

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

ELYJANY MORAIS LIMA SENA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE
PEPTÍDEOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE.**

São Luís

2014

ELYJANY MORAIS LIMA SENA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE
PEPTÍDEOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE.**

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.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade
Paes

São Luís

2014

Sena, Elyjany Moraes Lma

Investigação da atividade antiagregante *in vitro* de peptídeos inibidores da proteína dissulfeto isomerase / Elyjany Moraes Lima Sena. – 2014.

57 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Antonio Marcus de Andrade Paes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, 2014.

1. Difosfato de adenosina

2. Agregação plaquetária 3. Compostos de Sulfidril 1. Título

ELYJANY MORAIS LIMA SENA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA *IN VITRO* DE
PEPTÍDEOS INIBIDORES DA PROTEÍNA DISSULFETO ISOMERASE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Maranhão, como requisito para a obtenção do título de mestre em
Ciências da Saúde.

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

() APROVADA

() REPROVADA

**Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes – Universidade Federal do
Maranhão - UFMA - (Presidente)**

Prof. Dr. Raimundo Antonio Gomes Oliveira – UFMA

Profa. Dra. Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos – UFMA

**Profa. Dra. Ana Iochabel Soares Moretti – Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo - FMUSP**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela imensurável bondade que tem derramado sobre minha vida, mesmo nos momentos difíceis.

Ao meu marido, Michael Franco e meu filho Davi Sena, um amor muito além dos meus sonhos de menina. Ao meu marido pelo amor verdadeiro e suficiente para mais de uma vida.

Aos meus pais Elias e Joana, pela confiança e incentivo depositados em mim desde sempre e a minha irmã Elaine pela amizade.

Ao meu orientador Antonio Marcus, pelo sim ao meu pedido de orientação, pela seriedade em conduzir nosso trabalho, mas acima de tudo, pela paciência e amizade.

Ao grupo de trabalho “Agregação”, Prof^ª. Samira Abdala, Renato Gaspar, Lucas Fontelles e Hyran Reis, esse trabalho é nosso. MUITÍSSIMO obrigada pelo apoio técnico, científico, moral e principalmente, pela amizade e companheirismo. Estarei à disposição para ajudá-los em todas as suas caminhadas.

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 de Ensino e Pesquisa em Fisiologia – UFMA por todas as amizades construídas e aprendizado adquirido.

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

RESUMO

A Proteína dissulfeto isomerase (PDI) desempenha um importante papel na agregação de plaquetas, envolvendo proteínas tiólicas de superfície tanto em vias dependentes, quanto independentes de ADP. Recentemente foi demonstrado que um dodecapeptídeo (CxxC), contendo o motivo catalítico da PDI, era capaz de diminuir a atividade redutase da PDI, abrindo a perspectiva do uso do mesmo como agente terapêutico antitrombótico. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos de peptídeos PDI – símile sobre a agregação plaquetária *in vitro* e o mecanismo molecular de ação dos mesmos. Por análises *in silico* utilizando um programa de ancoragem molecular, observou-se que o peptídeo CxxC, bem como os seus peptídeos controle, scrambled (Scr) e AxxA, foram todos capazes de se ligar ao sítio de ligação do substrato na PDI. Posteriormente, por *western blot*, demonstrou-se que o peptídeo CxxC (25 μ M) promoveu uma discreta, mas importante, redução da marcação de tióis livres da PDI sugerindo associação física entre o peptídeo e a proteína. O mesmo não foi observado nas amostras incubadas com os peptídeos Scr e AxxA, na mesma concentração. Nos ensaios de agregação plaquetária, o plasma rico em plaquetas (PRP) foi pré-incubado com os peptídeos CxxC, Scr e AxxA utilizando ADP (5 μ M) como agente agregante. Encontramos que o peptídeo CxxC reduziu a agregação máxima em 14%, 27% e 30% nas concentrações de 3, 10 e 30 μ M, respectivamente. O peptídeo Scr e o peptídeo AxxA, não afetaram a agregação plaquetária induzida por ADP nas mesmas concentrações. Sendo assim, o conjunto dos dados aqui apresentados sugerem que o peptídeo CxxC associa-se à PDI de superfície e inibe parcialmente a agregação plaquetária via mecanismos mediados por trocas tiol-dissulfeto.

DESCRITORES: Difosfato de adenosina, Agregação plaquetária, Compostos de sulfidril, Plaquetas.

ABSTRACT

Protein disulfide isomerase (PDI) plays an important role in platelet aggregation involving thiol containing surface proteins in both dependent pathways and independent of ADP. Recently it has been shown that one dodecapeptide (CXXC) containing the catalytic motif PDI was able to decrease the reductase activity of PDI opening the perspective of using the same as antithrombotic therapeutic agent. This study aimed to investigate the effects of peptides PDI - like on platelet aggregation in vitro and molecular mechanism of action of the same. For in silico analysis using a molecular docking program, it was observed that the CXXC peptide as well as its control peptide, scrambled (SCR) and AXXA were all capable of binding to the substrate site of the PDI. Posteriormente, Western blot, it was demonstrated that the peptide CXXC (25 μ M) induced a slight but significant reduction of free thiols marking PDI suggesting physical association between the peptide and the protein. The same was not observed in samples incubated with Scr and AXXA peptides at the same concentration. In platelet aggregation assays, the platelet-rich plasma (PRP) was pre-incubated with the CXXC, Scr and AXXA peptides using ADP (5 μ M) as aggregating agent. CXXC found that the peptide reduced the maximum aggregation by 14%, 27% and 30% at concentrations of 3, 10 and 30 μ M, respectively. The Scr AXXA peptide and the peptide had no effect on platelet aggregation induced by ADP in the same concentrations. Thus, all the data presented here suggest that the CXXC peptide is associated with PDI surface and partially inhibits platelet aggregation via mechanisms mediated by thiol-disulfide exchange.

