



II Simpósio de Pesquisa do Ecossistema Ânima:
Juntos pelo Conhecimento: um novo saber cria um novo amanhã

**A UREASE DE *Proteus mirabilis* E O PAPEL NO EIXO INTESTINO-CÉREBRO NA
DOENÇA DE PARKINSON.**

Autores e Orientadores:

Vinicius Lopes de Souza¹, Dr. Matheus V. C. Grahl^{1,2} (Orientador)

¹ Escola de Ciências da Saúde, Centro Universitário Ritter dos Reis, Porto Alegre, RS, Brasil;
vinivls2002@gmail.com; matheus.grahl@ulife.com.br

² Programa de Graduação em Medicina e Ciências das Saúde e Instituto do Cérebro, Pontifícia
Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;
Matheusgrahl@hotmail.com

Resumo:

Pacientes com doença de Parkinson (DP) apresentam microbiota intestinal alterada. Ratos tratados oralmente com o microorganismo intestinal *Proteus mirabilis* desenvolveram sintomas semelhantes aos do Parkinson. Nosso trabalho avaliou o possível envolvimento da urease de *P. mirabilis* (PMU) na patogênese da DP. A proteína purificada foi administrada a camundongos por via intraperitoneal (20 µg/animal/dia) durante uma semana. Foram realizados testes comportamentais e os homogenatos cerebrais dos animais tratados foram submetidos a imunoenaios. *In vitro* a proteína foi incubada com α -sinucleína e examinadas através de microscopia eletrônica de transmissão. Nossos resultados mostraram que o tratamento com PMU induziu comportamento depressivo em camundongos. Não foram observados déficits motores. Os homogenatos cerebrais apresentaram níveis de α -sinucleína e tirosina hidroxilase diminuídos. A urease alterou a morfologia dos agregados de α -sinucleína *in vitro*, formando agregados fragmentados. Concluímos que a PMU não induz alterações motoras, no entanto ela foi capaz de induzir alterações bioquímicas características de DP.



Introdução:

As ureases (EC 3.1.3.5, ureia amidohidrolase) são enzimas que catalisam a hidrólise de uréia em dióxido de carbono e amônia. Essas proteínas são sintetizadas por plantas, fungos e bactérias, mas não são produzidos por animais [1]. Independentemente da origem, ureases compartilham pelo menos ~55% de identidade entre os filos e podem conter um, dois ou três subunidades organizadas em estruturas quaternárias complexas [2].

Uma alteração profunda na microbiota intestinal tem sido descrita em pacientes com DP, com prevalência de bactérias *Enterobacteriaceae*, entre as quais está *P. mirabilis*, abundantemente presente nas fezes [3, 4]. Alterações na permeabilidade da barreira epitelial intestinal e/ou da barreira hematoencefálica, resultantes da ação de moléculas pró-inflamatórias, toxinas ou metabólitos produzidos por patógenos, facilitam potencialmente a migração de compostos ativos da corrente sanguínea para o SNC [5, 6]. No contexto da disbiose intestinal, o aumento de citocinas ou interleucinas e o acúmulo de agregados proteicos anômalos, como os da -sinucleína observados no SNE, podem se espalhar ainda mais para o SNC [5, 6]. De acordo com a origem do SNE, a vagotomia completa em pacientes com DP diminuiu a progressão da doença quando comparados àqueles que não foram submetidos ou tiveram procedimento parcial [7,8-10].

Com o objetivo de estabelecer a contribuição do *P. mirabilis* na patogênese da DP, Choi et al. (2018) trataram ratos por via oral com uma suspensão de bactérias vivas [11]. Os animais desenvolveram sintomas motores semelhantes aos da DP e perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra e corpo estriado, acompanhados por níveis aumentados de marcadores pró-inflamatórios (Iba1, TNF- e IL-1) e deposição de -sinucleína no cérebro e cólon. [11]. *P. mirabilis* produz diversos fatores de virulência, entre eles a enzima urease, que ao catalisar a hidrólise da uréia da urina, gera amônia e contribui para a formação de cálculos urinários. Estes, por sua vez, envolvem as bactérias e protegem-nas contra a terapia antibiótica, permitindo que o patógeno sobreviva e prolifere [12, 13].

