunidade menor HpUreA, com 30 kDa, e uma subunidade maior HpUreB, com 62 kDa (Dunn et al., 1990; Hu e Mobley, 1990; Ha et al., 2001) (Figura 2).

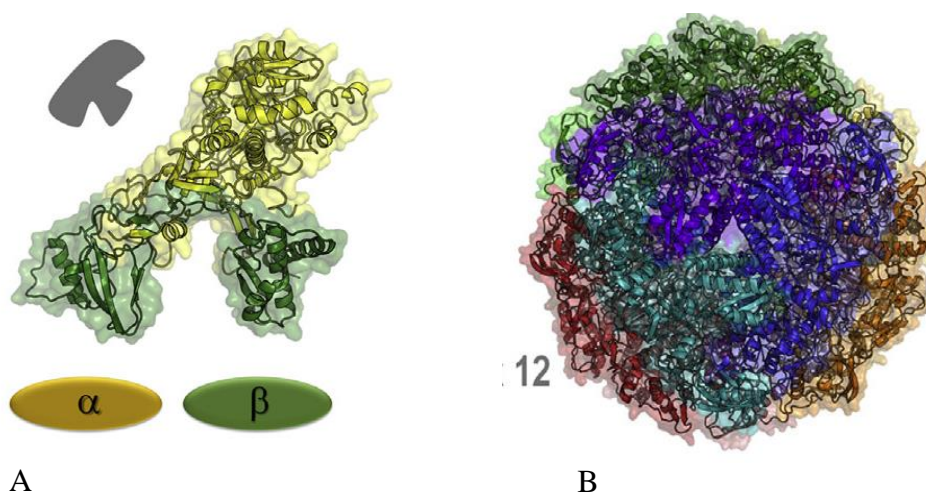


Figura 2. Esquema representativo da estrutura cristalográfica de urease de *Helicobacter pylori* (PDB id 1E9Z). Em A) o monômero funcional da HPU (cinza), em verde está representada a HpUreA, e em amarelo, a HpUreB. Em B) é vista a representação do dodecâmero, composto por 12 repetições do monômero representado em cinza em A. (Adaptado de Carlini e Ligabue-Braun 2016).

Pelo menos sete genes envolvidos na produção da urease de *H. pylori* foram descritos. Os genes *ureA* e *ureB* codificam as duas subunidades que compõem a enzima, enquanto os genes *ureE*, *ureF*, *ureG* e *ureH* codificam proteínas acessórias, responsáveis pela incorporação do níquel no centro ativo da urease (Carlini e Ligabue-Braun 2016). O

gene *ureI* codifica uma proteína que funciona como um canal na membrana externa da espiroqueta, atuando na internalização da uréia. Além desses genes, uma proteína transportadora de níquel é expressa a partir do gene *nixA* (McGee et al., 1999; Mobley et al., 1995). O operon da urease de *H. pylori* (HPU), contendo os genes estruturais da proteína e genes de proteínas acessórias para montagem do seu metalocentro, foi clonado e expresso em *E. coli*, obtendo-se a enzima recombinante com atividade ureolítica semelhante ao tipo selvagem (Hu e Mobley, 1993).

A HPU é considerada um fator de virulência, sendo a sua atividade um marcador utilizado amplamente para fins diagnósticos (Krogfelt et al., 2005). Supõe-se que a principal função dessa enzima está relacionada com a formação de um microclima neutro no lúmen gástrico, possibilitando a sobrevivência da bactéria em ambientes de pH desfavorável. Mutantes de *H. pylori* urease-negativos são incapazes de colonizar o estômago de leitões gnotobióticos e tampouco camundongos *nude* (Eaton et al., 1991; Tsuda et al., 1994). Inibidores de urease foram utilizados no tratamento de algumas de patologias causadas por microrganismos produtores da enzima; contudo, seu uso foi descontinuado pelo fato de muitos pacientes apresentarem reações colaterais adversas. O uso clínico de ácido acetohidroxâmico, que inibe ureases por se complexar com os átomos do níquel do centro ativo, causa depressão na síntese de DNA, afetando a medula óssea, além de ser teratogênico em doses elevadas (Bailie et al., 1986; Follmer 2010).

Além de estar envolvida na elevação do pH e formação de microclima adequado para a colonização por *H. pylori*, nosso grupo vem demonstrando que a HPU possui outras atividades biológicas que podem potencialmente contribuir para a patogênese das infecções causadas pela bactéria. Em particular, reportamos que a HPU é capaz de agregar plaquetas e de ativar neutrófilos, atuando através das lipoxigenases em ambos os modelos celulares.

Estes efeitos não requerem hidrólise de uréia pela HPU, pois persistem na proteína enzimaticamente inativa (Wassermann et al., 2010; Uberti et al., 2013). A Figura 3 resume os achados anteriores do grupo sobre propriedades biológicas da HPU que são independentes da sua atividade enzimática.

A urease de *H. pylori* é fortemente quimiotática para neutrófilos humanos, de modo lipoxigenase-dependente, ativando a produção de ROS nessas células (Uberti et al., 2013), o que lhes confere um alto potencial pró-inflamatório. Em ensaios *ex vivo*, a HPU protegeu neutrófilos humanos contra apoptose, com aumento nos níveis de Bcl-Xl e diminuição de BAD, proteínas mitocondriais envolvidas na apoptose. Os efeitos da HPU em neutrófilos *ex vivo* foram revertidos na presença de esculetina e AA861, evidenciando o recrutamento da via da 5-lipoxigenase (Uberti et al., 2013). *In vivo*, injeções locais de HPU causaram edema de pata em camundongos, com grande infiltração de neutrófilos, efeitos que são abolidos por pré-tratamento dos animais com esculetina, indicando a participação de eicosanoides derivados desta enzima na ação pró-inflamatória da HPU (Uberti et al., 2013). Esses dados são sugestivos de que a HPU pode estar envolvida em outros mecanismos da patogenicidade do *H. pylori*, e não somente na formação de um microclima que possibilita a sua sobrevivência no ambiente gástrico (Uberti et al., 2013; Carlini e Ligabue-Braun 2016).

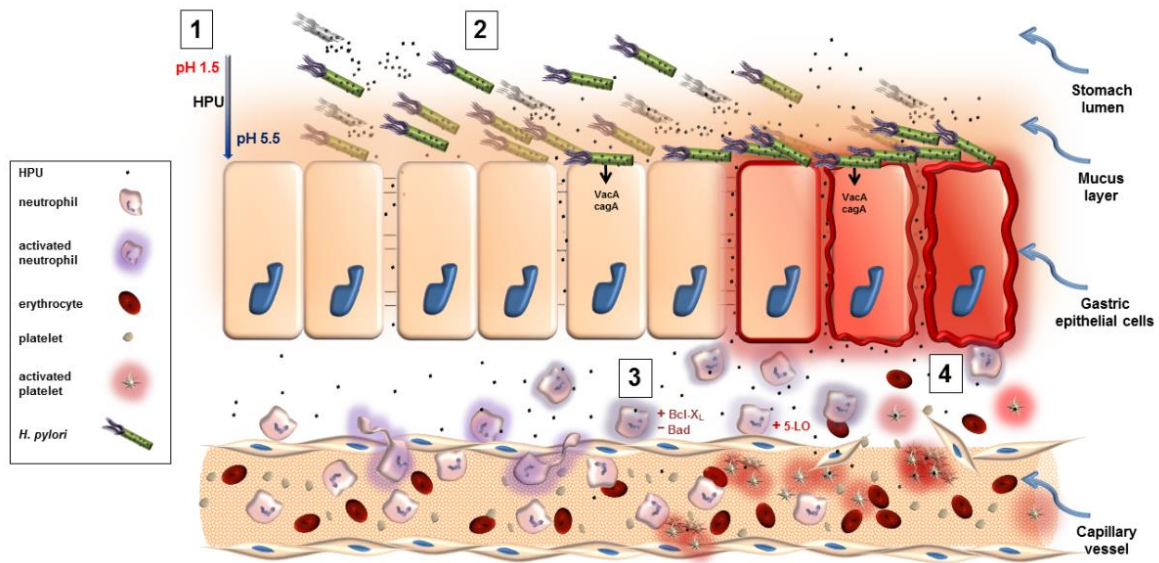


Figura 3. Esquema representativo das contribuições da HPU na inflamação da mucosa gástrica. 1. A colonização da mucosa gástrica se dá pela alcalinização do meio através a atividade da HPU citoplasmática. 2. A bactéria adere-se à superfície apical das células endoteliais e libera fatores de virulência como VacA e CagA. A lise bacteriana dispersa HPU no meio extracelular, e parte dessas liga-se à superfície de outras *H. pylori*. A HPU contribui com a desestabilização da junções célula-célula, aumentando a permeabilidade do epitélio. 3. HPU chega à lamina basal – HPU ativa plaquetas e neutrófilos via lipoxigenase, recruta neutrófilos até o local da infecção. HPU inibe a apoptose dos neutrófilos interferindo nos níveis de Bad e Bcl-xL. 4. Neutrófilos ativados por HPU liberam ROS causando danos ao tecido adjacente. Adaptado de Uberti e colaboradores (2013).

A HPU teve efeito anti-apoptótico também em células epiteliais gástricas, com aumento nos níveis de Bcl-XL e diminuição no conteúdo de BAD. Após 10 minutos de exposição, a HPU foi internalizada rapidamente por células epiteliais gástricas, num processo dependente de colesterol. A HPU induziu a expressão de fatores pró-angiogênicos e a diminuição da expressão de fatores anti-angiogênicos em células gástricas da linhagem AGS. Um forte efeito pro-angiogênico da HPU foi constatado pela formação de estruturas semelhantes a tubos por células endoteliais vasculares umbilicais humanas (HUVECs). Adicionalmente, a HPU induziu a formação de novos vasos no modelo de membrana corioalantóide de embrião de frango (Olivera-Severo et al., 2017).

O papel das subunidades da urease nas doenças causadas por *H. pylori* ainda não é claro, ainda mais sabendo que esse patógeno secreta OMVs (*outer membrane vesicles*) contendo urease e suas subunidades (Olofsson et al., 2010). A interação de HpUreB com CD74 em células epiteliais gástricas estimula a produção de IL-8 e ativação de NF-κB (Beswick et al., 2006) e a interação com linfócitos Th17 (Zhang et al., 2011). Uma possível interação da HpUreA diretamente com células AGS foi postulada, já que nas células incubadas com OMVs foi observado translocação de HpUreA para o núcleo celular (Olofsson et al., 2010). Corroborando esses dados, foi identificado um peptídeo de sinalização nuclear 21KKRKEK26 nessa subunidade (Lee et al., 2012). A HpUreA foi localizada também no núcleo de células COS-7 (Lee et al., 2012), acompanhando alterações nesta linhagem celular (Lee et al., 2015). Em relação à segunda subunidade, foi relatada a interação de anticorpos anti HpUreB com a glicoproteína IIIa de plaquetas, e discutida a importância dessa interação na trombocitopenia púrpura (Bai et al., 2009; Muhammad 2017).

1.4 Plaquetas na hemóstase, inflamação e sistema imune

Inicialmente, as plaquetas eram vistas como espectadoras na hemostasia, agora é evidente que de fato são mediadoras-chave na trombose, assim como na inflamação (Bhatt e Topol, 2003). Plaquetas são células sanguíneas especializadas do sistema imunitário inato, que desempenham um papel central em processos fisiológicos e patológicos, como inflamação, metástase tumoral, cicatrização e defesa a patógenos.

Muito embora sejam células anucleadas, estas possuem quantidades relevantes de RNA armazenado na forma de polissomos. Sob determinados estímulos, esses pré-mRNAs são rapidamente processados e traduzidos em proteínas funcionais (Lindemann et al., 2001). Plaquetas são uma fonte de IL-1 β e, quando ativadas, expressam-na em suas membranas, sinalizando para outras células, induzindo a inflamação e promovendo a adesão celular (Gawaz et al., 2000).

Plaquetas armazenam uma grande quantidade de diferentes moléculas, em seus mais de 60 grânulos/célula, as quais atuam na ativação de outras células e na resposta inflamatória (Vieira-de-Abreu et al., 2012). Existem 4 tipos de grânulos nas plaquetas: 1) grânulos alfa, maiores e mais numerosos, possuem uma grande variedade de proteínas, como P-selectina; 2) grânulos densos, menores e menos numerosos, acumulam pequenas moléculas como ADP, ATP e serotonina; 3) grânulos lisossomais, que contém glico-hidrolases e enzimas proteolíticas (Koseoglu e Flaumenhaft, 2013) e; 4) grânulos T, os de descrição mais recente, participam na sinalização por TLR9 (Thon et al., 2012). Esse imenso arsenal de moléculas dá às plaquetas a capacidade de participar de vários processos e possibilita um amplo espectro de possíveis interações, moduladas por vários receptores de membrana e integrinas (Cimmino e Golino, 2013; Thomas e Stoney, 2015; Koenen, 2016). Somado a isso, sob

ativação, as plaquetas liberam microvesículas que podem modular a coagulação, respostas imunes e processos inflamatórios distantes do local de ativação (Vajen et al., 2015).

Plaquetas ativadas sofrem modificações na organização das proteínas do citoesqueleto, resultando numa mudança de forma (*shape-change*) com extensiva formação de pseudópodos e reorganização da membrana externa da célula (Fox, 1993). Os grânulos se centralizam e se fundem com a membrana plasmática, e por exocitose, ocorre secreção do conteúdo dos diversos grânulos. Contudo, existem evidências que demonstram que as plaquetas sofrem ativação em diferentes graus (reversíveis ou irreversíveis) (Heijnen e van der Sluijs, 2015), levando estas a adquirirem um perfil adaptado frente ao estímulo recebido (Stalker et al., 2013). Entre os processos não clássicos nos quais as plaquetas podem atuar estão as respostas imunes adaptativas e inatas, e a angiogênese; porém os mecanismos por trás da ação dessas células não estão bem esclarecidos.

Entre os agonistas fisiológicos das plaquetas, o difosfato de adenosina (ADP), armazenado nos grânulos densos e liberado na ativação plaquetária, potencializa a secreção e estimula células próximas a secretarem os seus grânulos, em uma alça de retroalimentação positiva (Jurk e Kehrel, 2005). O *pool* de cálcio intracelular das plaquetas, armazenado em um sistema de túbulos, é mobilizado durante a ativação, sendo esse cálcio o principal gatilho na ativação e agregação plaquetária (Nesbitt et al., 2003). Além disso, proteínas como a P-selectina, secretada durante a ativação, são mediadores da interação das plaquetas com neutrófilos e monócitos (Singbartl et al., 2001).

Dentre os muitos receptores de membrana das plaquetas destaca-se a integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ou glicoproteína IIbIIIa - GPIIbIIIa), que está envolvida na mediação da agregação e ligação entre plaquetas, através de pontes de fibrina-fibrinogênio. Essa integrina é um importante receptor de fibrinogênio e pode ser estimulada tanto por agonistas solúveis, bem como por

fibrinogênio imobilizado, acionando uma cascata de sinalização, que gera o aumento de cálcio intracelular e exposição de fosfatidil-serina, e mediando a agregação (Koenen, 2016).

As plaquetas têm capacidade de aderir ao colágeno, principal componente da matriz subendotelial, através da interação deste com receptores específicos como a glicoproteína VI (GPVI) e a glicoproteína Ia/IIa (GPIa/IIa) (Clemetson e Clemetson, 2001). A GPVI desempenha um importante papel na sinalização induzida por colágeno, além de ser o receptor majoritário de colágeno nessa célula.

A GPVI é um membro da família das imunoglobulinas, associada ao receptor Fc cadeia γ (Polgar et al., 1997; Kehrel et al., 1998; Clemetson et al., 1999 Jandrot-Perrus et al., 2000). A GPVI é expressa na superfície das plaquetas como um complexo não-covalente, com uma subunidade sinalizadora, a cadeia γ comum dos imunoreceptores (Jandrot-Perrus et al., 2000; Gibbins et al., 1997). A GPVI participa na adesão das plaquetas ao subendotélio e ativação plaquetária induzida por colágeno, que resulta na agregação mediada pela secreção de ADP e síntese de tromboxana A₂, e oferece uma superfície procoagulante para a formação de trombina (Moroi et al.,1989; Nieswandt et al., 2001; Nieswandt e Watson, 2003). Além de mediar a resposta voltada à agregação plaquetária desencadeada por altas doses de colágeno, a GPVI também está envolvida no efeito inflamatório em resposta à baixas doses desse mesmo agonista. Essa glicoproteína pode estimular a liberação de imunomoduladores e reguladores da permeabilidade celular, atuando como um receptor com características imunológicas (Ollivier et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Considerando resultados anteriores do nosso grupo, que demonstraram que ureases de diferentes fontes, inclusive a HPU, podem causar efeitos biológicos de forma independente da atividade ureolítica, nesta tese tivemos como objetivo central aprofundar os estudos visando compreender a ativação de plaquetas humanas por HPU. Buscamos também verificar a potencial contribuição das células ativadas pela HPU na inflamação e modulação da imunidade, relevantes em patologias extra gástricas associadas a infecção por *Helicobacter pylori*.

2.2 Objetivos específicos:

- a) Realizar estudos de estrutura *versus* atividade para a ativação de plaquetas humanas por HPU;
- b) Avançar a compreensão dos mecanismos de ativação plaquetária por HPU e a participação de glicoproteínas da plaqueta como seus possíveis receptores;
- c) Verificar se a HPU e suas subunidades são capazes de induzir em plaquetas humanas o processamento de pré-mRNA de moléculas pró inflamatórias.

3 MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais, métodos e resultados estão apresentados na forma de um manuscrito submetido à *Frontiers in Microbiology*, submetido no dia 20 de setembro de 2017. Recebeu pareceres de 4 revisores, e a versão revisada foi re-submetida no dia 18 de novembro de 2017. O artigo foi aceito para publicação no dia 24 de novembro de 2017 conforme a carta do editor anexa ao final desta tese.