KEYWORDS: Adenosine diphosphate, platelet aggregation, sulfhydryl compounds, Platelets.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADP	Adenosina dinucleotídeo fosfato
ATP	Adenosina trinucleotídeo fosfato
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico
DTT	Ditiotreitol
GPVI	Glicoproteína VI
MPB	3-(N-maleimidilpropionil) biocitina
NEM	N-etilmaleimida
pCMBS	Ácido p-cloromercurifenilsulfônico
PDI	Proteína dissulfeto isomerase
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PF-4	Fator plaquetário-4
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
RPM	rotações por minuto
VWF	Fator de Von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 CAPÍTULO I – Regulação redox da agregação plaquetária.....	12
2. 1. Introdução.....	15
2.2. Estrutura Geral das plaquetas.....	15
3. O papel dos tióis de membrana na agregação plaquetária.....	17
3.1 Estrutura da $\alpha\text{IIb}\beta_3$	18
3.2 A atividade da integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é regulada por trocas tiol-dissulfeto.....	19
4. A PDI como elemento chave no processo de agregação.....	20
5. A inibição da PDI como ferramenta para novas terapias antitrombóticas.....	23
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo Geral	30
3.2 Objetivos Específicos.....	30
4 CAPÍTULO II - Mecanismos redoxes envolvidos na ação de um peptídeo inibidor da proteína dissulfeto isomerase sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	56
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	57

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios tromboembólicos constituem uma das causas mais comuns de morbimortalidade ao redor do mundo (KASPER, 2008). No Brasil, entre janeiro e novembro de 2013, o número de internações por embolia pulmonar, embolia e trombose arteriais, flebite tromboflebite, embolia e trombose venosa foi de 59.938, a um custo total de R\$ 61.683.409,54. Em uma análise mais ampla, as doenças do aparelho circulatório representam 7,28% das causas de óbito, um dos maiores índices de mortalidade do país, sendo 2,38% diretamente decorrentes de distúrbios tromboembólicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SIH/SUS 2013).

O tromboembolismo consiste na obstrução aguda da circulação venosa ou arterial pela instalação de coágulos sanguíneos (ALVARES *et al*, 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 (BIZZACCHI, 2004). O trombo venoso tem maior composição de fibrina e hemácias e o arterial tem maior composição de plaquetas. Esses aspectos têm implicações terapêuticas, visto que os agentes fibrinolíticos constituem a terapêutica de escolha na trombose venosa, enquanto os antiagregantes plaquetários são mais utilizados nos processos arteriais (PEREIRA, 2006). As plaquetas tem uma ação crucial à formação do trombo arterial, pois se ligam ao endotélio lesado independentemente do fluxo sanguíneo e desencadeiam todo o processo de agregação local e consequente formação do trombo (MORELLI, 2004).

Os principais receptores envolvidos na ativação inicial das plaquetas incluem os receptores de trombina, PAR1 e PAR4, o receptor GPVI de colágeno e os receptores de ADP, P2Y₁ e P2Y₁₂, assim como os receptores de tromboxano A₂ (ESSEX, 2009). A ativação resulta em alteração conformacional de uma integrina de membrana denominada GP α IIb β 3. Essa mudança conformacional é uma resposta a eventos intracelulares que envolvem a propagação e alteração conformacional do domínio citoplasmático da integrina levando a exposição do sítio ativo para ligação ao fibrinogênio solúvel no plasma (SHATTIL; NEWMAN, 2004).

Diversos estudos tem demonstrado que parte desse processo de estimulação de respostas plaquetárias, incluindo secreção e agregação, tem sido atribuída a rearranjos envolvendo grupamentos tióis e dissulfetos expostos na membrana da plaqueta (ESSEX, 2009; ESSEX *et al*, 2004; ESSEX *et al*, 1995). Os receptores α IIb β 3, α 2 β 1, GPIb, P2Y12, e GPVI possuem grupamentos tiol livres e são , portanto, sítios potenciais de regulação redox a ser exercida por proteínas tiólicas. Tal grupo inclui proteínas com atividade dissulfeto redutase como tiorredoxina, glutarredoxina e a proteína dissulfeto isomerase – (PDI) (ESSEX, 2004).

Em trabalho publicado recentemente, nosso grupo verificou que a atividade da PDI tanto *in vitro* quanto *in vivo* pode ser inibida pelo uso de peptídeos cuja sequência mimetiza o sítio catalítico da proteína. Mostramos que estes peptídeos são capazes de inibir a atividade redutase da PDI, contribuindo assim para a redução da geração de espécies reativas de oxigênio pela NADPH oxidase de neutrófilos humanos. Dados da literatura mostram que a agregação plaquetária pode ser inibida com o uso de alquilantes tiólicos ou inibidores da PDI (DTNB - 5,5' ditiobis-(2- ácido nitrobenzóico) e anticorpos anti-PDI respectivamente). Com isso, hipotetizamos que os peptídeos utilizados por Paes e colaboradores (2011) também poderiam inibir a agregação plaquetária.

Sendo assim, no presente trabalho apresentamos dois capítulos que abordam: (I) uma revisão atualizada da literatura acerca dos mecanismos redox envolvendo a PDI no processo de agregação plaquetária e (II) uma investigação da atividade antiagregante plaquetária de peptídeos PDI-símile através de ensaios de agregação utilizando plasma rico em plaquetas (PRP) e ancoragem molecular com triagem virtual de alta performance e precisão, deduzindo tridimensionalmente a interação molecular entre os peptídeos e seus mais prováveis sítios de ligação à PDI.

2 CAPÍTULO I

Artigo de Revisão

REGULAÇÃO REDOX DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

(a ser submetido à revista Brazilian Journal of Medical and Biological Reserch)

QUALIS B2 MEDICINA I

FATOR DE IMPACTO 1.139 DE ACORDO COM THOMPSON REUTERS

Artigo de Revisão**REGULAÇÃO REDOX DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA**

E.M.L. Sena ¹, R.S. Gaspar ¹, S.A. Silva ¹, D.M. Fries ², F.R.M. Laurindo ³ & A.M.A. Paes ^{1*}

1. Laboratório de Ensino e Pesquisa em Fisiologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.
2. Laboratório de Hemostasia, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
3. Laboratório de Biologia Vascular do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor correspondente:

A.M.A. Paes – Avenida dos Portugueses, 1966 – Campus do Bacanga

65080-850 São Luís (MA), Brasil.

