

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**HIRAN REIS SOUSA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO***  
**DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA DISSULFETO ISOMERASE PROTÉICA-**  
**ETAPA 2**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos**

**Co-orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes**

**São Luís – MA**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE  
PEPTÍDEOS INIBIDORES DA DISSULFETO ISOMERASE PROTÉICA–ETAPA 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**São Luís – MA**

**2016**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Reis Sousa, Hiran.

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AGREGANTE  
PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE PEPTÍDEOS INIBIDORES DA  
DISSULFETO ISOMERASE PROTÉICA: ETAPA 2 / Hiran Reis Sousa.  
- 2016.

52 p.

Orientador(a): Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos.

Coorientador(a): Antonio Marcus de Andrade Paes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da  
Saúde/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2016.

1. Agentes antitrombóticos. 2. Peptídeos. 3. Óxido-redução.  
4. Agregação plaquetária. 5. Proteína dissulfeto isomerase. I. Silva de  
Azevedo dos Santos, Ana Paula. II. de Andrade Paes, Antonio Marcus.  
III. Título.

**HIRAN REIS SOUSA**

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-AGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE  
PEPTÍDEOS INIBIDORES DA DISSULFETO ISOMERASE PROTÉICA–ETAPA 2**

A comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia     /     /     considerou o candidato

(     ) **APROVADO** (     ) **REPROVADO**

---

**Profª. Drª. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos**

Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA).

Presidente

---

**Prof. Dr. Marcelo Larami Santoro**

Instituto Butantan, São Paulo (SP)

Avaliador Externo

---

**Prof. Dr. Andrés Ezequiel Trostchansky Vasconcellos**

Universidad de la República, Montevideú, Uruguai.

Avaliador Externo

---

**Prof. Dr. Paulo Vitor Soeiro Pereira**

Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA).

Avaliador Interno

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela imensurável bondade que tem derramado sobre minha vida, mesmo nos momentos difíceis e por ter me abençoado ao longo da minha vida acadêmica, transformando derrotas em vitórias.

À minha esposa Stefanie, pelo seu amor e apoio nas horas difíceis, sempre com uma palavra de apoio quando eu mais precisava. O brigado pelo seu amor e companheirismo.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula, pelo carinho, paciência e dedicação. Meus agradecimentos com incomensurável admiração.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Antonio Marcus, por ter me conduzido no amadurecimento científico e me ensinado a trilhar no mundo da pesquisa a qual quero dedicar-me, mas acima de tudo, pela paciência e amizade.

Ao grupo de trabalho da agregação plaquetária, Prof<sup>a</sup>. Ms. Samira Abdalla, Profa Ms. Elyjane Sena, Renato Gaspar, Lucas Fontelles. Obrigado pelo conhecimento compartilhado, pelo apoio técnico, científico, moral e principalmente, pela amizade e companheirismo.

Ao prof. Dr. Andrés Ezequiel Trostchansky Vasconcellos, da Universidad de la República (UdelaR), por nos ter recebido calorosamente em seu laboratório e nos auxiliado em nossos experimentos.

À família LEFisio - UFMA por termos compartilhado momentos bons e ruins ao longo desses dois árduos anos.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão – HEMOMAR por ceder gentilmente o uso de seu equipamento de agregação.

A todos os voluntários que literalmente doaram o sangue para execução deste trabalho.

Ao laboratório Gaspar que doou o aparelho APACT 4 da Helena Laboratories para o desenvolvimento de nossos trabalhos.

Às agências financiadoras CNPq, CAPES e FAPEMA pelo auxílio e bolsas.

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem-se do presente, de forma que, acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido”

Dalai Lama

## RESUMO

Investigações recentes têm enfatizado a importância de mecanismos redox na modulação da função plaquetária. A superfície da plaqueta contém grande variedade de integrinas e outras moléculas receptoras que possuem tióis funcionais em sua estrutura, os quais são alvos potenciais de regulação redox. Dentre estas várias proteínas tiólicas, a integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  destaca-se por ser a via de convergência da ativação plaquetária induzida por diversos agonistas. A ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  é catalisada pela proteína dissulfeto isomerase (PDI), essencial à mudança de conformação que leva à exposição do sítio de ligação ao fibrinogênio. Sendo assim, a PDI tem se mostrado como um alvo importante para o desenvolvimento de fármacos reguladores da agregação plaquetária. Nos últimos anos, diversos estudos têm descrito substâncias de origem vegetal, animal e sintéticas que são capazes de inibir a PDI. Em trabalho do nosso grupo de pesquisa (DE A. PAES et al., 2011), demonstrou que o peptídeo sintético CxxC, o qual contém o motivo redox da PDI na sua sequência original CGHC, inibiu a atividade redutase desta enzima; efeito não observado com os peptídeos AxxA, que possui as cisteínas substituídas por alanina e Scr, peptídeo controle contendo os mesmos aminoácidos do peptídeo CxxC, porém com sequência aleatória sem formação de ditiol. Demonstrou-se, também, que apenas o peptídeo CxxC reduziu em 30% a agregação induzida por ADP (5 $\mu\text{M}$ ) em plasma rico em plaquetas, efeito aparentemente mediado pela associação do CxxC com a PDI na superfície plaquetária. Sendo assim, neste trabalho continuamos a avaliação dos efeitos do peptídeo CxxC e seus controles sobre a agregação plaquetária. Para tanto, incubamos lavado de plaquetas humanas com o peptídeo CxxC nas concentrações de 3, 6 e 10  $\mu\text{M}$ , resultando em inibição concentração-dependente da agregação ativada por trombina (0,02 U/mL) em 25, 60 e 74 %, respectivamente, com  $\text{IC}_{50}$  de  $6,13 \pm 1,09 \mu\text{M}$ . A presença dos peptídeos controle não produziu quaisquer efeitos inibitórios. O peptídeo CxxC reduziu a ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  na superfície da plaqueta, porém não impactou a expressão dos antígenos CD 62-P e CD 63. Os peptídeos controle não alteraram a expressão desses marcadores. A análise por espectrometria de massas da interação da PDI recombinante humana com os peptídeos, mostrou que apenas o peptídeo CxxC associa-se com a Cys<sub>400</sub> do motivo redox **a'** da hPDI, o qual tem sido considerado fundamental para a agregação plaquetária. Em conjunto, estes resultados demonstram que o peptídeo CxxC reduz a agregação plaquetária via associação com a PDI, podendo ser empregado como modelo para o desenvolvimento de fármacos novos antitrombogênicos.

**Palavras-chave:** agentes antitrombóticos, peptídeos, oxido-redução, agregação plaquetária, proteína dissulfeto isomerase.

## ABSTRACT

Recent researches have emphasized the importance of redox mechanisms for platelet function modulation. The platelet surface contains a large variety of integrin receptors and other molecules presenting functional thiol groups in their structures, which are potential targets for redox regulation. Among these various thiol-containing proteins, integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 stands out for being the convergence path of platelet activation induced by various agonists. Activation of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin is catalyzed by protein disulfide isomerase (PDI) through an essential conformational change leading to the exposure of fibrinogen-binding site. Thus, PDI has been shown to be an important target for the development of antiplatelet drugs. In recent years, many studies have described substances from plant (DE A. PAES et al., 2011), as well as synthetics that are capable of inhibiting PDI. In a previous study of our research group has shown that the synthetic peptide CxxC, which contains the redox motif of PDI in its original sequence **CGHC**, inhibited reductase activity of this enzyme, effect not observed with AxxA peptide, whose cysteines were replaced with alanine and Scr peptide, which contains the same aminoacids from CxxC peptide, but under random sequence. It has been also demonstrated that CxxC peptide was the only to reduce by 30% ADP-induced aggregation (5 $\mu$ M) in platelet rich plasma, an effect apparently mediated by the association of CxxC and PDI at platelet surface. Thus, in this work, we further assessed the effects of CxxC and its control peptides on platelet aggregation. Washed human platelets were incubated with CxxC peptide at concentrations of 3, 6 and 10  $\mu$ M, resulting in a dose-dependent inhibition of maximum aggregation activated by thrombin (0.02 U/mL) at 25, 60 and 74%, respectively with IC<sub>50</sub> of 6.13  $\pm$  1.09  $\mu$ M. The presence of control peptides did not produce any inhibitory effect. CxxC peptide also reduced the activation of  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 integrin at platelet surface, but did not affect the expression of the markers CD 62-P and CD 63. Control peptides did not alter the expression of these markers. Analysis by mass spectrometry of the interaction of recombinant human PDI with the peptide showed that only CxxC peptide associated with the redox Cys<sub>400</sub> of **a'** motif of PDI, which has been considered essential for platelet aggregation. Together, these results demonstrate that CxxC peptide reduces platelet aggregation by association with PDI and can be further used as a model for the development of new antithrombotic drugs.

**Keywords:** antithrombotic agents, peptides, redox, platelet aggregation, protein disulfide isomerase.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>2.1</b>	<b>Plaquetas</b> .....	14
<b>2.2</b>	<b>As integrinas plaquetárias e seus mecanismos reguladores</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>As proteínas dissulfeto isomerase</b> .....	19
<b>2.4</b>	<b>Inibidores das PDIs como potenciais alvos terapêuticos</b> .....	22
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	25
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	25
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	26
<b>4.1</b>	<b>Identificação</b> .....	26
<b>4.2</b>	<b>Achados fundamentais</b> .....	27
<b>4.3</b>	<b>Resumo</b> .....	27
<b>4.4</b>	<b>Introdução</b> .....	28
<b>4.5</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	29
4.5.1	Criação e síntese dos peptídeos.....	29
4.5.2	Preparação de plasma rico em plaquetas e plaquetas lavadas .....	31
4.5.3	Agregação de plaquetas .....	31
4.5.4	Citometria de fluxo .....	32
4.5.5	Marcação de tióis livres da superfície celular de plaquetas.....	32
4.5.6	ESI LC-MS/MS e estudos de mapeamento dos peptídeos .....	33
4.5.7	Análise estatística .....	34
<b>4.6</b>	<b>Resultados</b> .....	34
4.6.1	CxxC atenua a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina.....	34
4.6.2	CxxC diminui a ativação de integrinas na superfície das plaquetas $\alpha$ Ib $\beta$ 3 .....	36
4.6.3	CxxC diminui PDI tióis livres na superfície das plaquetas disponibilidade.....	38
4.6.4	CxxC se liga covalentemente ao sítio ativo C terminal da PDI.....	39
<b>4.7</b>	<b>Discussão</b> .....	41

<b>4.8</b>	<b>Contribuições dos autores .....</b>	<b>44</b>
<b>4.9</b>	<b>Agradecimentos.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>46</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>
	<b>APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>53</b>
	<b>APÊNDICE B- Figuras suplementares do artigo .....</b>	<b>54</b>
	<b>ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Os eventos chave na agregação plaquetária: Ativação plaquetária, secreção e agregação .....	16
Figura 2. Representação de mecanismos redox que estão envolvidos na agregação plaquetária .....	18
Figura 3. Domínios, composição e estrutura tridimensional da PDI.....	20
Figura 4. Diagrama esquemático das possíveis aplicações terapêuticas na modulação da função da PDI.....	22
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da PDI e as sequências de aminoácidos dos peptídeos CxxC, AxxA e Scr .....	30
Figura 6. CxxC inibe a agregação de plaquetas induzida por ADP e trombina em plasma rico em plaquetas .....	35
Figura 7. Efeito do peptídeo CxxC sobre a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas lavadas .....	36
Figura 8. O peptídeo CxxC diminui a ativação das integrinas $\alpha$ IIb $\beta$ 3 em plaquetas lavadas ativadas por trombina, mas não interfere com a de grânulos $\alpha$ e denso .....	37
Figura 9. O peptídeo CxxC diminui o número de tióis livres na PDI marcados com MPB....	39
Figura 10. Ligação do peptídeo CxxC à Cys <sub>400</sub> do domínio ativo a' da hPDI.....	40
Figura S1. Caracterização MS/MS dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA.....	54
Figura S2. Análise da tripsinização da PDI por HPLC/MS .....	54

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>ACD</b>	Ácido citrato dextrose
<b>AcMo</b>	Anticorpo monoclonal
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina
<b>AINE</b>	Anti-inflamatório não esteroidal
<b>APACT</b>	Análise automatizada de agregação e coagulação de plaquetas (do inglês <i>Automated Platelet Aggregation and Coagulation Tracer</i> )
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina
<b>AUC</b>	Área sobre a curva (do inglês <i>Area Under the Curve</i> )
<b>CD</b>	Grupo de diferenciação (do inglês <i>Cluster of Differentiation</i> )
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Dispersão frontal (do inglês <i>forward scatter</i> )
<b>GP</b>	Glicoproteína
<b>hPDI</b>	Proteína Dissulfeto Isomerase recombinante Humana
<b>LC-ESI-MS/MS</b>	Cromatografia Líquida acoplada a Fonte de Ionização por Electrospray acoplada à Espectrometria de Massas tandem Espectrometria de Massas, (do inglês <i>Liquid Chromatography with Electrospray Ionization with Mass Spectrometry tandem Mass Spectrometry</i> )
<b>LP</b>	Lavado de plaqueta
<b>MFI</b>	Intensidade média de fluorescência (do inglês <i>mean fluorescence intensity</i> )
<b>MPB</b>	3- (N-maleimidilpropionil) biocitina
<b>NEM</b>	N-etilmaleimida

<b>PAF</b>	Fator de agregação plaquetário (do inglês <i>Platelet Aggregation Fator</i> )
<b>PACMA 31</b>	Ácido carbamoil metilamida propiônico (do inglês <i>propynoic acid carbamoyl methyl amide</i> )
<b>PAO</b>	Óxido fenilarsênico (do inglês <i>Phenylarsine oxide</i> )
<b>PCMBS</b>	Ácido p-cloromercurifenilsulfônico
<b>PDI</b>	Proteína dissulfeto isomerase
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês <i>Platelet Derived Growth Factors</i> )
<b>PerCP</b>	Clorofilil peridinina
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PPP</b>	Plasma pobre em plaquetas
<b>PRP</b>	Plasma rico em plaquetas
<b>RE</b>	Retículo endoplasmático
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>ST</b>	Sangue Total
<b>SSC</b>	Dispersão lateral (do inglês <i>side scatter</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>TCEP</b>	Tris 2-carboxietilfosfina
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TEP</b>	Tromboembolia pulmonar
<b>TEV</b>	Tromboembolia venosa
<b>TRB</b>	Trombina
<b>TVP</b>	Tromboembolia venosa profunda
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>vWF</b>	Fator de Von Willebrand

## 1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios tromboembólicos constituem uma das maiores causas de morbimortalidade prevenível em doentes hospitalizados ao redor do mundo (FAUCI, 2008). No Brasil, entre janeiro de 2008 e março de 2016, o número de internações por embolias e tromboes registradas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) foi de 701.906, a um custo total de R\$ 515.188.559,35, dando um gasto médio de R\$ 733,98 por paciente. (BRASIL, 2016). Em uma análise mais ampla, as doenças do aparelho circulatório representam 19,52% das causas de óbito, um dos maiores índices de mortalidade do país, sendo 2,46% do total de mortalidade diretamente decorrente de distúrbios tromboembólicos (BRASIL, 2016).

A Trombose é definida como o processo patológico resultante da ativação e propagação inapropriada da resposta hemostática normal do organismo, podendo envolver tanto território venoso quanto o arterial, isto é, significa a formação de trombo na luz de um vaso venoso ou arterial (ALVARES; PÁDUA; TERRA FILHO, 2003). De acordo com o local acometido, a obstrução arterial tromboembólica pode expressar-se clinicamente por infarto agudo do miocárdio, angina *pectoris*, acidente vascular cerebral isquêmico ou obstrução arterial periférica (MANSUR et al., 2004). No caso da trombose venosa há uma associação tradicional com o coágulo vermelho que apresenta hemácias e grande quantidade de fibrina. Esse processo trombótico é geralmente iniciado pela ativação da cascata de coagulação. Em contraste, o trombo arterial, aderido a lesões escleróticas, é rico em plaquetas, tendo aparência de um trombo branco. Esse conceito simples tem importantes implicações terapêuticas. O trombo vermelho é tradicionalmente tratado com anticoagulantes, como a heparina e a warfarina, devido à relação direta com a coagulação; a inibição plaquetária tem sido o alvo utilizado no tratamento da síndrome coronária aguda causada pelo trombo branco ou plaquetário (CASTRO et al., 2006).

Atualmente, muitas classes de drogas têm sido utilizadas no tratamento de doenças tromboembólicas, como: anticoagulantes, anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), bloqueadores dos receptores de difosfato de adenosina (ADP), inibidores enzimáticos e inibidores da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , como o abciximab. Porém, vários desses medicamentos possuem efeitos colaterais graves, necessitam de cuidados hospitalares para sua administração, desenvolvem resistência ou inibem poucas vias de ativação plaquetária, mostrando uma necessidade de busca por novos fármacos, principalmente os que atuem por novas vias, tais como trocas tiol-dissulfeto e outros mecanismos redox (FURIE; FLAUMENHAFT, 2014). Durante a ativação plaquetária para

a formação do trombo, mecanismos redox envolvidos em alterações na morfologia e na função das plaquetas conduzem à agregação plaquetária (ESSEX, DAVID W., 2009). As trocas tiol-dissulfeto são catalisados por proteínas da família das proteínas dissulfeto isomerase (PDI), que têm sido o foco de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos a serem utilizados em ensaios clínicos para a prevenção e tratamento das doenças tromboembólicas. Trabalhos recentes têm descrito substâncias de origem vegetal (JASUJA et al., 2012), animal (KONG et al., 2015) e sintética (LI et al., 2012) que são promissores agentes para terapias antitrombóticas por inibirem as PDIs.