Esse manuscrito é uma compilação de resultados do meu mestrado e do doutorado. Na dissertação de mestrado foram obtidos os dados mostrados nas figuras 1, parte da 2, e a figura S2 do artigo.



The Impact of *Helicobacter pylori* Urease upon Platelets and Consequent Contributions to Inflammation

Adriele Scopel-Guerra^{1†}, Deiber Olivera-Severo^{1,2†}, Fernanda Staniscuaski^{1,3}, Augusto F. Uberti^{1,4}, Natália Callai-Silva¹, Natália Jaeger⁵, Bárbara N. Porto⁵ and Celia R. Carlini^{6*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Wesley H. Brooks,
University of South Florida, Tampa,
United States

Reviewed by:

Andrew S. Day,
University of Otago, New Zealand
Alireza Sadjadi,
Tehran University of Medical Sciences,
Iran
Abdul Sadiq,
University of Malakand, Pakistan

*Correspondence:

Celia R. Carlini
celia.carlini@pucrs.br

[†]These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 20 September 2017

Accepted: 24 November 2017

Published: 12 December 2017

Citation:

Scopel-Guerra A, Olivera-Severo D,
Staniscuaski F, Uberti AF,
Callai-Silva N, Jaeger N, Porto BN and
Carlini CR (2017) The Impact of
Helicobacter pylori Urease upon
Platelets and Consequent
Contributions to Inflammation.
Front. Microbiol. 8:2447.
doi: 10.3389/fmicb.2017.02447

¹ Center of Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ² Department of Biology, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, São Luiz Gonzaga, Brazil, ³ Department of Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁴ Institute of Biology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil, ⁵ Institute of Biomedical Research, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁶ Brain Institute (BRAINS-InsCer), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Gastric infection by *Helicobacter pylori* is considered a risk factor for gastric and duodenal cancer, and extragastric diseases. Previous data have shown that, in a non-enzymatic way, *H. pylori* urease (HPU) activates neutrophils to produce ROS and also induces platelet aggregation, requiring ADP secretion modulated by the 12-lipoxygenase pathway, a signaling cascade also triggered by the physiological agonist collagen. Here we investigated further the effects on platelets of recombinant versions of the holoenzyme HPU, and of its two subunits (HpUreA and HpUreB). Although HpUreA had no aggregating activity on platelets, it partially inhibited collagen-induced aggregation. HpUreB induced platelet aggregation in the nanomolar range, and also interfered dose-dependently on both collagen- and ADP-induced platelet aggregation. HPU-induced platelet aggregation was inhibited by antibodies against glycoprotein VI (GPVI), the main collagen receptor in platelets. Flow cytometry analysis revealed exposure of P-selectin in HPU-activated platelets. Anti-glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) antibodies increased the binding of FITC-labeled HPU to activated platelets, whereas anti-GPVI did not. Evaluation of post-transcriptional events in HPU-activated platelets revealed modifications in the pre-mRNA processing of pro-inflammatory proteins, with increased levels of mRNAs encoding IL-1 β and CD14. We concluded that HPU activates platelets probably through its HpUreB subunit. Activation of platelets by HPU turns these cells into a pro-inflammatory phenotype. Altogether, our data suggest that *H. pylori* urease, besides allowing bacterial survival within the gastric mucosa, may have an important, and so far overlooked, role in gastric inflammation mediated by urease-activated neutrophils and platelets.

Keywords: inflammation, mRNA processing, IL-1 β , lipoxygenase inhibitors, CD14, GPVI, collagen receptor, platelet aggregation

INTRODUCTION

Diseases caused by *Helicobacter pylori* have a great impact on public health, since this bacterium colonizes the gastric mucosa of half of the world's population, with a higher prevalence in the poorer countries (Parkin, 2004). *Helicobacter pylori* is a major cause of gastric and duodenal pathologies (Ferlay et al., 2013) and it was classified as the first carcinogenic bacterium by the World Health Organization more than 2 decades ago (IARC, 1994). Urease produced by *H. pylori* enables bacterial colonization of the gastric mucosa by catalyzing the hydrolysis of urea into carbon dioxide and ammonia, thereby causing a local pH increase and alterations of the mucus properties that favor the pathogen's survival (Perrais et al., 2014). Urease-negative strains of *H. pylori* were unable to infect the gastric mucosa of germfree piglets, ferrets, or mice (Hu and Mobley, 1990; Eaton et al., 1991; Andrutis et al., 1995).

Helicobacter pylori urease (HPU) accounts for ~10% of total cell protein content (Suzuki et al., 2007). HPU is a large protein, consisting of a dodecameric organization of two subunits (HpUreA, 26.5 kDa; HpUreB, 61.7 kDa; Ha et al., 2001). Structure vs. activity relationships of the non-enzymatic properties of ureases have been so far poorly characterized (Carlini and Ligabue-Braun, 2016). It has been reported that HpUreB interacts with CD74 on gastric epithelial cells inducing IL-8 production (Beswick et al., 2006) and it also binds to Th17 lymphocytes (Zhang et al., 2011). A monopartite nuclear localization signal is present in HpUreA (sequence $_{21}KKRKEK_{26}$), and the protein is able to target the nuclei of COS-7 (Lee et al., 2012) and of AGS gastric epithelial cells, causing alterations of the cellular morphology (Lee et al., 2015). Additionally, *H. pylori* secreted outer membrane vesicles (OMVs) contain urease-related proteins, including HpUreA and HpUreB (Olofsson et al., 2010). Incubation of AGS gastric epithelial cells with *H. pylori* OMVs promoted the translocation of HpUreA into the cell cytoplasm and nuclear localization of the protein (Olofsson et al., 2010).

Epidemiological studies have shown that *H. pylori* infection correlates positively with several extragastric pathologies, such as intestine bowel diseases, cardiovascular and cerebrovascular diseases (Franceschi et al., 2015; Goni and Franceschi, 2016; Kyburz and Muller, 2017). Several hematological diseases such as primary immune thrombocytopenia, iron deficiency anemia, childhood leukemia, and coagulation disorders have been associated with *H. pylori* infection (Papagiannakis et al., 2013). The role of this pathogen (Christodoulou et al., 2011) and of its virulence factors in these extragastric diseases is still controversial, requiring further studies (Muhammad et al., 2017).

We have previously reported that canatoxin (Carlini and Guimaraes, 1981), an isoform of *Canavalia ensiformis* urease (Follmer et al., 2001), presents biological properties that are independent of its enzyme activity, including neurotoxicity, activation of blood platelets (Carlini and Guimaraes, 1981; Carlini et al., 1985; Ghazaleh et al., 1997) and *in vivo* pro-inflammatory activity (Benjamin et al., 1992; Carlini and Ligabue-Braun, 2016; Olivera-Severo et al., 2017). We have also demonstrated that a recombinant HPU activated platelets through a lipoxygenase-mediated pathway, leading to exocytosis

of dense granules and release of adenosine diphosphate (ADP), which then promoted platelet aggregation (Wassermann et al., 2010). Independently of its enzyme activity, HPU displays a potent lipoxygenase-dependent chemotactic effect on neutrophils, both *in vivo* and *in vitro*, causing cell migration in levels comparable to those induced by fMLP (Uberti et al., 2013). HPU activated human neutrophils eliciting extracellular ROS production and protected neutrophils as well as cultured gastric epithelial cells against apoptosis, interfering on the levels of mitochondrial proteins regulating this process (Uberti et al., 2013; Olivera-Severo et al., 2017). Recently we reported on the angiogenic potential of HPU, a property that could have implication in the invasion and metastization of gastric tumors (Olivera-Severo et al., 2017).

Platelets are anucleated cells involved, aside of hemostasis and thrombi formation, in physiological processes such as tissue regeneration, angiogenesis, inflammation and immunity (Jurk and Kehrel, 2005; Farndale, 2009; Vieira-de-Abreu et al., 2012). Platelets store distinct compounds in granules that, once released, contribute to the immune response (Vieira-de-Abreu et al., 2012) and they produce IL-1 β , a pro-inflammatory cytokine (Lindemann et al., 2001; Morrell et al., 2014). IL-1 β is considered a platelet agonist, which acts through an autocrine loop to link thrombosis and immunity, signaling to endothelial cells and promoting neutrophil adhesion (Brown et al., 2013). Platelet activation leads to a sustained synthesis of the pro-IL-1 β protein, which accumulates in the platelets' cytosol until cleavage to release the cytokine (Lindemann et al., 2001). Platelets interact with components of the subendothelial matrix, with different immune cells and many pathogens (Clemetson, 2011; Morrell et al., 2014) and participate in cancer metastasis (Jurk and Kehrel, 2005; Farndale, 2009). Platelets signal the innate immune system through the release of microparticles and NET formation (Italiano et al., 2010; Carestia et al., 2016). These various characteristics of platelets enable a large spectrum of possible cell interactions and modulation by different membrane receptors (Cimmino and Golino, 2013; Thomas and Storey, 2015).

Collagen, the main component of the subendothelial matrix, promotes adhesion and activation of platelets. Several platelet collagen receptors are involved in these events (Clemetson and Clemetson, 2001). Among them, glycoprotein VI (GPVI), a member of the immunoglobulin superfamily of receptors (Clemetson et al., 1999; Jandrot-Perrus et al., 2000), plays a crucial role in the responses of platelets to collagen. GPVI participates in platelet adhesion to the subendothelium matrix and triggers a collagen-induced activation, resulting in a thromboxane A₂- and ADP-mediated aggregation thus providing a procoagulant surface for thrombin formation (Moroi et al., 1989; Nieswandt et al., 2001; Nieswandt and Watson, 2003). Collagen binding to GPVI receptor involves signaling through the 12-lipoxygenase pathway (Coffey et al., 2004a,b). On the other hand, when platelets are exposed to low collagen doses, activation through GPVI leads to a secretory phenotype accompanied by release of their dense- and alpha granules' contents, but without changing the platelets into their prothrombotic state (Ollivier et al., 2014).

In this study, we aimed to elucidate the mechanism underlying the activation of platelets exposed to an enzymatically active HPU holoenzyme and to its subunits HpUreA and HpUreB. To that aim, we performed aggregation assays and investigated the roles of platelet's glycoprotein VI and IbIIIa in HPU-induced and subunits-induced responses. Furthermore, we analyzed expression of P-selectin and the processing of pre-mRNAs in platelets treated with these proteins.

MATERIALS AND METHODS

Helicobacter pylori Urease (HPU)

A recombinant *Helicobacter pylori* urease (HPU) was produced by heterologous expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIL transformed with a PGEM-T-easy (Promega) plasmid carrying the whole urease operon (kindly provided by Dr. Barbara Zambelli, Università di Bologna, Italy). HPU was purified from bacterial extracts according to Olivera-Severo et al. (2017). Protein homogeneity was checked by 0.1% sodium dodecyl sulfate 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Figure S1A). Previous to the experiments, a 0.5 mg protein.mL⁻¹ solution was dialyzed against 20 mM sodium phosphate 150 mM sodium chloride, pH 7.5 (PBS 7.5), and the buffer from the last dialysis change was used as a negative control in the bioassays.

Fluorescent HPU was prepared by incubation of a 1.0 mg.mL⁻¹ solution of urease with 0.1% fluorescein isothiocyanate (FITC) in PBS 7.5 for 60 min at 4°C. The mixture was exhaustively dialyzed against PBS 7.5 and then applied into a Fast-Desalting column (Amersham Biosciences) to remove any unbound FITC (Wassermann et al., 2010).

Helicobacter pylori Urease Isolated Subunits

The subunits of *Helicobacter pylori* urease, HpUreA and HpUreB, were produced in *Escherichia coli* BL21 (DE3)-RIL transformed with pET101/D-TOPO (Thermo Fisher Scientific) plasmids containing the cDNA encoding each of the subunits (a generous gift from Dr Cesare Montecucco, Università di Padova, Italy). Bacteria were grown in Luria broth with the antibiotics chloramphenicol (Sigma Aldrich, USA; 40 µg.mL⁻¹) and ampicillin (Sigma Aldrich, USA; 100 µg.mL⁻¹) for maintenance of the plasmids. The His-tagged subunits HpUreA and HpUreB were purified from bacterial extracts as follows: after cultivation, cells were harvested by centrifugation, suspended in extraction buffer (20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, 5 mM imidazole, pH 7) and lysed using an ultrasonic homogenizer (10 pulses of 30 s) in an ice bath. After centrifugation (20 min, 20,000 × g, 4°C), the homogenates were submitted to Ni²⁺ affinity chromatography on a 5 mL Chelating Sepharose Fast Flow column (GE Healthcare Life Sciences). After removal of the unbound proteins, the column was eluted stepwise with 300 mM imidazole in 20 mM sodium phosphate, 500 mM sodium chloride, pH 7.0 to obtain HpUreA- and HpUreB-enriched fractions. For the last step of purification, the fractions from the Ni²⁺-affinity step were concentrated in Amicon devices with 10 kDa cut-off (Millipore, Belford, MA, USA), applied into

a Superdex S200 Hi-load column mounted in a Akta Purifier system (GE Healthcare Life Sciences), equilibrated in PBS 7.5. The protein fractions were analyzed by SDS-PAGE and by Western blots (Figure S1B), pooled and concentrated in Amicon devices (10 kDa cut-off) to a concentration of 0.5 mg.mL⁻¹.

Protein Determination

The protein content of samples was determined by absorbance at 280 nm, or by the Coomassie dye binding method (Bradford, 1976).

Urease Activity

The urea hydrolyzing activity of HPU was measured by the alkaline nitroprussiate method (Weatherburn, 1967) using ammonium sulfate as reference, to follow the purification of the holoenzyme.

Platelet Aggregation

Rabbit platelets were used in the aggregation assays. Animal care and handling followed international guidelines and all protocols were approved by the institutional Ethics Committee (UFRGS process 721.217). Platelet aggregation assays were performed essentially as described by Wassermann et al. (2010) using two different turbidimetric assays. For platelet aggregation assays performed in a plate reader (SpectraMax[®] M3, Molecular Devices), agonists were added to 100 µL aliquots of PRP, without or with inhibitors, to make 150 µL final reaction volume in 96 wells flat bottom plates, with absorbance readings at 650 nm every 11 s during 20 min. For platelet aggregation using a Lummi-aggregometer (Chrono-Log Corp.), after pre-incubation of PRP (300 µL) for 2 min under continuous stirring at 37°C, aggregation was triggered by addition of the agonist (maximal volume 30 µL) and the reaction was registered during 10 min. In both assays, platelet's response was quantified as area under the aggregation tracings. Response to the physiological agonist collagen (bovine tendon, 50 µg.mL⁻¹) or ADP (10 µM) (final concentrations) was taken as positive control of platelet activation.

In some of the experiments, platelets were pre-incubated at room temperature without stirring with HPU subunits, inhibitors or antibodies before addition of the platelet agonist: eicosanoid synthesis inhibitors esculetin (0.5 and 1 mM) and indomethacin (75–300 µM); antibodies against platelet glycoproteins GPVI or IbIIIa, or anti-platelet cell markers (see the following sections for more details).

Platelet Isolation

Peripheral human blood of healthy volunteers was obtained in the presence of 0.313% (w/v) sodium citrate. Written informed consent was obtained from the participants of this study. All procedures regarding blood collection and handling were conducted in strict accordance to Brazilian legislation (Law no. 6.638/1979) and were approved by the institutional Ethics Committee (UFRGS process 721.217).

Human platelets were isolated according to Ollivier et al. (2014) with some modifications; briefly, a platelet-rich plasma (PRP) was separated from whole blood by centrifugation at 200 g

for 15 min. For flow cytometry assays (see below), the platelets were pelleted from PRP by an additional centrifugation step ($800 \times g$, 10 min), and washed 3 times ($800 \times g$, 10 min) with a modified Tyrode's buffer (3.6 mM citric acid, 0.5 mM glucose, 0.5 mM KCl, 0.1 mM $MgCl_2$, 10.3 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ pH 6.5). After the third wash, the platelets were suspended in the reaction buffer (5 mM HEPES, 12 mM $NaHCO_3$, 137 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 0.3 mM NaH_2PO_4 , 1 mM $MgCl_2$, 5.5 mM glucose, pH 7.4). For quantitative PCR, washed platelets were immunolabeled as CD61 positive cells and separated in a MidiMACS LS column (Miltenyi Biotec) according to manufacturer's instructions.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

For RNA extraction, the isolated platelets were suspended in reaction buffer to a final cell concentration of $10^7 \cdot mL^{-1}$. Platelets were incubated with $50 \mu g \cdot mL^{-1}$ collagen or 100 nM urease, HpUreA or HpUreB, in reaction buffer, without stirring (to avoid aggregation), at $37^\circ C$, for 30, 90, and 180 min. Total RNA was extracted immediately after the stimuli, using TriZol reagent (Ludwig Biotec), following the manufacturer's instructions. cDNA synthesis from total RNA was performed with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems/ThermoFischer Scientific), following the manufacturer's instructions, using random primers.

Pro-Inflammatory Expression Profile Analysis

Real time quantitative PCR was performed to compare CD14, interleukin-1 beta (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) genes expression levels in platelets challenged by collagen, the holoenzyme HPU, and by the HpUreA and HpUreB subunits, in three different time intervals at $37^\circ C$, without stirring. The beta actin gene was used (Zsori et al., 2013) to normalize the RNA content of the samples. Gene specific primers were designed to span exon junctions (Table S1). Reactions were carried in an Eco thermocycler (Illumina), using the qPCR-Sybr Green kit (Ludwig Biotec), and following the parameters: $95^\circ C$ for 5 min (initial denaturation), 40 cycles at $95^\circ C$ for 10 s (denaturation), $60^\circ C$ for 15 s (annealing), $72^\circ C$ for 15 s (extension). Melting curves were performed at the end of each reaction, with temperatures ranging from 55 to $95^\circ C$ (increments of $0.1^\circ C/s$). All cDNA samples were diluted 1:5. Reactions were carried out in technical quadruplicates from two independent biological replicates. Results were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (Livak and Schmittgen, 2001).