Tel: +55 (98) 3273 8547 E-mail: marcuspaes@ufma.br

ABSTRACT

Platelets play a critical role in hemostasis when the vascular endothelium is injured and the activation of this process and its regulation occur through based on thiol - disulfide exchange reactions. The protein disulfide isomerase plays a central role in platelet aggregation for catalyzing redox reactions and isomerisation involving thiol groups of proteins. The fibrinogen receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ contains free thiols that are required for activation of that receptor in a conformation high affinity for fibrinogen. This process occurs under enzymatic control, with the PDI directly participating in the activation of $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Physiological concentrations of reduced glutathione generate thiols in $\alpha\text{IIb}\beta 3$ and leverage the dependent reactions of thiols that receptor. Several studies have shown that the PDI secreted by platelets and vascular endothelial cells is essential for standard thrombus formation. Inhibition of extracellular PDI therefore represents a potential strategy for new antithrombotic therapies.

KEYWORDS: platelets, thiols, $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin, platelet aggregation.

Conteúdo

1. Introdução
2. Estrutura geral das plaquetas
3. O papel dos tióis de membrana na agregação plaquetária
 - 3.1 Estrutura da $\alpha\text{IIb}\beta 3$
 - 3.2 A atividade da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ é regulada por trocas tiol-dissulfeto
4. A PDI como elemento chave no processo de agregação
5. A inibição da PDI como ferramenta para novas terapias antitrombóticas.

1. Introdução

As plaquetas desempenham um papel chave e benéfico na hemostasia porque podem ser ativadas e mobilizadas rapidamente para formação do tampão hemostático. A hemostasia primária normal requer três eventos críticos: adesão, liberação do conteúdo dos grânulos e agregação plaquetária, envolvendo para isso diversos receptores em cada um desses eventos (1). Similar ao que ocorre em outras células, a ativação plaquetária é modulada por alterações nos níveis de nucleotídeos cíclicos, pelo influxo de cálcio, hidrólise de fosfolípidos de membrana e fosforilação de proteínas intracelulares (1,2).

Em resposta à ativação, a mais abundante integrina plaquetária, $\alpha\text{IIb}\beta_3$, sofre uma mudança conformacional que eleva sua afinidade por proteínas adesivas como fibrinogênio, fibronectina, vitronectina e fator de von Willebrand. O mecanismo exato ainda não está claro mas várias linhas de pesquisa tem sugerido que a mudança para o estado de alta afinidade ocorre devido à clivagem de pontes dissulfeto no interior da integrina, mas especificamente na subunidade β (3). A clivagem ou o rearranjo de pontes dissulfeto iniciada por tióis é um processo dinâmico que regula a função de células e proteínas incluindo aquelas envolvidas na hemostasia e na função plaquetária (1,4). Proteínas tiólicas, tais como tioredoxina, glutarredoxina e proteína dissulfeto isomerase (PDI) são consideradas as principais mediadoras desses rearranjos (4).

A PDI está envolvida em vários processos celulares incluindo adesão, entrada de vírus na célula e progressão de doenças (2,4,5). Na superfície de plaquetas, a PDI desempenha um papel crucial em reações como adesão, agregação e secreção (6). A expressão da PDI na superfície celular, é um indicador da importância das trocas tiol-dissulfeto nas células em geral, em particular, na membrana das plaquetas (7). Nessa revisão são discutidas as reações redox envolvidas na agregação plaquetária através de trocas tiol-dissulfeto e mediadas pela proteína dissulfeto isomerase. A importância dessas reações para a função plaquetária e as evidências de que os inibidores dessa proteína podem ser novos e promissores agentes antitrombóticos.

2. Estrutura geral das plaquetas

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, anucleadas, de forma discóide e diâmetro entre 2 a 3µm. Seu período médio de vida está em torno dos 10 dias, após o que são removidas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado. Apesar do aspecto morfológico relativamente simples ao microscópio óptico, as plaquetas possuem uma estrutura funcional complexa, permitindo-lhe rápido reconhecimento da lesão vascular que a habilita a desencadear o processo de formação do tampão hemostático (8).

A membrana plasmática da plaqueta é revestida externamente por uma camada de glicoproteínas (GP) — dentre as quais se destacam as GP I, II, III e suas variantes Ib, IIIa — que desempenham papel essencial à ativação e agregação plaquetárias (9). Internamente, possuem um sistema canalicular aberto que se estende do citoplasma ao meio externo e funciona como meio de rápida liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos (10). Os grânulos α contêm fatores reguladores da formação do trombo, tais como o VWF, fibronectina, trombomodulina, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e uma proteína neutralizadora da heparina, o fator 4 plaquetário (PF-4), enquanto os grânulos densos contêm ATP, ADP, serotonina e cálcio. Estes fatores, em conjunto, contribuem para o recrutamento plaquetário e estabilização do trombo (11).

Após a lesão vascular, as plaquetas aderem rapidamente ao subendotélio exposto. Em condições de baixa turbulência, como aquelas características da circulação venosa, as plaquetas podem se ligar diretamente ao colágeno exposto. Em condições de alta turbulência, como as presentes na circulação arterial, a interação é iniciada pelo receptor plaquetário GPIb que se liga às fibrilas de colágeno subendotelial através do fator VWF e do receptor de colágeno $\alpha_2\beta_1$, um membro da família das integrinas (11). A adesão das plaquetas ao endotélio vascular promove, ainda, a liberação do conteúdo dos grânulos plaquetários e a geração de outros mediadores da ativação/agregação, tais como o tromboxano A_2 . Juntamente ao colágeno, ADP e trombina, o tromboxano A_2 compõe o grupo dos mais importantes agonistas da ativação plaquetária (2).