Desta forma, a presente dissertação de mestrado continuou as investigações iniciadas em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo do Laboratório de Fisiologia Experimental da Universidade Federal do Maranhão (LeFisio-UFMA), nos quais se tem testado a eficiência de um grupo de dodecapeptídeos sintéticos, cujas estruturas mimetizam o sítio ativo redox da PDI. São eles: CxxC, que contém o motivo redox da PDI; Scr, que apresenta uma sequência aleatória dos mesmos resíduos, e AxxA, no qual as cisteínas foram substituídas por alaninas. Inicialmente, foi demonstrado um efeito inibidor do peptídeo CxxC sobre a atividade redutase da PDI de neutrófilos fagocíticos (DE A. PAES et al., 2011). A seguir, observou-se que o peptídeo CxxC inibiu a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas (PRP) ativadas com ADP, em um mecanismo aparentemente dependente da associação com a PDI exposta na superfície da plaqueta (SENA, 2014). Sendo assim, nesta nova etapa, foram empregados os mesmos peptídeos sintéticos (CxxC, AxxA e Scr) com o objetivo de aprofundar a investigação dos mecanismos responsáveis pelo efeito inibidor da agregação plaquetária observado com o peptídeo CxxC. Esses mesmos peptídeos, foram testados também em um sistema purificado de plaquetas (lavado de plaquetas). Também substituímos o agonista ADP por trombina, uma vez que este agonista é de escolha para testes que envolvam agregação plaquetária em lavados de plaquetas e avaliação por citometria de fluxo com anticorpos monoclonais que interfiram na agregação plaquetária dependente de fibrina. Nos testes desta nova fase, foram utilizadas técnicas complementares de investigação, a saber: i) turbidimetria (agregômetro) para a investigação do impacto dos peptídeos na formação de agregados plaquetários; ii) caracterização fenotípica com anticorpos monoclonais (citometria de fluxo) para analisar a expressão de antígenos de superfície plaquetário que são capazes de avaliar separadamente, mecanismos desencadeados no processo de ativação de plaquetas; iii) espectrometria de massas (ESI LC-MS/MS), utilizada para analisar a interação dos peptídeos com a proteína dissulfeto isomerase recombinante humana (hPDI).

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Plaquetas

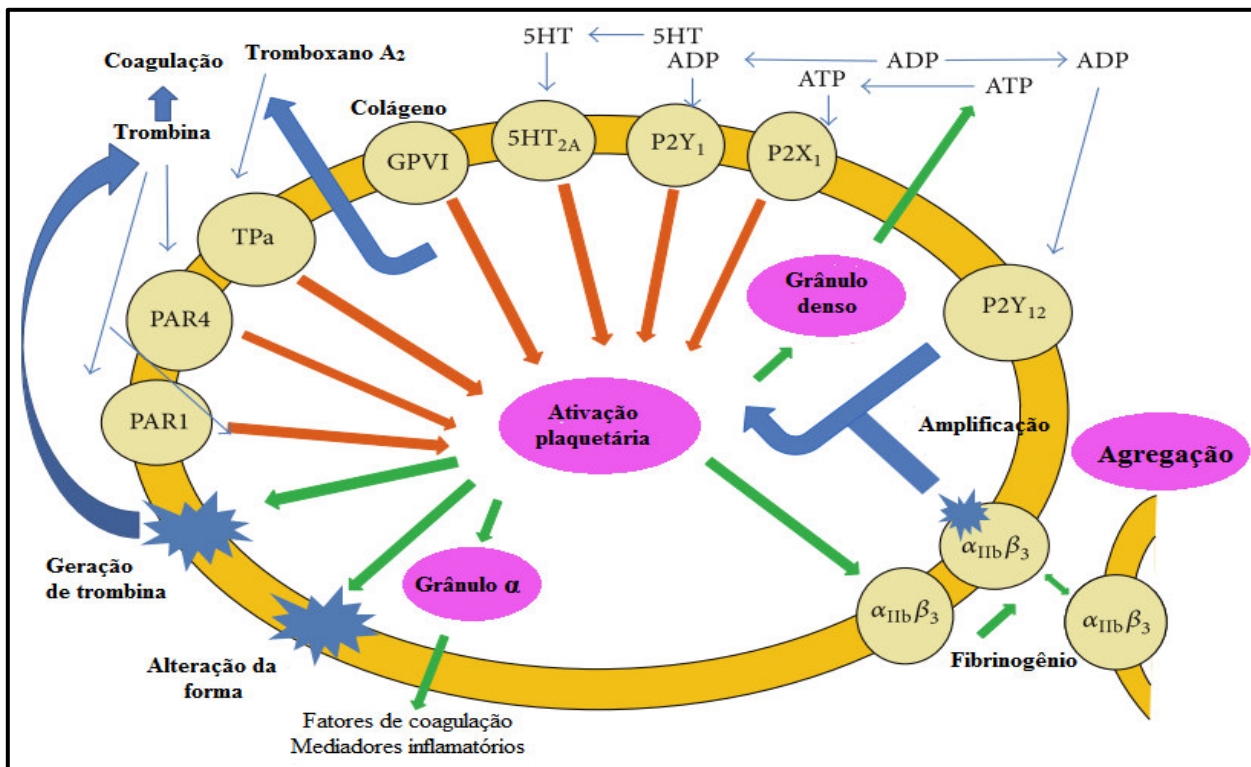
As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos discóides de aspecto granular, derivados dos megacariócitos medulares e possuem tempo de meia-vida próximo a dez dias, quando são retiradas da circulação pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (ITALIANO; HARTWIG, 2007). Apesar de serem as menores unidades hematológicas, as plaquetas possuem em sua composição estruturas diversas de alta complexidade que estão ligadas a processos fisiopatológicos (CASTRO et al., 2006), imunidade (THON et al., 2012) e hemostasia (FURIE; FLAUMENHAFT, 2014). Na hemostasia, a plaqueta é responsável pela formação do tampão plaquetário, pela estabilização do trombo e promoção da retração do coágulo por intermédio da mudança conformacional do seu citoesqueleto rico em fibras contráteis (LEVIN, 2013).

O citoplasma plaquetário contém grânulos densos, grânulos  $\alpha$  e grânulos lisossomais que estão diretamente relacionados com a função plaquetária de manutenção da integridade vascular e hemostasia. Além disso, possui fibras de actina e miosina que promovem a mudança conformacional da plaqueta de discóide para esférica durante a ativação plaquetária e ancoram os grânulos citoplasmáticos (CASTRO et al., 2006). Os grânulos densos estocam íons bivalentes e moléculas pequenas não protéicas, como tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>), ADP, trifosfato de adenosina (ATP), serotonina (5-HT) e pirofosfato. Em conjunto, atuam na sinalização e recrutamento de plaquetas inativas na circunvizinhança do sítio lesado, amplificando o estímulo de ativação e agregação plaquetária, além de agirem na modulação e ativação leucocitária. Os grânulos  $\alpha$  contêm moléculas de adesão importantes para a interação da plaqueta, além de fatores mitogênicos, proteínas plasmáticas, fatores relevantes para a coagulação/fibrinólise (FLAUMENHAFT et al., 1999). Os grânulos lisossomais armazenam glicosidases, proteases, proteínas catiônicas com atividade bactericida, embora a função dos lisossomos plaquetários na hemostasia seja desconhecida, durante um contexto de ativação *in vitro*, além da secreção de grânulos- $\alpha$  e grânulos densos, o conteúdo dos lisossomos também é exocitado (CHEN et al., 2000). As plaquetas possuem também um sistema canalicular aberto que começa na membrana plasmática e permite o intercâmbio de substâncias entre os compartimentos extra e intracelular. Estudos recentes mostraram que as proteínas da famílias das PDIs, migram para a superfície plaquetária durante o



processo de ativação plaquetária, através do sistema canalicular aberto (SCA) presente nas plaquetas (CRESCENTE et al., 2016).

A membrana plasmática das plaquetas são ricas em glicoproteínas (GP) que servem como alvos moleculares para: (a) reconhecimento do endotélio vascular ativado ou subendotélio lesado, iniciando a resposta plaquetária de manutenção da integridade vascular via GP Ia e GP IIa; (b) ancoramento das plaquetas na região do dano via interação do complexo GP Ib-IX-V com constituintes subendoteliais, fibras colágenas e fator de Von Willebrand (vWF); (c) interação com o fibrinogênio via Integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (ANDREWS; BERNDT, 2005; HEEMSKERK et al., 2005). Algumas GP, entre as quais GP Ib e a integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, contêm grupos tiólicos vicinais sujeitos a reações redox. Proteínas com atividade isomerase, tais como, as PDIs são recrutadas para a superfície das plaquetas por intermédio da liberação de grânulos plaquetários e promovem o rearranjo dinâmico de pontes de dissulfeto, propiciando a ativação plaquetária (MANICKAM, N.; AHMAD, S. S.; ESSEX, D. W., 2011; MANICKAM et al., 2008). A isomerização de pontes dissulfeto da integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 leva à sua ativação, que é a via de convergência final da ativação plaquetária por diversos agonistas como colágeno, trombina, fator ativador de plaquetas (PAF), ADP, epinefrina, e TXA<sub>2</sub>, de forma que, sua inibição implica na inibição de todas as vias que a antecedem (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014) (Figura 1).

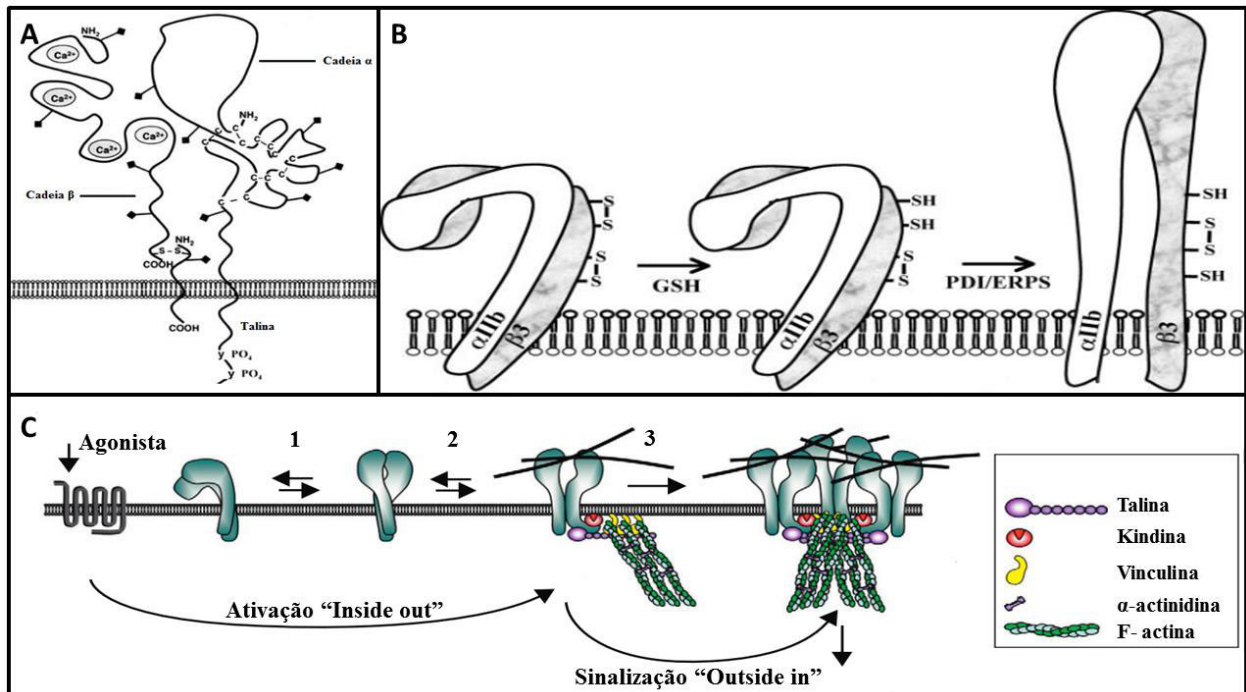


**Figura 1: Os eventos chave na agregação plaquetária: Ativação, secreção e agregação plaquetária.** Existem diversos agonistas de plaquetas fisiologicamente relevantes, tais como trombina e colágeno que ativam as plaquetas através de um receptor de agonista primário (setas vermelhas). A ativação plaquetária leva a ativação “inside-out” da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , bem como a liberação de grânulos citoplasmáticos (setas verdes). A ativação da integrina  $\alpha_{IIb}\beta_3$  permite sua ligação com o fibrinogênio e, por consequência disso, desencadeia uma série de reações de fosforilação na cauda da integrina que promovem a alteração na forma da plaqueta, denominada sinalização “outside in” (setas azuis). A sinalização “outside in” amplifica a liberação de conteúdos dos grânulos plaquetários. **Fonte:** (GHOSHAL; BHATTACHARYYA, 2014) Adaptado.

## 2.2. As integrinas plaquetárias e seus mecanismos reguladores

As integrinas são uma família de macromoléculas mediadoras da adesão celular, reguladoras da angiogênese, da homeostasia vascular e constituem receptores de superfície celular heterodiméricos encontrados em quase todos os tipos de células. São compostas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  ligadas não-covalentemente e são conhecidos dezoito tipos de subunidades  $\alpha$  e oito tipos de subunidades  $\beta$  em mamíferos, que combinadas, constituem pelo menos 24 integrinas já descritas (MILLARD; ODDE; NEAMATI, 2011; SHIMAOKA; SPRINGER, 2003; TUCKER, 2002; XIONG et al., 2001). O contato entre as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  envolve suas metades amino-terminais, que juntas formam uma "cabeça" globular e as porções remanescentes formam duas caudas em formato cilíndrico que transpassam a membrana plasmática. Ambas as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  apresentam um pequeno domínio transmembrana (20 a 30 resíduos) e uma região intracelular (20 a 50 resíduos) (Figura 2) (HAUBNER; FINSINGER; KESSLER, 1997).

Como outros receptores, as integrinas transmitem sinais para o interior da célula, chamada de sinalização *outside-in*, por meio dos domínios citoplasmáticos. Na subunidade  $\beta$ , esses domínios conectam-se a filamentos de actina do citoesqueleto por meio de proteínas intracelulares como talina, vinculina e  $\alpha$ -actinina (Haubner, Finsinger, Kessler, 1997). Através da sinalização *outside-in* as plaquetas regulam a organização de seu citoesqueleto, ativam cascatas de quinases sinalizadoras, aumentam a degranulação e estas ações são reguladas pela ativação inicial das integrinas por mecanismos citoplasmáticos denominados genericamente de ativação *inside-out*, evitando a adesão patológica mediada pela integrina. A ativação *inside-out* é iniciada como consequência de ligações dos domínios citoplasmáticos dos receptores primários de ativação plaquetária com seus respectivos substratos (Figura 1, setas vermelhas), em consequência dessas ligações, ocorre a migração de substâncias do ER (retículo endoplasmático) para a superfície plaquetária, auxiliando na ativação das integrinas  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 de superfície e liberação de grânulos  $\alpha$  e densos (Figura 1, setas verdes). Tanto a sinalização *outside-in* quanto a ativação *inside-out*, estão associadas a alterações conformacionais distintas, no segmento extracelular das integrinas. Estas mudanças variam com o tipo e natureza do ligante e são moduladas por cátions divalentes. (Figura 2A) (BANNO; GINSBERG, 2008; XIONG et al., 2001).



**Figura 2: Representação de mecanismos redox que estão envolvidos na agregação plaquetária:** (A) Modelo da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . A subunidade  $\beta_3$  contém 56 resíduos de cisteína, 32 dos quais estão em uma região rica em cisteína. A subunidade  $\alpha\text{IIb}$  contém sítios de ligação com o  $\text{Ca}^{2+}$ , ambas as subunidades têm sítios de glicosilação (■). O domínio citoplasmático da subunidade  $\beta_3$  interage com a talina e contém sítios de fosforilação. **Fonte:** (ESSEX, DAVID W., 2009) adaptado (B) Modelo da regulação redox na função da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . A integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  parte de uma conformação de repouso com baixa afinidade ao fibrinogênio para uma conformação intermediária, catalisada pelo sistema glutathione (GSH/GSSG). A conformação inicial tem uma ligação dissulfeto que é sensível à clivagem redox pela GSH para formar tióis adicionais. Os tióis recém-gerados participam de uma reação de isomerização que resulta no estado de alta afinidade. Uma PDI catalisa o evento que é necessário para a conversão ao estado de alta afinidade. As mudanças estruturais são iniciadas pela ativação *inside-out*. **Fonte:** (ESSEX, DAVID W., 2009) Adaptado. (C) Mecanismo geral de ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ . **Fonte:** (MARGADANT et al., 2011) Adaptado.

Interações mediadas pelas integrinas com a matriz extracelular são necessárias para a fixação, organização do citoesqueleto, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência das células no contexto de uma grande variedade de processos biológicos, incluindo a agregação de plaquetas. As integrinas também atuam em processos fisiopatológicos tais como inflamação, cicatrização de feridas, angiogênese e metástases de tumores, além de ser um meio de entrada de parasitas intracelulares (MARGADANT et al., 2011). Curiosamente, muitos desses mecanismos que são desencadeados a partir de eventos citoplasmáticos, levando à ativação de integrinas de superfície, são regidos por proteínas com função isomerase, em que as PDIs são as mais representativas. As PDIs migram para a superfície das plaquetas através do SCA (CRESCENTE et al., 2016) e são necessárias para a ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  (MARGADANT et al., 2011).