Flow Cytometry Analysis

Platelets ($5 \mu L$ of PRP) kept at $37^\circ C$ without stirring were stimulated with 100 nM or 300 nM HPU, $25 \mu g \cdot mL^{-1}$ collagen, for 1, 5, and 10 min. Resting platelets (negative controls, no addition) and stimulated platelets in $50 \mu L$ of reaction buffer were stained with FITC-labeled anti-CD42 (GP1b) (1:25) (Abcam) and PerCP-labeled anti-CD62P (P-selectin) (1:5) (Abcam) antibodies for 20 min, at room temperature in the dark. After the incubation period, platelets were fixed with 1% paraformaldehyde. Platelets

were identified by gating on platelets' size on the basis of forward scatter (FSC) and side scatter (SSC), followed by CD42 expression, a platelet marker. A total of 20,000 events were analyzed for MFI/percentage of CD62P expression. Data were acquired using a FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson) with BD FACSDiva software and analyzed by Flowjo[®] vX.

In another set of experiments, platelets were previously treated with polyclonal anti-GPVI (1:10) (Santa Cruz Biotech) or monoclonal anti-IIbIIIa (1:10) (Santa Cruz Biotech) for 20 min at room temperature and then stimulated with 100 nM FITC-conjugated HPU for 1, 5, and 10 min at $37^\circ C$. Platelets not treated with the antibodies nor exposed to HPU served as negative controls. After the incubation period, cells were fixed with 1% paraformaldehyde. Platelets were identified as described before. A total of 50,000 events were analyzed for percentage of FITC-positive cells. Data were acquired using a FACSCanto II (Beckton Dickinson) with BD FACSDiva software and analyzed by Flowjo[®] vX.

Statistical Analysis

The statistical significance of the differences between two groups was assessed using the unpaired Student's *t*-test. For multiple comparisons a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed, and the Tukey *post hoc* test was used to calculate significance. GraphPad Prism6 software (San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analysis. Statistically significance was set at *p*-value ≤ 0.05 . Data in graphs represent mean \pm standard error of the mean (SEM) of at least three experiments, unless otherwise stated.

RESULTS

Effects of HPU Subunits on Platelet Aggregation

Our previous study has shown that HPU induces aggregation of rabbit platelets in nanomolar concentrations (Wassermann et al., 2010). To test if the isolated subunits also induce this effect, HpUreA and HpUreB were tested as platelet agonists. While HpUreB induced platelet aggregation in a dose dependent manner (Figures 1A,B), HpUreA had no activity under the same conditions. As reported for HPU, aggregation induced by HpUreB in rabbit platelets also depends on the production of lipoxygenase-derived eicosanoids (Figures 1C,D), as indicated by the inhibitory effect of esculetin, which blocks the platelet 12-lipoxygenase, and by the potentiating effect of the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin (Figures 1E,F) (Wassermann et al., 2010). To investigate whether the isolated subunits could interfere in the aggregation triggered by the physiological agonists collagen or ADP, the platelets were previously incubated without stirring with HpUreA or HpUreB, and then challenged with the agonists (Figure 2). Surprisingly, considering the lack of direct effect of HpUreA, both subunits caused a dose-dependent inhibition of platelets' response to the agonists (Figure 2A). HpUreB was more effective than HpUreA in inhibiting platelet's response to collagen or ADP (Figure 2B). Moreover, HpUreB apparently interfered in the second wave of aggregation, abruptly

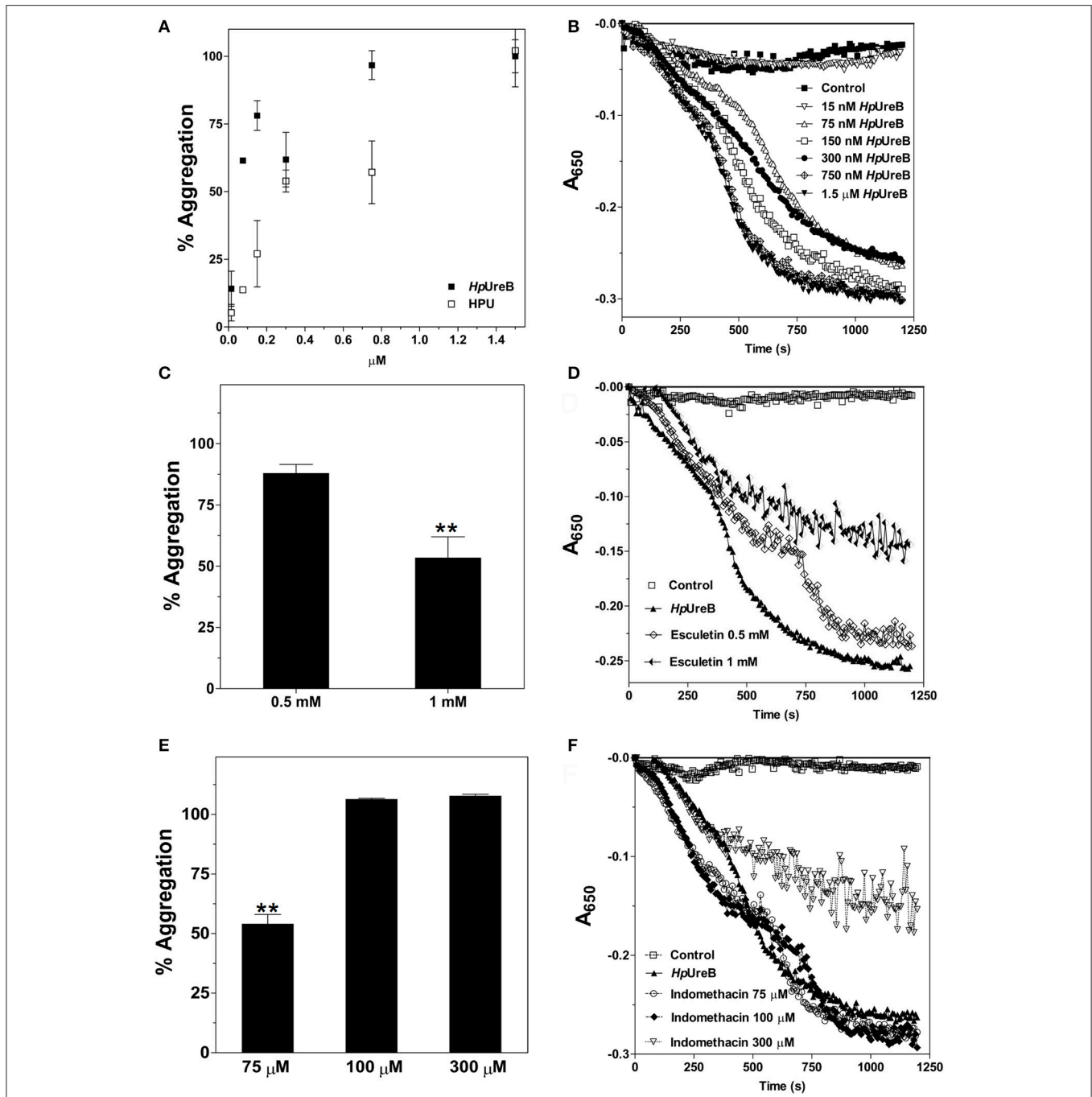
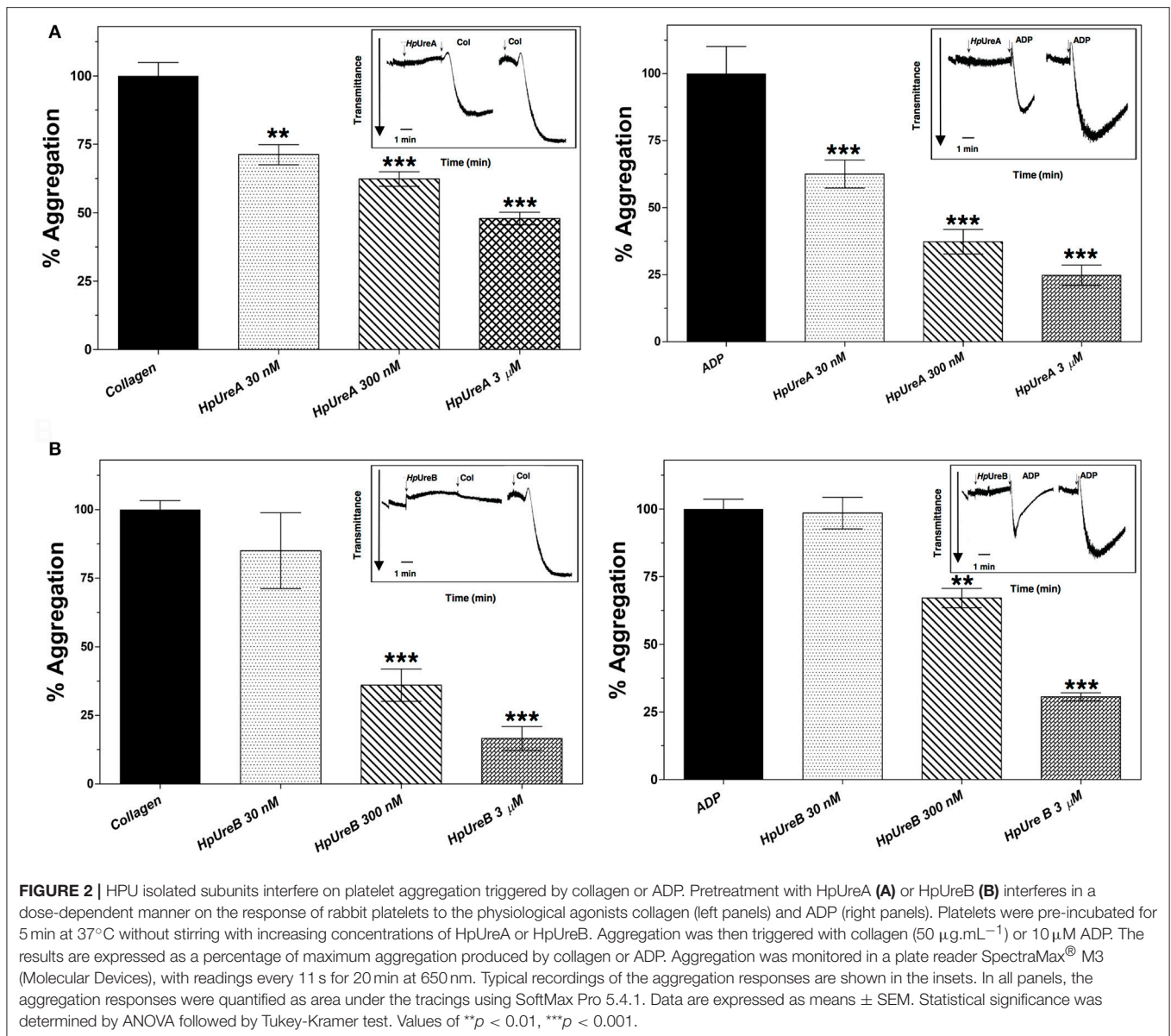


FIGURE 1 | Effects of HPU subunits on platelet aggregation. **(A,B)** HpUreB induces platelet aggregation in a dose dependent manner. **(A)** Aggregation of rabbit platelets was induced with the indicated final concentrations of HPU (open symbols, results taken from Wassermann et al., 2010) and HpUreB (closed symbols, this work). Aggregation induced by HPU or HpUreB at 1.2–1.4 μM was considered 100%. **(B)** Superimposed tracings of aggregation induced by different HpUreB concentrations as measured in the plate reader. **(C–E)** HpUreB-induced platelet aggregation depends on lipoxygenase-derived eicosanoid(s). Platelets were pretreated with the inhibitors of eicosanoids synthesis, esculetin (a 12-lipoxygenase inhibitor) **(C,D)** and indomethacin (a cyclooxygenase inhibitor) **(E,F)** at room temperature for 5 min without stirring. Aggregation was triggered by addition of 750 nM HpUreB (time zero), and after 2 min at 37°C stirring was turned on. Platelets response was monitored on SpectraMax M3 plate reader, with readings at 650 nm every 7 s for 20 min. Superimposed individual tracings of typical experiments are shown in **(B,D,F)**. Aggregation responses were quantified as area under the tracings using SoftMax Pro 5.4.1 **(A,C,E)**. Data are expressed as means ± SEM. Statistical significance was determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer test. Values of ***p* < 0.01.

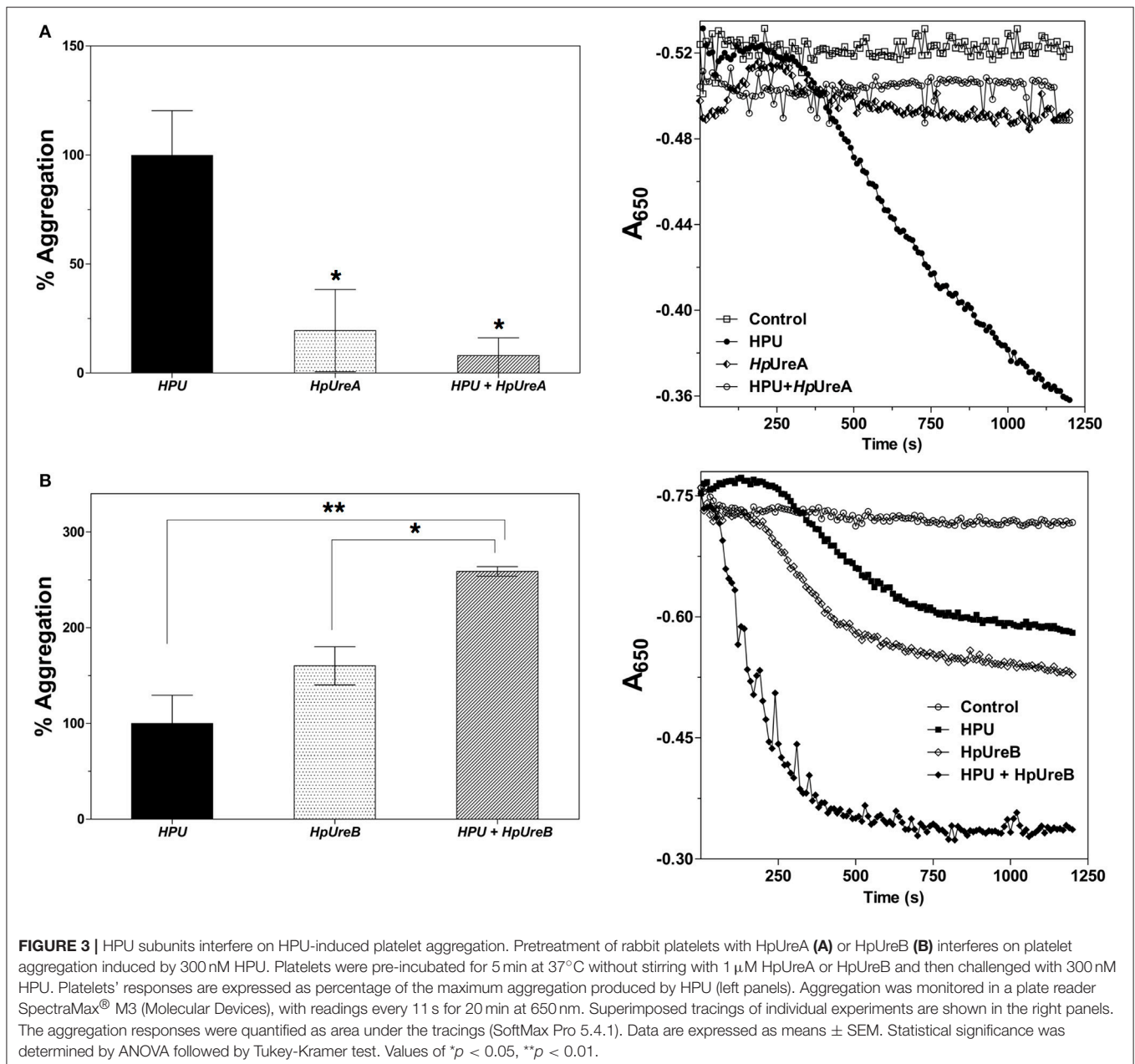


blocking the progression of aggregation in response to released ADP (Figure 2B, right panel), an effect not seen in HpUreA-treated platelets. HpUreA and HpUreB also interfered in the HPU-induced platelet aggregation (Figure 3). While 1 μM HpUreB had a synergistic effect on platelets activated by 300 nM HPU, increasing the aggregation response by 150% (Figure 3A), 1 μM HpUreA decreased the aggregation response by 75% (Figure 3B).