Os principais receptores envolvidos na ativação inicial das plaquetas incluem os receptores de trombina, PAR1 e PAR4, o receptor GPVI de colágeno e os receptores de ADP, P2Y₁ e P2Y₁₂, assim como os receptores de tromboxano A_2 , TP α e TP β (4). A ativação destes receptores resulta em alteração conformacional da integrina $\alpha IIb\beta_3$, como resposta a

eventos de sinalização intracelular que envolvem a propagação e alteração conformacional do domínio citoplasmático da integrina levando a exposição do domínio para ligação ao fibrinogênio solúvel no plasma (12).

3.O papel dos tióis de membrana na agregação plaquetária

A função plaquetária dos tióis livres ou sulfidrilas permaneceu por muito tempo pouco estudada, porém, mais recentemente, eles tem sido implicados como parte de processos de estimulação de várias respostas plaquetárias, incluindo secreção e agregação (4, 13, 14). A forma ativa do tiol é a forma desprotonada se apresentando como ânion tiolato (S^-), que é um dos mais fortes nucleófilos biológicos; sendo, o grupo tiol da cisteína um dos grupos funcionais mais reativos encontrados nas proteínas (4). A variação da forma ativa de ânion tiolato para a forma inativa reduzida ($-SH$) depende do pKa dos resíduos de cisteínas da proteína. Assim, como o pKa da maioria dos grupos tiol dos resíduos de cisteína fica em torno de 8,5 há predomínio da forma reduzida em pH fisiológico (4). Além do pKa, grupos vizinhos aos tióis contendo aminoácidos carregados positivamente como lisina, arginina e histidina podem aumentar a tendência de desprotonação do tiol (4,15).

Embora o mecanismo exato não seja ainda bem definido, diversos trabalhos têm demonstrado que reações redox entre esse grupamentos são essenciais para ativação e agregação plaquetária (16). Lahav e colaboradores (2000) demonstraram que agentes alquilantes de sulfidrilas livres como pCMBS e DTNB são capazes de inibir a agregação plaquetária induzida por agonistas como ADP, colágeno, epinefrina, trombina e ácido araquidônico (5). Em outro estudo do mesmo grupo, porém, examinando o papel de trocas tiol-dissulfeto e PDI associada à superfície da plaqueta no contexto da ligação do fibrinogênio à integrina $\alpha IIb\beta 3$, observaram que a utilização dos mesmos agentes alquilantes, inibiu de maneira similar a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e trombina, sugerindo que o efeito do bloqueio de tióis é mediado pela $\alpha IIb\beta 3$ ou associado a proteínas envolvidas na ligação ao fibrinogênio (7). Margaritis et. al. (2011), em estudo comparativo entre os efeitos do bloqueio de sulfidrilas livres utilizando N-etilmaleimida (NEM) e a redução de pontes dissulfetos com ditioneitol (DTT), observou que o NEM inibiu a agregação plaquetária induzida por altas doses de ADP ou colágeno de maneira dose-

dependente e que o DTT, ao contrário, ao reduzir pontes dissulfeto, amplificou a resposta de agregação não sendo necessária a adição de agente agregante como ADP ou colágeno (16).

Os receptores plaquetários $\alpha\text{Ib}\beta 3$, $\alpha 2\beta 1$, GPIb, P2Y12, e GPVI possuem grupamentos tiol livres e são, portanto, sítios potenciais de regulação redox a ser exercida por proteínas com tióis reativos. Tal grupo inclui proteínas com atividade dissulfeto redutase como tiorredoxina, glutarredoxina e a PDI (2,4).

3.1 Estrutura da $\alpha\text{Ib}\beta 3$

A $\alpha\text{Ib}\beta 3$ é uma integrina exclusiva da superfície plaquetária, com densidade de aproximadamente 80.000 cópias por plaqueta em repouso. Porém, durante a fase de secreção este número é elevado em 25% a 50% mediante a translocação dos grânulos α plaquetários para a superfície (18,19). A $\alpha\text{Ib}\beta 3$ é um receptor para fibrinogênio, fibronectina, vibronectina e fator de von Willebrand com importante papel tanto na adesão quanto para agregação plaquetária, processo para o qual é indispensável. Apresenta-se como um heterodímero constituído de subunidades α e β que se associam. Cada subunidade consiste em uma longa porção extracelular, um domínio transmembrana e uma pequena porção voltada para o citoplasma. A região extracelular da subunidade α possui um domínio β -*propeller* (N-terminal), um domínio “thigh” e dois domínios “calf” (20). A subunidade β é constituída por um domínio A, no interior do qual há uma região dependente de cátions divalentes (Ca^{2+}) incluindo um motivo MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) diretamente envolvido na ativação da integrina; um domínio PSI (plexin, semaforina, integrina) e um domínio híbrido, todos implicados na ativação da integrina. Além destes domínios, há também quatro regiões ricas em cisteínas, altamente conservadas, chamadas de domínios I-EGF (*integrin-epidermal growth factor*) e por um domínio β TD (β -tail domain) proximal à membrana (21). Na membrana plaquetária, essas duas subunidades estão associadas, de modo que, o domínio β -*propeller* e o domínio A formam a “região da cabeça da integrina” que é seguida por duas “caudas” compostas pelos outros domínios de cada subunidade. Tanto a subunidade αIb quanto a $\beta 3$ possuem pontes dissulfeto na sua estrutura. αIb contém 18 resíduos de cisteínas e $\beta 3$ contém 53 resíduos dos quais 33 estão nos domínios I-EGF da porção extracelular da molécula (20,21,22). Anteriormente,

acreditava-se que todas estas cisteínas estivessem unidas por pontes dissulfeto. Porém, trabalhos recentes tem demonstrado também a presença de sulfidrilas livres (4,22,23,24).