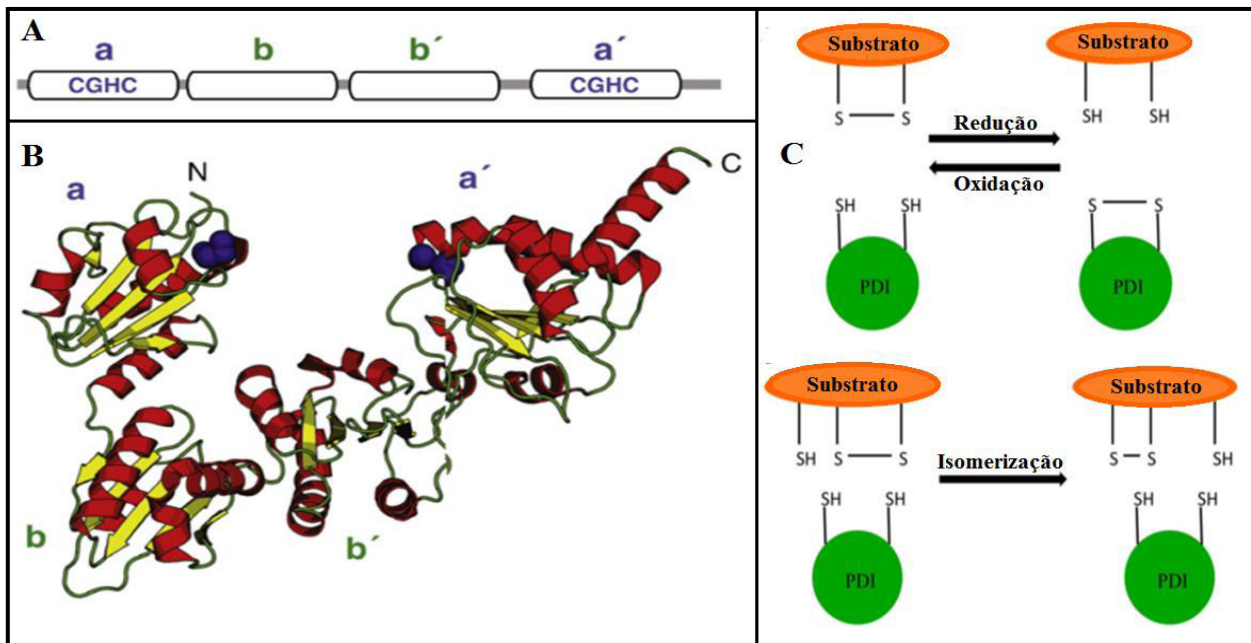
Em plaquetas, a ativação das integrinas são divididas em duas etapas (Figura 2B): A primeira etapa, comprovadamente independente da ação das PDIs (ESSEX, DAVID W.; LI, 1999), é desencadeada por eventos citoplasmáticos oriundos da ativação plaquetária, que provocam uma mudança da conformação de baixa afinidade da integrina com o fibrinogênio (dobrada com a cabeça fechada) para uma conformação de afinidade intermediária (estendida com a cabeça fechada). A segunda etapa, que é dependente da ação das PDIs, converte a integrina para uma conformação de alta afinidade com o fibrinogênio (estendida com a cabeça aberta). Eventos de sinalização *outside-in* (fase irreversível), induzida pela ligação com o fibrinogênio, modificam a conformação do citoesqueleto, causando a alteração da forma discóide para esférica com projeções e ativação de várias cascatas de sinalização. (ESSEX, DAVID W., 2009; MARGADANT et al., 2011; TUCKER, 2002; ZHU et al., 2010) (Figura 2C).

### 2.3. As proteínas dissulfeto isomerase

A PDI é a principal representante da grande família proteica das tiol/dissulfeto oxidoreduases encontradas no lúmen do retículo endoplasmático (ER) de células eucarióticas. Foi o primeiro catalizador de enovelamento proteico descrito, quando em 1963, Goldberg e colaboradores relataram a atividade redutase de preparações microsossomais de fígado de rato através da reativação da enzima ribonuclease A desenovelada (GOLDBERGER; EPSTEIN; ANFINSEN, 1964). Em 1985, Edman e colaboradores conseguiram determinar a sequência do sítio ativo da PDI de rato como WCGHCK através do sequenciamento de DNA complementar (EDMAN et al., 1985). Esta sequência é homóloga ao sítio ativo das tiorredoxinas e está relacionado com a atividade catalítica de reações de redução e oxidação de tióis, bem como a isomerização de pontes dissulfeto (HOLMGREN, 1968).

Atualmente, classificada com cerca de vinte membros (PDI, PDIp, PDILT, ERp57, ERp72, ERp44, PDIr, ERp46, P5, ERdj5, ERp18, AGr2, AGr3, TMX, TMX2, TMX3, TMX4, TMX5, ERp27 e ERp29), as PDIs possuem como característica comum ou unidade básica, a presença de pelo menos uma junção entre domínios semelhantes à tiorredoxina ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ), podendo os domínios variarem em comprimento, arranjo e serem de natureza catalítica ou não (domínios do tipo a e b respectivamente) (KOZLOV et al., 2010). Hoje são identificadas várias isoformas em células de mamíferos, fungos, plantas e bactérias (WILKINSON; GILBERT, 2004). Mesmo o nome da família sugerindo uma função isomerase, esta atividade não foi demonstrada

experimentalmente para todos os membros (VAN LITH et al., 2007). Por conseguinte, é importante enfatizar que o agrupamento de proteínas na família PDI não se baseia em uma função comum ou as mesmas propriedades enzimáticas, mas sim a localização no ER bem como similaridade estrutural e sequencial (APPENZELLER-HERZOG; ELLGAARD, 2008). Os domínios do tipo “a” contém duas cisteínas em um motivo CXXC no sítio ativo, com uma sequência intermediária de Gly-His sendo a mais comum nas PDIs. Alguns domínios, que faltam uma ou mesmo duas cisteínas do sítio ativo, também são classificadas como domínios do tipo A, por semelhança de sequências ao invés da presença de atividade catalítica (KOZLOV et al., 2010). Os domínios do tipo “b” não têm cisteínas no sítio ativo e, portanto, não têm atividade redox (Figura 3A e 3B) (APPENZELLER-HERZOG; ELLGAARD, 2008).



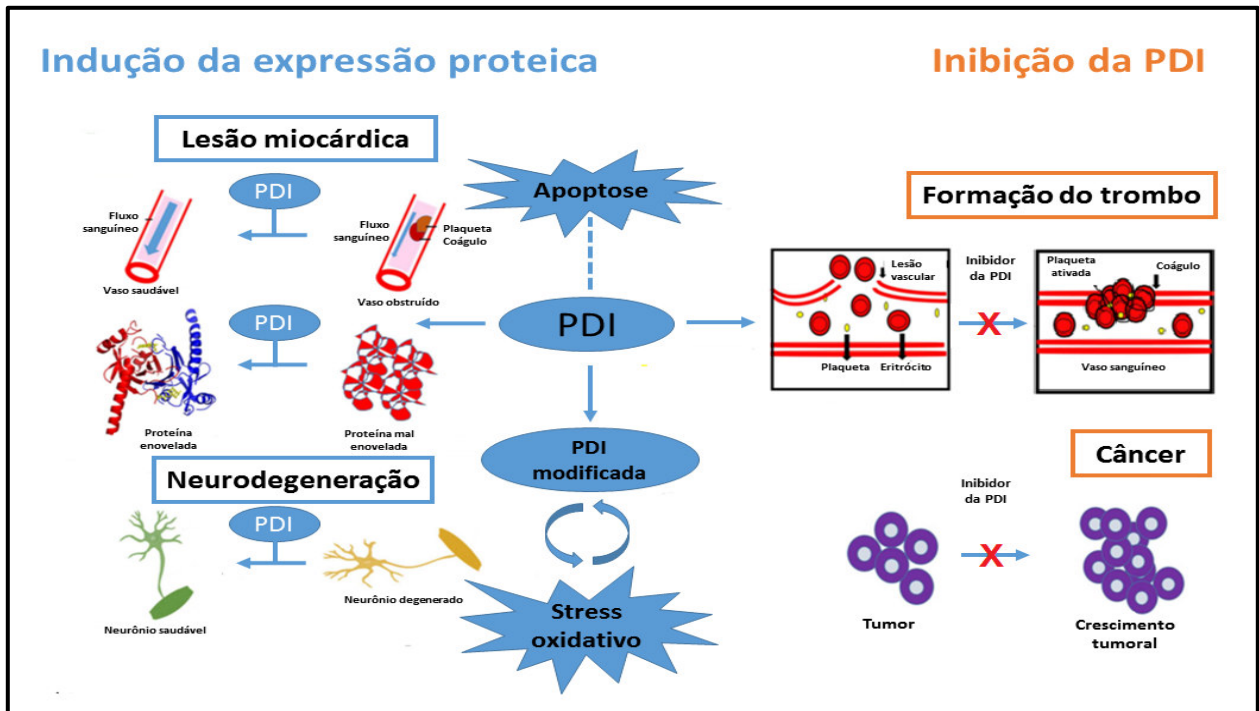
**Figura 3: Domínios, composição e estrutura tridimensional da PDI.** (A) Os Domínios semelhantes à tioredoxina são mostrados como retângulos arredondados, os domínios de cor roxa são domínios catalíticos (a e a') e os de cor verde, domínios não catalíticos (b e b'). As sequências do local ativo estão evidenciadas. (B). As hélices ( $\alpha$ ) são mostrados em vermelho, os fios ( $\beta$ ) em amarelo e as conexões em verde. As cisteínas do sítio ativo estão representadas como esferas roxas. **Fonte:** (APPENZELLER-HERZOG; ELLGAARD, 2008) Adaptado. (C) Reações de oxidação, redução e isomerização promovidas pela PDI. **Fonte:** (ALI KHAN; MUTUS, 2014) Adaptado.

Quando as PDIs se encontram em estado oxidado, suas pontes dissulfeto podem ser desfeitas pelo ataque de um ânion tiolato ( $S^-$ ) do substrato, de modo a induzir a formação de uma ponte dissulfeto mista PDI-substrato, catalisando assim, a oxidação do sítio ativo do substrato quando essa ponte mista é desfeita e tornando a PDI reduzida. O mecanismo oposto também é

possível, onde a PDI em estado reduzido perde um próton, formando um íon tiolato que ataca a ponte dissulfeto do substrato, formando uma ponte dissulfeto mista PDI-substrato que ao ser desfeita por rearranjo, torna a PDI oxidada e o substrato reduzido (Figura 3C). As PDIs também catalisam o rearranjo de ligações dissulfeto (isomerização) de substratos que possuam pontes dissulfeto erroneamente inseridas ou com uma conformação instável que resulta na exposição de resíduos hidrofóbicos, facilitando a ligação do substrato com o *pocket* hidrofóbico no domínio b' da PDI. As reações de isomerização se dão através de uma reação de redução seguida de uma reação de oxidação no mesmo substrato em pares redox diferentes do substrato, conferindo a este, maior estabilidade estrutural (WALKER; GILBERT, 1997).

Embora as PDIs possuam uma sequência de retenção (KDEL) para ancoragem no lúmen do ER, presente na porção C-terminal da proteína, uma quantidade significativa destas proteínas foram encontradas fora do ER, demonstrando a sua capacidade de desprendimento e migração para o núcleo, citoplasma, superfície celular e meio extracelular (WILKINSON; GILBERT, 2004). Apesar das PDIs terem sido objeto de análise bioquímica intensa desde então, só recentemente é que elas começaram a ser realmente entendidas, a nível molecular. Com toda a base bioquímica e estrutural agora a dar frutos, a atenção voltou-se para a definição das funções *in vivo* de proteínas PDIs (BENHAM, 2012). O interesse científico pelas PDIs aumenta conforme o papel destas proteínas é revelado em diversos processos fisiológicos e patológicos. A desregulação da expressão da PDI e/ou sua atividade enzimática está associada a uma série de condições patológicas (BENHAM, 2012), como doenças neurodegenerativas (ELETTO et al., 2014; UEHARA et al., 2006), doenças cardiovasculares (LAURINDO et al., 2008), diabetes (GREK; TOWNSEND, 2014) e câncer (XU; SANKAR; NEAMATI, 2014). As PDIs de superfície, embora esta não seja a localização mais comum, regulam vários processos biológicos importantes como internalização de patógenos (RYSER et al., 1994), incluindo a infecção de linfócitos TCD4<sup>+</sup> pelo vírus HIV I (BI et al., 2011), infecção pela forma promastigota de *Leishmania chagasi* (SANTOS et al., 2009), infecção pela toxina colérica (TAYLOR et al., 2014), na formação do trombo (JASUJA et al., 2012), resposta a lesões teciduais (REINHARDT et al., 2008) e ativação da integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 em plaquetas (ESSEX, DAVID W., 2009; ESSEX, DAVID W.; LI, 2003; FURIE, 2009; FURIE; FLAUMENHAFT, 2014) (Figura 4).





**Figura 4: Diagrama esquemático das possíveis aplicações terapêuticas na modulação da função da PDI.** Tanto a indução da expressão proteica da PDI quanto as inibições da sua função podem ser utilizadas terapêuticamente no combate a diversas patologias. **Fonte:** (PARAKH; ATKIN, 2015) Adaptado.

#### 2.4. Inibidores das PDIs como potenciais ferramentas terapêuticas

O número de membros descobertos da família PDI, aumentou rapidamente nos últimos anos, e com isso a importância destas proteínas na manutenção da saúde e estudo de algumas doenças tem crescido, principalmente em áreas de estudo da hemostasia (FURIE; FLAUMENHAFT, 2014), biologia lipídica (PINTO et al., 2016), imunidade (GREK; TOWNSEND, 2014), câncer (XU et al., 2014), neurodegenerações (HOFFSTROM et al., 2010) e infertilidade (VAN LITH et al., 2007). O desenvolvimento de instrumentos e reagentes mais específicos, o advento de estruturas cristalinas de alta resolução, bem como o desenvolvimento de camundongos nocaute para alguns membros da família PDI (ZHOU et al., 2015), estão ajudando a definir as suas funções específicas na manutenção da saúde e no desenvolvimento de doenças (BENHAM, 2012). Várias propriedades merecem ser levadas em consideração na determinação de quais inibidores das PDIs devem avançar para ensaios clínicos. Uma propriedade que é importante para um antitrombótico antagonista da PDI, é a reversibilidade de seu efeito, pois um sangramento em decorrência do seu uso pode ser facilmente contido. Porém, a irreversibilidade é uma característica relevante em terapias antineoplásicas. Outra propriedade a ser considerada é a permeabilidade celular, uma vez que a alta permeabilidade é necessária para inibir o crescimento



tumoral, porém na inibição da agregação plaquetária não seria necessária pois o seu alvo está na superfície celular (XU et al., 2014). O mecanismo é outro parâmetro a se considerar ao decidir quais os compostos devem avançar para ensaios clínicos. Inibidores alostéricos que atuam do lado de fora do domínio catalítico podem, diminuir interações enzima-substrato ou induzir alterações conformacionais na enzima, interferindo com a sua atividade oxidoreductase, representando uma estratégia para a inibição da PDI na redução da formação de trombos (FLAUMENHAFT; FURIE; ZWICKER, 2015).

Atualmente, não há inibidores de PDI em uso terapêutico. As funções exatas da PDI em muitas doenças precisam de mais caracterização antes de serem realizados ensaios clínicos. Além disso, faltam inibidores das PDIs potentes e seletivos para desenvolvimento clínico. A bacitracina, o primeiro inibidor de PDI, não conseguiu passar para ensaios clínicos devido à sua toxicidade fora do alvo e fraca permeabilidade celular (ROBINSON et al., 2006). O desenvolvimento de novos ensaios de atividade da PDI levou às recentes descobertas de uma série de inibidores de PDI, tais como os inibidores irreversíveis (PACMA 31, 16F16 e RB-11-ca) e reversíveis (juniferdina e rutina ou quercetina-3-rutinosídeo). Estes novos inibidores de PDI provaram ser potentes em modelos de câncer, HIV-1, infecção e trombose, e são ferramentas úteis para aprofundar os conhecimentos das funções biológicas das PDIs (ALI KHAN; MUTUS, 2014). Embora seja necessária uma avaliação mais aprofundada da sua especificidade para PDI e seus efeitos fora do alvo, eles podem servir para conduzir uma seleção de candidatos viáveis para estudos clínicos (XU et al., 2014).

Estudo recente, utilizando modelos de camundongo geneticamente modificados juntamente com variantes de PDI recombinantes, demonstrou que o sítio ativo C-terminal da PDI é decisivo para a hemostasia e trombose. Demonstrou também que a atividade catalítica do motivo CGHC C-terminal da PDI é crucial para que aconteçam as alterações conformacionais que levam à ativação da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, resultando em uma maior deposição de plaquetas e fibrina no trombo (ZHOU et al., 2015). Sendo assim, considerando que o nosso grupo de pesquisa já havia demonstrado que o peptídeo sintético CxxC, desenhado com base na sequência linear dos sítios ativos da PDI (WCGHCK), diminuiu a atividade redutase da PDI em leucócitos (DE A. PAES et al., 2011) e reduziu em 30% a agregação plaquetária em PRP promovida pela ativação com ADP (5  $\mu$ M) (SENA, 2014), decidimos continuar os estudos do peptídeo CxxC para avaliação de seu potencial efeito antitrombótico, aprimorar a compreensão dos mecanismos redox que envolvem as

PDI na agregação plaquetária, bem como, em outros mecanismos fisiopatológicos semelhantemente regulados. Para tanto, decidimos adotar algumas alterações dos nossos protocolos anteriores e acrescentar novas estratégias que nos permitissem investigar as potencialidades do peptídeo CxxC como um modelo ao desenvolvimento de novos agentes antitrombogênicos com ação via inibição da PDI.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Investigar os possíveis mecanismos moleculares da ação de peptídeos miméticos da PDI sobre os mecanismos redox que envolvem a ativação e agregação plaquetária *in vitro*.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

Avaliar o impacto da presença dos peptídeos PDI miméticos sobre os mecanismos de agregação em plasma rico em plaquetas e em lavado de plaquetas.

Mensurar o efeito dos peptídeos PDI miméticos sobre a expressão de proteínas receptoras da superfície celular plaquetária, quando induzidas a ativação.

Pesquisar os possíveis mecanismos de interação dos peptídeos PDI miméticos com sítios ativos da PDI que regulam os mecanismos redox da agregação.

## 4. MANUSCRITO

### 4.1. Identificação

#### TÍTULO DO ARTIGO ORIGINAL:

Papel antiplaquetário para um peptídeo direcionado à proteína dissulfeto isomerase:  
Evidência de ligação covalente com o motivo redox CGHC C-terminal.

#### TÍTULO CURTO:

Atividade antiplaquetária de um peptídeo alvo da PDI.