HPU Interaction with Platelet Membrane Receptors

Activation of human platelets by 100 and 300 nM HPU induced P-selectin exposure in a subpopulation of these cells (Figure 4A). This effect occurred immediately after addition of HPU and persisted for at least 10 min. Other signs of activation were also seen, such as increase in the cellular size

and membrane complexity (Figure S4). Previously we have hypothesized (see Wassermann et al., 2010) that, in rabbit platelets, HPU may recruit the same signaling pathway triggered by collagen. Considering that anti-GPVI antibodies almost completely blocked HPU-induced aggregation (Figure S2), here we investigated whether HPU interacts with platelets receptors. For that aim pretreatments of human platelets with either anti-GPVI, the main collagen receptor, or anti-GPIIb/IIIa, implicated in platelets' activation by fibrinogen and von Willebrand factor, were carried out. Surprisingly, after blockade of GPIIb/IIIa by the antibodies, there was an increase in HPU binding to platelets (Figure 4B, left panel). We could not observe reactivity of the employed commercial polyclonal anti-GPIIa/IIIb antibodies against HpUreB under our experimental conditions (Figure S3). Nonetheless, the signs of platelet activation (increased cell size) could no longer be seen, thereby confirming that HPU-induced

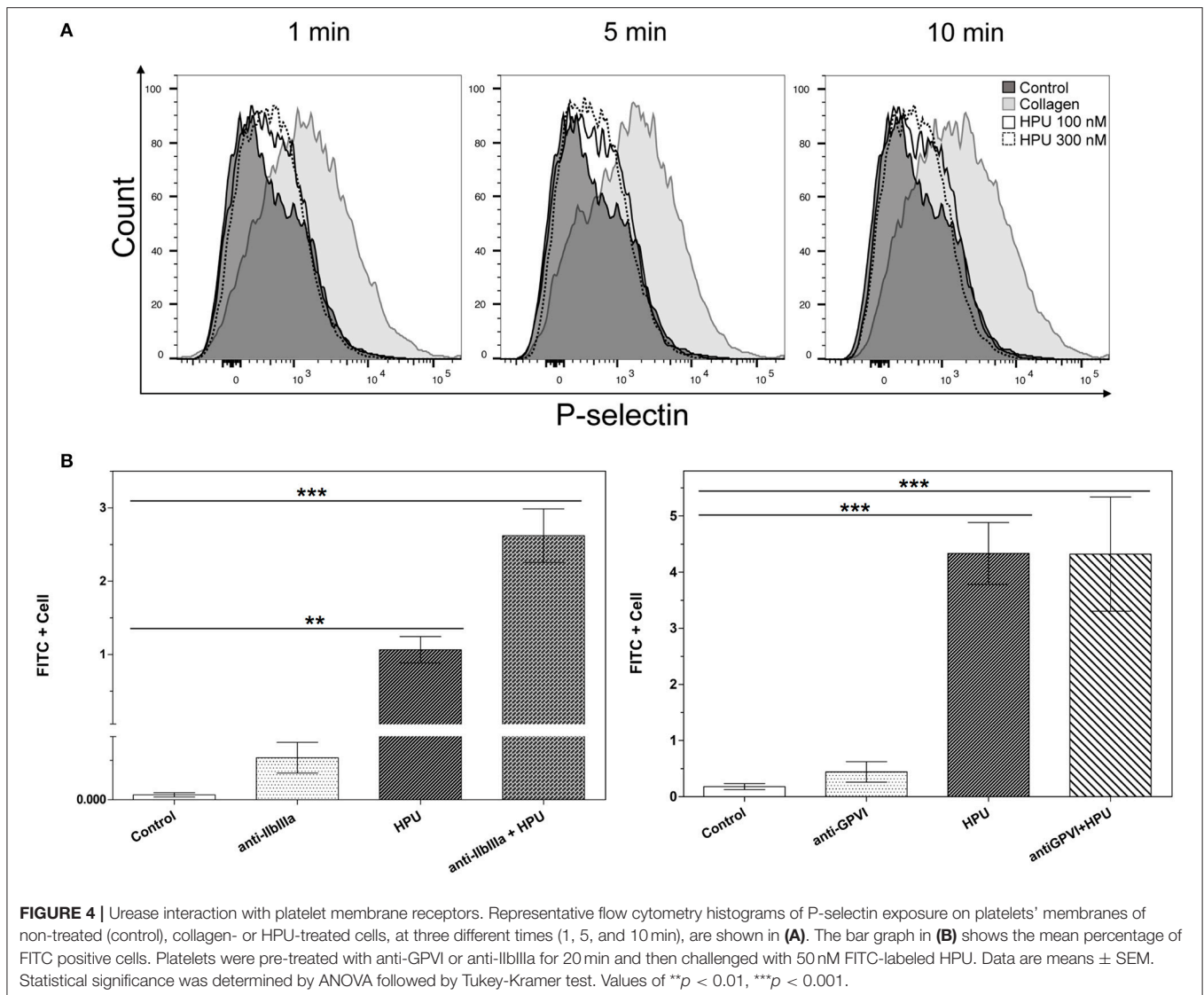


platelet activation somehow involves binding to the platelet membrane, if not directly to, at least in the vicinity of, this physiologically relevant receptor. On the other hand, the binding of FITC-labeled HPU to platelets was not affected by either mono- or polyclonal antibodies against GPVI (Figure 4B, right panel).

Urease and Its Subunits Modify Pre-mRNA Processing in Platelets

To evaluate the processing of pre-mRNA in platelets, qPCR analysis was performed after platelets treatment with HPU or its subunits. Collagen-activated platelets were used as positive controls. Collagen increased the IL-1β mRNA processing levels

(Figure 5A), peaking at 30 min of treatment and then gradually decreasing to reach levels below the controls in 3 h-treated platelets. Differently, HPU-treated platelets decreased the process in the short treatment (30 min) and then gradually increased IL-1β pre-mRNA processing to reach, after a 3 h treatment, levels similar to those seen in collagen-treated platelets at 30 min (Figure 5A). Exposure of platelets to either HPU's subunits modified the IL-1β mRNA processing, but with different patterns as compared to that produced by the holoenzyme. The time-course of HpUreA's effect was similar to that seen in collagen-exposed platelets. On the other hand, treatment of platelets with HpUreB inhibited IL-1β mRNA processing in all tested times (Figure 5B).



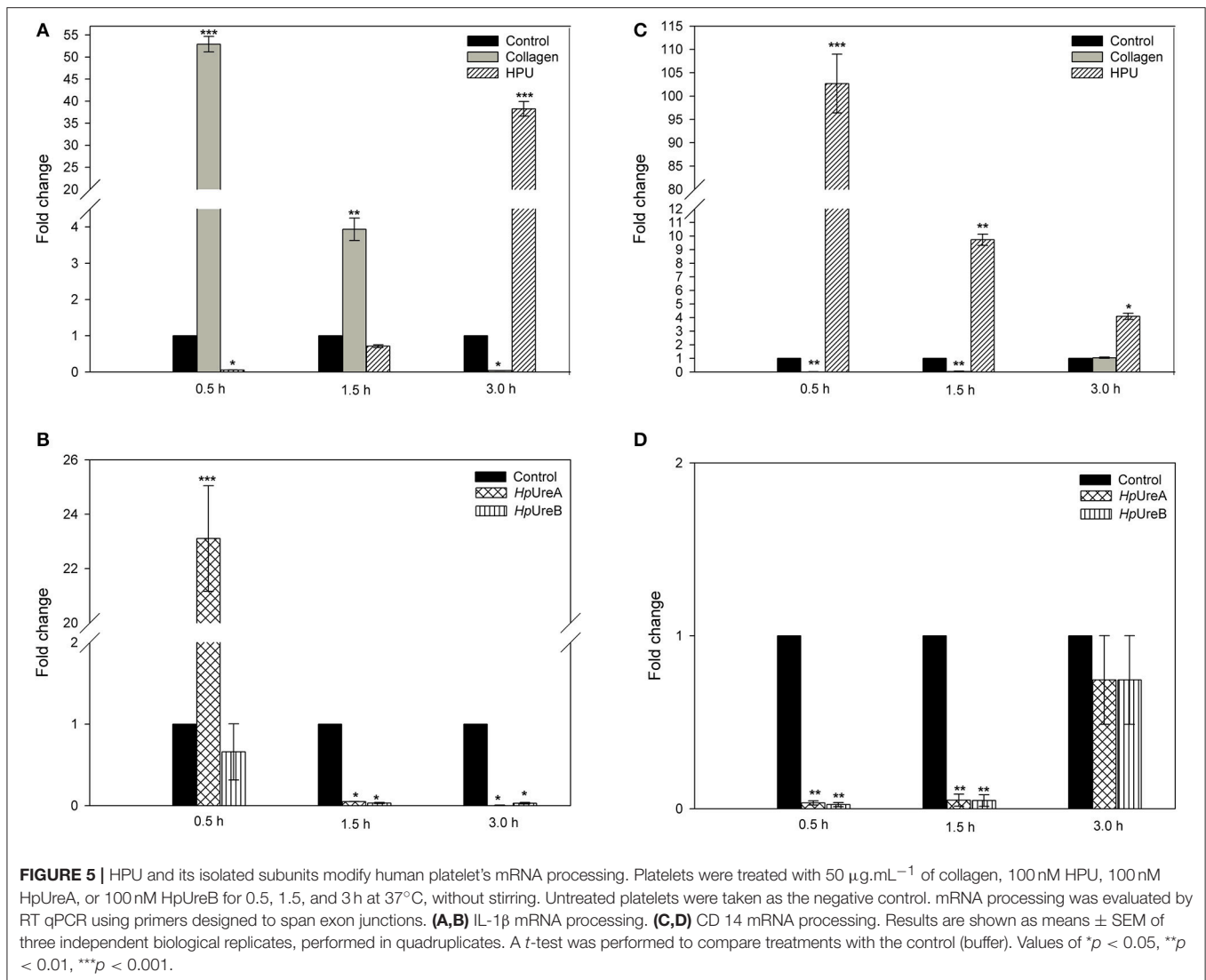
Contrasting with the inhibition observed in collagen-treated platelets (Figure 5C), the processing of CD14 mRNA was greatly enhanced (about 100-fold) in HPU-treated platelets (30 min). The levels gradually decreased to reach levels still 4-fold higher than in resting platelets with 3 h of HPU treatment. Similar to the inhibition patterns seen in collagen-stimulated platelets, HpUreA or HpUreB inhibited the processing of CD14 mRNA up to 1.5 h after treatment, returning to control levels after 3 h (Figure 5D). Neither HPU nor its subunits interfered on the processing of pre-mRNA of COX-2, ICAM-1, or iNOS under the tested conditions.

DISCUSSION

The association of *H. pylori* infection, a pathogen with a global dispersal, with several extragastric pathologies has not gone unnoticed. Besides its well established role in stomach diseases, gastric and duodenal cancer (Ferlay et al., 2013),

epidemiological studies have associated this bacterial infection with cardiovascular and thromboembolic conditions (Manolakis et al., 2007; Papagiannakis et al., 2013) and other extragastric diseases (Franceschi et al., 2015; Goni and Franceschi, 2016; Kyburz and Muller, 2017). The potential contribution of the very abundant bacterial urease to the pathogenesis of these extragastric diseases in *H. pylori* positive patients has been so far mostly overlooked.

Microbial and plant ureases have many non-enzymatic properties, mostly based on induction of exocytosis and recruitment of eicosanoids pathways, among which are neurotoxicity and pro-inflammatory activity (Carlini and Ligabue-Braun, 2016). One of these non-enzymatic properties of ureases, regardless of their source and quaternary structures, is their ability to induce aggregation of blood platelets (Follmer et al., 2004; Carlini and Ligabue-Braun, 2016). This platelet-aggregating effect of ureases is due to their exocytosis-inducing activity which leads to the release of



ADP from platelets' dense granules, and requires the eicosanoid 12-hydroxy-peroxy-eicosatetraenoic acid (12-HPETE), produced by the platelet 12-lipoxygenase (Carlini et al., 1985; Olivera-Severo et al., 2006a,b; Wassermann et al., 2010). These data suggested that platelet aggregation induced by HPU resembles that of collagen-activated platelets through its GPVI receptor, a response reported to also require 12-HPETE synthesis by the activated platelets (Coffey et al., 2004a,b). Back then, we hypothesized that ureases and collagen may recruit similar or overlapping signaling cascades to exert their actions in platelets (Wassermann et al., 2010).

Here, we aimed to deepen the knowledge on how HPU interacts with platelets. Recombinant versions of HPU, and of its two subunits, HpUreA and HpUreB, were produced and platelet aggregation assays, flow cytometry and quantitative PCR were used to analyze how these proteins affect platelets' physiology.

In Wassermann et al. (2010), we reported that 1 μM HPU induced maximal aggregation of rabbit platelets. The response

of rabbit platelets to HPU involved the 12-lipoxygenase, as it could be blocked by esculetin, and the eicosanoid 12-HETE, an oxidized derivative of 12-HPETE, was detected in the medium (Wassermann et al., 2010). Here we showed that HpUreB induces rabbit platelet aggregation in the same molar range as that of the holoenzyme. In contrast HpUreA, even in a 10-fold greater concentration had no platelet aggregating activity. This result reinforces the non-enzymatic nature of the platelet-activating property of HPU, since HpUreB has no enzymatic activity (Ha et al., 2001; Suzuki et al., 2007). Platelets' response to HpUreB required production of lipoxygenase-derived eicosanoids, as could be deduced from the dose-dependent inhibitory effect of esculetin (Figures 1C,D). The fact that pretreatment of platelets with the cyclooxygenase inhibitor indomethacin enhanced platelets' reactivity to HpUreB (Figures 1E,F) is expected for a lipoxygenase-mediated process, in a condition of increased availability of arachidonic acid, which is the substrate of both enzymes (Wassermann et al., 2010). These

data can be interpreted as HpUreB being the HPU's domain active on platelets, and corroborates previous findings showing that this effect does not require the enzyme's ureolytic activity.

Pre-incubation of platelets with either one of the HPU's subunits inhibited, in a dose-dependent manner, the aggregation response to collagen or ADP (**Figure 2**). These data indicate that (1) although not inducing platelet aggregation, HpUreA also interacts with platelets; (2) HPU binds to platelets' membranes through at least two binding sites, one present in each of its subunits; (3) the isolated subunits bind to platelets in the same sites as does HPU itself; and (4) the binding of HPU's subunits partially blocks physiological functions of platelets. While an explanation for these observations is not trivial, the data clearly indicated that the binding sites and/or the type of binding to platelet membrane of the two subunits are quite different, implying that distinct mechanisms of action may underly their effects on platelets. The reason why pre-incubation with either HPU's subunits inhibited the platelet aggregation promoted by collagen or ADP is unclear, considering their effects on HPU-induced aggregation (**Figure 3**). HpUreA inhibited HPU-induced aggregation, which is consistent to its binding to platelets with an antagonist-like behavior. This effect may be related to fact that ureases insert themselves into lipid bilayers thereby affecting membrane physicochemical properties (Piovesan et al., 2014; Micheletto et al., 2016). On the other hand, HpUreB probably interacts specifically with some platelet receptor, as it induces aggregation *per se*, and it acted synergistically with HPU to amplify the aggregating effect (**Figure 3**).

Activation of human platelets (constitutively positive for CD42, or glycoprotein 1b) by HPU in comparison to collagen was studied by flow cytometry following the expression of P-selectin (CD62P) (**Figure 4**). Platelets are known to modulate their degranulation and release of specific granules according to the stimulus (Jonnalagadda et al., 2012). For instance, collagen-activated platelets, when in low concentrations of the agonist, can degranulate and release their granular contents without a significant exposure of P-selectin (Ollivier et al., 2014). Here we demonstrated that HPU-stimulated human platelets, despite their low expression of P-selectin, show signs of activation, and eventually aggregate under favorable conditions.

Fibrinogen binding to GPIIb/IIIa is a requirement for ADP-induced platelet aggregation. We have previously reported that platelet aggregation induced by canatoxin required ADP release and the presence of fibrinogen (Carlini et al., 1985; Follmer et al., 2001). Here we showed that pre-treatment of platelets with antibodies against GPIIb/IIIa enhanced the binding of FITC-labeled HPU to the cells (**Figure 4B**, left panel). Altogether, these results implicate the involvement of GPIIb/IIIa in the ADP-dependent platelet-aggregating effect of ureases. Muhammad et al. (2017) reviewed the mechanisms by which *H. pylori* infection could lead to cardiovascular and thromboembolic diseases, emphasizing that a cross-reactivity between HpUreB and GPIIIa could be the link associating *H. pylori* infection to immune thrombocytopenia. Bai et al. (2009) produced monoclonal antibodies against a recombinant HpUreB and showed that these antibodies cross-reacted with GPIIIa from

normal platelets and partially inhibited aggregation induced by ADP. The binding motif recognized by the monoclonal anti-HpUreB in the platelet GPIIIa was not identified. This cross-reactivity of HpUreB and GPIIIa may be implicated in our observation that platelets pre-treated with anti-GP IIb/IIIa bound more FITC-labeled HPU than did unstimulated platelets (**Figure 4B**). The lack of effect of the anti-GPVI antibodies in preventing HPU binding to platelets does not go against our previous hypothesis that HPU (**Figure 4B**, right panel), and now including HpUreB, share with collagen a lipoxygenase-mediated pathway of platelet activation (Wassermann et al., 2010). However, binding to GPVI seems not to be the feature that explains the similarity of platelets' response to these agonists.

It is well known that platelets participate in the inflammatory process by modulating the activity of other inflammatory cells (Thomas and Storey, 2015; Koenen, 2016). We have previously demonstrated that HPU displays pro-inflammatory activity in the mouse paw edema model, causing an intense eicosanoid-dependent neutrophil infiltration in the tissues (Uberti et al., 2013). In the same study, HPU showed a non-enzymatic, lipoxygenase-dependent, chemotactic effect on human neutrophils, and induced extracellular production of reactive oxygen species (ROS) by the activated cells (Uberti et al., 2013). Our data reinforced results obtained by other groups showing that purified HPU elicited the production of ROS and inflammatory cytokines by human macrophages and primary monocytes *in vitro* (Harris and Granger, 1996; Shimoyama et al., 2003), induced transendothelial migration of T cells (Enarsson et al., 2005) and increased the expression of inducible NO synthase (Gobert et al., 2002). All these activities of HPU contribute to tissue inflammation and injury. Here we investigated whether activation of human platelets by HPU leads to a pro-inflammatory phenotype of these cells.