3.2 A atividade da $\alpha\text{IIb}\beta_3$ é regulada por trocas tiol-dissulfeto.

A integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$, após ativação plaquetária, sofre três alterações na estrutura conformacional do seu domínio extracelular (19). Uma conformação dobrada, de baixa afinidade; uma conformação estendida com a região da cabeça ainda dobrada, correspondendo a um estado de afinidade intermediária; e uma conformação totalmente estendida correspondendo ao estado de alta afinidade pelo ligante, especialmente o fibrinogênio plasmático (15, 19). Esses eventos são iniciados quando as plaquetas são ativadas com um ou mais agonistas. As mudanças conformacionais da integrina ocorrem em resposta à sinalização tanto extracelular, quanto intracelular. Alterações que envolvam o domínio citoplasmático, resultando em exposição do sítio de ligação, são referidas como sinalização “inside-out” (18). Por outro lado, os eventos decorrentes da ligação do fibrinogênio ao sítio ativo são referidos como sinalização *outside-in*, pois incluem resposta adicional da plaqueta ativada com mudança na forma e retração do coágulo, os quais ocorrem através de fosforilação de resíduos de tirosina e rearranjos no citoesqueleto (4,18).

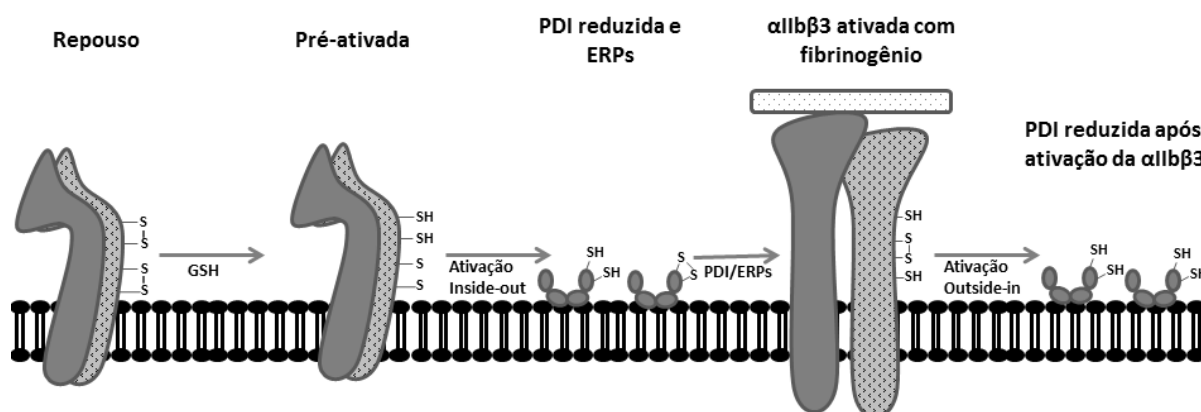


FIGURA 1 – Modelo para regulação redox da função da $\alpha\text{IIb}\beta_3$. Mudança na estrutura conformacional da $\alpha\text{IIb}\beta_3$ passando de um estado de baixa afinidade (repouso) para um estado intermediário que é preparado dela GSH através da geração de tióis adicionais. Estes tióis recentemente gerados participarão de nova reação que resulta no estado de alta afinidade pelo fibrinogênio e que é mediada pela PDI.

Diversos pesquisadores através de estudos estruturais da integrina têm corroborado o conceito de que a clivagem de pontes dissulfeto na $\alpha\text{IIb}\beta_3$ pode ser a responsável pela conversão da integrina para um estado de alta afinidade ao fibrinogênio (13,24,26). A adição

de agentes redutores como o ditioneitol (DTT) promove o rompimento de pontes dissulfeto localizadas nos domínios I-EGF levando a alterações estruturais e exposição do sítio de ligação ao fibrinogênio. Kamata et. al. (2004), em um estudo no qual os resíduos de cisteína da subunidade $\beta 3$ foram substituídos por serina, encontrou que as pontes dissulfetos necessárias à manutenção da estrutura inativa da integrina estavam localizadas nos domínios I-EGF e que o rompimento de apenas uma dessas pontes era suficiente para promover ativação. Ao contrario, quando pontes dissulfeto localizadas fora desses domínios foram rompidas, apenas 15% dos testes sofreram ativação plaquetária (27).

Apesar da clivagem de pontes dissulfeto estar intimamente relacionada com a ativação da integrina, há evidências de que é necessário não apenas a redução dessas pontes, mas também a presença de tióis livres para que ocorram trocas tiol-dissulfeto (23,28). A incubação da forma inativa da integrina com um derivado maleimídico impede a ativação promovida pelo DTT confirmando o conceito de que para ativação são necessárias trocas tiol-dissulfeto (4,13,28). Essex 2009 descreveu um modelo geral para ativação da $\alpha \text{IIb}\beta 3$: a estimulação plaquetária induz alterações na integrina por sinalização celular “inside-out”. Essa sinalização induz a propagação de mudanças conformacionais do domínio citoplasmático para o sítio de ligação da integrina resultando na ligação do fibrinogênio seguida do agrupamento de integrinas; a associação $\alpha \text{IIb}\beta 3$ -fibrinogênio induz a alteração conformacional na integrina levando a sinalização “outside-in” e resposta adicional de outras plaquetas (4,13).

4. A PDI como elemento chave no processo de agregação

A PDI foi a primeira proteína catalizadora de enovelamento proteico descoberta sendo caracterizada como uma chaperona do retículo endoplasmático (29). Membro da superfamília das tioredoxinas, a PDI possui como principal característica a presença de um motivo catalítico ditiólico CxxC. A proteína está organizada em 5 domínios (a, b, a', b' e c), com peso molecular aproximado de 55 kDa. As cisteínas reativas estão localizadas na sequência Trp-Cys-Gly-His-Cys (WCGHC) dos domínios a e a'. Sendo que os domínios b e b' não possuem os motivos redoxes (25).