#### AUTORES:

H. R. Sousa \*, E. M. L. Sena \*, R. S. Gaspar \*, S. A. da Silva \*, J. L. de L. Fontelles  
\*, T. L. S. Araujo †, M. Mastrogiovanni ‡, D. M. Fries †, A.P.S. Azevedo-Santos§, F.  
R. M. Laurindo †, A. Trostchansky ‡ e A. M. Paes \*<sup>1</sup>

#### FILIAÇÕES:

\* Laboratório de Fisiologia Experimental, Departamento de Ciências Fisiológicas da  
Universidade Federal do Maranhão, São Luís (MA), Brasil.

† Laboratório de Biologia Vascular, Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), Brasil.

‡ Departamento de Bioquímica e Center for Free Radical e Investigação Biomédica,  
Faculdade de Medicina, Universidad de la República, Montevideu, Uruguai.

§ Laboratório de Immunophysiology, Departamento de Patologia da Universidade  
Federal do Maranhão, São Luís (MA), Brasil.

<sup>1</sup> Endereço para correspondência:

Paes, A.M. - Avenida dos Portugueses, 1966 - Campus do Bacanga CEP:65080-850  
São Luís (MA), Brasil. Telefone: +55 (98) 3273 8557 E-mail: [marcuspaes@ufma.br](mailto:marcuspaes@ufma.br)

#### PERIÓDICO:

Journal of Thrombosis and Haemostasis

Fator de Impacto: 5,72

Qualis – Medicina I: A1

## 4.2. Achados fundamentais

- Inibidores da proteína dissulfeto isomerase (PDI) têm sido considerados uma nova classe antitrombótica.
- CxxC é um peptídeo alvo-PDI que tem sido mostrado previamente para inibir a sua atividade redutase.
- CxxC se liga à PDI da superfície plaquetária e inibe a agregação induzida por ADP e pela trombina.
- CxxC se liga a Cys<sub>400</sub> do motivo redox CGHC no domínio **a'** da PDI, um sitio para a atividade pró-trombótica da PDI.

## 4.3. Resumo

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) desempenha um papel capital na agregação de plaquetas e seus inibidores tem emergido como novos fármacos antitrombóticos. Em trabalhos anteriores, foi elaborado um peptídeo com base no motivo redox (CGHC) da PDI, que inibe tanto a atividade redutase da PDI quanto a geração de superóxido pela Nox2 neutrofílica, modulada pela PDI. Assim, testamos a hipótese de que o peptídeo também inibe a agregação plaquetária por associação à PDI da superfície destas células. Para este efeito, foram usados três peptídeos: CxxC, contendo o motivo redox PDI; Scr, apresentando uma sequência aleatória dos mesmos resíduos e AxxA, com cisteínas substituídas por alanina. Nós mostramos que a PDI estava envolvida na indução da agregação plaquetária induzidas por ADP e trombina em PRP, bem como em agregações de plaquetas lavadas. O peptídeo CxxC diminuiu a agregação de plaquetas de forma dose-dependente, enquanto que nem AxxA, nem Scr exerceram qualquer efeito. A ativação das plaquetas induzida pela trombina foi analisada por citometria de fluxo seguindo a expressão de superfície da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ativada, P-Selectina e granulofisina. O peptídeo CxxC diminuiu a ativação da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, mas não teve efeito sobre os outros antígenos de superfície testados. O peptídeo CxxC foi o único capaz de diminuir a expressão de PDI na membrada celular, sem nenhum efeito sobre o total de tióis livres não específicos nas proteínas da superfície. Finalmente, a capacidade do peptídeo em se ligar covalentemente com a PDI foi analisada por LC-ESI MS/MS. Detectamos a adição de uma molécula de CxxC à PDI através da ligação com a Cys<sub>400</sub>, que está localizado no motivo redox domínio **a'**, um local importante para a atividade pró-trombótica da PDI. Em resumo, os nossos dados sustentam uma nova atividade antiplaquetária para o peptídeo

CxxC e sugere a Cys<sub>400</sub> da PDI como sítio específico para o planejamento de drogas que tenham como objetivo a concepção de novos agentes antitrombóticos.

**PALAVRAS-CHAVE:** agentes antitrombóticos, peptídeos, oxido-redução, agregação plaquetária, proteína dissulfeto isomerase.

#### 4.4. Introdução

A proteína dissulfeto isomerase (PDI) é o membro protótipo de uma família de enzimas oxidorreductase, denominadas como família das PDIs, cuja função principal é catalisar o enovelamento redox de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (ER) (ELLGAARD; RUDDOCK, 2005). Com base numa estrutura multi-domínio, as funções de oxidação, redução e reações de isomerização de pontes dissulfeto realizadas pela PDI requerem tióis vicinais nos seus motivos catalíticos (**CGHC**), localizados nos domínios **a** e **a'** (NOIVA, 1999), além da ligação do substratos a um bolsão hidrofóbico localizado no domínio **b'** (PIRNESKOSKI et al., 2004). Do lado de fora do ER, a PDI também foi encontrada na superfície celular de vários tipos de células, tais como linfócitos, neutrófilos, células endoteliais e, em particular as plaquetas, onde esta enzima é funcionalmente ativa e provou ser essencial para a agregação destas células (CHO et al., 2008; ESSEX, D.; CHEN; SWIATKOWSKA, 1995; ESSEX, DAVID W.; LI, 1999).

Inibidores da PDI, tais como bacitracina, RNAses desnaturadas ou anticorpos anti-PDI, impedem a ativação e agregação das plaquetas (ESSEX, DAVID W.; LI, 1999). Além disso, eles coíbem a ativação da  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 (LAHAV et al., 2002), uma integrina politiólica encontrada exclusivamente na superfície das plaquetas, que promove a ligação das plaquetas ao fibrinogênio solúvel e ao fator de Von Willebrand (BENNETT, 2005). A ativação da integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3, induzida por Mn<sup>2+</sup>, não depende da sinalização intracelular e também é inibida por anticorpos anti-PDI, sugerindo uma interação estreita entre a integrina  $\alpha$ Ib $\beta$ 3 e a PDI na superfície plaquetária (ESSEX, DAVID W., 2009). Outras proteínas tiólicas de membrana, tais como glicoproteína Iba (BURGESS, JANETTE K et al., 2000) e o receptor de colágeno  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (LAHAV et al., 2003) também são regulados pela PDI. A PDI inibe a agregação de plaquetas induzida por adenosina difosfato (ADP), embora não interfira com receptor P2Y<sub>12</sub> de ADP, cujos tióis livres são alvos do clopidogrel (ESSEX, DAVID W., 2009; MANICKAM et al., 2008). Portanto, a PDI é um centro de convergência para diferentes vias de sinalização da agregação plaquetária, principalmente

devido à modulação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  pelas trocas tiol-dissulfeto (ESSEX, DAVID W., 2009; ESSEX, DAVID W.; LI, 1999; MANICKAM, N.; AHMAD, S.; ESSEX, D., 2011).

Embora ubíqua, a PDI tem emergido como um novo alvo antitrombótico, particularmente porque envolve mecanismos diferentes das visadas pelas terapias atuais, ou seja, proteínas da cascata de coagulação, receptores de plaquetas, plaquetas e proteínas de sinalização clássicas (FLAUMENHAFT, 2013; JASUJA et al., 2012). Recentemente, várias moléculas de baixo peso molecular, tanto naturais como sintéticas, têm sido descritas como inibidores seletivos da PDI. Os derivados de amidas de ácidos metilados carbamoil-propanóico (PACMAs) inibem o crescimento de células de carcinoma do ovário através da inibição irreversível da PDI (XU et al., 2012). Atividades antiplaquetárias foram descritas para flavonóides derivados da quercetina contendo uma ligação O-glicosídica no anel 3 e que inibem a PDI (JASUJA et al., 2012). Além disso, o mastoparan, um veneno tetradecapeptídico de vespa, inibe o fator de crescimento tecidual- $\beta\text{1}$  derivado de plaquetas através da inibição da PDI e outras tiol isomerasas (BROPHY; COLLER; AHAMED, 2013).

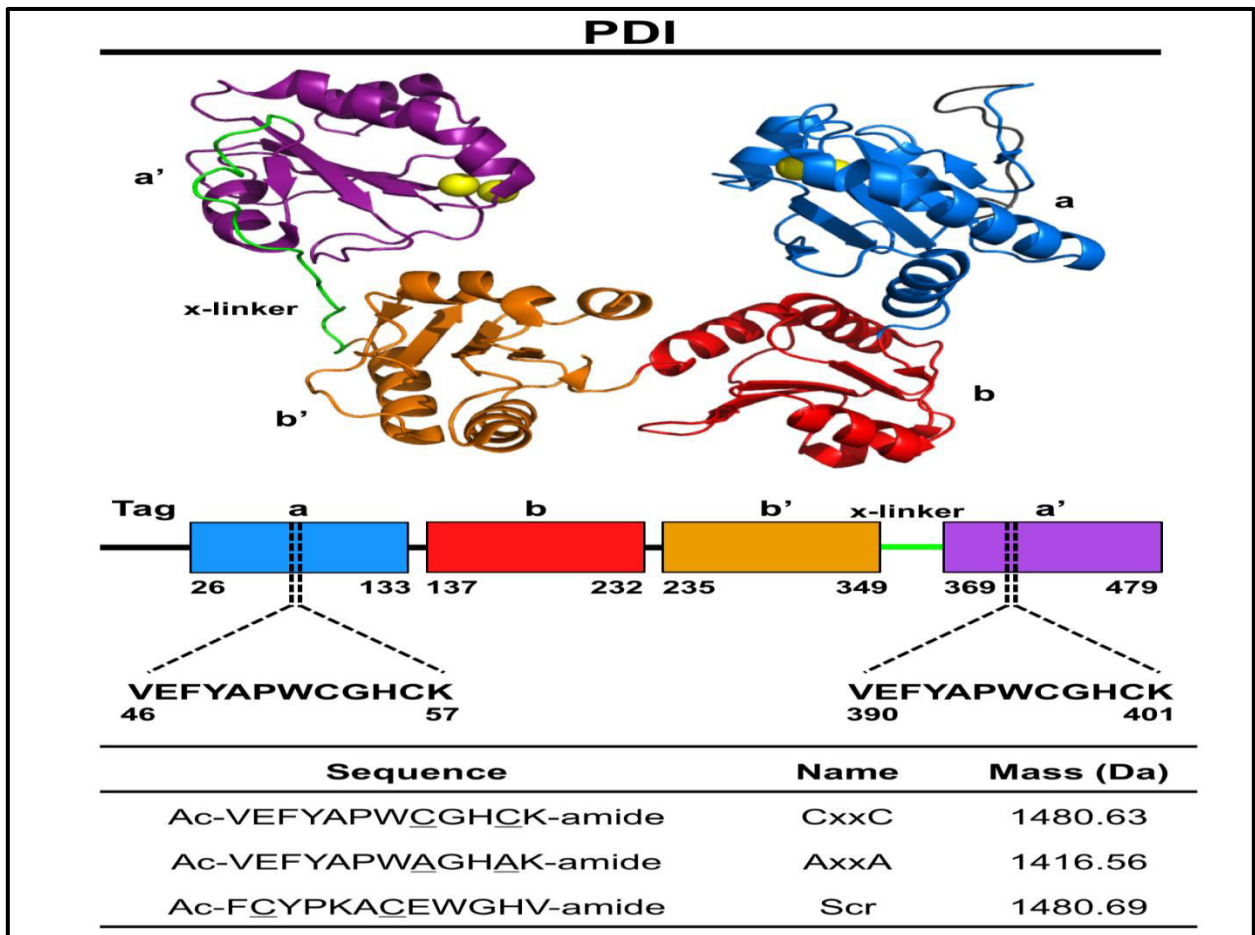
Recentemente, nós mostramos que um dodecapeptídeo mimético ao motivo redox CGHC-ativo da PDI (CxxC) inibiu tanto a atividade redutase da PDI quanto a geração, modulada pela PDI, de superóxido pela Nox2 de neutrófilos (DE A. PAES et al., 2011). Assim, hipotetizamos que o peptídeo CxxC poderia inibir a agregação plaquetária por associação à PDI da superfície plaquetária. No presente trabalho, demonstramos que o peptídeo CxxC inibe agregações de plaquetas induzidas tanto por trombina, quanto por ADP, diminui a ativação da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , e reduz a disponibilidade de tióis livres da PDI na superfície das plaquetas. Tais efeitos são atribuídos a uma ligação covalente do peptídeo CxxC com o motivo redox CGHC no domínio **a'** da PDI. Estes dados sustentam a hipótese estabelecida e sugerem que a atividade do peptídeo CxxC pode ser melhor explorada como um modelo para o desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos.

## **4.5. Materiais e métodos**

### **4.5.1. Criação e síntese dos peptídeos**

Os peptídeos foram concebidos com base na sequência linear dos sítios ativos da PDIA1 (número de acesso Protein Data Bank P21195). Para fins de projeto levamos em consideração os motivos redox da PDI (CGHC) em ambos domínios **a** e **a'** (Figura 5). Assim,

desenvolvemos os seguintes peptídeos (patente brasileira BR 10 2015 018076 4, 23 de julho de 2015), contendo um grupo acetila no aminoácido C-terminal e uma amida na extremidade N-terminal (Figura 5, tabela inferior): i) CxxC (VEFYAPWCGHCK) análogo às sequências contendo a motivos redox de V<sub>46</sub>-K<sub>57</sub> e V<sub>390</sub>-K<sub>401</sub>; ii) AxxA (VEFYAPWAGHAK) com a mesma sequência que CxxC, exceto pelas Cys que foram substituídas por resíduos de Ala; iii) Scr (FCYPKACEWGHV), que contém os mesmos resíduos de CxxC em sequência aleatória, sem formação de tióis vicinais. A síntese dos peptídeos foi solicitada da EZ Biolab Inc. (Carmel, IN, EUA) e apresentaram grau de pureza > 95%. Para todos os ensaios experimentais, o estado redox dos peptídeos em solução aquosa foi avaliado utilizando o reagente DTNB (ELLMAN, 1959) e utilizados no seu estado reduzido.



**Figura 5. Representação esquemática da estrutura da PDI e as sequências de aminoácidos dos peptídeos CxxC, AxxA e de Scr.** Diagrama exibindo a estrutura cristalina da PDI humana (número de acesso P21195) foi utilizada para desenhar três dodecapeptídeos cujas sequências são baseadas em motivos redox CGHC da PDI. O peptídeo CxxC apresenta a sequência idêntica aos motivos redox da PDI, enquanto que AxxA tiveram suas cisteínas substituídas por alaninas e Scr apresenta uma sequência aleatória, sem tióis vicinais. A sequência precisa e o peso molecular para cada peptídeo são mostrados na tabela abaixo.



#### 4.5.2. Preparação de plasma rico em plaquetas e plaquetas lavadas

As amostras de sangue foram obtidas de voluntários autodeclarados saudáveis e que não tinham usado medicamentos antiplaquetários durante pelo menos 10 dias antes da punção venosa. O termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado e os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Maranhão, sob o número vigente 017432/2011-29. As amostras de sangue foram colhidas por venopunção com seringas de 20 mL e scalp 21G e postos em tubo Falcon de 50 mL contendo 5 mL de ácido cítrico-citrato dextrose (ACD) e centrifugado a 250 x g durante 15 minutos para se obter plasma rico em plaquetas (PRP). Para as plaquetas lavadas, seguimos um método anteriormente descrito (BONILLA et al., 2013). Resumidamente, o PRP foi centrifugado a 800 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente e o precipitado de plaquetas ressuspense em tampão Tyrode isento de  $\text{Ca}^{2+}$  (NaCl 134 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12 mM, KCl 2,9 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,34 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, 10 mM HEPES, 5 mM de glicose, pH 7,4) contendo ACD na proporção de 9:1 (Tyrode:ACD 9:1 v/v). As plaquetas foram novamente centrifugadas a 900 x g durante 10 minutos, ressuspensas em tampão Tyrode isento de  $\text{Ca}^{2+}$ , e o lavado de plaquetas foi utilizado dentro de um prazo máximo de 5 horas.

#### 4.5.3. Agregação de plaquetas

Os ensaios de agregação com PRP foram realizados em um agregômetro AggRam de quatro canais (Helena Biosciences, Gateshead, Reino Unido), como descrito anteriormente (LAHAV et al., 2002). Resumidamente, o PRP ( $2-3 \times 10^8$  plaquetas/mL) foi incubado durante 10 minutos a 37°C com o agente alquilante de tiol 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, 2,5 mM; Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA); bacitracina (5 mM; Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA), um inibidor de PDI; anticorpos anti-PDI (RL90, 1: 250; ABR Affinity Bioreagents, Golden, EUA) ou os peptídeos CxxC, Scr ou AxxA (3-30 uM). Em seguida, o PRP foi ativado com ADP (5 uM; Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) ou trombina (0,02 U/mL; Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA). A agregação plaquetária com lavado de plaquetas foi realizada utilizando um espectrofotômetro Varian Cary-UV-vis a 37°C sob agitação e leitura ajustada para 220 nm de comprimento de onda. As plaquetas ( $2-3 \times 10^8$  plaquetas/mL) em tampão Tyrode livre de  $\text{Ca}^{2+}$  foram pré-incubadas com CxxC (1-10 uM), AxxA (10 uM), ou Scr (10 uM) durante 10 minutos anteriores à agregação com trombina (0,02 U/mL). Em todas as experiências com as plaquetas lavadas, foi adicionado  $\text{Ca}^{2+}$  (2 mM) 2 min antes da ativação com trombina.

#### 4.5.4. Citometria de fluxo

As plaquetas lavadas sob condições idênticas aos ensaios de agregação foram incubadas durante 10 min a 37°C com os peptídeos CxxC (1-10 uM), AxxA (10 uM) ou Scr (10 uM). Em seguida, foram incubadas por 10 minutos com trombina (0,02 U/mL). Plaquetas não ativadas foram utilizadas como estado basal. Após os experimentos preliminares de titulação de anticorpos, para a identificação de plaquetas (CD41/61 PerCP, VIPL2 clone, Novus Biologicals, Littleton, EUA), ativação da integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (PAC-1 FITC, clone PAC-1, BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA), expressões na superfície das plaquetas de P-selectina (CD 62-P FITC, Psel.KO.2.7 clone, Novus Biologicals, Littleton, EUA) ou granulofisina (CD63 PerCP, H5C6 clone, Novus Biologicals, Littleton, EUA), as amostras foram incubadas por 10 minutos ao abrigo de luz e adquiridas citômetro de fluxo modelo FACSCalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, EUA). Os dados de fluorescência foram adquiridos através de uma contagem total de  $2,5 \times 10^4$  células por amostra e analisados utilizando o software FlowJo VX (Tree Star, EUA).