Aqui, nosso objetivo foi investigar as propriedades biológicas da PMU que poderiam ser relevantes para a patogênese da doença de Parkinson. Para esse objetivo, a holoenzima purificada foi testada em células cultivadas e administrada em camundongos. Homogeneizados de culturas celulares ou tecidos cerebrais foram analisados quanto a efeitos citotóxicos. Os camundongos tratados foram avaliados quanto a alterações comportamentais seguindo o protocolo de Choi et al. (2018) [11]. Visando elucidar as relações estrutura versus atividade da PMU, também foram



realizados testes com sua subunidade isolada. Finalmente, a formação de fibrilas de alfa-sinucleína foi investigada in vitro na presença de PMU.

Palavras-chave: neuroinflamação, α -sinucleinopatias, doença de Parkinson.

Métodos:

Rotarod

O dispositivo consistia em um cilindro de 5 cm de diâmetro que aumentava gradativamente sua rotação de 5 para 16 rpm. Os animais foram colocados sobre a haste rotativa e a velocidade foi aumentada gradativamente, atingindo seu máximo após 5 min. Cada dia de teste consistiu em três sessões de 5 minutos, com intervalo de 1 hora entre elas. A integridade da coordenação motora foi avaliada com base no tempo médio de permanência dos animais na haste a cada dia [14, 15].

Teste de Pólo

Os ratos foram gentilmente colocados voltados para cima no topo de um poste vertical de superfície áspera (diâmetro 8 mm; altura 55 cm). Foram registrados o tempo necessário para o animal tocar suas quatro patas no solo (tempo de atividade locomotora). Cada sessão experimental foi composta por três testes, com intervalo entre tentativas de 1 hora, e foi considerado o tempo médio por dia. Quando o animal não conseguia virar-se para o chão ou caiu do poste, o tempo foi registrado como 5 min (máximo) [15, 16].

Análises de Western Blot

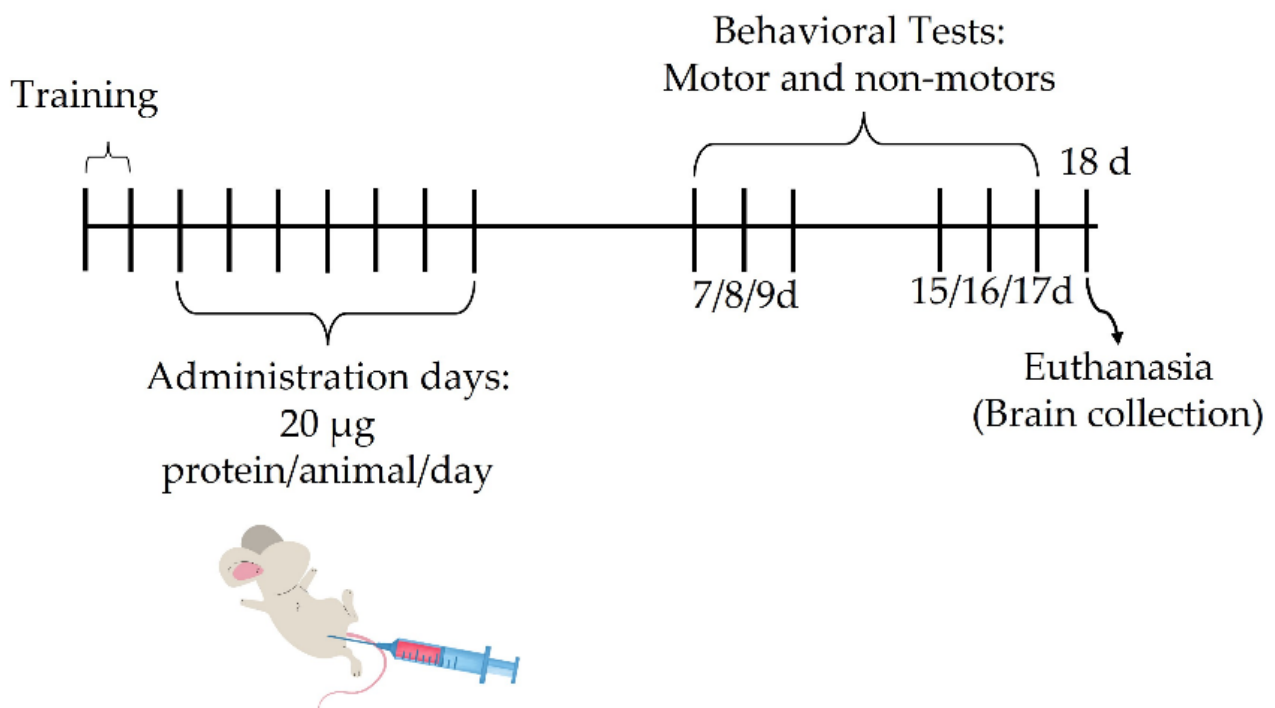
Os homogenatos cerebrais foram desnaturados em tampão de amostra (Tris HCl 50 mM, pH 6, 8, SDS a 1%, 2-mercaptoetanol a 5%, glicerol a 10%, azul de bromofenol a 0,001%) e aquecidos em banho seco durante 5 min. As amostras (20 μ g de proteína total) foram separadas em géis de SDS-PAGE e as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,22 μ m (BioRad, Hercules, CA, EUA). Os marcadores de massa molecular (PageRuler, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) foram executados em paralelo. As membranas foram bloqueadas com PBS Tween (NaCl