Platelets have reservoirs of pre-mRNA that are processed into the corresponding mRNA upon stimulation (Denis et al., 2005). Treatment of platelets with collagen, HPU, HpUreA, or HpUreB, modified their processing of IL-1 β and CD14 pre-mRNAs, each protein producing effects with a distinct kinetics. Collagen and HpUreA had similar time pattern for stimulation of IL-1 β pre-mRNA processing, with peaks at 30 min after treatment and then decreasing to levels below control after 3 h (**Figures 5A,B**). The slower but persistent effect of HPU of increasing IL-1 β production 3 h after treatment confirms that this protein changes platelets into a pro-inflammatory phenotype. Further studies are necessary to confirm if the pre-mRNA processing changes observed here impact as well the platelets' protein levels of IL-1 β and CD-14 after exposure to HPU.

Zhang et al. (2009) reported that platelets express TLR4, CD14 and MyD88, the signaling pathway triggered in response to lipopolysaccharides (LPS), as described in other cell types (Funda et al., 2001). CD14 is a co-receptor of various Toll-like receptors (TLRs) present in hematopoietic and non-hematopoietic cells that recognizes PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), triggering the innate immune response and participating in inflammation (Zanoni and Granucci, 2013). Distinct from

collagen and the subunits HpUreA and HpUreB, that lowered CD14 pre-mRNA processing below control levels, HPU greatly enhanced the processing of CD14 mRNA (Figure 5). This result suggests that HPU activates at least part of the signaling pathway triggered by LPS, and the increased expression of CD14 in HPU-activated platelets corroborates their phenotype conversion into pro-inflammatory cells. The absence of CD14 expression in unstimulated platelets, or in platelets stimulated by collagen under normal physiological conditions, in contrast to the increased levels after HPU stimulus, resembles the reaction of intestinal mucosal cells, which only show increased expression levels of CD14 associated to inflammatory processes (Funda et al., 2001).

Similar to cell activation through LPS where a role of CD14 in the induction of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8 expression has been identified (Dentener et al., 1993; Schumann et al., 1994), here we hypothesize that CD14 expression may be modulating the IL-1 β levels in platelets stimulated with HPU. This does not occur when platelets are stimulated with collagen, HpUreA or HpUreB. It has been described that platelets stimulated by LPS (Brown and McIntyre, 2011) or dengue virus (Hottz et al., 2013) process IL-1 β pre-mRNA and that once stimulated, these cells release microparticles loaded with IL-1 β by a mechanism not yet completely elucidated (Hottz et al., 2013). If HPU-stimulated platelets also release microparticles containing IL-1 β , that could be delivered nearby endothelial cells or immune cells responsive to IL-1 β , such as macrophages and lymphocytes, will be a subject of future studies.

The natural existence of any urease's subunits in a free state has never been described thus the relevance of the biological effects described here for HpUreA or HpUreB is uncertain. On the other hand this study provided valuable insights into the structure vs. activity relationships of HPU concerning its effects on platelets. While it became clear that HpUreB carries the major "platelet-active" domain of HPU, the contributions of HpUreA to the platelet activating effect of HPU are less clear. The antagonistic effect of HpUreA against aggregation induced by the physiological agonists ADP and collagen, proved its interaction with platelets' membranes. Moreover only HpUreA increased IL-1 β pre-mRNA processing like HPU did. Thus both HPU subunits contribute to the protein's effect on platelets although in different ways. Another evidence of the existence of two platelet binding sites in HPU is the fact that both of its subunits competed with HPU, partially blocking the aggregating effect of the holoenzyme. In alignment with this conclusion, other studies by our group performed with the isolated subunits of the tri-chained *Proteus mirabilis* urease have identified a "platelet-activating" domain in

one of its small subunits whose sequence is homologous to the C-terminal half of HpUreA (Broll V, unpublished results).

In summary, in this work we have shown that HPU and its subunits affect platelet physiology in ways that may contribute to the pathogenicity of *H. pylori* by other mechanisms besides enabling bacterial survival in the gastric lumen. The pro-inflammatory phenotype of HPU-activated platelets implies altered participation of these cells in many physiological processes, possibly contributing to the development of the extragastric diseases associated to *H. pylori* infection. Altogether our results reinforce the importance of microbial ureases, acting also in non-enzymatic ways, as a virulence factor of pathogenic microorganisms.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS-G and DO-S planned and conducted experiments on the interactions of urease and its subunits with platelets; AS-G, DO-S, and AFU planned and conducted platelet aggregation assays; AS-G, DO-S, AFU, and NC-S produced the recombinant proteins; AS-G and FS planned and conducted mRNA processing experiments; NJ and BP conducted flow cytometry assays; AS-G, DO-S, FS, NJ, and CC have written and revised the manuscript; CC has conceived and coordinated this study.

FUNDING

This work was supported by Brazilian agencies Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Edital 63/2010 Toxinologia, proj. 1205/2011; Edital PosDoc-SUS 2909/2010, proj. 054/2010) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Edital Universal Proc. No. 475908/2012-0 and No. 446052/2014-1). AS-G was a recipient of a CAPES Ph.D. fellowship.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Barbara Zambelli, PhD, from Università di Bologna, Italy, and Cesare Montecucco, PhD, Università di Padova, Italy, for kindly providing the holoprotein (HPU) and HPU's isolated chains constructs.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02447/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Andrutis, K. A., Fox, J. G., Schauer, D. B., Marini, R. P., Murphy, J. C., Yan, L., et al. (1995). Inability of an isogenic urease-negative mutant strain of *Helicobacter mustelae* to colonize the ferret stomach. *Infect. Immun.* 63, 3722–3725.
- Bai, Y., Wang, Z., Bai, X., Yu, Z., Cao, L., Zhang, W., et al. (2009). Cross-reaction of antibody against *Helicobacter pylori* urease B with platelet glycoprotein IIIa and its significance in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Int. J. Hematol.* 89, 142–149. doi: 10.1007/s12185-008-0247-4
- Benjamin, C. F., Carlini, C. R., and Barja-Fidalgo, C. (1992). Pharmacological characterization of rat paw edema induced by canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds. *Toxicon* 30, 879–885. doi: 10.1016/0041-0101(92)90386-J
- Beswick, E. J., Pinchuk, I. V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J. C., Yamaoka, Y., et al. (2006). The *Helicobacter pylori* urease B subunit

- binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect. Immun.* 74, 1148–1155. doi: 10.1128/IAI.74.2.1148-1155.2006
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Brown, G. T., and McIntyre, T. M. (2011). Lipopolysaccharide signaling without a nucleus: kinase cascades stimulate platelet shedding of proinflammatory IL-1 β -rich microparticles. *J. Immunol.* 186, 5489–5496. doi: 10.4049/jimmunol.1001623
- Brown, G. T., Narayanan, P., Li, W., Silverstein, R. L., and McIntyre, T. M. (2013). Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1 β autocrine loop. *J. Immunol.* 191, 5196–5203. doi: 10.4049/jimmunol.1300354
- Carestia, A., Kaufman, T., and Schattner, M. (2016). Platelets: new bricks in the building of neutrophil extracellular traps. *Front. Immunol.* 7:271. doi: 10.3389/fimmu.2016.00271
- Carlini, C. R., and Guimaraes, J. A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicol.* 19, 667–675. doi: 10.1016/0041-0101(81)90104-5
- Carlini, C. R., Guimaraes, J. A., and Ribeiro, J. M. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br. J. Pharmacol.* 84, 551–560. doi: 10.1111/j.1476-5381.1985.tb12940.x
- Carlini, C. R., and Ligabue-Braun, R. (2016). Ureasas as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicol.* 110, 90–109. doi: 10.1016/j.toxicol.2015.11.020
- Christodoulou, D. K., Milionis, H. J., Pappa, P., Katsanos, K. H., Sigounas, D., Florentin, M., et al. (2011). Association of *Helicobacter pylori* infection with cardiovascular disease—is it just a myth? *Eur. J. Intern. Med.* 22, 191–194. doi: 10.1016/j.ejim.2010.11.010
- Cimmino, G., and Golino, P. (2013). Platelet biology and receptor pathways. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 299–309. doi: 10.1007/s12265-012-9445-9
- Clemetson, J. M., Polgar, J., Magnenet, E., Wells, T. N., and Clemetson, K. J. (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to Fc α 1bR and the natural killer receptors. *J. Biol. Chem.* 274, 29019–29024. doi: 10.1074/jbc.274.41.29019
- Clemetson, K. J. (2011). The role of platelets in defence against pathogens. *Hamostaseologie* 31, 264–268. doi: 10.5482/ha-1152
- Clemetson, K. J., and Clemetson, J. M. (2001). Platelet collagen receptors. *Thromb. Haemost.* 86, 189–197.
- Coffey, M. J., Coles, B., Locke, M., Bermudez-Fajardo, A., Williams, P. C., Jarvis, G. E., et al. (2004a). Interactions of 12-lipoxygenase with phospholipase A2 isoforms following platelet activation through the glycoprotein VI collagen receptor. *FEBS Lett.* 576, 165–168. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.007
- Coffey, M. J., Jarvis, G. E., Gibbins, J. M., Coles, B., Barrett, N. E., Wylie, O. R., et al. (2004b). Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circ. Res.* 94, 1598–1605. doi: 10.1161/01.RES.0000132281.78948.65
- Denis, M. M., Tolley, N. D., Bunting, M., Schwartz, H., Jiang, H., Lindemann, S., et al. (2005). Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122, 379–391. doi: 10.1016/j.cell.2005.06.015
- Dentener, M. A., Bazil, V., Von Asmuth, E. J., Ceska, M., and Buurman, W. A. (1993). Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J. Immunol.* 150, 2885–2891.
- Eaton, K. A., Brooks, C. L., Morgan, D. R., and Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* 59, 2470–2475.
- Enarsson, K., Brisslert, M., Backert, S., and Quiding-Jarbrink, M. (2005). *Helicobacter pylori* induces transendothelial migration of activated memory T cells. *Infect. Immun.* 73, 761–769. doi: 10.1128/IAI.73.2.761-769.2005
- Farndale, R. W. (2009). Platelet glycoprotein VI as a mediator of metastasis. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1711–1712. doi: 10.1111/j.1538-7836.2009.03566.x
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., et al. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* 49, 1374–1403. doi: 10.1016/j.ejca.2012.12.027
- Follmer, C., Barcellos, G. B., Zingali, R. B., Machado, O. L., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., et al. (2001). 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.* 360(Pt 1), 217–224. doi: 10.1042/0264-6021:3600217
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Olivera-Severo, D., and Carlini, C. R. (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357–1363. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04046.x
- Franceschi, F., Gasbarrini, A., Polyzos, S. A., and Kountouras, J. (2015). Extragastic Diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 20(Suppl. 1), 40–46. doi: 10.1111/hel.12256
- Funda, D. P., Tuckova, L., Farre, M. A., Iwase, T., Moro, I., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2001). CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells *in vitro*: lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect. Immun.* 69, 3772–3781. doi: 10.1128/IAI.69.6.3772-3781.2001
- Ghazaleh, F. A., Francischetti, I. M., Gombarovits, M. E., and Carlini, C. R. (1997). Stimulation of calcium influx and platelet activation by canatoxin: methoxyverapamil inhibition and downregulation by cGMP. *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 362–367. doi: 10.1006/abbi.1997.9898
- Gobert, A. P., Mersey, B. D., Cheng, Y., Blumberg, D. R., Newton, J. C., and Wilson, K. T. (2002). Cutting edge: urease release by *Helicobacter pylori* stimulates macrophage inducible nitric oxide synthase. *J. Immunol.* 168, 6002–6006. doi: 10.4049/jimmunol.168.12.6002
- Goni, E., and Franceschi, F. (2016). *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Helicobacter* 21(Suppl. 1), 45–48. doi: 10.1111/hel.12340
- Ha, N. C., Oh, S. T., Sung, J. Y., Cha, K. A., Lee, M. H., and Oh, B. H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of *Helicobacter pylori* urease. *Nat. Struct. Biol.* 8, 505–509. doi: 10.1038/88563
- Harris, N. R., and Granger, D. N. (1996). Mechanisms underlying enhanced capillary filtration induced by platelet-activating factor. *Am. J. Physiol.* 270(1 Pt 2), H127–133.
- Hottz, E. D., Lopes, J. F., Freitas, C., Valls-de-Souza, R., Oliveira, M. F., Bozza, M. T., et al. (2013). Platelets mediate increased endothelium permeability in dengue through NLRP3-inflammasome activation. *Blood* 122, 3405–3414. doi: 10.1182/blood-2013-05-504449
- Hu, L. T., and Mobley, H. L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 58, 992–998.
- IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7–14 June 1994. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 61, 1–241.
- Italiano, J. E. Jr., Mairuhu, A. T., and Flaumenhaft, R. (2010). Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr. Opin. Hematol.* 17, 578–584. doi: 10.1097/MOH.0b013e32833e77ee
- Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A. H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., et al. (2000). Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96, 1798–1807.
- Jonnalagadda, D., Izu, L. T., and Whiteheart, S. W. (2012). Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood* 120, 5209–5216. doi: 10.1182/blood-2012-07-445080
- Jurk, K., and Kehrel, B. E. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Semin. Thromb. Hemost.* 31, 381–392. doi: 10.1055/s-2005-916671
- Koenen, R. R. (2016). The prowess of platelets in immunity and inflammation. *Thromb. Haemost.* 116, 605–612. doi: 10.1160/TH16-04-0300
- Kyburz, A., and Muller, A. (2017). *Helicobacter pylori* and Extragastic Diseases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 400, 325–347. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6_14
- Lee, J. H., Jun, S. H., Baik, S. C., Kim, D. R., Park, J. Y., Lee, Y. S., et al. (2012). Prediction and screening of nuclear targeting proteins with nuclear localization signals in *Helicobacter pylori*. *J. Microbiol. Methods* 91, 490–496. doi: 10.1016/j.mimet.2012.10.004
- Lee, J. H., Jun, S. H., Kim, J. M., Baik, S. C., and Lee, J. C. (2015). Morphological changes in human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease subunit A. *J. Microbiol.* 53, 406–414. doi: 10.1007/s12275-015-5085-5

- Lindemann, S., Tolley, N. D., Dixon, D. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., et al. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* 154, 485–490. doi: 10.1083/jcb.200105058
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Manolakis, A., Kapsoritakis, A. N., and Potamianos, S. P. (2007). A review of the postulated mechanisms concerning the association of *Helicobacter pylori* with ischemic heart disease. *Helicobacter* 12, 287–297. doi: 10.1111/j.1523-5378.2007.00511.x
- Micheletto, Y. M. S., Moro, C. F., Lopes, F. C., Ligabue-Braun, R., Martinelli, A. H. S., Marques, C. M., et al. (2016). Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles. *Colloids Surf. B Biointerf.* 145, 576–585. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.063
- Moroi, M., Jung, S. M., Okuma, M., and Shinmyozu, K. (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J. Clin. Invest.* 84, 1440–1445. doi: 10.1172/JCI114318
- Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M., and Modjeski, K. L. (2014). Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood* 123, 2759–2767. doi: 10.1182/blood-2013-11-462432
- Muhammad, J. S., Zaidi, S. F., Saeed, S. A., and Ishaq, M. (2017). Current status of *Helicobacter pylori* association with haematological and cardiovascular diseases: a mini review. *J. Pak. Med. Assoc.* 67, 907–911.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., et al. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 20, 2120–2130. doi: 10.1093/emboj/20.9.2120
- Nieswandt, B., and Watson, S. P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102, 449–461. doi: 10.1182/blood-2002-12-3882
- Olivera-Severo, D., Uberti, A. F., Marques, M. S., Pinto, M. T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., et al. (2017). A new role for *Helicobacter pylori* urease: contributions to angiogenesis. *Front. Microbiol.* 8:1883. doi: 10.3389/fmicb.2017.01883
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., and Carlini, C. R. (2006a). *Bacillus pasteurii* urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch. Biochem. Biophys.* 452, 149–155. doi: 10.1016/j.abb.2006.06.001
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., and Carlini, C. R. (2006b). Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 851–861. doi: 10.1590/S0100-879X2006000700002
- Ollivier, V., Syvannarath, V., Gros, A., Butt, A., Loyau, S., Jandrot-Perrus, M., et al. (2014). Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS ONE* 9:e104712. doi: 10.1371/journal.pone.0104712
- Olofsson, A., Vallstrom, A., Petzold, K., Tegtmeyer, N., Schleucher, J., Carlsson, S., et al. (2010). Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Mol. Microbiol.* 77, 1539–1555. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x
- Papagiannakis, P., Michalopoulos, C., Papalexi, F., Dalampoura, D., and Diamantidis, M. D. (2013). The role of *Helicobacter pylori* infection in hematological disorders. *Eur. J. Intern. Med.* 24, 685–690. doi: 10.1016/j.ejim.2013.02.011
- Parkin, D. M. (2004). International variation. *Oncogene* 23, 6329–6340. doi: 10.1038/sj.onc.1207726
- Perrais, M., Rousseaux, C., Ducourouble, M. P., Courcol, R., Vincent, P., Jonckheere, N., et al. (2014). *Helicobacter pylori* urease and flagellin alter mucin gene expression in human gastric cancer cells. *Gastric Cancer* 17, 235–246. doi: 10.1007/s10120-013-0267-5
- Piovesan, A. R., Martinelli, A. H., Ligabue-Braun, R., Schwartz, J. L., and Carlini, C. R. (2014). *Canavalia ensiformis* urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 547, 6–17. doi: 10.1016/j.abb.2014.02.006
- Schumann, R. R., Rietschel, E. T., and Loppnow, H. (1994). The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med. Microbiol. Immunol.* 183, 279–297. doi: 10.1007/BF00196679
- Shimoyama, T., Fukuda, S., Liu, Q., Nakaji, S., Fukuda, Y., and Sugawara, K. (2003). *Helicobacter pylori* water soluble surface proteins prime human neutrophils for enhanced production of reactive oxygen species and stimulate chemokine production. *J. Clin. Pathol.* 56, 348–351. doi: 10.1136/jcp.56.5.348
- Suzuki, H., Hibi, T., and Marshall, B. J. (2007). *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. *J. Gastroenterol.* 42, 1–15. doi: 10.1007/s00535-006-1990-z
- Thomas, M. R., and Storey, R. F. (2015). The role of platelets in inflammation. *Thromb. Haemost.* 114, 449–458. doi: 10.1160/TH14-12-1067
- Uberti, A. F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G. E., Scopel-Guerra, A., Moraes, J. A., Barcellos-de-Souza, P., et al. (2013). Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon* 69, 240–249. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.02.009
- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R. A., Weyrich, A. S., and Zimmerman, G. A. (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin. Immunopathol.* 34, 5–30. doi: 10.1007/s00281-011-0286-4
- Wassermann, G. E., Olivera-Severo, D., Uberti, A. F., and Carlini, C. R. (2010). *Helicobacter pylori* urease activates blood platelets through a lipoygenase-mediated pathway. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 2025–2034. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00901.x
- Weatherburn, M. W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.* 39, 971–974. doi: 10.1021/ac60252a045
- Zanoni, I., and Granucci, F. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:32. doi: 10.3389/fcimb.2013.00032
- Zhang, G., Han, J., Welch, E. J., Ye, R. D., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Malik, A. B., et al. (2009). Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J. Immunol.* 182, 7997–8004. doi: 10.4049/jimmunol.0802884
- Zhang, J. Y., Liu, T., Guo, H., Liu, X. F., Zhuang, Y., Yu, S., et al. (2011). Induction of a Th17 cell response by *Helicobacter pylori* Urease subunit B. *Immunobiology* 216, 803–810. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.006
- Zsori, K. S., Muszbek, L., Csiki, Z., and Shemirani, A. H. (2013). Validation of reference genes for the determination of platelet transcript level in healthy individuals and in patients with the history of myocardial infarction. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3456–3466. doi: 10.3390/ijms14023456

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Scopel-Guerra, Olivera-Severo, Stanisciowski, Uberti, Callai-Silva, Jaeger, Porto and Carlini. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Urease of *Helicobacter pylori* and its interaction with platelets: contributions to the inflammatory process.