#### 4.5.5. Marcação de tióis livres da superfície celular de plaquetas

Tióis livres presentes na superfície das plaquetas em repouso foram marcadas tal como descrito por Burgess *et al.* (BURGESS, JANETTE K. et al., 2000), com modificações. Alíquotas contendo  $1,7 \times 10^7$  plaquetas foram previamente incubadas durante 20 min a 37°C com ou sem 25 uM dos peptídeos CxxC, AxxA, ou Scr, com adição de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP, 1 mM) durante 10 min em algumas ocasiões. Estes foram marcados com 3-N-maleimido-propionil biotina (MPB, 100 uM, Molecular Probes, Eugene, EUA) durante 30 min a 25°C sob agitação contínua. Subsequentemente, foram incubadas com 200 uM de glutatona reduzida (Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) durante 30 minutos seguida de incubação com iodoacetamida a 400 uM (10 min, 25°C; Sigma Chemical Co, Saint Louis, EUA) para neutralização residual dos grupos tióis. Em seguida, as plaquetas foram ressuspensas em tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 0.5 M de NaCl, 0.1% de Triton X-100, e 5 mM de EDTA, pH 8, mais inibidores de protease aprotinina, leupeptina, e PMSF), incubou-se durante 50 min e sonicados em seguida. Os homogenatos celulares permaneceram *overnight* incubados com esferas de estreptavidina a 4°C para se ligar a tióis livres ligados ao MPB. As esferas foram lavadas duas vezes e em seguida fervidas em tampão de Laemmli durante 5 minutos. As proteínas ligadas à estreptavidina foram separadas em SDS/PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas por *Western blot* utilizando

anticorpos anti-PDI (RL90, 1: 1000) e anti-biotina (1: 2000; Calbiochem, La Jolla, EUA). A detecção foi feita com *scanner* de infravermelhos Odyssey (Li-Cor, Lincoln, EUA) ou quimioluminescência.

#### 4.5.6. ESI LC-MS/MS e estudos de mapeamento dos peptídeos.

A PDI recombinante humana (hPDI) foi obtida de acordo com relatos anteriores do nosso grupo (DE A. PAES et al., 2011). A hPDI reduzida foi preparada por incubação da enzima com DTT na razão molar de 10: 1 durante 30 minutos à temperatura ambiente. Alíquotas de hPDI (1  $\mu$ M) foram incubadas na ausência ou na presença de CxxC (6  $\mu$ M) ou Scr (6  $\mu$ M) durante 1 h à temperatura ambiente. Em todos os casos, depois de passar a mistura reacional através de dispositivos de filtros centrífugos (Merck KGaA, Alemanha), a proteína foi analisada num espectrômetro com fonte de íons do tipo *electrospray*, seu analisador do tipo híbrido quadrupolo triplo, acoplado a uma armadilha de íons ou “*ion trap*” (QTrap 4500, AB Sciex, Framingham, MA) ideal para análise de reações entre proteínas e peptídeos. A proteína foi separada numa coluna C4 (5  $\mu$ m, 150 x 1mm de Grace Vydac, Hesperia, CA), e eluiu-se com o solvente A (0,1% de ácido fórmico) e solvente B (0,1% de ácido fórmico em acetonitrilo). A proteína foi eluída com uma vazão de fluxo de 0,1 mL/min, utilizando o seguinte gradiente de solvente: 0-2 min 5% de solvente B; 2-10 min, 5-50% de solvente B; 10-20 min, 50% de solvente B; 20-21 min, 50-5% de solvente B para reequilibrar à condição inicial por 14 minutos. Eletropulverização com tensão de 5 kV e a temperatura capilar de 300°C. A análise por MS de proteínas foi realizada no modo de íon positivo; os dados foram adquiridos e analisados pelo software 1.6.1 Analyst (ABSciex, Framingham, MA). Os resultados foram processados usando o Peak View software (ABSciex, Framingham, MA) para obter o peso molecular da proteína.

Para determinar o local de adução covalente, seguida por tripsinização da enzima, foi feita a análise por LC-MS/MS. A hPDI no estado nativo ou incubados com os peptídeos foram digeridos durante a noite em 50 mM de tampão de pirofosfato de pH 7,4, com tripsina de grau de sequenciamento, utilizando uma proporção de enzima:substrato de 1:50 (m/m). Os peptídeos foram separados numa coluna de fase inversa (5 m, 2,1 x 150 mm, 300 Å, de Grace Vydac, Hesperia, CA) e eluiu-se com o solvente A (0,1% de ácido fórmico) e solvente B (ácido fórmico a 0,08% em acetonitrilo). Os peptídeos foram eluídos a 40°C a uma vazão de fluxo de 0,25 mL/min com um gradiente linear de solvente B (2-60% em 105 minutos). Eletropulverização com tensão de 5 kV, e

a temperatura capilar de 260°C. As análises por MS dos peptídeos usando o QTRAP4500 foram realizadas no modo de íons positivos, utilizando um intervalo de massas de 100-2000. A análise dos peptídeos, bem como a série y- e b- foram obtidos com o software Peak View e identificação da proteína foi feita comparando os peptídeos obtidos com a base de dados MASCOT (Matrix Science, UK) (BATTHYANY et al., 2006).

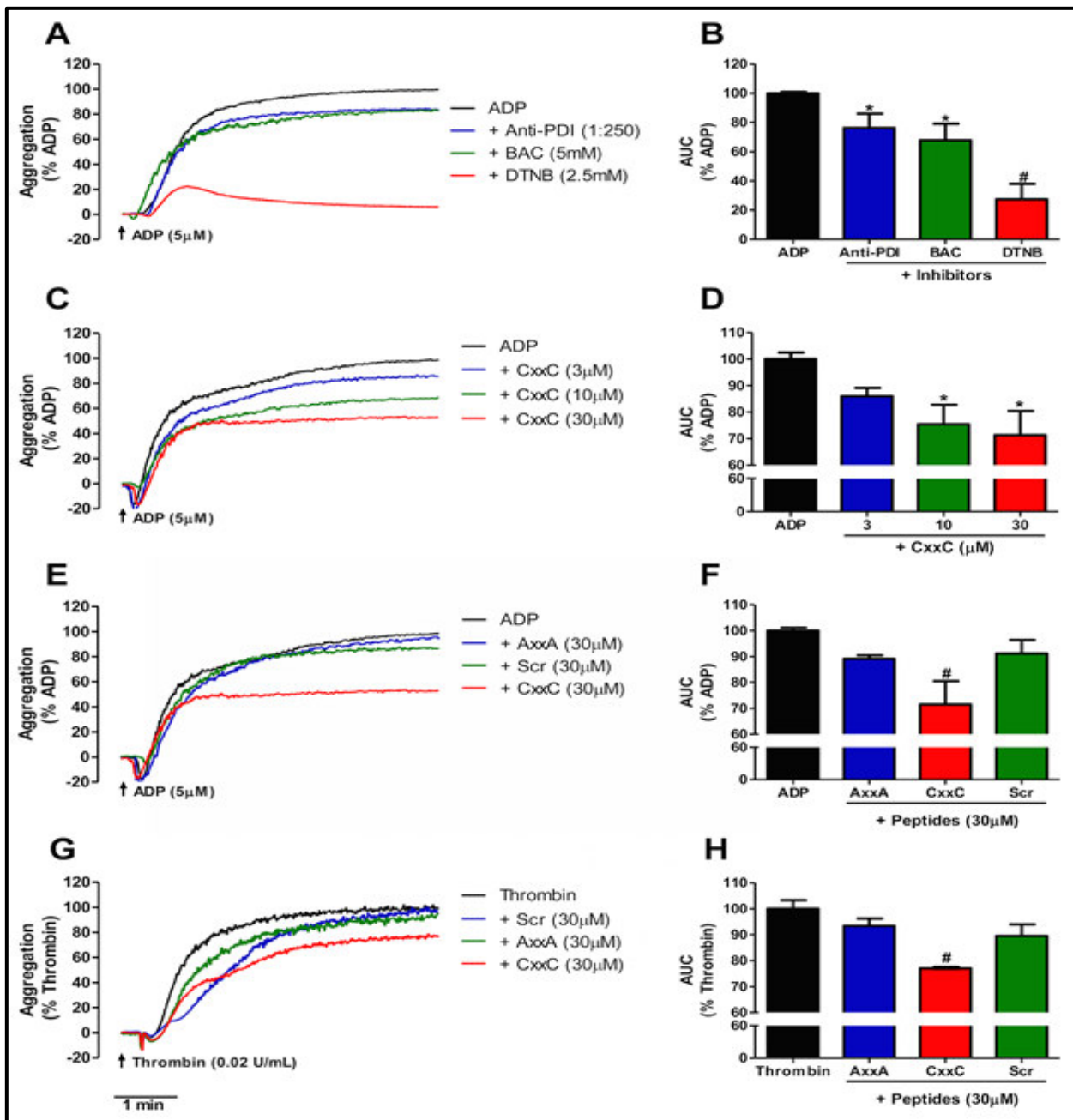
#### 4.5.7. Análise estatística

Os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 3 a 6 experiências independentes por protocolo. Foi realizado One way ANOVA e pós teste de Newman Keuls, considerado significativo quando  $p < 0,05$ . Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

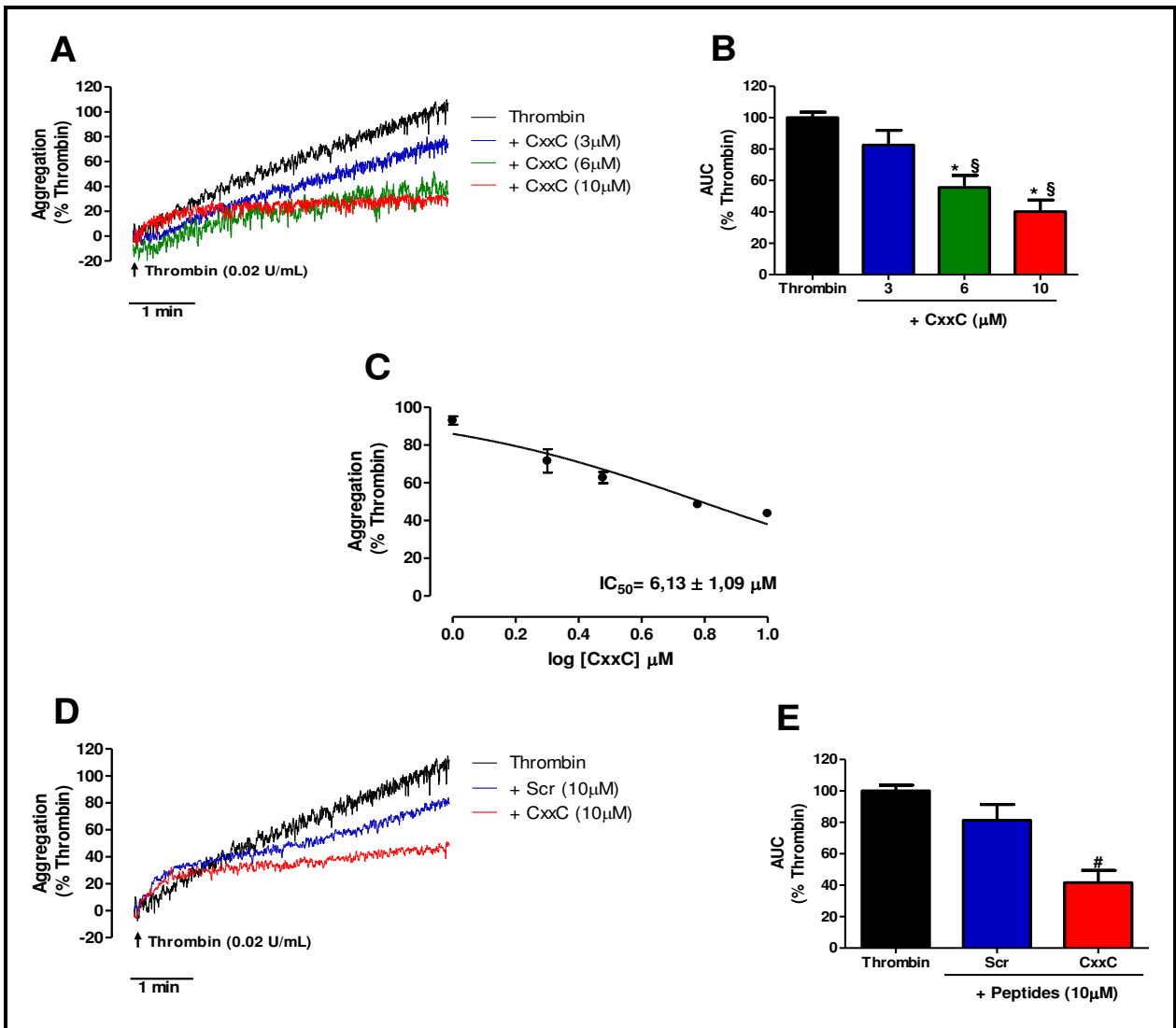
## 4.6. Resultados

### 4.6.1. CxxC atenua a agregação plaquetária induzida por ADP e trombina

Inicialmente, foi avaliado o papel de alguns reagentes de tióis sobre a função plaquetária. Como mostrado nas Figuras 6A e 6B, a agregação de plaquetas induzida por ADP, foi quase abolida com a incubação por DTNB 2,5 mM, um agente alquilante de tióis. A bacitracina (5 mM), um inibidor da PDI ou a neutralização pelo anticorpo anti-PDI RL90 (1:250), também diminuiu a agregação induzida por ADP, embora em menor grau. Quando testadas concentrações do peptídeo CxxC (3-30  $\mu$ M), uma inibição máxima de cerca de 30% foi observada (Figuras 6C e 6D). Esta inibição foi atribuída à presença de tióis vicinais no peptídeo CxxC, uma vez que nem AxxA nem Scr, na concentração máxima testada para CxxC, foram capazes de afetar a agregação de plaquetas de forma significativa (Figuras 6E e 6F). Resultados semelhantes foram observados para os três peptídeos, quando a agregação de plaquetas foi induzida por trombina, sugerindo que os efeitos do peptídeo CxxC é independente do agonista eleito (figuras 6G e 6H). Para assegurar o efeito antiplaquetário de CxxC, os peptídeos foram também incubados em plaquetas lavadas (Figura 7). Foi observado um efeito dose-dependente do peptídeo CxxC na inibição da agregação de plaquetas (Figura 7A e 7B), com um  $IC_{50}$  observado de  $6,13 \pm 1,09 \mu$ M (Figura 7C). Mais uma vez, o peptídeo controle Scr não teve nenhum efeito sobre a agregação de plaquetas (Figuras 7D e 7E). No geral, estes resultados sugerem que o peptídeo CxxC atenua a agregação de plaquetas, de forma proeminente em plaquetas lavadas, devido à presença de tióis vicinais.