A reatividade da PDI é atribuída à proximidade espacial dos tióis das duas cisteínas dos seus sítios ativos. Estes tióis tem a capacidade de interconversão entre a forma tiol e

dissulfeto de acordo com o estado redox ou pH do meio (35). As cisteínas do sítio ativo atuam tanto como aceptores de elétrons, quando estão na forma dissulfeto (S-S, oxidada), quanto como doadores de elétrons, quando na forma ditiólica (-SH, reduzida) (4). Além disso, a PDI e suas análogas catalisam reações de isomerização, ou seja, reorganizam pontes dissulfeto através de sucessivos ciclos de oxidação e redução (4,13,34). Ao contrário da maioria dos resíduos de cisteínas, cujo pK_a é superior a 8.0, o primeiro tiol do sítio ativo da PDI, ou seja, o N-terminal, tem pK_a na faixa de 4.5 a 6.7, existindo na forma de ânion tiolato em pH fisiológico (4,25).

Outro modulador da atividade da PDI na membrana plaquetária é o estado redox, que é regulado principalmente pela relação entre as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) da glutathiona (37). Enquanto as células contém de 1-10 mM, quase toda na forma reduzida, o plasma contém apenas em torno de 10-25 μ M. A proporção de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) é aproximadamente 100:1 no citoplasma das células, o que desfavorece a formação de pontes dissulfeto em função do meio altamente redutor. No retículo endoplasmático, porém, a proporção fica em torno de 2-3:1, favorecendo a formação de dissulfetos (4,37). O potencial redox gerado pela relação GSH/GSSG influencia no balanço entre as frações ditiol e dissulfeto dos sítios ativos da PDI consequentemente modulando sua atividade oxidante ou redutora (4,37).

Apesar da modulação exercida pela relação GSH/GSSG e o pH, não se conhece o mecanismo exato que controla a atividade da PDI na plaqueta (4). Burgess et. al. (2000) mostraram que a forma ativada da PDI é sua forma ditiólica, através de ensaios de biotinylação (39). Surpreendentemente, o aumento de tios livres, não só da PDI, mas de proteínas de membrana como um todo, foi mais evidente quando a plaqueta estava agregada, ao invés de apenas ativada (40). Acrescentando-se a isso o fato de que a adição de GSH não é capaz de ativar a plaqueta (40), é possível concluir que a plaqueta deve conter algum mecanismo transmembrana para a manutenção de tióis livres na superfície celular. Dados anteriores apontavam que os sítios ativos de cerca de 26% da PDI presente na superfície de plaquetas em repouso estão sob a forma ditiólica, enquanto nas plaquetas ativadas esse percentual sobe para 81%. Isto indica que a redução de pontes dissulfeto nos sítios ativos da PDI é necessária para a ativação das plaquetas (39,40).

Independente de como a PDI é regulada, sabe-se que esta proteína é essencial para a agregação plaquetária e que encontra-se na membrana de plaquetas, conforme demonstrado por Chen et al, (30). Pesquisas, principalmente, as desenvolvidas pelo grupo de Essex e colaboradores, pormenorizaram a intrínseca dependência entre a agregação plaquetária e a PDI. Em 1999, esse grupo de pesquisadores, investigando o efeito de inibidores da PDI (anticorpos anti-PDI, substrato competitivo de RNase e bacitracina) sobre a agregação plaquetária, observou que a inibição da PDI implica na inibição da agregação plaquetária (40). Estes mesmo pesquisadores, em um estudo utilizando reagentes sulfidrílicos (pCMBS, DTNB, MPB e NEM) e também inibidores da PDI para investigar o papel funcional e possíveis interações entre a PDI e a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, observaram que plaquetas humanas tratadas com reagentes sulfidrílicos ou inibidores da PDI, apresentam tanto o processo de agregação como de secreção diminuídos, observaram ainda, quando a integrina é estimulada diretamente, anticorpos anti-PDI não são capazes de inibir a agregação, mas reagentes como pCMBS, sim, reforçando a idéia de que a atividade da PDI sobre a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ é um evento anterior à ativação da mesma e que ocorre através de trocas tiol-dissulfeto (13). Manickan et. al. (2007) em um estudo semelhante ao de Essex et. al. (2001), porém utilizando anticorpos anti-PDI e manganês (Mn^{2+}), um ativador da $\alpha\text{IIb}\beta 3$, para investigar os possíveis alvos da PDI, excluindo o P2Y_{12} , e seu papel na ativação da $\alpha\text{IIb}\beta 3$, demonstrou que a reação catalisada pela PDI além de necessária, é ponto chave para ativação dessa integrina (41).

A PDI é sugerida como facilitadora, senão, a causadora de alteração conformacional na estrutura da $\alpha\text{IIb}\beta 3$ através de trocas tiol-dissulfeto (4,41). Esses rearranjos, conduzem a integrina de um estado de baixa para um estado de alta afinidade pelo fibrinogênio (4). Várias linhas de pesquisa têm demonstrado que o bloqueio da atividade da PDI inibe a agregação plaquetária, embora essa inibição esteja mais direcionada a uma segunda fase do processo de agregação (4,13,22,40). Experimentos em plasma citratado e utilizando como indutores epinefrina e ADP demonstraram a ocorrência de uma resposta bifásica de agregação. Com a adição de bacitracina, um conhecido inibidor da PDI, o principal efeito foi a forte inibição da segunda fase de agregação sugerindo que a fase primária é independente da PDI e que o bloqueio da fase secundária pela bacitracina compromete as alterações conformacionais facilitadas pela PDI (40). O GSH também está associado a alteração

conformacional da $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Foi demonstrado que o GSH gera tióis livres na subunidade $\beta 3$ da $\alpha\text{IIb}\beta 3$ mas que sozinho não induz a agregação o que sugere que uma segunda reação tiol-dissulfeto é requerida para ativar a integrina (14). A PDI provavelmente é quem promove essa segunda reação modificando totalmente a integrina para um estado de alta afinidade ao fibrinogênio (4,14). A constatação do efeito direto da PDI sobre a $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ou em algum fator no final da segunda onda de agregação deu-se através do uso de Mn^{2+} que ativa diretamente a integrina (41) como já foi mencionado.