137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, Tween-20 a 0,1%) contendo albumina de soro bovino a 5% (Sigma) e subsequentemente incubadas com os seguintes anticorpos: anti- alfa sinucleína de coelho (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA, PA517239, 1:1000), antitirosina hidroxilase de coelho (Invitrogen, OPA104050, 1:1000) e antiactina de coelho (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA, A2066, 1:1000). Anticorpos secundários (anti-coelho, 1:10.000) acoplados à peroxidase de rábano foram obtidos da Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, EUA). As bandas proteicas foram visualizadas utilizando um kit de detecção de quimioluminescência (Millipore, Billerica, MA, EUA) com aparelho L-Pix Chemi (Loccus, Cotia, Brasil). Os níveis de expressão proteica foram quantificados usando o software ImageJ v.8.0 e normalizados contra - actina como controle endógeno [17].

Resultados e discussões:

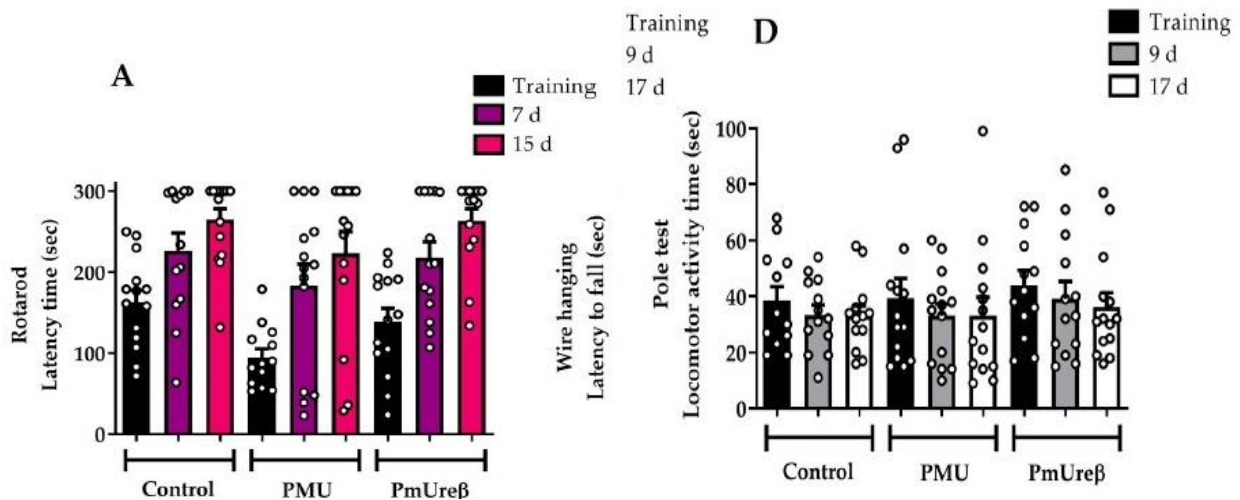
Nossos resultados indicam que a urease não foi capaz de induzir alterações motoras nos animais testados conforme o cronograma de execução testado (figura 1 - cronograma de tratamento).