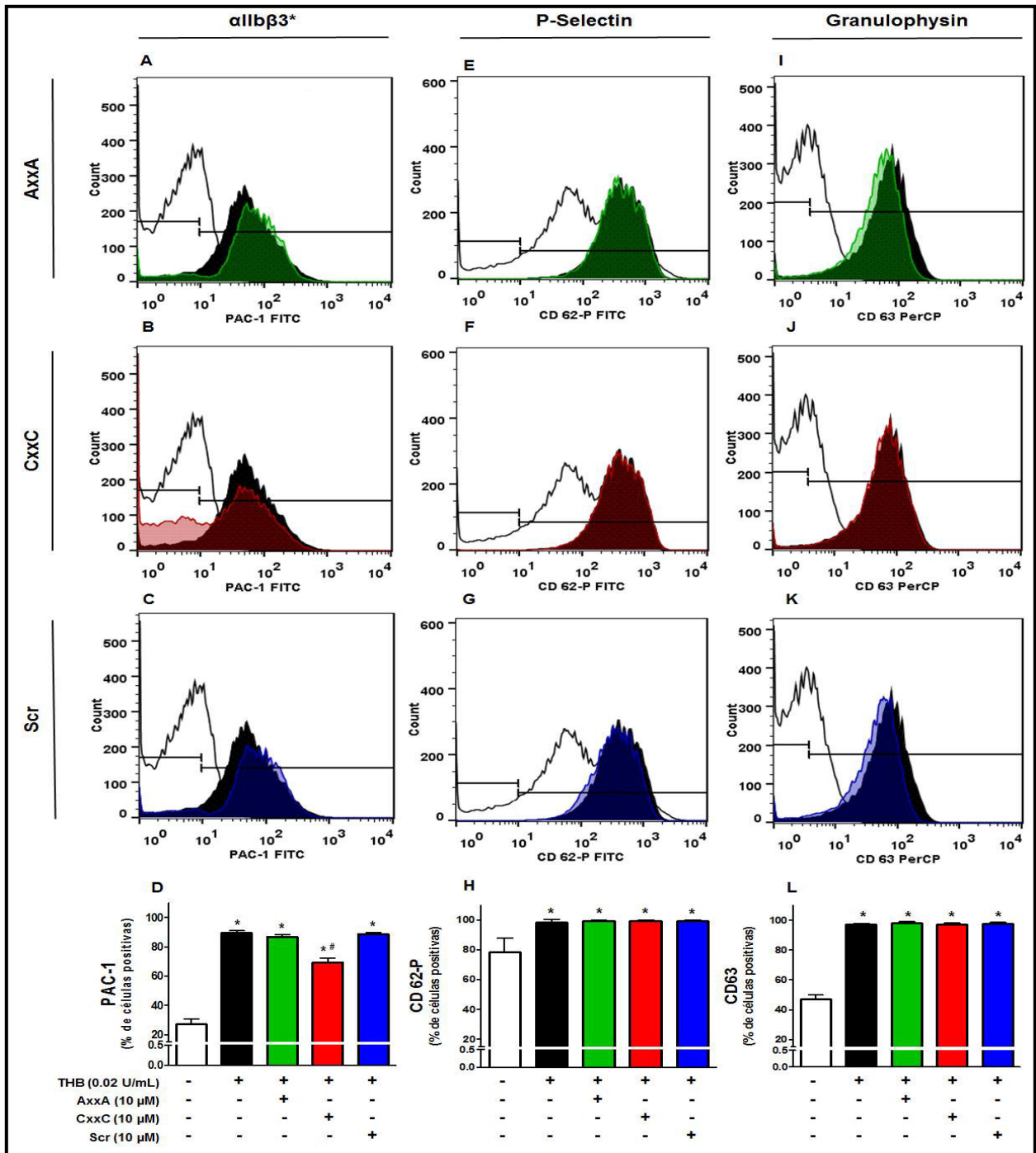
**Figura 6. CxxC inibe a agregação de plaquetas induzida por ADP e trombina em plasma rico em plaquetas.** Todas as experiências foram realizadas em plasma rico em plaquetas (PRP,  $2-3 \times 10^8$  plaquetas/mL,  $37^\circ\text{C}$ ) e todas as drogas foram incubadas 10 minutos antes da adição do agonista. **A:** Anticorpo inibidor específico de PDI, anti-PDI RL90 (1:250), inibidor não específico de PDI, Bacitracina (BAC, 5 mM) ou bloqueador de tióis livres, DTNB (2,5 mM) foram incubados antes da agregação de plaquetas induzida por ADP ( $5 \mu\text{M}$ ). **B:** AUC de experimentos realizados em A. \*  $p < 0,05$  vs ADP; #  $P < 0,05$  vs todos. **C:** Incubação do peptídeo CxxC (3, 10 ou  $30 \mu\text{M}$ ) e submetida a agregação de plaquetas induzida por ADP ( $5 \mu\text{M}$ ). **D:** AUC dos experimentos realizados em C. \*  $p < 0,05$  vs ADP. **E:** AxxA, Scr ou CxxC a  $30 \mu\text{M}$  foram incubados e submetida a agregação das plaquetas com ADP ( $5 \mu\text{M}$ ). **F:** AUC dos experimentos realizados em E. #  $p < 0,05$  vs todos. **G:** AxxA, Scr ou CxxC a  $30 \mu\text{M}$  foram incubados e submetida a agregação de plaquetas com trombina ( $0,02 \text{ U/mL}$ ). **H:** AUC de experimentos realizados em G. #  $p < 0,05$  vs todos. Todas as significâncias foram determinadas pelo teste t de Student. Todas as curvas são representativas de pelo menos 3 experimentos distintos, com exceção para o anti-PDI em A e trombina em G, com  $n = 2$ . 100% é definida como valores máximos de ADP ou trombina nas curvas, e a curva média de ADP ou trombina nos gráficos de barras de AUC. As setas indicam quando os agonistas foram adicionados.



**Figura 7. Efeito do peptídeo CxxC sobre a agregação plaquetária induzida por trombina em plaquetas lavadas.** **A:** plaquetas lavadas (PL,  $2-3 \times 10^8$  plaquetas/mL,  $37^\circ\text{C}$ ) foram previamente incubadas com CxxC (3, 6 e 10  $\mu\text{M}$ ) durante 10 minutos e, em seguida, ativadas com trombina (0,02 U/mL). **B:** AUC de experimentos realizados em A.  $p < 0,05$  vs \* Trombina;  $\S p < 0,05$  vs CxxC 3  $\mu\text{M}$ . **C:** regressão não linear da curva dose-resposta de CxxC (1, 2, 3, 6 e 10  $\mu\text{M}$ ) com agregação máxima induzida por trombina (0,02 U/mL). **D:** PL sob as mesmas condições de A, incubadas com Scr ou CxxC (10  $\mu\text{M}$ ) e ativadas com trombina (0,02 U/mL). **E:** AUC de experimentos realizados em D. #  $p < 0,05$  vs todos. Todas significâncias foram determinadas pelo teste t de Student. As curvas são representativas de pelo menos 3 experimentos independentes, exceto para Scr 10  $\mu\text{M}$  com  $n = 2$ . As setas indicam quando os agonistas foram adicionados.

#### 4.6.2. CxxC diminui a ativação de integrinas na superfície das plaquetas $\alpha\text{IIb}\beta 3$

O papel do peptídeo CxxC sobre a ativação das plaquetas foi analisado por meio de citometria de fluxo para medir a expressão da integrina  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  ativa (Figuras 8A-8D, PAC-1), P-selectina (Figuras 8E-8H, CD62-P) e granulofisina (Figuras 8I-8L, CD63) de plaquetas em repouso e ativadas por trombina.



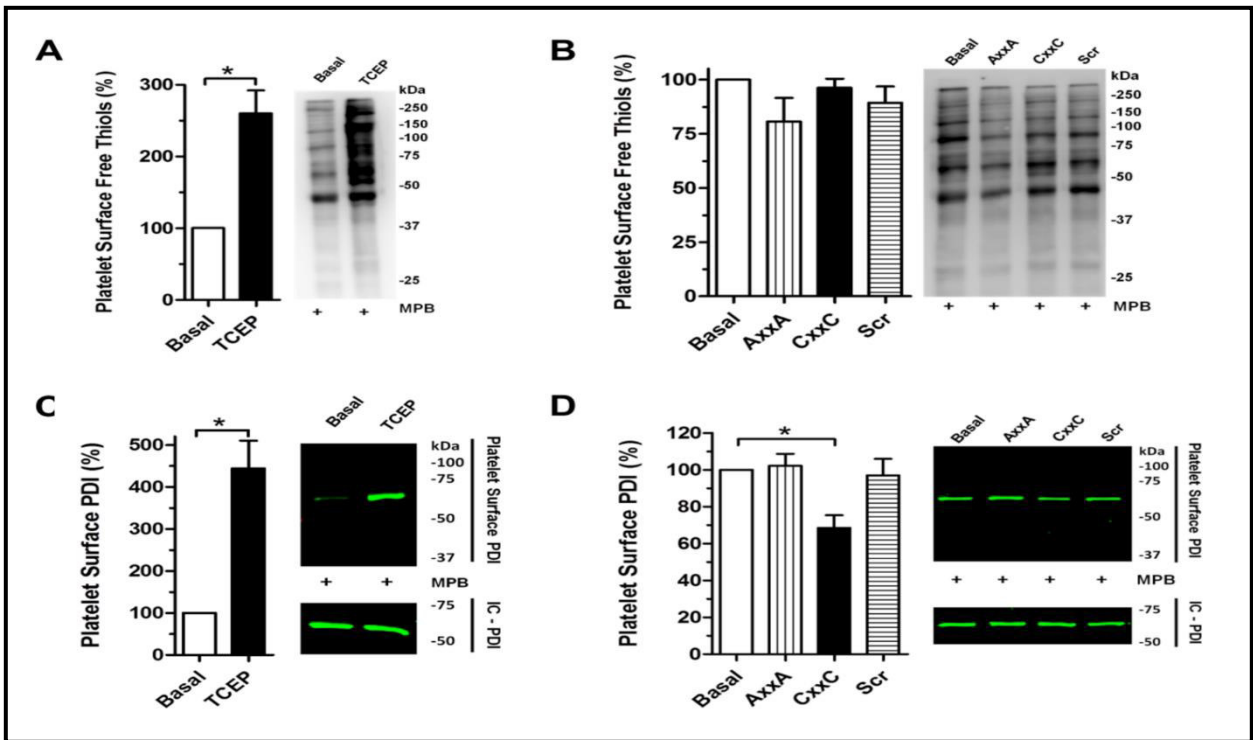
**Figura 8. O peptídeo CxxC diminui a ativação de integrinas  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 em plaquetas lavadas ativadas por trombina, mas não interfere com a liberação de grânulos  $\alpha$  e densos.** As plaquetas lavadas (2-3 células de  $\times 10^8$ /mL) foram incubadas com os peptídeos (10  $\mu$ M, 10 min, 37°C) antes da ativação por trombina (0,02 U/mL, 10 min, 37°C) e depois expostas a anticorpos PAC-1 FITC ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ativadas, painéis A-D), CD 62-FITC P (P-selectina, os painéis E-H) e CD 63 PerCP (granulofisina, painéis I-L) tal como descrito na seção Materiais e Métodos. Plaquetas em repouso, sem marcação e sem incubação com os peptídeos (barras pretas) foram usadas como basal, plaquetas em repouso, marcadas e sem incubação com os peptídeos (linhas pretas sem preenchimento) foram utilizados para comparação. AxxA (verde, painéis A, E e I), Scr (azul, painéis C, G e K) e CxxC (vermelho, os painéis B, F e J) são mostrados separados uns dos outros, nos respectivos repouso e estados ativados. \* P <0,05 vs repouso; # P <0,05 vs ativado, analisados pelo teste t de Student. Os histogramas apresentados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes.

Todos os três marcadores tiveram aumento, estatisticamente significativo, da expressão de superfície no estado ativado das plaquetas (Figuras 8D, 8H e 8L). A incubação de CxxC a 10  $\mu$ M antes da ativação das plaquetas diminuiu a ativação de integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 em 30% (Figura 8D), ao passo que não se observou qualquer efeito sobre a expressão de superfície de P-selectina e granulofisina (Figuras 8H e 8L). Ambos AxxA e Scr não demonstraram quaisquer efeitos sobre a expressão superficial de quaisquer marcadores. Dada a estreita associação entre atividade isomerase da PDI e ativação das integrinas  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 na superfície das plaquetas, este conjunto de dados reforça a PDI como um possível alvo para a ação antiplaquetária do peptídeo CxxC.

#### 4.6.3. CxxC diminui a disponibilidade de tióis livres da PDI na superfície das plaquetas

Para analisar a possível associação do peptídeo CxxC e seus peptídeos controle com os tióis livres da PDI na superfície das plaquetas, foram incubadas plaquetas em repouso com o 3-(N-maleimidilpropionil) biocitina (MPB), um reagente de tióis impermeável à membrana. A Figura 9A mostra que a maioria dos resíduos de cisteínas estão oxidados na superfície de plaquetas em repouso, uma vez que a exposição das plaquetas não-ativadas ao TCEP 1 mM, um agente redutor de tióis impermeável à membrana, promoveu um aumento de quase 3 vezes a ligação com o MPB. As presenças dos peptídeos não alteraram significativamente a ligação total de tióis livres na superfície da membrana plaquetária pelo MPB (Figura 9B). A avaliação da ligação à PDI de superfície pelo MPB mostrou um aumento de 4 vezes a ligação do MPB sob TCEP, o que sugere que a PDI de superfície é mais oxidada em condições de repouso (Figura 9C). Por outro lado, quando CxxC (25  $\mu$ M) estava presente, a ligação da PDI de superfície pelo MPB foi significativamente diminuída em cerca de 30%, enquanto AxxA Scr e não teve nenhum efeito (Figura 9D). A redução de tióis da superfície plaquetária pelo TCEP não afetou o conteúdo da PDI intracelular, que foi avaliado pelo sobrenadante após ligação com o MPB (Figuras 9C e 9D, painéis inferiores). Estes dados suportam a importante hipótese que o peptídeo CxxC liga-se à PDI de superfície de forma covalente de algum modo específico, uma vez que nenhum efeito foi observado no total de tióis livres suspenso a partir de plaquetas de membrana em repouso.



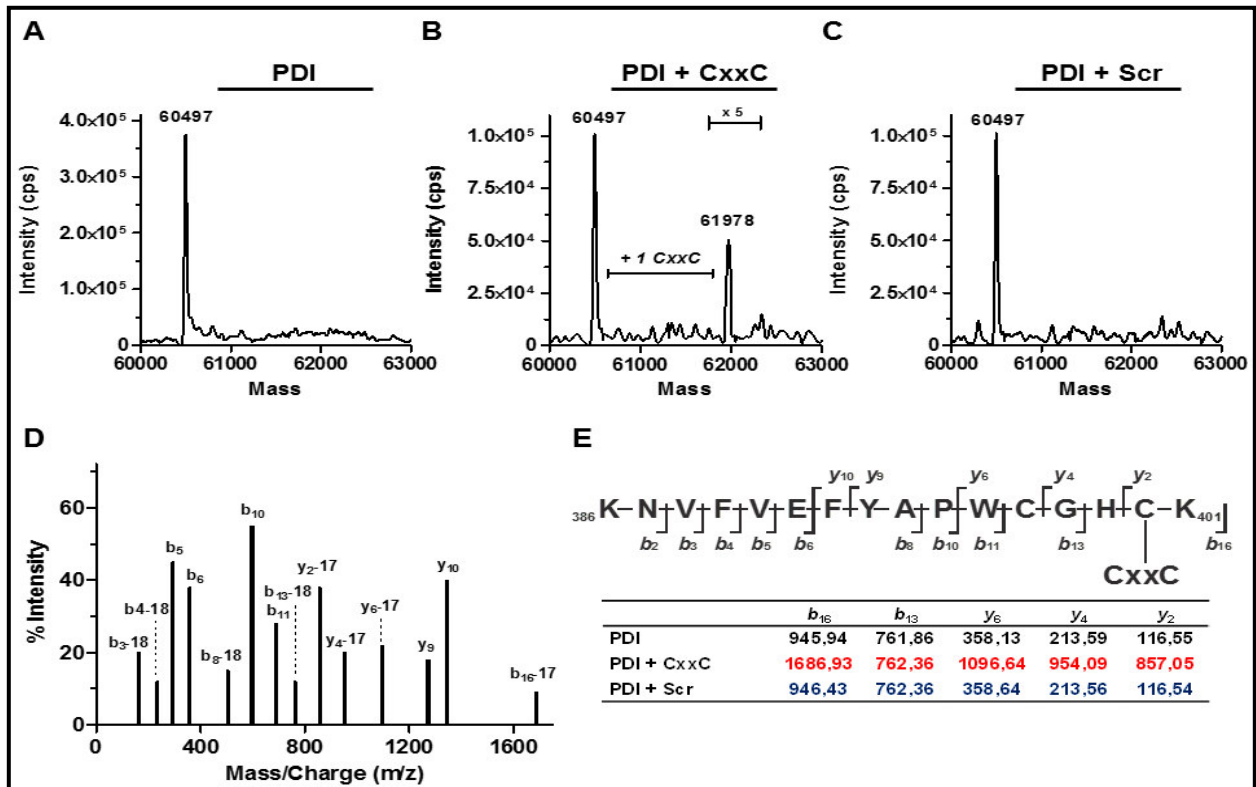


**Figura 9.** O peptídeo CxxC diminui o número de tióis livres na PDI marcados com MPB na superfície da membrana de plaquetas. **A:** grupos tiol extracelulares de plaquetas lavadas, incubadas ou não com TCEP (1 mM, 10 min) foram marcadas com MPB e precipitada com esferas magnéticas com estreptavidina, para a detecção do total de tióis livres exposto à membrana por transferência de Western. **B:** plaquetas em repouso foram incubadas com ou sem CxxC, Scr ou AxxA (25  $\mu$ M, 20 min, 37°C) e foram submetidas aos mesmos procedimentos como descrito em A. **C e D:** as membranas de nitrocelulose dos procedimentos de A e B foram marcadas utilizando anticorpo anti-PDI (RL90, 1: 1000). As manchas no fundo de C e D são representativas do conteúdo intracelular de PDI (IC-PDI) que foi detectada no sobrenadante do lisado de células depois da precipitação. Em todos os painéis, as barras verticais representam análises densitométricas, expressas como a média  $\pm$  SEM das percentagens relativas ao estado basal e foram obtidos a partir de 3-4 experimentos independentes. \*  $P < 0,05$  vs condição basal analisados pelo teste t de Student.

#### 4.6.4. CxxC se liga covalentemente ao sítio ativo C terminal da PDI

A provável associação de CxxC à PDI foi abordada através da sua reação *in vitro* com PDI recombinante humana (hPDI), seguida pela análise de espectrometria de massas. Os dados espectrais da Figura 10 A-C mostram um pico de 60.497 Da observado em todas as condições, o que corresponde à forma reduzida da hPDI. Quando CxxC estava presente, os espectros mostraram o aparecimento de um pico de 61.978 Da (Figura 10B) em conformidade com a adição de 1.481 Da, o que é equivalente a massa do peptídeo CxxC (Figura S1). Não foram encontrados picos adicionais na presença de Scr. Após tripsinização, mapeamento de massa dos peptídeos por ESI LC-MS/MS da hPDI incubadas com CxxC permitiu a identificação de peptídeos que abrangem 80% da sequência primária da hPDI (Figura S2). Entre os peptídeos resultantes da tripsinização da hPDI, um peptídeo que contém resíduos Lys386-Lys401, que inclui ambas as cisteínas (Cys<sub>397</sub> e

Cys<sub>400</sub>) do sítio ativo **a'** da hPDI, foi analisado por abrigoar um aduto consistente com a ligação do peptídeo CxxC (Figura 10D). O peptídeo aduzido ( $[M-17]^{+2} = 1.686,93$  Da), quando comparado com o não modificado ( $[M-17]^{+2} = 945,94$  Da), mostrou uma diferença de 740,99 Da, a qual corresponde à adição duplamente carregada do peptídeo CxxC ( $[M + H] = 1481$  Da) (Figura 10E).



**Figura 10:** Ligação do peptídeo CxxC à Cys<sub>400</sub> do sítio ativo **a'** da hPDI. A hPDI recombinante reduzida (1  $\mu$ M de massa) foi analisado por LC-MS no modo de íons positivos na ausência (A) ou na presença de 6  $\mu$ M CxxC (B) ou 6  $\mu$ M Scr (C). Em todos os casos, uma proteína de 60.497 Da apareceu, mas em (B) um novo pico de 61978 Da ( $\Delta$  1481 Da) foi observada correspondente, com a adição de uma molécula de CxxC. (D). A análise de íons positivos por ESI LC-MS/MS da série Y e B do peptídeo K<sub>386</sub>-K<sub>401</sub>. Os resultados apresentados correspondem ao peptídeo carregado com carga tripla e os fragmentos com carga dupla. A cobertura de ambas as séries confirmou a estrutura do peptídeo. A tabela mostra os íons, que foram utilizados para confirmar a adição de CxxC a Cys<sub>400</sub> exibindo os que contêm a diferença entre os resíduos de Cys entre os fragmentos de  $\sim$ 740,5 Da.