Outras proteínas também foram estudadas como alvos da PDI. Através do bloqueio da via do ADP pela apyrase e MeSAMP, comprovou-se que a PDI inibe a agregação plaquetária independente dos receptores P2Y_{12} e P2Y_1 (24). Não obstante, buscou-se a relação da PDI com outras integrinas, como o receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ e a glicoproteína Ib, ambos necessários para a adesão plaquetária. Através de peptídeos que ativam especificamente a $\alpha 2\beta 1$, a inibição da PDI reduziu consideravelmente a taxa de ativação desta integrina (44). Quanto à glicoproteína Ib, Burgess et al (2000) mostrou que a PDI encontra-se próxima à glicoproteína Ib na membrana plaquetária e que esta sofre inibição quando adicionados inibidores da PDI por mecanismos análogos ao da $\alpha 2\beta 3$ (39). Portanto, acredita-se que a ação da PDI seja geral às integrinas da membrana plaquetária (4) e a descoberta de um agente inibidor da PDI sem prejuízos sistêmicos é o grande desafio dos agentes antitrombóticos.

5. A inibição da PDI como ferramenta para novas terapias antitrombóticas.

A PDI representa um novo alvo para terapia antitrombótica que é distinta de proteínas da cascata de coagulação, receptores plaquetários ou proteínas de sinalização plaquetárias como os alvos das terapias atuais (45). A potente atividade antitrombótica de anticorpos anti-PDI indica que esta proteína é um potencial alvo farmacológico para o controle da formação de trombos (42). Contudo, pela própria função que a PDI desempenha na formação, clivagem e rearranjo das pontes dissulfeto, facilita o enovelamento de proteínas. Sua inibição pode provocar acúmulo de proteínas deformadas o que levaria ao estresse do retículo endoplasmático e a resposta de proteínas mal-enovelada (UPR), resultando consequentemente, em morte da célula. Somados a isso, temos a ampla e diversificada distribuição tecidual dessa proteína (42).

A identificação de pequenas moléculas que interfiram com a atividade de PDI, que sejam seletivas e não tóxicas se faz necessária para corroborar a viabilidade da PDI como novo alvo para pesquisas nesse campo. A potente atividade antitrombótica de anticorpos anti-PDI indicam que ela pode ser um alvo útil no controle da formação de trombose. Porém, a sua ubíqua distribuição sistêmica somada à sua função crítica intracelular, são potenciais complicações de sua inibição. De acordo com recente trabalho de Jasuja et al. (2012), o flavonóide quercetina pode representar a primeira geração de inibidores da PDI, visto que foi capaz de inibir a agregação plaquetária por inibição seletiva da chaperona, sem interferir em outras tiol isomerases. O efeito inibitório foi observado tanto em ensaios de agregação com plaquetas humanas lavadas e ativadas com ADP e colágeno; como também, após a infusão do flavonóide em ratos e posterior obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Neste caso, a estimulação foi com um agonista do receptor de trombina. De acordo com o trabalho, a atividade inibitória desse flavonóide é restrita a metabólitos que contém uma ligação O-glicosídica no anel 3 do composto (42). Além da atividade na agregação plaquetária, um aumento nos níveis de PDI foram documentados em uma variedade de cânceres humanos, incluindo ovário, próstata, pulmão além de linfoma, glioma, leucemia mielóide aguda e melanoma. A inibição da atividade da PDI conduz à apoptose de células tumorais sugerindo que a PDI é um alvo promissor também para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (46, 47). Segundo um estudo de Xu e col. (2012) investigando a citotoxicidade de derivados do ácido propiônico carbamoil metil amida (PACMAs) contra linhagens de células de câncer de ovário humano, observou que alguns derivados, especialmente o Pacma 31, atua como um potente e irreversível inibidor da PDI, exibindo atividade in vivo com biodisponibilidade oral. Mais importante, este estudo mostra que a PDI é um alvo em potencial para pesquisas e novos tratamentos contra o câncer (47).

6. Considerações Finais

Embora o mecanismo pelo qual a PDI participa da ativação/agregação plaquetária não esteja exatamente compreendido nem como sua atividade é regulada, é fato que sua presença é essencial para a adequada função plaquetária. As observações de Jasuja et al (2012) de que flavonóides comumente ingeridos na dieta sejam potentes inibidores da PDI,

especialmente por bloquear o acúmulo de plaquetas e a formação de fibrina, indicam que a regulação farmacológica da atividade da PDI é um potencial alvo terapêutico na prevenção do tromboembolismo (42).

Mais investigações nesse campo são necessárias, não apenas direcionadas a PDI, mas a outras tiol –isomerases que também podem interferir na formação do trombo, para estabelecer e consolidar os inibidores dessas proteínas como uma nova e promissora classe de agentes antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

1. Essex, DW and Li M. Redox Modification of Platelet Glycoproteins. *Current Drug Targets* 2006; 7: 1233-1241
2. Essex, DW. The role of thiols and disulfides in platelet function. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 736-46.
3. Robinson A, O'Neil S, Kiernan A, O'Donoghue N and Moran N. Bacitracin reveals a role for multiple thiol isomerase in platelet function. *British Journal of Haematology* 2005; 132: 339-348.
4. Essex, DW. Redox Control of Platelet Function. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11(5): 1191-225.
5. Lahav J, Gofer-Dadosh N, Luboshitz J, Hess O, and Shaklai M. *Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion*. *FEBS Letters* 2000 475: 89-92.
6. Essex DW, Chen K and Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood* 1995; 86: 2168-2173.
7. Lahav, J. et al. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide Exchange. *Blood* 2002. N.100: 2472-2478
8. Castro HC, Ferreira BLA, Nagashima T, Schueler A, Rueff C, Camisasca D, et al. Plaquetas: ainda um alvo terapêutico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2006; 42(5): 321-32.
9. McNicol A, Gerrard JM. *Platelet morphology, aggregation, and secretion*. *Adv. In Mol. And Cell Biol* 1997; 18: 1-29.
10. Abshire TC et al. *Transfusion Medicine and Hemostasis, Clinical and Laboratory Aspects*, 2009. Academic Press: p. 433-38.
11. Miller JL. *Plaquetas Sanguineas*. In: Henry, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais*. São Paulo: Manole 2008; 724-44.
12. Shattil SJ and Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood* 2004; 104: 1606-15.
13. Essex DW, Mengru Li, Miller A, Feinman RD. Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry* 2001; 40: 6070-6075.