Adrielle Scopel-Guerra[†], Deiber Olivera-Severo[†], Fernanda Staniscuaski, Augusto F. Uberti, Natália Callai-Silva, Natália Jaeger, Bárbara N. Porto, Celia R. Carlini*

*Correspondence: Celia R. Carlini celia.carlini@pucrs.br

Materials and Methods

SDS-PAGE ,Western Blot and Dot blot analysis

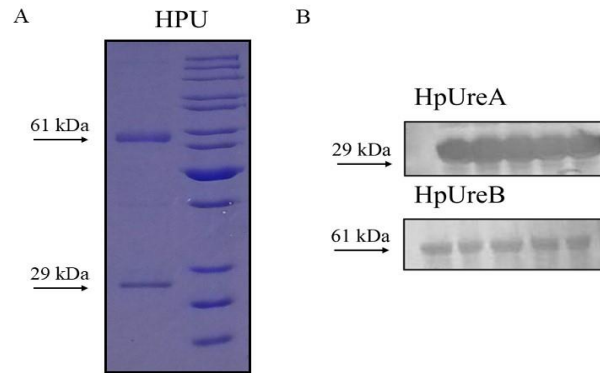
The recombinant proteins (30 µg total protein) after the final purification step were denatured in sample buffer (50 mM Tris–HCl, pH 6.8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) and heated in a boiling water bath for 3 min. Samples were resolved in 10% or 12% SDS–PAGE. Rainbow markers (Amersham Pharmacia Biotech) run in parallel were used to estimate molecular masses. Proteins bands in the gels were stained with Coomassie blue. For Western blots, proteins bands in the gels were transferred to PVDF membranes (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech, the membranes were then blocked with Tween-TBS (20 mM Tris–HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20) containing 1% bovine serum albumin. Immunoreactivity of the resolved proteins were probed for 2 h with polyclonal rabbit antibodies: anti-HpUreA (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-HpUreB (Santa Cruz Biotechnology, 1:1000), anti-GPVI (Santa Cruz

Biotechnology, 1:500) or anti-I**IIb**IIIa (Santa Cruz Biotechnology, 1:100). After exhaustive washing with Tween-TBS, PVDF membranes were incubated with biotin-conjugated anti-rabbit IgG antibodies (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) for 1 h followed by incubation with streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (1:1000; Caltag Laboratories, Burlingame, CA). Immunoreactive proteins were visualized by 3,3'-diaminobenzidine (Sigma Aldrich, USA) staining.

For dot blot assays, 5 μ L of purified HPU five-fold serially diluted solutions (1 mg.mL⁻¹) were spotted on PVDF sheets. Afterwards, the membranes were blocked and washed as described above for the Western blot analysis, and then probed with anti-GPVI (Santa Cruz Biotechnology, 1:500) or anti-I**IIb**IIIa (Santa Cruz Biotechnology, 1:100) antibodies. Secondary antibodies (anti-rabbit, 1:20.000) coupled to horseradish peroxidase were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). The protein bands were visualized using a chemiluminescence detection kit (Millipore, MA, USA).

Table S1.
Primers used in the real time PCR experiments.

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')
IL-1 β	Forward	CGTATATGCTCAGGTGTCAACCTATCTTCG
	Reverse	CTTGTGCTCCACTTGTTGCTCCA
CD14	Forward	TATCGACCATGGAGCGCG
	Reverse	CCTCTACTGCAGACACACT
ICAM	Forward	CCTCACCGTGTACTTTTATTTTGAGATGGA
	Reverse	TCAGGGGATTCTCCTGGGAG
iNOS	Forward	GCAGAATGTGACCATCATGG
	Reverse	ACAACCTTGGGGTTGAAGGC
COX-2	Forward	TGAAACCCACTCCAAACACA
	Reverse	GAGAAGGCTTCCCAGCTTTT
Beta actin	Forward	GATGGCCACGGCTGCTTC



Reverse

TGCCTCAGGGCAGCGGAA

Figure S1. Purification of HPU, HpUreA and HpUreB. (A) SDS-PAGE of purified recombinant HPU showing two protein bands, corresponding to HpUreA (29 kDa) and HpUreB (61 kDa). (B) Western blots of HpUreA (29 kDa) and HpUreB (61 kDa) bands probed with the corresponding antibodies. Each lane corresponds to the purified proteins isolated different bacterial colony purification.

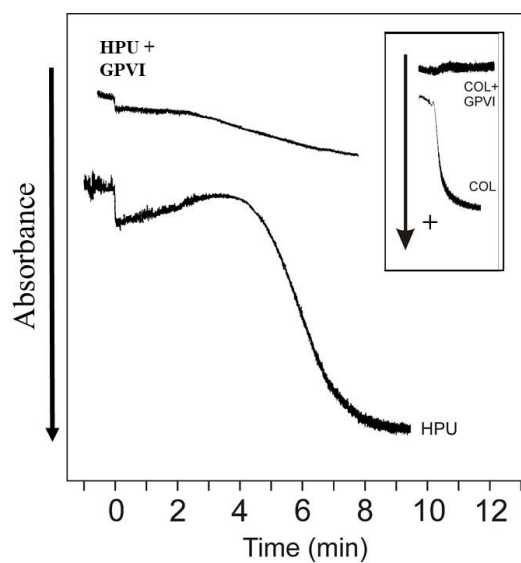
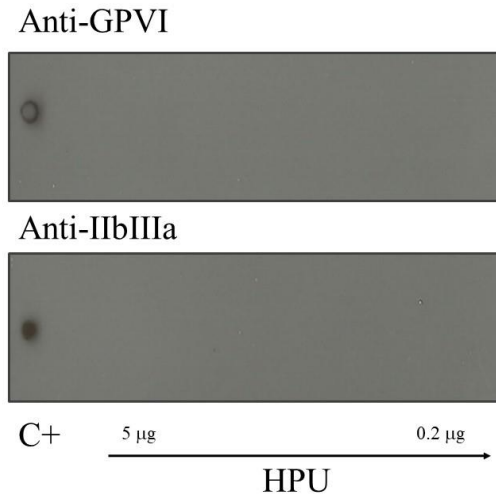


Figure S2. HPU-induced platelet aggregation is inhibited by anti-GPVI. Platelet aggregation induced by HPU or collagen (inset) is almost completely blocked in the presence of anti-

GPVI antibody. Platelets were pre-incubated with anti-GPVI ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) for 10 min at room temperature without stirring, and then aggregation was triggered (time zero) by addition of HPU (300 nM) or collagen ($20 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Aggregation was monitored continuously by absorbance readings during 8 min. A typical result is shown out of at least 4 experiments using platelets from different



rabbits.

Figure S3. Anti-IIbIIIa and Anti-GPVI do not give cross-reaction with HPU. Dot blot analysis to show the absence of immunoreactivity of the anti-GPVI and anti-IIbIIIa antibodies towards HPU. Decreasing quantities of HPU (1, 0.20 and 0.04 mg.mL^{-1}) were adsorbed ($5 \mu\text{L}$) onto the PVDF membranes. C+ indicates addition of the antibodies directly to the PVDF sheets. Dot blots were revealed using a chemiluminescence detection kit and the images were digitalized.

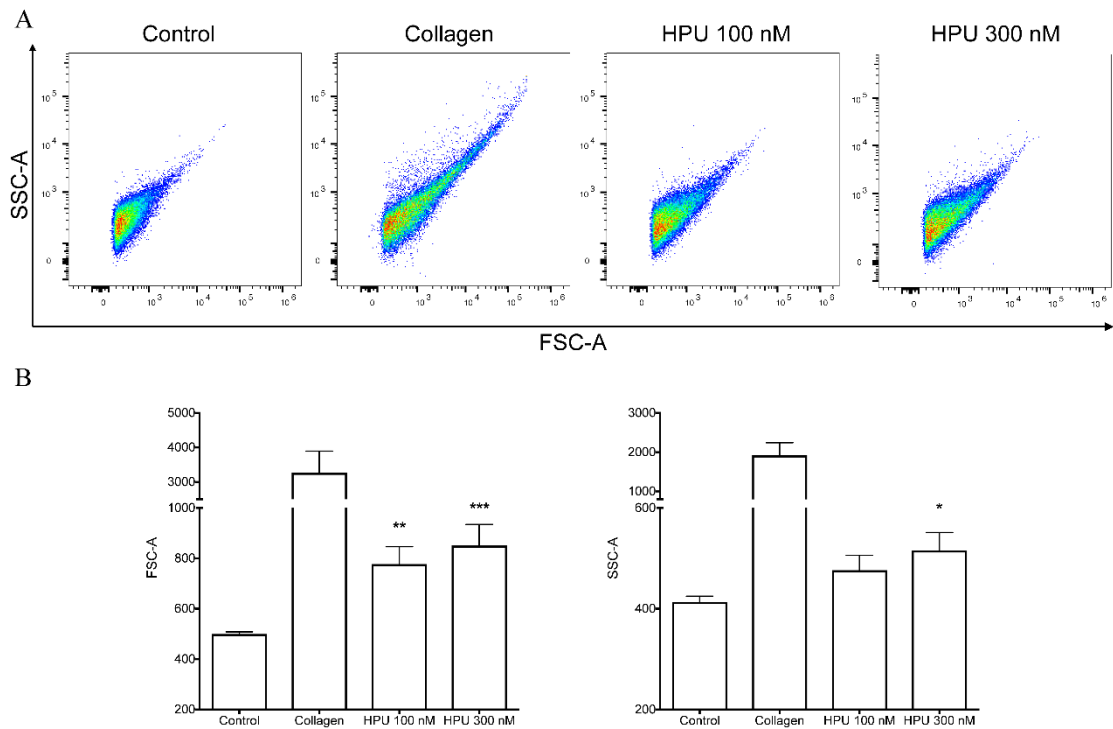


Figure S4. HPU induces platelet activation. (A) Representative flow cytometry dot plots of platelets population of non-treated (control), collagen- or HPU-treated cells. The bar graph in (B) shows variations of cell size and membrane complexity. Platelets were treated with 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ collagen, 100 nM or 300 nM HPU. Data are means \pm SEM. Statistical significance was determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer test. Values of $p < 0.01^*$, $<0.001^{**}$.

1 DISCUSSÃO

A infecção por *Helicobacter pylori* é uma questão de saúde pública. Sabe-se que pessoas infectadas por essa bactéria têm um risco aumentado de vir a desenvolver doenças gástricas graves, como úlceras pépticas e câncer de estômago. Além disso, outras patologias têm sido associadas à infecção por *H. pylori*, como doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, doenças autoimunes, e neurodegenerativas (Franceschi et al., 2015; Goni e Franceschi, 2016; Kyburz e Muller, 2017).

Ureases são enzimas amplamente distribuídas em plantas, bactérias e fungos, e apesar de poderem ter uma, duas ou três cadeias polipeptídicas, são proteínas altamente conservadas quanto à sua estrutura quaternária e ao seu mecanismo catalítico. As ureases apresentam propriedades não enzimáticas em modelos animais – mamíferos e insetos, como a capacidade de ativar excitose, de recrutar a rota dos eicosanoides, e induzir inflamação e neurotoxicidade (Carlini et al., 1985; Olivera-Severo et al., 2006b; 2006a; Wassermann et al., 2010; Carlini e Ligabue-Braun, 2016). Entre essas atividades, nosso grupo demonstrou que ureases induzem agregação de plaquetas sanguíneas de diferentes espécies animais (Carlini e Ligabue-Braun, 2016). Essa propriedade das ureases foi constatada para as proteínas de cadeia única das plantas *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) (Carlini et al., 1985) e *Glycine max* (soja) (Follmer et al., 2004), e para as bacterianas de duas cadeias (*H. pylori*) (Wassermann et al., 2010) e de três cadeias (*Bacillus pasteurii*) (Olivera-Severo et al., 2006b) e *Proteus mirabilis* (Broll, 2017). Plaquetas humanas, de rato, de coelho e de cobaia agregam quando expostas a concentrações de ureases na faixa de 0,1 a 1 μM (Carlini et al., 1985). A capacidade de induzir agregação de plaquetas foi a primeira das atividades não-enzimáticas de ureases a ser claramente demonstrada, em estudos com as enzimas

inibidas covalentemente com *p*-hidroxi-mercuribenzoato (Follmer et al., 2001). Por terem mais de um domínio proteico biologicamente ativo, que lhes confere atividades independentes da ação de catalisar a hidrólise da ureia, as ureases integram a classe das proteínas multifuncionais, também conhecidas como proteínas *moonlighting* (Ligabue-Braun e Carlini, 2015).

A obtenção das subunidades recombinantes da HPU permitiu realizarmos estudos de estrutura *versus* atividade para esta urease. Nesse trabalho, utilizamos um novo vetor de expressão para a HPU visando maior produção de proteína recombinante, e com o novo plasmídeo, conseguimos aumentar significativamente a produção da HPU. Como mencionado na introdução, existem poucos dados na literatura relativos aos efeitos biológicos das cadeias isoladas da HPU. Demonstramos aqui que HpUreA e HpUreB interagem com a membrana de plaquetas, corroborando os dados obtidos com a holoenzima por Wassermann e colaboradores (2010). A incubação das plaquetas com HpUreA, apesar de não ativar ou agregar plaquetas (testada em doses até 10 vezes maiores que HPU), bloqueia a resposta das células a agonistas clássicos, como ADP e colágeno (Figura 2A do artigo), e também inibe a agregação induzida por HPU (Figura 3A do artigo). O fato da pré-incubação das plaquetas com HpUreA bloquear a resposta dessas para a HPU indica que ambas as proteínas competem pelo mesmo sítio de ligação, ou que a HpUreA se liga em locais bem próximos, e por impedimento estérico, bloqueia a ligação da holoenzima (Scopel-Guerra, 2013). Já foi descrito para a urease majoritária da *C. ensiformis* (JBU) e para o peptídeo inseticida derivado desta, o jaburetox, que essas proteínas podem se inserir em bicamadas lipídicas e formar canais iônicos, sem contudo causar lise celular (Piovesan et al., 2014; Micheletto et al., 2016). Esse tipo de interação com membranas, se também ocorre com a HpUreA, poderia talvez explicar o efeito “estabilizador” dessa proteína nas plaquetas.

Por outro lado, a HpUreB mostrou ser um agonista de plaquetas (Scopel-Guerra, 2013), causando agregação *per se* e potenciando o efeito agregador da HPU (Figuras 1 e 3B, artigo). O efeito indutor de agregação plaquetária da HpUreB ocorre na mesma faixa de concentração molar observado para a HPU, com efeito máximo para 1 μ M, de acordo com Wassermann e colaboradores (2010). Assim como a HPU, a HpUreB agrega plaquetas de coelhos ativando a rota das lipoxigenases, evidenciado em ensaios na presença dos inibidores esculetina e indometacina. Em plaquetas pré-tratadas com o inibidor de 12-lipoxigenase, a esculetina, houve inibição parcial da agregação, já em plaquetas pré-tratadas com indometacina, observou-se um aumento da agregação (Figura 1 do artigo). Esse efeito pode ser explicado pela maior disponibilidade de substrato, uma vez que o ácido araquidônico é o substrato tanto das ciclo-oxigenases como das lipoxigenases. Esses resultados indicam que a HpUreB contém o domínio de interação da holoenzima com as plaquetas. Os dados também comprovam que o efeito indutor de agregação plaquetária da HPU é independente da atividade ureolítica, posto que HpUreB não possui atividade enzimática (Ha et al., 2001; Suzuki et al., 2007), mesmo contendo a região do sítio ativo da enzima.