Como mostrado na Figura 10E, essa diferença foi descrita através da análise comparativa dos fragmentos y<sub>2</sub>, y<sub>4</sub>, y<sub>6</sub> e b<sub>16</sub> do resíduo Lys<sub>386</sub>-Lys<sub>401</sub>, oriundo das reações CxxC/PDI. Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada no fragmento b<sub>13</sub>, o único a conter a Cys<sub>397</sub> mas não contém a Cys<sub>400</sub>. Não houve diferença entre os fragmentos derivados das reações que compreendem a PDI isolada ou PDI+Scr (Figura 10E). Por conseguinte, estes resultados demonstram claramente que o peptídeo CxxC se liga covalentemente à Cys<sub>400</sub> do sítio ativo **a'** da hPDI, provavelmente através de uma ligação dissulfeto mista.

#### 4.7. Discussão

A PDI tem sido provada ser de capital importância para a função plaquetária e formação de trombos (CHO et al., 2008; ESSEX, D. et al., 1995) e recentemente emergiu como um alvo importante para a terapia antitrombótica (FLAUMENHAFT, 2013; JASUJA et al., 2012). Em um estudo anterior foi demonstrado que CxxC, um dodecapeptídeo mimético ao local redox ativo da PDI, inibiu a atividade redutase da PDI (DE A. PAES et al., 2011). Aqui, nós expandimos nossas investigações do peptídeo CxxC, demonstrando um papel antiplaquetário para este peptídeo, cujo efeito inibidor sobre a ativação e agregação das plaquetas parece estar relacionado com a sua ligação covalente a moléculas de PDI expostas na superfície das plaquetas.

Os reagentes tióis, tais como o reagente alquilante de tióis DTNB, são inibidores conhecidos da agregação das plaquetas (ALEDORT et al., 1968; MACINTYRE et al., 1977), um efeito ainda confirmado por avaliação dos efeitos do DTNB em nosso estudo. A incubação de CxxC com PRP inibiu a agregação máxima em 30%, independentemente do agonista eleito; enquanto que peptídeos controle não promoveram quaisquer efeitos inibitórios. Digno de nota, esta resposta máxima foi semelhante à obtida quando o PRP foi incubado com inibidores clássicos da PDI, como a bacitracina ou anticorpo anti-PDI RL90. Isto é consistente com estudos anteriores mostrando que a agregação induzida por ADP ou trombina, que era de 30-40% mais baixo em plaquetas PDI-nulos, em comparação com as plaquetas de tipo selvagem (KIM et al., 2013). Para evitar a interferência de outros componentes do PRP no efeito do peptídeo CxxC, as ações dos peptídeos também foram avaliadas em plaquetas lavadas. O efeito inibitório promovido pelo peptídeo CxxC sobre a agregação plaquetária induzida por trombina foi potencializada, alcançando uma inibição máxima de quase 60% com IC50 de ~ 6,13  $\mu$ M; enquanto AxxA e Scr se mantiveram ineficazes. Estes resultados corroboram a função da PDI como parte do mecanismo mediado pelos tióis ao atuar sobre a superfície de plaquetas para a formação de trombos. Eles também enfatizam o papel de tióis vicinais sobre a inibição da PDI, destes, CxxC foi o único peptídeo de abrigar tais características estruturais e a única a ser eficaz. Tióis vicinais são grupos sulfidríla perto o suficiente para permitir a troca ditiol/dissulfeto reversível (GITLER; MOGYOROS; KALEF, 1994), e compreendem os presentes nos sítios ativos CGHC da PDI (ESSEX, DAVID W, 2004). Os primeiros relatórios demonstraram que o óxido de fenilarsina (PAO), um reagente que se liga especificamente a tióis vicinais, inibe reversivelmente a ativação e agregação das plaquetas (ESSEX, DAVID W.; LI, 1999), através da segmentação de ambas sulfidrílas vicinais da PDI

(ESSEX, DAVID W, 2004) e integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (MANICKAM, N et al., 2011) na superfície das plaquetas.

Para avaliar com mais precisão os efeitos CxxC na ativação plaquetária, utilizamos citometria de fluxo para determinar possíveis consequências em glicoproteínas de membrana de plaquetas que, após a ativação, ou mudam de conformação (integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ) ou aumentam a expressão de proteínas de superfície (P-selectina e granulofisina). Após a ativação por trombina, o peptídeo CxxC reduziu a ligação do anticorpo PAC-1 com a integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  ativa em 30%, ao passo que AxxA e Scr, não tiveram nenhum efeito. Surpreendentemente, nenhum dos peptídeos teve qualquer efeito sobre a expressão de superfície de membrana de P-selectina e granulofisina. A PDI tem um papel bem descrito na ativação  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (ESSEX, DAVID W., 2009), o que torna razoável especular que o efeito inibidor do peptídeo CxxC é posterior à inibição da PDI de superfície. Por outro lado, parece não haver nenhuma interação entre integrinas ou caminhos secretórios de P-selectina e granulofisina, uma vez que o inibidor de eptifibatide, específico para  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  não interfere com a secreção de grânulos (CHANDLER et al., 2010; ZHOU et al., 2015). Na verdade, dois grupos diferentes, usando plaquetas PDI-nulos encontraram resultados contrastantes sobre se a PDI afeta a exposição na superfície das plaquetas de grânulos alfa (P-selectina) e denso (granulofisina) (KIM et al., 2013; ZHOU et al., 2015). Portanto, os dados aqui descrito suportam uma associação direta entre PDI e  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , mas enfraquece o possível papel da PDI na exposição de grânulos de plaquetas.

O peptídeo CxxC foi testado na inibição da atividade redutase da PDI (DE A. PAES et al., 2011). Assim, o próximo passo da investigação foi verificar se os efeitos exercidos pelo peptídeo CxxC em estudos funcionais foram devidos a uma interação com tióis reativos de superfície das plaquetas ou uma inibição da PDI bastante específica. Estudos de *Western blot* mostraram que tióis de superfície de plaquetas em repouso encontravam-se principalmente no seu estado oxidado, com a incubação com TCEP, um redutor tiol membrana impermeável, houve forte aumento da ligação de MPB aos tióis livres de superfície. Dado que tanto CxxC e Scr estavam no seu estado reduzido, pode-se supor uma permuta de tiol-dissulfeto entre estes peptídeos e proteínas tiólicas oxidadas. No entanto, não houve alteração no conteúdo total de tióis de superfície, quando as plaquetas foram incubadas com qualquer dos três peptídeos, descartando a alquilação inespecífica de tióis como um mecanismo geral de ação do peptídeo CxxC. Caso contrário, demonstrou-se que as sucessivas trocas tiol-dissulfeto entre cisteínas críticas, em vez de redução

de dissulfeto, por si só, são cruciais para a ativação e agregação de plaquetas, para o qual é necessário a PDI (ESSEX, DAVID W, 2004; ESSEX, DAVID W., 2009). Portanto, considerando a associação hipotética de CxxC e PDI, investigou-se a ligação destes peptídeos com a PDI através da ligação com o MPB. Semelhante a outras proteínas contendo tióis, a PDI também foi encontrada, principalmente no seu estado oxidado. No entanto, quando as plaquetas em repouso foram incubadas com os peptídeos, CxxC diminuiu a ligação de tióis livres da PDI com o MPB em quase 30%, em relação ao basal, um efeito não observado com AxxA ou Scr. Consequentemente, a ação do peptídeo CxxC diminuiu a disponibilidade de tióis livres em PDI de superfície, reforçando a hipótese de uma troca de tióis-dissulfeto entre eles.

Em seguida, especulou-se que este peptídeo se ligaria de forma covalente às cisteínas da PDI, de um modo semelhante ao descrito para a inibição da PDI por bacitracina. Na inibição da PDI por bacitracina, tem sido sugerido o envolvimento da formação de ligações dissulfeto mistas com Cys<sub>314</sub> e Cys<sub>345</sub>, localizadas no domínio da bolsa hidrofóbica entre o domínio **b'** e a região de ligação X, respectivamente. Além disso, os tipos mais hidrofóbicos de bacitracina, incluindo bacitracina F e H, promovem uma maior inibição da atividade redutase da PDI (DICKERHOF et al., 2011). Assim, os estudos de LC-MS/MS foram realizados para analisar a interação do peptídeo CxxC com a PDI, bem como identificar o possível local de ligação do peptídeo. Para este efeito foi utilizado uma PDI recombinante humana (DE A. PAES et al., 2011), que tem uma massa de 60.497 Da devido a uma cauda de His. Quando incubada com CxxC, foi detectado um aumento de massa de 1,481 Da, o que corresponde à adição de uma molécula de CxxC. Não foi encontrado aduto do peptídeo controle contendo tiol (Scr) com a hPDI. Esta descoberta fornece evidências de que o peptídeo CxxC se liga covalentemente à PDI e que a presença de tióis vicinais é necessária para esta interação.

Finalmente, para identificar o local de ligação do CxxC com a proteína PDI recombinante, foram feitas incubações ou não com os peptídeos, e consecutivamente, submetido a tripsinização, seguida por mapeamento de massa dos peptídeos. Foram encontradas diferenças de massa no resíduo Lys386-Lys401 apenas na série y e b que continham as Cys<sub>397</sub> e Cys<sub>400</sub> sendo este, o local de um sítio ativo CGHC do domínio **a'**. Especificamente, os dados de ESI LC-MS/MS permitiram concluir que i) PDI+reação com CxxC exibiram um aumento de massa de 740,99 Da (1481 Da, duplamente carregado) no fragmento carregado B16, em comparação com PDI ou PDI+reações Scr; ii) O fragmento b13, que contém apenas Cys<sub>397</sub>, não foi modificado pelo peptídeo

CxxC; iii). Os fragmentos y2 e y4, contendo apenas Cys<sub>400</sub>, mostrou o mesmo aumento em massa de b16. Em paralelo, o fragmento de y6 contendo ambos os resíduos de cisteína não mostraram aumento adicional quando comparado com y2 e y4. Apesar do mapeamento de massa dos peptídeos cobrirem 80% da proteína, o fragmento que contém o sítio ativo CGHC do domínio **a** (Cys<sub>53</sub>-Cys<sub>56</sub>) não foi recuperado, que constitui um aspecto limitativo da presente análise. Porém, os dados de LC-MS/MS suportam que existe a adução de uma única molécula de CxxC, portanto, é razoável considerar que a Cys<sub>400</sub> é o sítio de ligação para o peptídeo CxxC.

Tomados em conjunto, os dados aqui apresentados demonstram que o peptídeo CxxC se liga covalentemente a Cys<sub>400</sub> do sítio redox CGHC C-terminal da PDI, evidenciando um mecanismo potencial para a sua atividade antiplaquetária. Além disso, eles corroboram com resultados recentemente publicados em que mostram as cisteínas reativas do motivo CGHC C-terminal (ou domínio **a'**) na PDI, são de importância capital para a trombose (ZHOU et al., 2015). A este respeito, este trabalho pode ser considerado como uma prova de conceito de que a Cys<sub>400</sub> é um alvo potencial para o desenho de drogas sítio-dirigidas e ao desenvolvimento de novos agentes antitrombóticos.

#### **4.8. Contribuições dos autores**

Protocolos de agregação de plaquetas: H. R. Sousa, E.M.L. Sena, R. S. Gaspar. Estudos em citometria de fluxo: H. R. Sousa, R. S. Gaspar, A.P.S. Azevedo-Santos. Protocolos de biologia molecular: T.L.S. Araújo, R. S. Gaspar, J.L.L. Fontelles. Estudos de espectrometria de massa: H. R. Sousa, M. Mastrogiovanni, S.A. Silva, A. Trostchansky. Supervisão da execução protocolos e discussão de dados: S.A. Silva, D.M. Fries, A.P.S. Azevedo-Santos, A.M. Paes. Concepção da hipótese e supervisão de estudo: F.R.M Laurindo, A.M. Paes. Discussão dos dados e elaboração do manuscrito: H.R. Sousa, E.M.L. Sena, R. S. Gaspar, F.R.M Laurindo, A. Trostchansky, , A.P.S. Azevedo-Santos, A.M. Paes. Todos os autores leram e aprovaram formato final do manuscrito.

#### **4.9. Agradecimentos**

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão, FAPEMA (APP 0395/12, 0814/13 Estágio, APCINTER 02698/14 e bolsas de estudo de graduação para RS Gaspar e JLL Fontelles), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (485251/2012-4) e Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (bolsa de mestrado para H.R. Sousa e E.M.L. Sena). A. Trostchansky foi apoiada por grupos CSIC I+D 2014 (536) e FAPEMA (PVI-05558/15). Os autores são gratos ao Prof. Dario Nicolau do HEMOMAR por apoiar a execução de protocolos de agregação e Johnny Ramos por obter suporte técnico durante a citometria de fluxo dos estudos. Os autores declaram nenhum conflito real ou potencial de interesse.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos neste trabalho, mostram como peptídeos sintéticos que possuem motivos catalíticos semelhantes ao da PDI, podem ter a capacidade de interagir com esta proteína, inibindo suas atividades redox. Essa interação pode resultar numa diminuição de ativação de integrinas  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  da superfície plaquetária, quando estas são ativadas com trombina, interferindo nos mecanismos de agregação plaquetária e expressão de antígenos de superfície plaquetária, mesmo quando se utilizam amostras hematológicas diferentes na análise de seus efeitos.

Com os resultados desse trabalho, os passos seguintes do nosso grupo de pesquisa, será testar os peptídeos em modelo animal para verificar a reprodutibilidade *ex vivo* e *in vivo* dos efeitos inibidores dos peptídeos que foram exaustivamente comprovados em testes *in vitro*.

Esse modelo de investigação pode ser tomado como base para investigações de outras substâncias que tenham potencial para se tornar em droga antitrombótica. Também, espera-se um maior enfoque das pesquisas posteriores a este trabalho para substâncias inibidoras do motivo catalítico GCHC C-terminal (domínio **a'**) da PDI, por já ter sido provado, em nosso trabalho e em outro trabalho recente, a importância dessa região da PDI para o desempenho de seu papel na fisiologia das plaquetas, para estabelecer e consolidar os inibidores dessas proteínas como uma nova e promissora classe de agentes antitrombóticos.



## REFERÊNCIAS

- ALEDORT, L. M. et al. Inhibition of Sulfhydryl-Dependent Platelet Functions by Penetrating and Non-Penetrating Analogues of Parachloromercuribenzene. **Blood**, v. 31, n. 4, p. 471-479, 1968-04-01 00:00:00 1968.
- ALI KHAN, H.; MUTUS, B. Protein disulfide isomerase a multifunctional protein with multiple physiological roles. **Frontiers in Chemistry**, v. 2, 2014-August-26 2014.
- ALVARES, F.; PÁDUA, A. I.; TERRA FILHO, J. Tromboembolismo pulmonar: diagnóstico e tratamento. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 214-240, 2003.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5, p. 447-453, 2005.
- APPENZELLER-HERZOG, C.; ELLGAARD, L. The human PDI family: Versatility packed into a single fold. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 4, p. 535-548, 4// 2008.
- BANNO, A.; GINSBERG, M. H. Integrin activation. **Biochemical Society transactions**, v. 36, n. Pt 2, p. 229-234, 2008.
- BATTHYANY, C. et al. Reversible Post-translational Modification of Proteins by Nitrated Fatty Acids in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 20450-20463, July 21, 2006 2006.
- BENHAM, A. M. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 8, p. 781-789, 2012.
- BENNETT, J. S. Structure and function of the platelet integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ . **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3363-3369, 2005.
- BI, S. et al. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 26, p. 10650-10655, June 28, 2011 2011.
- BONILLA, L. et al. Regulation of protein kinase C by nitroarachidonic acid: Impact on human platelet activation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 533, n. 1-2, p. 55-61, 5// 2013.
- BRASIL. **Sistema de Informações Hospitalares**, p. DATASUS, 2016. Disponível em: <<http://datasus.saude.gov.br/datasus>>. Acesso em: 09 de junho de 2016.
- BROPHY, T. M.; COLLIER, B. S.; AHAMED, J. Identification of the Thiol Isomerase-binding Peptide, Mastoparan, as a Novel Inhibitor of Shear-induced Transforming Growth Factor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) Activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 15, p. 10628-10639, April 12, 2013 2013.
- BURGESS, J. K. et al. Physical proximity and functional association of glycoprotein  $1b\alpha$  and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9758-9766, 2000.

- BURGESS, J. K. et al. Physical Proximity and Functional Association of Glycoprotein 1b $\alpha$  and Protein-disulfide Isomerase on the Platelet Plasma Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 13, p. 9758-9766, March 31, 2000 2000.
- CASTRO, H. C. et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 5, p. 321-32, 2006.
- CHANDLER, A. B. et al. Regulation of CD40L (CD154) and CD62P (p-selectin) surface expression upon GPIIb-IIIa blockade of platelets from stable coronary artery disease patients. **Thrombosis research**, v. 125, n. 1, p. 44-52, 2010.
- CHEN, D. et al. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release. **Blood**, v. 96, n. 5, p. 1782-1788, 2000-09-01 00:00:00 2000.
- CHO, J. et al. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 1123-1131, 2008.
- CRESCENTE, M. et al. Intracellular Trafficking, Localization, and Mobilization of Platelet-Borne Thiol Isomerases. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 6, p. 1164-1173, June 1, 2016 2016.
- DE A. PAES, A. M. et al. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47phox: evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 4, p. 799-810, October 1, 2011 2011.
- DICKERHOF, N. et al. Bacitracin inhibits the reductive activity of protein disulfide isomerase by disulfide bond formation with free cysteines in the substrate-binding domain. **FEBS Journal**, v. 278, n. 12, p. 2034-2043, 2011.
- EDMAN, J. C. et al. Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. **Nature**, v. 317, n. 6034, p. 267-270, 09/19/print 1985.
- ELETTO, D. et al. Redox controls UPR to control redox. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 17, p. 3649-3658, September 1, 2014.
- ELLSGAARD, L.; RUDDOCK, L. W. **The human protein disulphide isomerase family: substrate interactions and functional properties.** 2005. 28-32
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70-77, 1959.
- ESSEX, D.; CHEN, K.; SWIATKOWSKA, M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of. **Blood**, v. 86, n. 6, p. 2168-2173, 1995.
- ESSEX, D. W. The role of thiols and disulfides in platelet function. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 6, n. 4, p. 736-746, 2004.
- ESSEX, D. W. Redox Control of Platelet Function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 5, p. 1191-1225, 2009/05/01 2009.