(figura 1 - cronograma de tratamento)

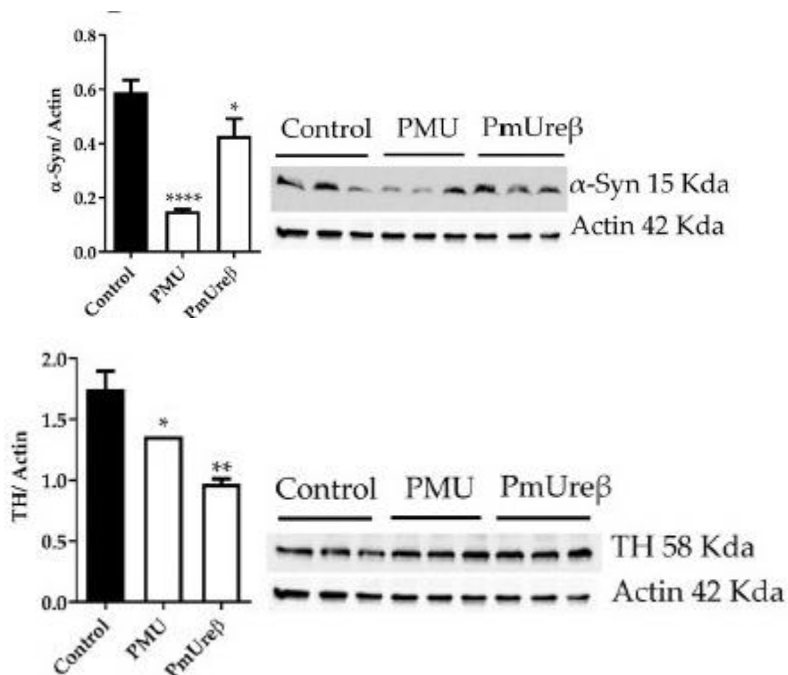


Os ensaios de rotarod e pole teste não demonstraram alterações motoras (Figura 2 - rotaroad e teste de poste). As condições de tratamento provavelmente não induziram danos suficientes para gerar efeitos diretamente no comportamento dos animais.



(Figura 2 - rotaroad e teste de poste)

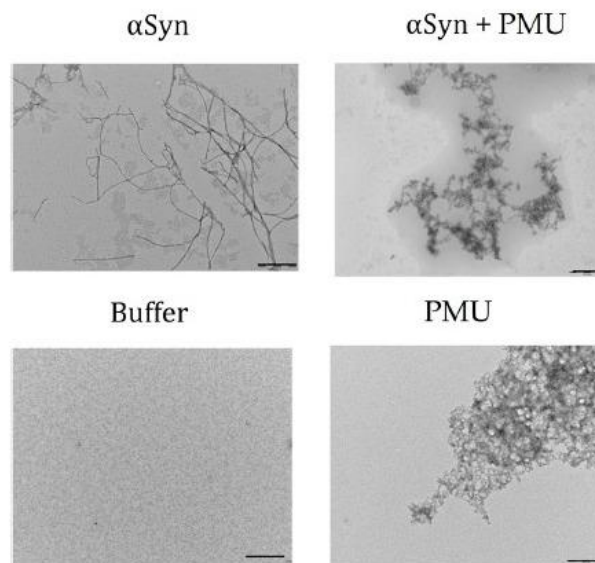
No entanto, nossos achados bioquímicos, com homogenizados cerebrais, indicam que a urease induziu a diminuição de tiroxina hidrosilase (marcador de neurônios dopaminérgicos) e a produção de alfa-sinucleína. (figura 3 - western blot). Estes achados indicam que a urease foi capaz de induzir alterações prodrômicas que precedem o início dos sintomas motores.



(figura 3 - western blot)



Para confirmar a interação entre urease e alfa-sinucleína nós investigamos a fibrilação de alfa-sinucleína quando exposta a urease (figura 4 - cinéticas de alfa sinucleína) onde demonstramos que a PMU induziu alterações morfológicas no formato de fibras características da proteína sinucleína.



(figura 4 - cinéticas de alfa sinucleína)

Conclusões:

Nossos achados indicam que as ureases são capazes de induzir características prodrômicas que podem levar ao desenvolvimento de sintomas característicos da DP. No entanto, nossos resultados demonstrados no trabalho apesar de não demonstrarem sintomas motores podem ser explicados por conta do cronograma/dose utilizada neste protocolo.