O efeito de induzir agregação de plaquetas observado para as ureases deve-se a capacidade destas de induzir exocitose dos grânulos densos plaquetários, causando a liberação de seu conteúdo de ADP. Plaquetas degranuladas não responderam à canatoxina, e a agregação de plaquetas normais foi abolida na presença do antagonista AMP ou da enzima apirase, que hidrolisa o ADP liberado, demonstrando que a resposta de agregação depende da secreção dos grânulos e da liberação de ADP (Carlini et al., 1985). A ativação das plaquetas por ureases requer a formação de ácido 12-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico (12-HPETE), produzido a partir de ácido araquidônico pela enzima 12-lipoxigenase plaquetária,

como visto para a canatoxina (Carlini et al., 1985), para a urease de *B. pasteurii* (Olivera-Severo et al., 2006 b), e para a HPU (Wassermann et al., 2010).

Carlini e colaboradores (1985) verificaram que plaquetas de coelho estimuladas por canatoxina tornavam-se refratárias a um novo estímulo com essa urease ou com colágeno. No entanto, as mesmas plaquetas continuavam responsivas ao ADP, PAF-acéter ou ácido araquidônico. Nesse estudo, para explicar essa observação, foi levantada a hipótese de que a canatoxina e o colágeno compartilhariam parte da mesma rota de sinalização (Carlini et al., 1985). Mais de 20 anos depois, em 2004, o grupo de Coffey e colaboradores publicou dois estudos mostrando que a interação do colágeno com seu receptor plaquetário GPVI induz ativação da rota da 12-lipoxigenase (Coffey et al., 2004a; Coffey et al., 2004b). Em seguida, nosso grupo demonstrou que, assim como ocorre com a canatoxina, a HPU induz a agregação de plaquetas do coelho através da rota das lipoxigenases, induzindo a degranulação dos grânulos densos e liberando o ADP plaquetário (Wassermann et al., 2010).

Semelhante ao que foi observado com plaquetas de coelho (Wassermann et al., 2010), comprovamos aqui, usando citometria de fluxo, que a HPU interage com a membrana de plaquetas humana, sendo possível detectar a proteína fluorescente aderida à superfície das células (Figura 4B do artigo). Nas plaquetas tratadas com HPU, não houve aumento significativo da exposição de P-selectina (Figura 4^a do artigo). Esta proteína (CD62P) é acumulada nos grânulos alfa da célula, e sob estímulo forte, como o do colágeno (Figura 4^a do artigo), esta é liberada no citosol e transloca-se para a face externa da membrana celular (Singbartl et al., 2001). No entanto, observamos modificações no formato das células, o chamado *shape change*, indicativo do estado de ativação nas plaquetas exposta a HPU. Sabe-se que plaquetas podem modular a secreção de seus grânulos, conforme o tipo de estímulo recebido (Jonlagadda et al., 2012). A observação de Ollivier e colaboradores (2014) de

que plaquetas ativadas com baixas doses de colágeno exibem baixa exposição de P-selectina, mesmo apresentando outros sinais de ativação, como a secreção de seus grânulos, estabelece mais um ponto comum entre as respostas de plaquetas ao colágeno e à HPU.

Após estímulo de HpUreB, sem agitação, plaquetas de coelho também se tornam refratárias a um segundo estímulo com colágeno, mas respondem ao ADP, ainda que menos intensamente (Scopel-Guerra, 2013) (Figura 2B do artigo), de modo semelhante ao que foi descrito para a canatoxina (Carlini et al., 1985). Como base nessa observação, postulamos que a HPU poderia estar compartilhando com o colágeno o mesmo receptor de membrana, GPVI, que recruta a sinalização via 12-H(P)ETE em plaquetas (Coffey et al., 2004a; Coffey et al., 2004b). Contudo, apesar dos anticorpos anti-GPVI bloquearem a agregação de plaquetas humana induzida pela HPU, e por sua subunidade HpUreB, não foi possível observar interferência dos anticorpos na ligação da FITC-HPU nas plaquetas. Podemos concluir desse resultado que a HPU não se liga à GPVI, e que a urease interage com um outro “receptor” na membrana das plaquetas, como visualizado nos ensaios com FITC-HPU. No entanto, como visto nos ensaios de agregação, a ligação dos anticorpos anti-GPVI com a GPVI na membrana das plaquetas interfere na resposta destas à HPU. Uma hipótese para explicar esses achados seria que a ligação do anti-GPVI à GPVI de algum modo “estabiliza” ou “congela” a membrana da plaqueta, de tal modo a impedir *downstream* a sinalização via lipoxigenase recrutada pela urease.

A participação de outro importante receptor de membrana da plaqueta, a glicoproteína IIb/IIIa, também foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo anti-GPIIb/IIIa. Sabendo que agregação plaquetária induzida pela canatoxina é dependente de fibrinogênio (Carlini et al., 1985), e que esta integrina é um receptor de fibrinogênio, esperava-se que os anticorpos anti-GPIIb/IIIa bloqueassem a ligação de FITC-HPU nas

plaquetas. Surpreendentemente, houve um aumento da interação HPU-plaquetas após o tratamento com anti-IIbIIIa (Figura 4B do artigo). Apesar de não termos detectado (Figura S3 do artigo) interação entre os anticorpos anti-GPIIbIIIa utilizados e a HPU, nas condições testadas, existem relatos de reação cruzada entre anti-HpUreB e a proteína IIIa (Bai et al., 2009), o que poderia levar o anticorpo se ligar à HPU aderida na plaqueta e explicar o aumento observado. Muhammad e colaboradores (2017) associaram essa interação entre IIIa e anti-HpUreB como uma possível causa de doenças tromboembólicas e cardiovasculares, uma vez que a proteína IIIa, constitutivamente expressa em plaquetas, está intimamente relacionada a doenças como a púrpura trombocitopênica.

Conforme discutido acima, a GPVI parece não estar diretamente envolvida na interação urease-plaquetas, uma vez que o bloqueio desse receptor não afetou a ligação da HPU nas células. Kuwana, 2014, revisou os possíveis mecanismos pelos quais a infecção por *H. pylori* poderia levar a púrpura trombocitopênica idiopática, evidenciando que indivíduos infectados por *H. pylori* possuem um desbalanço na razão entre os receptores tipo Fc γ em monócitos e macrófagos, com diminuição da expressão dos receptores Fc γ RIIB. Esse desbalanço pode explicar o aumento da produção de anticorpos anti-plaquetas por células T CD4⁺. Somando-se a isso, algumas cepas de *H. pylori* podem causar agregação plaquetária dependente do receptor de colágeno GPIb (que possuem ancoragem por Fc γ), sem participação de CagA e VacA (Byrne et al., 2003), sugerindo que proteínas presentes na superfície da bactéria mimetizariam a ação do colágeno na plaqueta, levando à ativação do fator de von Willebrand (Handin, 2003). Sabendo que, no *H. pylori*, parte da HPU está aderida a membrana externa da bactéria, e que este microrganismo interage com porções Fc γ de glicoproteínas de células sanguíneas, é possível que a HPU esteja envolvida nessa interação entre a bactéria e proteínas de membranas celulares, inclusive em plaquetas (Figura

4). O bloqueio do receptor GPVI por anticorpos não impede a interação da urease com a superfície das plaquetas, em contrapartida, inibe a agregação plaquetária induzida por HPU, por conseguinte, é possível que a HPU seja molécula candidata na interação de *H. pylori* e Fc γ .

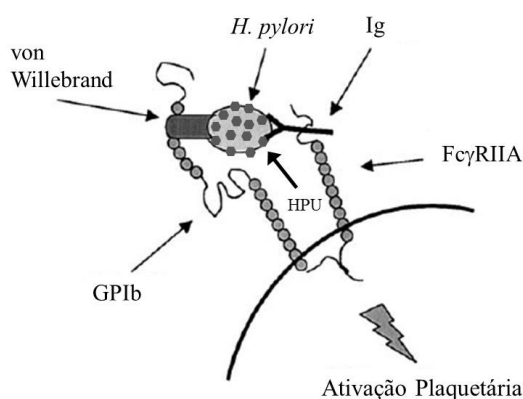


Figura 1. Mecanismo proposto de interação da HPU com fator de von Willebrand e plaquetas. Adaptado de Byrne e colaboradores (2003).

Quando ativadas, as plaquetas liberam moléculas capazes de induzir ativação de outros tipos celulares, contribuindo, e potencialmente aumentando, estímulos para a inflamação (Koenen, 2016). Considerando os trabalhos anteriores do nosso grupo demonstrando que a HPU causa efeitos pró-inflamatórios, tanto em modelos *in vivo* como *ex vivo*, avaliamos, em plaquetas ativadas por HPU, o processamento de moléculas que contribuem para a inflamação.

O perfil do processamento de mRNA das moléculas ICAM, iNOS, COX-2, CD14 e IL-1 β em plaquetas tratadas com HPU, HpUreA, HpUreB ou colágeno foi analisado por PCR quantitativo. Nas condições de tempo e concentração testadas para a HPU e suas subunidades, não foi detectada modificação no processamento de mRNA para ICAM, COX-2 e iNOS. Corroborando dados que demonstram que *H. pylori* pode regular positivamente moléculas inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-8, RANTES, TNF- α e NF- κ B (Lamb and

Chen, 2013), o estímulo de plaquetas com HPU levou a um perfil de processamento de IL-1 β condizente com uma ação pró-inflamatória, com um aumento lento, gradual e persistente, com pico após 3 horas de tratamento (Figura 5A do artigo). Demonstrando mais uma vez que ambas as subunidades da HPU interagem com as plaquetas, tanto HpUreA como HpUreB alteraram o processamento do mRNA de IL-1 β , mas de maneira distinta. Enquanto plaquetas tratadas como HpUreA mostraram um perfil de resposta semelhante à provocada pelo colágeno, com aumento do processamento de IL-1 β , as plaquetas tratadas com HpUreB tiveram esse processamento bloqueado, apesar desse ser o domínio da HPU que ativa agregação plaquetária (Figura 5B do artigo). Pode-se concluir a partir desses resultados que os dois domínios na HPU que interagem com plaquetas, um presente na HpUreA e o segundo na HpUreB, têm propriedades distintas e complementares: o domínio na subunidade A não induz agregação, interfere na agregação induzida por colágeno, ADP ou HPU, mas ativa o processamento de mRNA para IL-1 β à semelhança do colágeno, contribuindo para a inflamação provocada pela infecção por *H. pylori*; já o domínio na subunidade B recruta a via da 12-lipoxigenase que leva à ativação da maquinaria de excitose das plaquetas com a consequente agregação das mesmas. Este domínio bloqueou o processamento do mRNA de IL-1 β , não havendo contribuição para a inflamação por esta via.

CD14 é uma molécula envolvida no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos) vinculada a receptores Toll-like (TLRs), ligada à resposta imune e com participação em processos inflamatórios (Zanoni and Granucci, 2013). Essa molécula está associada ao reconhecimento de LPS, e já foi descrito que plaquetas possuem a rota de sinalização ativada por LPS, com a presença de CD14, TLR4 e MyD88 (Zhang et al., 2009), como descrito para outros tipos celulares (Funda et al., 2001). Nossos dados mostraram que a HPU aumenta em mais de 100 vezes o processamento de pré-mRNA

de CD14, induzindo um estado pró-inflamatório nas plaquetas, que se soma ao aumento do processamento de IL-1 β . Sabe-se que o estímulo de CD14 por LPS leva a um aumento de IL-1 β , bem como TNF α e IL-6 e IL-8 (Dentener et al., 1993; Schumann et al., 1994). Ademais, como plaquetas possuem IL-1R e são responsivas ao IL-1 β , esta citocina modula a sua própria síntese e exocitose, através de micropartículas (Brown et al., 2013).

Holtz e colaboradores (2013) estudaram a interação entre o vírus da dengue e plaquetas, demonstrando que o vírus pode desencadear ativação plaquetária via NLRP-3, e liberação de microvesículas contendo IL-1 β . Para avaliar se a ativação plaquetária induzida por ureases desencadearia a mesma resposta descrita para LPS, ou pelo vírus da dengue, seriam necessários mais experimentos. Em contrapartida, o tratamento das plaquetas com colágeno, HpUreA ou HpUreB, levou a uma diminuição dos níveis de processamento do mRNA do CD14. Este tipo de fenômeno foi descrito para células de mucosa intestinal, nas quais o aumento da expressão de CD14 ocorre apenas em associação a um processo inflamatório (Funda et al., 2001). Diferentemente dos efeitos da HPU na agregação plaquetária e no aumento do mRNA de IL-1 β , que puderam ser atribuídos a uma das subunidades, no caso do processamento do mRNA do CD14, apesar de ficar evidente que ambas as subunidades da urease interagem com a plaqueta, isoladamente nenhuma das subunidades reproduz o efeito da holoproteína. Esta observação pode ser interpretada como sendo este efeito dependente da conformação nativa da HPU, que é um dodecômero composto por 6 subunidades de cada tipo.

2 CONCLUSÕES

Como conclusões desta tese, podemos afirmar que a HPU possui ao menos dois sítios de ligação a plaquetas, humanas ou de coelhos, um presente em cada subunidade. Isoladamente, HpUreA e HpUreB podem interagir de formas diferentes estimulando essas células, e contribuindo para a ação da HPU na ativação plaquetária. Outras atividades da HPU, por outro lado, dependem de ambas as subunidades e/ou de sua estrutura dodecamérica. Esses dados reforçam que a HPU é capaz de ativar plaquetas independentemente de sua atividade enzimática. Além de interferir nas propriedades das plaquetas e conseqüentemente, o papel destas na hemostasia, a HPU também ativa mecanismos que transformam a plaqueta em uma célula pró-inflamatória, contribuindo com a produção de citocina(s) e expressando receptores característicos de células “inflamadas”.

No conjunto, os resultados obtidos nesta tese, somados a outros dados obtidos com a HPU em nosso grupo, indicam que esta urease, além de ser um fator de virulência por sua atividade enzimática, tem potencial para contribuir, não enzimaticamente, no estabelecimento e manutenção da inflamação crônica, típica nas patologias gástricas decorrentes da infecção por *H. pylori*. Ademais, por ativar a agregação plaquetária e fazer a fenoc conversão de plaquetas a células com um perfil pró-inflamatório, a HPU pode também contribuir para a patogênese de doenças extra gástricas associadas a esta bactéria.

3 REFERÊNCIAS

- Andrews, R.K., Blakeley, R.L., and Zerner, B. (1984). Urea and urease. *Adv Inorg Biochem* 6, 245-283.
- Bai, Y., Wang, Z., Bai, X., Yu, Z., Cao, L., Zhang, W., et al. (2009). Cross-reaction of antibody against *Helicobacter pylori* urease B with platelet glycoprotein IIIa and its significance in the pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol* 89(2), 142-149. doi: 10.1007/s12185-008-0247-4.
- Bailie, N.C., Osborne, C.A., Leininger, J.R., Fletcher, T.F., Johnston, S.D., Ogburn, P.N., et al. (1986). Teratogenic effect of acetohydroxamic acid in clinically normal beagles. *Am J Vet Res* 47(12), 2604-2611.
- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J.C., Yamaoka, Y., et al. (2006). The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun* 74(2), 1148-1155. doi: 10.1128/IAI.74.2.1148-1155.2006.
- Bhatt, D.L., and Topol, E.J. (2003). Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2(1), 15-28. doi: 10.1038/nrd985.
- Brenner, H., Arndt, V., Stegmaier, C., Ziegler, H., and Rothenbacher, D. (2004). Is *Helicobacter pylori* infection a necessary condition for noncardia gastric cancer? *Am J Epidemiol* 159(3), 252-258.
- Broll, V. (2017). Estrutura versus função: aspectos estruturais e funcionais do Jaburetox e da urease de *Proteus mirabilis*. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*
- Brown, G.T., Narayanan, P., Li, W., Silverstein, R.L., and McIntyre, T.M. (2013). Lipopolysaccharide stimulates platelets through an IL-1beta autocrine loop. *J Immunol* 191(10), 5196-5203. doi: 10.4049/jimmunol.1300354.
- Burucoa, C., and Axon, A. (2017). Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 22 Suppl 1. doi: 10.1111/hel.12403.
- Byrne, M.F., Kerrigan, S.W., Corcoran, P.A., Atherton, J.C., Murray, F.E., Fitzgerald, D.J., et al. (2003). *Helicobacter pylori* binds von Willebrand factor and interacts with GPIb to induce platelet aggregation. *Gastroenterology* 124(7), 1846-1854.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., and Ribeiro, J.M. (1985). Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet lipoxygenase pathway. *Br J Pharmacol* 84(2), 551-560.
- Carlini, C.R., and Ligabue-Braun, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: A review. *Toxicon* 110, 90-109. doi: 10.1016/j.toxicon.2015.11.020.
- Censini, S., Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J.E., Ghiara, P., Borodovsky, M., et al. (1996). *cag*, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(25), 14648-14653.
- Cimmino, G., and Golino, P. (2013). Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res* 6(3), 299-309. doi: 10.1007/s12265-012-9445-9.
- Clemetson, J.M., Polgar, J., Magnenat, E., Wells, T.N., and Clemetson, K.J. (1999). The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors. *J Biol Chem* 274(41), 29019-29024.
- Clemetson, K.J., and Clemetson, J.M. (2001). Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86(1), 189-197.