ESSEX, D. W.; LI, M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. **British Journal of Haematology**, v. 104, n. 3, p. 448-454, 1999.

\_\_\_\_\_. Redox Control of Platelet Aggregation†. **Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 129-136, 2003/01/01 2003.

FAUCI, A. S. **Harrison's principles of internal medicine**. McGraw-Hill, Medical Publishing Division, 2008.

FLAUMENHAFT, R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 23, n. 7, p. 264-268, 10// 2013.

FLAUMENHAFT, R. et al. Proteins of the Exocytotic Core Complex Mediate Platelet  $\alpha$ -Granule Secretion: ROLES OF VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN, SNAP-23, AND SYNTAXIN 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 4, p. 2492-2501, January 22, 1999 1999.

FLAUMENHAFT, R.; FURIE, B.; ZWICKER, J. I. Therapeutic Implications of Protein Disulfide Isomerase Inhibition in Thrombotic Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 1, p. 16-23, January 1, 2015.

FURIE, B. Pathogenesis of thrombosis. **ASH Education Program Book**, v. 2009, n. 1, p. 255-258, January 1, 2009 2009.

FURIE, B.; FLAUMENHAFT, R. Thiol Isomerases in Thrombus Formation. **Circulation Research**, v. 114, n. 7, p. 1162-1173, March 28, 2014 2014.

GHOSHAL, K.; BHATTACHARYYA, M. Overview of platelet physiology: its hemostatic and nonhemostatic role in disease pathogenesis. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

GITLER, C.; MOGYOROS, M.; KALEF, E. LABELLING OF PROTEIN VICINAL DITHIOLS: ROLE OF PROTEIN-S<sub>2</sub> TO PROTEIN-(SH)<sub>2</sub> CONVERSION IN METABOLIC REGULATION AND OXIDATIVE STRESS. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 403-415, 1994.

GOLDBERGER, R. F.; EPSTEIN, C. J.; ANFINSEN, C. B. Purification and Properties of a Microsomal Enzyme System Catalyzing the Reactivation of Reduced Ribonuclease and Lysozyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 5, p. 1406-1410, May 1, 1964 1964.

GREK, C.; TOWNSEND, D. M. Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. **Endoplasmic reticulum stress in diseases**, v. 1, n. 1, p. 4-17, 2014.

HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H. Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the  $\alpha\beta$ 3 integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 36, n. 13-14, p. 1374-1389, 1997.

HEEMSKERK, J. W. M. et al. Platelet Collagen Receptors and Coagulation. A Characteristic Platelet Response as Possible Target for Antithrombotic Treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 3, p. 86-92, 2005.

HOFFSTROM, B. G. et al. Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. **Nat Chem Biol**, v. 6, n. 12, p. 900-906, 12//print 2010.

- HOLMGREN, A. Thioredoxin. 6. The Amino Acid Sequence of the Protein from Escherichia coli B. **European Journal of Biochemistry**, v. 6, n. 4, p. 475-484, 1968.
- ITALIANO, J.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. **Platelets**, v. 2, p. 23-44, 2007.
- JASUJA, R. et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 6, p. 2104-2113, 2012.
- KIM, K. et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. **Blood**, v. 122, n. 6, p. 1052-1061, 2013.
- KONG, Y. et al. LX0702, a novel snake venom peptide derivative, inhibits thrombus formation via affecting the binding of fibrinogen with GPIIb/IIIa. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 127, n. 4, p. 462-466, 4// 2015.
- KOZLOV, G. et al. A structural overview of the PDI family of proteins. **FEBS Journal**, v. 277, n. 19, p. 3924-3936, 2010.
- LAHAV, J. et al. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2472-2478, 2002-10-01 00:00:00 2002.
- LAHAV, J. et al. Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin  $\alpha 2\beta 1$ . **Blood**, v. 102, n. 6, p. 2085-2092, 2003-09-15 00:00:00 2003.
- LAURINDO, F. R. M. et al. Novel Role of Protein Disulfide Isomerase in the Regulation of NADPH Oxidase Activity: Pathophysiological Implications in Vascular Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 6, p. 1101-1114, 2008/06/01 2008.
- LEVIN, J. The evolution of mammalian platelets. **Platelets**, v. 3, p. 25, 2013.
- LI, Y.-X. et al. A novel anti-platelet peptide (Z4A5) potential for glycoprotein IIb/IIIa inhibits platelet aggregation. **Thrombosis Research**, v. 129, n. 5, p. e217-e222, 5// 2012.
- MACINTYRE, D. E. et al. Effect of thio reagents on platelet transport processes and responses to stimuli. **Biochemical pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 319-323, 1977.
- MANICKAM, N.; AHMAD, S.; ESSEX, D. Vicinal thiols are required for activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 platelet integrin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 6, p. 1207-1215, 2011.
- MANICKAM, N.; AHMAD, S. S.; ESSEX, D. W. Vicinal thiols are required for activation of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 platelet integrin. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 9, n. 6, p. 1207-1215, 2011.
- MANICKAM, N. et al. Protein disulphide isomerase in platelet function. **British Journal of Haematology**, v. 140, n. 2, p. 223-229, 2008.
- MANSUR, A. D. P. et al. Diretrizes de doença coronariana crônica angina estável. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, p. 2-43, 2004.
- MARGADANT, C. et al. Mechanisms of integrin activation and trafficking. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 5, p. 607-614, 10// 2011.

- MILLARD, M.; ODDE, S.; NEAMATI, N. Integrin Targeted Therapeutics. **Theranostics**, v. 1, p. 154-188, 02/17 2011.
- NOIVA, R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 10, n. 5, p. 481-493, 10// 1999.
- PARAKH, S.; ATKIN, J. Novel roles for protein disulphide isomerase in disease states: a double edged sword? **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 3, 2015-May-21 2015.
- PINTO, B. A. S. et al. Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. **Metabolic Brain Disease**, p. 1-11, 2016.
- PIRNESKOSKI, A. et al. Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 11, p. 10374-10381, 2004.
- REINHARDT, C. et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 1110-1122, 2008.
- ROBINSON, A. et al. Bacitracin reveals a role for multiple thiol isomerases in platelet function. **British Journal of Haematology**, v. 132, n. 3, p. 339-348, 2006.
- RYSER, H. J. et al. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 10, p. 4559-4563, 1994.
- SANTOS, C. X. C. et al. Protein disulfide isomerase (PDI) associates with NADPH oxidase and is required for phagocytosis of *Leishmania chagasi* promastigotes by macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 4, p. 989-998, October 1, 2009 2009.
- SENA, E. M. L. **Investigação da atividade antiagregante in vitro de peptídeos inibidores da proteína dissulfeto isomerase**. 2014. 57 Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão.
- SHIMAOKA, M.; SPRINGER, T. A. Therapeutic antagonists and conformational regulation of integrin function. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 703-716, 09//print 2003.
- TAYLOR, M. et al. Substrate-Induced Unfolding of Protein Disulfide Isomerase Displaces the Cholera Toxin A1 Subunit from Its Holotoxin. **PLoS Pathog**, v. 10, n. 2, p. e1003925, 2014.
- THON, J. N. et al. T granules in human platelets function in TLR9 organization and signaling. **The Journal of cell biology**, v. 198, n. 4, p. 561-574, 2012.
- TUCKER, G. C. Inhibitors of integrins. **Current opinion in pharmacology**, v. 2, n. 4, p. 394-402, 2002.
- UEHARA, T. et al. S-Nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 513-517, 05/25/print 2006.

VAN LITH, M. et al. A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 8, p. 2795-2804, 2007.

WALKER, K. W.; GILBERT, H. F. Scanning and Escape during Protein-disulfide Isomerase-assisted Protein Folding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 8845-8848, April 4, 1997 1997.

WILKINSON, B.; GILBERT, H. F. Protein disulfide isomerase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1699, n. 1–2, p. 35-44, 6/1/ 2004.

XIONG, J.-P. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$ . **Science**, v. 294, n. 5541, p. 339-345, 2001.

XU, S. et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 40, p. 16348-16353, October 2, 2012 2012.

XU, S.; SANKAR, S.; NEAMATI, N. Protein disulfide isomerase: a promising target for cancer therapy. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 3, p. 222-240, 3// 2014.

ZHOU, J. et al. The C-terminal CGHC motif of protein disulfide isomerase supports thrombosis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 12, p. 4391-4406, 2015.

ZHU, J. et al. Closed headpiece of integrin  $\alpha IIb\beta 3$  and its complex with an  $\alpha IIb\beta 3$ -specific antagonist that does not induce opening. **Blood**, v. 116, n. 23, p. 5050-5059, 2010-12-02 00:00:00 2010.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE**

### 1. Apresentação:

O Sr(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “*Investigação da atividade anti-agregante plaquetária in vitro de peptídeos inibidores da dissulfeto isomerase protéica*” na **qualidade de doador voluntário**. Neste projeto pretendemos validar a atividade antiagregante plaquetária de peptídeos sintéticos com vistas ao desenvolvimento de futuros medicamentos para o tratamento de distúrbios tromboembólicos. Este é um estudo inteiramente *in vitro*, ou seja, não lhe utilizaremos para a administração ou aplicação de qualquer substância. **O que lhe solicitamos** neste momento é a doação de **uma amostra de sangue** que será coletada por pessoa qualificada e com o uso de material estéril, **em um volume máximo de 50 mL**. Esta amostra será utilizada para o fim específico e exclusivo de separação de plaquetas, as quais serão utilizadas nos experimentos previstos pelo projeto.

Caso não se sinta à vontade para aceitar, por quaisquer motivos que sejam, o Sr(a) tem total liberdade para recusar este convite sem qualquer ônus ou prejuízo. Em aceitando, lhe agradecemos por contribuir para o desenvolvimento científico do nosso Estado.

### 2. Consentimento:

São Luís, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Eu, \_\_\_\_\_, CPF/RG \_\_\_\_\_, aceito ser doador voluntário de amostra de sangue para o estudo acima descrito e que foi me foi apresentado e explicado pelos pesquisadores abaixo – assinados.

### 3. Pesquisadores responsáveis:

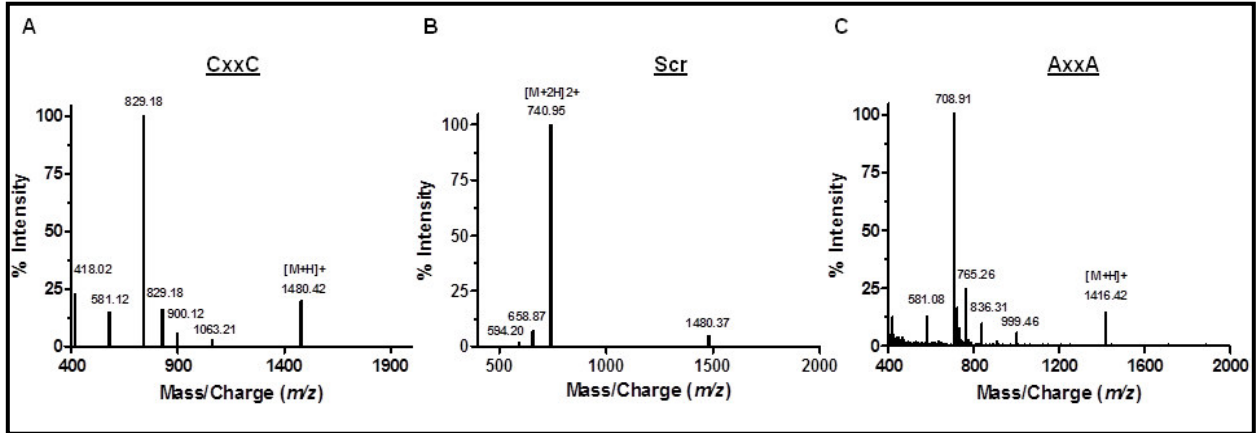
---

Hiran Reis Sousa  
 TEL: (98) 99227-9689

---

Prof. Dr. Antonio Marcus de A. Paes  
 TEL: (98) 99226-0505

## APÊNDICE B– FIGURAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO



**Figura S1. Caracterização MS/MS dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA.** Cada um dos peptídeos foi sintetizado como explicado na seção de materiais e métodos. A figura mostra os espectros representativos MS/MS no modo de íons positivos de: **A-** CxxC (massa 1480 Da); **B-** Scr (massa 1480 Da); **C-** AxxA (massa 1416 Da).

1	MLRRALLCLA	VAALVRADAP	EEEDHVLVLR	KSNFAEALAA	HKYLLVEFYA
51	PWCGHCK <b>ALA</b>	<b>PEYAKAAGKL</b>	<b>KAEGSEIRLA</b>	<b>KVDATEESDL</b>	<b>AQQYGVRYGYP</b>
101	<b>TIKFFRNGDT</b>	<b>ASPKEYTAGR</b>	<b>EADDIVNWLK</b>	<b>KRTGPAATTL</b>	<b>PDGAAAE SLV</b>
151	<b>ESSEVAVIGF</b>	<b>FKDVE SDAK</b>	<b>QFLQAAE AID</b>	<b>DIPFGIT SNS</b>	<b>DVF SKYQLDK</b>
201	<b>DGVVLFKKFD</b>	<b>EGRN NFEGEV</b>	<b>TKENLLDFIK</b>	<b>HNQLPLVIEF</b>	<b>TEQTAPKIFG</b>
251	<b>GEIKTHILLF</b>	<b>LPKSVSDYDG</b>	<b>KLSNFKTAAE</b>	<b>SFKGKILFIF</b>	<b>IDS DHTDNQR</b>
301	<b>ILEFFGLKKE</b>	<b>ECPAVRLITL</b>	<b>EEEMTKYKPE</b>	<b>SEELTAERIT</b>	<b>EFCHRFLGK</b>
351	<b>IKPHLMSQEL</b>	<b>PEDWDKQPVK</b>	<b>VLVGKNFEDV</b>	<b>AFDEKKNV FV</b>	<b>EFYAPWCGHC</b>
401	<b>KQLAPIWDKL</b>	<b>GETYKDHENI</b>	<b>VIAKMDSTAN</b>	<b>EVEAVKVHSF</b>	<b>PTLKFFPASA</b>
451	<b>DRTVIDYNGE</b>	<b>RTLDGFKKFL</b>	<b>ESGGQDGAGD</b>	<b>DDDLEDLEEA</b>	<b>EEDMEEDDD</b>
501	<b>QKAVKDEL</b>				

**Figura S2: Análise da tripsinização da PDI por HPLC/MS.** PDI recombinante foi digerida por tripsina para confirmar a identidade da enzima. PDI reduzido foi incubado com tripsina porcina (50:1) em bicarbonato de amônio (50 mM, pH 8) incubação “overnight”. A amostra foi analisada utilizando espectrometria de massa em tandem com cromatografia líquida (HPLC-MS). O programa MASCOT foi empregado para o processamento de dados e análises. Na figura é ilustrada a sequência PDI A1 humana e representado em vermelho os peptídeos compatíveis. A cobertura da proteína foi compatível em 79% da sequência. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes (n = 3).



# ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 – São Luis - Maranhão.

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER CONSUBSTANCIADO	
X PROJETO DE PESQUISA	Número do Protocolo: 23115-017432/2011-29
PROJETO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA	Data de entrada no CEP 12/12-2011
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	Data da assembléia 01/03/2012

## I - Identificação:

Título do projeto:	Investigação da atividade anti-agregante plaquetária in vitro de peptídeos inibidores da dissulfeto isomerase protéica		
Identificação do Pesquisador Responsável:	Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes		
Identificação da Equipe executor:	Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, Profa. Dra. Ana Paula dos Santos, Elyjany Moraes Lima, Lucas Martins França		
Instituição onde será realizado:	Departamento de Ciências Fisiológicas- CCBS/UFMA		
Área temática:	III	Multicêntrico:	Não
Cooperação estrangeira:	Não	Patrocinador:	Não
		Data de recebimento:	01/03/2012
		Data de devolução	27/02/12

## II - Objetivos:

Investigar os efeitos de peptídeos sintéticos ditiólicos PDI – miméticos sobre a agregação plaquetária in vitro e o mecanismo molecular dos mesmos.

## III - Sumário do projeto:

O presente projeto busca avaliar a potencial atividade antiagregante plaquetária dos de peptídeos sintéticos ditiólicos PDI – miméticos, de modo a ser capaz de propor um mecanismo de ação que os eleva ao patamar de potenciais agentes farmacológicos antitrombogênicos. Visa desenhar e sintetizar novos peptídeos com base na estrutura tridimensional da PDI e submeter pedido de depósito de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

## IV - Comentários do relator:

Projeto não atende a descrição detalhada e ordenada do projeto de pesquisa, conforme prega a Resolução 196/96, pois não esclarece como ocorrerá o recrutamento dos voluntários e a coleta da amostra de sangue. Consta o Cv Lattes de toda a equipe executora.

## V - Pendências:

Nenhuma

## VI – Recomendações:

Nenhuma

## VII - Parecer Consubstanciado do CEP

Foram apresentados os documentos enumerados em Pendências; desse modo, o 23115-017432/2011-29, referente a pesquisa de Dissertação de Mestrado sob o título **Investigação da atividade anti-agregante plaquetária in vitro de peptídeos inibidores da dissulfeto isomerase protéica**. É considerado por este CEP COMO APROVADO.