Referências:

[¹]Carlini, C.R.; Ligabue-Braun, R. Ureases as Multifunctional Toxic Proteins: A Review. *Toxicon* 2016, 110, 90–109. [CrossRef] [PubMed]

[²] Kappaun, K.; Piovesan, A.R.; Carlini, C.R.; Ligabue Braun, R. Ureases: Historical Aspects, Catalytic, and Non-Catalytic Properties—A Review. *J. Adv. Res.* 2018, 13, 3–17. [CrossRef] [PubMed]



- [3] Li, W.; Wu, X.; Hu, X.; Wang, T.; Liang, S.; Duan, Y.; Jin, F.; Qin, B. Structural Changes of Gut Microbiota in Parkinson's Disease and Its Correlation with Clinical Features. *Sci. China Life Sci.* 2017, 60, 1223–1233. [CrossRef]
- [4] Tan, A.H.; Lim, S.Y.; Lang, A.E. The Microbiome–Gut–Brain Axis in Parkinson Disease— from Basic Research to the Clinic. *Nat. Rev. Neurol.* 2022, 18, 476–495. [CrossRef]
- [5] Marizzoni, M.; Provasi, S.; Cattaneo, A.; Frisoni, G.B. Microbiota and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Opin. Neurol.* 2017, 30, 630–638. [CrossRef] [PubMed]
- [6] Quigley, E.M.M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017, 17, 94. [CrossRef] [PubMed]
- [7] Caputi, V.; Giron, M. Microbiome-Gut-Brain Axis and Toll-Like Receptors in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1689. [CrossRef]
- [8] Svensson, E.; Horváth-Puhó, E.; Thomsen, R.W.; Djurhuus, J.C.; Pedersen, L.; Borghammer, P.; Sørensen, H.T. Vagotomy and Subsequent Risk of Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.* 2015, 78, 522–529. [CrossRef] [PubMed]
- [9] Liu, B.; Fang, F.; Pedersen, N.L.; Tillander, A.; Ludvigsson, J.F.; Ekbom, A.; Svenningsson, P.; Chen, H.; Wirdefeldt, K. Vagotomy and Parkinson Disease. *Neurology* 2017, 88, 1996–2002. [CrossRef]
- [10] Killinger, B.A.; Madaj, Z.; Sikora, J.W.; Rey, N.; Haas, A.J.; Vepa, Y.; Lindqvist, D.; Chen, H.; Thomas, P.M.; Brundin, P.; et al. The Vermiform Appendix Impacts the Risk of Developing Parkinson's Disease. *Sci. Transl. Med.* 2018, 10, eaar5280. [CrossRef]
- [11] Choi, J.G.; Kim, N.; Ju, I.G.; Eo, H.; Lim, S.-M.; Jang, S.-E.; Kim, D.-H.; Oh, M.S. Oral Administration of *Proteus Mirabilis* Damages Dopaminergic Neurons and Motor Functions in Mice. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1275. [CrossRef]
- [12] Schaffer, J.N.; Pearson, M.M. *Proteus Mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol. Spectr.* 2015, 3, 383–433. [CrossRef] [PubMed]
- [13] Armbruster, C.E.; Mobley, H.L.T.; Pearson, M.M. Pathogenesis of *Proteus Mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 2018, 8, 8. [CrossRef]
- [14] Neves, G.; Menegatti, R.; Antonio, C.B.; Graziottin, L.R.; Vieira, R.O.; Rates, S.M.K.; Noël, F.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M. Searching for Multi-Target Antipsychotics: Discovery of Orally Active Heterocyclic N-Phenylpiperazine Ligands of D2-like and 5-HT1A Receptors. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 1925–1935. [CrossRef]



[¹⁵] Souza, I.; Frost, P.S.; França, J.V.; Nascimento-Viana, J.B.; Neris, R.L.S.; Freitas, L.; Pinheiro, D.J.L.L.; Nogueira, C.O.; Neves, G.; Chimelli, L.; et al. Acute and Chronic Neurological Consequences of Early-Life Zika Virus Infection in Mice. *Sci. Transl. Med.* 2018, 10, eaar2749. [CrossRef]

[¹⁶] Ogawa, N.; Hirose, Y.; Ohara, S.; Ono, T.; Watanabe, Y. A Simple Quantitative Bradykinesia Test in MPTP-Treated Mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1985, 50, 435–441.

[¹⁷] Uberti, A.F.; Callai-Silva, N.; Grahl, M.V.C.; Piovesan, A.R.; Nachtigall, E.G.; Furini, C.R.G.; Carlini, C.R. *Helicobacter pylori* Urease: Potential Contributions to Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 3091. [CrossRef] [PubMed]

Fomento: Estes trabalho foi financeiro pela CAPES, CNPq, FAPERGS, FAPERJ.