- Coffey, M.J., Coles, B., Locke, M., Bermudez-Fajardo, A., Williams, P.C., Jarvis, G.E., et al. (2004a). Interactions of 12-lipoxygenase with phospholipase A2 isoforms following platelet activation through the glycoprotein VI collagen receptor. *FEBS Lett* 576(1-2), 165-168. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.007.
- Coffey, M.J., Jarvis, G.E., Gibbins, J.M., Coles, B., Barrett, N.E., Wylie, O.R., et al. (2004b). Platelet 12-lipoxygenase activation via glycoprotein VI: involvement of multiple signaling pathways in agonist control of H(P)ETE synthesis. *Circ Res* 94(12), 1598-1605. doi: 10.1161/01.RES.0000132281.78948.65.
- Covacci, A., Telford, J.L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., and Rappuoli, R. (1999). Helicobacter pylori virulence and genetic geography. *Science* 284(5418), 1328-1333.
- D'Elios, M.M., Amedei, A., Cappon, A., Del Prete, G., and de Bernard, M. (2007). The neutrophil-activating protein of Helicobacter pylori (HP-NAP) as an immune modulating agent. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50(2), 157-164. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00258.x.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., et al. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 13(6), 607-615. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7.
- Dentener, M.A., Bazil, V., Von Asmuth, E.J., Ceska, M., and Buurman, W.A. (1993). Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol* 150(7), 2885-2891.
- Dixon, M.F. (1995). Histological responses to Helicobacter pylori infection: gastritis, atrophy and preneoplasia. *Baillieres Clin Gastroenterol* 9(3), 467-486.
- Dunn, B.E., Campbell, G.P., Perez-Perez, G.I., and Blaser, M.J. (1990). Purification and characterization of urease from Helicobacter pylori. *J Biol Chem* 265(16), 9464-9469.
- Eaton, K.A., Brooks, C.L., Morgan, D.R., and Krakowka, S. (1991). Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by Helicobacter pylori in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 59(7), 2470-2475.
- Elliott, S.N., and Wallace, J.L. (1998). Neutrophil-mediated gastrointestinal injury. *Can J Gastroenterol* 12(8), 559-568.
- Feder, V., Kmetzsch, L., Staats, C.C., Vidal-Figueiredo, N., Ligabue-Braun, R., Carlini, C.R., et al. (2015). Cryptococcus gattii urease as a virulence factor and the relevance of enzymatic activity in cryptococcosis pathogenesis. *FEBS J* 282(8), 1406-1418. doi: 10.1111/febs.13229.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136(5), E359-386. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Figueiredo, C., Machado, J.C., and Yamaoka, Y. (2005). Pathogenesis of Helicobacter pylori Infection. *Helicobacter* 10 Suppl 1, 14-20. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00339.x.
- Fischbach, W., Chan, A.O., and Wong, B.C. (2005). Helicobacter pylori and Gastric Malignancy. *Helicobacter* 10 Suppl 1, 34-39. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00338.x.
- Follmer, C. (2010). Ureases as a target for the treatment of gastric and urinary infections. *J Clin Pathol* 63(5), 424-430. doi: 10.1136/jcp.2009.072595.
- Fox, J.E. (1993). The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 70(6), 884-893.
- Franceschi, F., Gasbarrini, A., Polyzos, S.A., and Kountouras, J. (2015). Extragastric Diseases and Helicobacter pylori. *Helicobacter* 20 Suppl 1, 40-46. doi: 10.1111/hel.12256.
- Funda, D.P., Tuckova, L., Farre, M.A., Iwase, T., Moro, I., and Tlaskalova-Hogenova, H. (2001). CD14 is expressed and released as soluble CD14 by human intestinal epithelial cells in vitro:

- lipopolysaccharide activation of epithelial cells revisited. *Infect Immun* 69(6), 3772-3781. doi: 10.1128/IAI.69.6.3772-3781.2001.
- Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., et al. (2000). Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148(1), 75-85.
- Gibbins, J.M., Okuma, M., Farndale, R., Barnes, M., and Watson, S.P. (1997). Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett* 413(2), 255-259.
- Goni, E., and Franceschi, F. (2016). Helicobacter pylori and extragastric diseases. *Helicobacter* 21 Suppl 1, 45-48. doi: 10.1111/hel.12340.
- Goodwin, C.S., and Armstrong, J.A. (1990). Microbiological aspects of Helicobacter pylori (Campylobacter pylori). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9(1), 1-13.
- Ha, N.C., Oh, S.T., Sung, J.Y., Cha, K.A., Lee, M.H., and Oh, B.H. (2001). Supramolecular assembly and acid resistance of Helicobacter pylori urease. *Nat Struct Biol* 8(6), 505-509. doi: 10.1038/88563.
- Handin, R.I. (2003). A hitchhiker's guide to the galaxy--an H. pylori travel guide. *Gastroenterology* 124(7), 1983-1985.
- Heijnen, H., and van der Sluijs, P. (2015). Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost* 13(12), 2141-2151. doi: 10.1111/jth.13147.
- Hopkins, R.J., Girardi, L.S., and Turney, E.A. (1996). Relationship between Helicobacter pylori eradication and reduced duodenal and gastric ulcer recurrence: a review. *Gastroenterology* 110(4), 1244-1252.
- Hu, L.T., and Mobley, H.L. (1990). Purification and N-terminal analysis of urease from Helicobacter pylori. *Infect Immun* 58(4), 992-998.
- Hu, L.T., and Mobley, H.L. (1993). Expression of catalytically active recombinant Helicobacter pylori urease at wild-type levels in Escherichia coli. *Infect Immun* 61(6), 2563-2569.
- IARC (1994). Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 61, 1-241.
- INCA (2016). <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/definicao: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva> [Accessed November 10 2016].
- Jandrot-Perrus, M., Busfield, S., Lagrue, A.H., Xiong, X., Debili, N., Chickering, T., et al. (2000). Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily. *Blood* 96(5), 1798-1807.
- Jonnalagadda, D., Izu, L.T., and Whiteheart, S.W. (2012). Platelet secretion is kinetically heterogeneous in an agonist-responsive manner. *Blood* 120(26), 5209-5216. doi: 10.1182/blood-2012-07-445080.
- Jurk, K., and Kehrel, B.E. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 31(4), 381-392. doi: 10.1055/s-2005-916671.
- Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K.J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C.G., et al. (1998). Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-

- activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 91(2), 491-499.
- Koenen, R.R. (2016). The prowess of platelets in immunity and inflammation. *Thromb Haemost* 116(4), 605-612. doi: 10.1160/TH16-04-0300.
- Konieczna, I., Zarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesinska, B., Fraczyk, J., Kaminski, Z., et al. (2012). Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci* 13(8), 789-806.
- Koseoglu, S., and Flaumenhaft, R. (2013). Advances in platelet granule biology. *Curr Opin Hematol* 20(5), 464-471. doi: 10.1097/MOH.0b013e3283632e6b.
- Kroghelt, K.A., Lehours, P., and Megraud, F. (2005). Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 10 Suppl 1, 5-13. doi: 10.1111/j.1523-5378.2005.00341.x.
- Kuwana, M. (2014). *Helicobacter pylori*-associated immune thrombocytopenia: clinical features and pathogenic mechanisms. *World J Gastroenterol* 20(3), 714-723. doi: 10.3748/wjg.v20.i3.714.
- Kyburz, A., and Muller, A. (2017). *Helicobacter pylori* and Extragastric Diseases. *Curr Top Microbiol Immunol* 400, 325-347. doi: 10.1007/978-3-319-50520-6_14.
- Lamb, A., and Chen, L.F. (2013). Role of the *Helicobacter pylori*-induced inflammatory response in the development of gastric cancer. *J Cell Biochem* 114(3), 491-497. doi: 10.1002/jcb.24389.
- Lee, J.H., Jun, S.H., Baik, S.C., Kim, D.R., Park, J.Y., Lee, Y.S., et al. (2012). Prediction and screening of nuclear targeting proteins with nuclear localization signals in *Helicobacter pylori*. *J Microbiol Methods* 91(3), 490-496. doi: 10.1016/j.mimet.2012.10.004.
- Lee, J.H., Jun, S.H., Kim, J.M., Baik, S.C., and Lee, J.C. (2015). Morphological changes in human gastric epithelial cells induced by nuclear targeting of *Helicobacter pylori* urease subunit A. *J Microbiol* 53(6), 406-414. doi: 10.1007/s12275-015-5085-5.
- Ligabue-Braun, R., Andreis, F.C., Verli, H., and Carlini, C.R. (2013). 3-to-1: unraveling structural transitions in ureases. *Naturwissenschaften* 100(5), 459-467. doi: 10.1007/s00114-013-1045-2.
- Ligabue-Braun, R., Carlini, C. R. Moonlighting Toxins: Ureases and Beyond. In: Gopalakrishnakone P, Carlini CR, Ligabue-Braun R. (Org.). *Plant Toxins*. 1ed.: Springer Netherlands, 2015, v. , p. 1-21.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., et al. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154(3), 485-490. doi: 10.1083/jcb.200105058.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y., Manica, A., Liu, H., Roumagnac, P., et al. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* 445(7130), 915-918. doi: 10.1038/nature05562.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454(7203), 436-444. doi: 10.1038/nature07205.
- Marshall, B.J., and Warren, J.R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1(8390), 1311-1315.
- McGee, D.J., May, C.A., Garner, R.M., Himpsl, J.M., and Mobley, H.L. (1999). Isolation of *Helicobacter pylori* genes that modulate urease activity. *J Bacteriol* 181(8), 2477-2484.
- Micheletto, Y.M.S., Moro, C.F., Lopes, F.C., Ligabue-Braun, R., Martinelli, A.H.S., Marques, C.M., et al. (2016). Interaction of jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and a derived peptide with lipid vesicles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 145, 576-585. doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.063.

- Mobley, H.L., Garner, R.M., and Bauerfeind, P. (1995). Helicobacter pylori nickel-transport gene nixA: synthesis of catalytically active urease in Escherichia coli independent of growth conditions. *Mol Microbiol* 16(1), 97-109.
- Moroi, M., Jung, S.M., Okuma, M., and Shinmyozu, K. (1989). A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *J Clin Invest* 84(5), 1440-1445. doi: 10.1172/JCI114318.
- Muhammad, J.S., Zaidi, S.F., Saeed, S.A., and Ishaq, M. (2017). Current status of Helicobacter pylori association with haematological and cardiovascular diseases: A mini review. *J Pak Med Assoc* 67(6), 907-911.
- Nesbitt, W.S., Giuliano, S., Kulkarni, S., Dopheide, S.M., Harper, I.S., and Jackson, S.P. (2003). Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol* 160(7), 1151-1161. doi: 10.1083/jcb.200207119.
- Nieswandt, B., Brakebusch, C., Bergmeier, W., Schulte, V., Bouvard, D., Mokhtari-Nejad, R., et al. (2001). Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 20(9), 2120-2130. doi: 10.1093/emboj/20.9.2120.
- Nieswandt, B., and Watson, S.P. (2003). Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102(2), 449-461. doi: 10.1182/blood-2002-12-3882.
- Oleastro, M., Rocha, R., and Vale, F.F. (2017). Population genetic structure of Helicobacter pylori strains from Portuguese-speaking countries. *Helicobacter* 22(4). doi: 10.1111/hel.12382.
- Olivera-Severo, D., Uberti, A.F., Marques, M.S., Pinto, M.T., Gomez-Lazaro, M., Figueiredo, C., et al. (2017). A New Role for Helicobacter pylori Urease: Contributions to Angiogenesis. *Front Microbiol* 8, 1883. doi: 10.3389/fmicb.2017.01883.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., and Carlini, C.R. (2006a). Bacillus pasteurii urease shares with plant ureases the ability to induce aggregation of blood platelets. *Arch Biochem Biophys* 452(2), 149-155. doi: 10.1016/j.abb.2006.06.001.
- Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., and Carlini, C.R. (2006b). Ureases display biological effects independent of enzymatic activity: is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? *Braz J Med Biol Res* 39(7), 851-861.
- Ollivier, V., Syvannarath, V., Gros, A., Butt, A., Loyau, S., Jandrot-Perrus, M., et al. (2014). Collagen can selectively trigger a platelet secretory phenotype via glycoprotein VI. *PLoS One* 9(8), e104712. doi: 10.1371/journal.pone.0104712.
- Olofsson, A., Vallstrom, A., Petzold, K., Tegtmeier, N., Schleucher, J., Carlsson, S., et al. (2010). Biochemical and functional characterization of Helicobacter pylori vesicles. *Mol Microbiol* 77(6), 1539-1555. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07307.x.
- Papagiannakis, P., Michalopoulos, C., Papalexi, F., Dalampoura, D., and Diamantidis, M.D. (2013). The role of Helicobacter pylori infection in hematological disorders. *Eur J Intern Med* 24(8), 685-690. doi: 10.1016/j.ejim.2013.02.011.
- Parsonnet, J., Friedman, G.D., Orentreich, N., and Vogelmann, H. (1997). Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection. *Gut* 40(3), 297-301.
- Peek, R.M., Jr. (2016). New Biology to New Treatment of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *Dig Dis* 34(5), 510-516. doi: 10.1159/000445231.
- Peek, R.M., Jr., Fiske, C., and Wilson, K.T. (2010). Role of innate immunity in Helicobacter pylori-induced gastric malignancy. *Physiol Rev* 90(3), 831-858. doi: 10.1152/physrev.00039.2009.

- Piovesan, A.R., Martinelli, A.H., Ligabue-Braun, R., Schwartz, J.L., and Carlini, C.R. (2014). Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 547, 6-17. doi: 10.1016/j.abb.2014.02.006.
- Polgar, J., Clemetson, J.M., Kehrel, B.E., Wiedemann, M., Magnenat, E.M., Wells, T.N., et al. (1997). Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem* 272(21), 13576-13583.
- Riddles, P.W., Whan, V., Blakeley, R.L., and Zerner, B. (1991). Cloning and sequencing of a jack bean urease-encoding cDNA. *Gene* 108(2), 265-267.
- Roberts, S.E., Morrison-Rees, S., Samuel, D.G., Thorne, K., Akbari, A., and Williams, J.G. (2016). Review article: the prevalence of *Helicobacter pylori* and the incidence of gastric cancer across Europe. *Aliment Pharmacol Ther* 43(3), 334-345. doi: 10.1111/apt.13474.
- Rutherford, J.C. (2014). The emerging role of urease as a general microbial virulence factor. *PLoS Pathog* 10(5), e1004062. doi: 10.1371/journal.ppat.1004062.
- Schumann, R.R., Rietschel, E.T., and Loppnow, H. (1994). The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin. *Med Microbiol Immunol* 183(6), 279-297.
- Scopel-Guerra, A. (2013). *Urease de Helicobacter pylori e suas subunidades: papel na ativação e agregação plaquetária*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Singbartl, K., Forlow, S.B., and Ley, K. (2001). Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J* 15(13), 2337-2344. doi: 10.1096/fj.01-0199com.
- Sirko, A., and Brodzik, R. (2000). Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochim Pol* 47(4), 1189-1195.
- Stalker, T.J., Traxler, E.A., Wu, J., Wannemacher, K.M., Cermignano, S.L., Voronov, R., et al. (2013). Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 121(10), 1875-1885. doi: 10.1182/blood-2012-09-457739.
- Suzuki, H., Hibi, T., and Marshall, B.J. (2007). *Helicobacter pylori*: present status and future prospects in Japan. *J Gastroenterol* 42(1), 1-15. doi: 10.1007/s00535-006-1990-z.
- Thomas, M.R., and Storey, R.F. (2015). The role of platelets in inflammation. *Thromb Haemost* 114(3), 449-458. doi: 10.1160/TH14-12-1067.
- Thon, J.N., Peters, C.G., Machlus, K.R., Aslam, R., Rowley, J., Macleod, H., et al. (2012). T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. *J Cell Biol* 198(4), 561-574. doi: 10.1083/jcb.201111136.
- Tsuda, M., Karita, M., Morshed, M.G., Okita, K., and Nakazawa, T. (1994). A urease-negative mutant of *Helicobacter pylori* constructed by allelic exchange mutagenesis lacks the ability to colonize the nude mouse stomach. *Infect Immun* 62(8), 3586-3589.
- Uberti, A.F., Olivera-Severo, D., Wassermann, G.E., Scopel-Guerra, A., Moraes, J.A., Barcellos-de-Souza, P., et al. (2013). Pro-inflammatory properties and neutrophil activation by *Helicobacter pylori* urease. *Toxicon* 69, 240-249. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.02.009.
- Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., et al. (2001). *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 345(11), 784-789. doi: 10.1056/NEJMoa001999.
- Vajen, T., Mause, S.F., and Koenen, R.R. (2015). Microvesicles from platelets: novel drivers of vascular inflammation. *Thromb Haemost* 114(2), 228-236. doi: 10.1160/TH14-11-0962.

- Vieira-de-Abreu, A., Campbell, R.A., Weyrich, A.S., and Zimmerman, G.A. (2012). Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum. *Semin Immunopathol* 34(1), 5-30. doi: 10.1007/s00281-011-0286-4.
- Wassermann, G.E., Olivera-Severo, D., Uberti, A.F., and Carlini, C.R. (2010). Helicobacter pylori urease activates blood platelets through a lipoxygenase-mediated pathway. *J Cell Mol Med* 14(7), 2025-2034. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00901.x.
- Yamaoka, Y. (2010). Mechanisms of disease: Helicobacter pylori virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(11), 629-641. doi: 10.1038/nrgastro.2010.154.
- Yamaoka, Y., Reddy, R., and Graham, D.Y. (2010). Helicobacter pylori virulence factor genotypes in children in the United States: clues about genotype and outcome relationships. *J Clin Microbiol* 48(7), 2550-2551. doi: 10.1128/JCM.00114-10.
- Yoshiyama, H., and Nakazawa, T. (2000). Unique mechanism of Helicobacter pylori for colonizing the gastric mucus. *Microbes Infect* 2(1), 55-60.
- Zanoni, I., and Granucci, F. (2013). Role of CD14 in host protection against infections and in metabolism regulation. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 32. doi: 10.3389/fcimb.2013.00032.
- Zhang, G., Han, J., Welch, E.J., Ye, R.D., Voyno-Yasenetskaya, T.A., Malik, A.B., et al. (2009). Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 182(12), 7997-8004. doi: 10.4049/jimmunol.0802884.
- Zhang, J.Y., Liu, T., Guo, H., Liu, X.F., Zhuang, Y., Yu, S., et al. (2011). Induction of a Th17 cell response by Helicobacter pylori Urease subunit B. *Immunobiology* 216(7), 803-810. doi: 10.1016/j.imbio.2010.12.006.