14. Essex DW and Li, M. Redox control of platelet aggregation. *Biochemistry* 2003; **42**: 129–36
15. Hansen, Rosa E.; Winther, J. R. *An Introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents and practical considerations*. Analytical Biochemistry, 2009. 394: p. 147-158.
16. Margaritis, A. et al., The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions. **Pharmacological Research** 2011, 63: 77-84
17. Plow EF, Marguerie GA, Ginsberg M. Fibrinogen, fibrinogen receptor and the peptides that inhibit these interactions. *Biochem Pharmacol*. 1987;36:4035–4040.
18. Michelson, Alan D. **Platelets**. 2 ed. USA: Elsevier, 2007
19. Takagi, J., Petre, B. M., Walz, T. & Springer, T. A. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002, 110: 599–611
20. Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, and Arnaout MA. New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 2003 102: 1155–1159.
21. Takagi J, Beglova N, Yalamanchili P, Blacklow SC, and Springer TA. Definition of EGF-like, closely interacting modules that bear activation epitopes in integrin β subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 98: 11175–11180,.
22. Bennet, J. S. Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J. Clin. Invest.* 2005 115:3363–3369.
23. Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, and Kehrel BE. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood* 100: 2472–2478, 2002.
24. Manickam N, Sun X, Hakala KW, Weintraub ST, and Essex DW. Thiols in the α IIb β 3 integrin are necessary for platelet aggregation. *Br J Haematol* 142: 457–465, 2008.
25. Pirneskoski, A. et al. Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(11): p. 10374-10381, 2004.
26. Swiatkowska, M. et al. *Ero1* is Expressed on Blood Platelets in Association with Protein-disulfide Isomerase and Contributes to Redox-controlled Remodeling of α IIb β 3. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(39): p. 29874–883, 2010.

27. Kamata T, Ambo H, Puzon–McLaughlin W, Tieu KK, Handa M, Ikeda Y, and Takada Y. Critical cysteine residues for regulation of integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ are clustered in the epidermal growth factor domains of the β_3 subunit. *Biochem J* 378: 1079–1082, 2004.
28. Yan B and Smith JW. A redox site involved in integrin activation. *J Biol Chem* 275: 39964–39972, 2000.
29. Goldberger RF, Epstein CJ & Anfinsen CB (1964) Purification and properties of a microsomal enzyme system catalyzing the reactivation of reduced ribonuclease and lysozyme. *J Biol Chem* 239, 1406–1410.
30. Chen K, Detwiler TC, and Essex DW. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol* 90: 425–431, 1995.
31. Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, and Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols=disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274: 2416–2423, 1999.
32. Noiva R (1999) Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 10:481–493.
33. Barbouche R., Miquelis R, Jones I.M., and Fenouillet E. *Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion.* *J. Biol. Chem.*, 2003. **278**: p.3131–36.
34. Paes, AMA, Mecanismo da interação entre a proteína dissulfeto isomerase e a NADPH oxidase: papel regulatório sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos profissionais. Tese (doutorado), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2009.
35. Gitler C, Mogyoros M, and Kalef E. Labeling of protein vicinal dithiols: role of protein-S2 to protein-(SH)₂ conversion in metabolic regulation and oxidative stress. *Methods Enzymol* 233: 403–415, 1994.
36. Carvalho AP, Fernandes PA, and Ramos MJ. Similarities and differences in the thioredoxin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol* 91: 229–248, 2006.
37. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J. Cell Biol.* 164: 341–346, 2004.
38. Noiva R. Protein disulfide isomerase: The multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 10: 481–493, 1999.
39. Burgess, J.K., et al,. *Physical Proximity and Functional Association of Glycoprotein 1b α and Protein-disulfide Isomerase on the Platelet Plasma Membrane.* *The Journal of Biological Chemistry*, 2000. **275**(13) p. 9758–66.

40. Essex DW and Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *Br J Haematol* 104: 448–454, 1999.
41. Manickan N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex, DW. Protein disulphide isomerase in platelet function. *Br. J. Haematol.*, 140: p. 223–229, 2007
42. Jasuja, R. Freda H. Passam, Daniel R. Kennedy, Sarah H. Kim, Lotte van Hessem, Lin Lin, Sheryl R. Bowley, Sucharit S. Joshi, James R. Dilks, Bruce Furie, Barbara C. Furie, and Robert Flaumenhaft. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest.* 2012;122(6):2104–2113.
43. Litvinov RI, Nagaswami C, Vilaire G, Shuman H, Bennett JS, and Weisel JW. Functional and structural correlations of individual allbb3 molecules. *Blood* 104: 3979–3985, 2004.
44. Lahav J, Wijnen EM, Hess O, Hamaia SW, Griffiths D, Makris M, Knight CG, Essex DW, and Farndale RW. Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin $\alpha 2\beta 1$. *Blood* 102:2085–2092, 2003.
45. Flaumenhaft, Robert. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2013.
46. Hashida T, Kotake Y, Ohta S. Protein disulfide isomerase knockdown-induced cell death is cellline-dependent and involves apoptosis in MCF-7 cells. *J Toxicol Sci.*;36(1):1–7, 2011.
47. Xu, S., et al., Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. 109(40): p. 16348-53

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

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

3.2 Objetivos Específicos

Predizer a interação dos peptídeos isolados com a PDI, através de técnicas *in silico* de acoplagem molecular com base na estrutura tridimensional da PDI;

Investigar os alvos moleculares da ação destes peptídeos na superfície celular da plaqueta através de técnicas de imunodeteção.

Avaliar a atividade anti-agregante plaquetária de peptídeos PDI-símile em modelos de agregação plaquetária *in vitro*;

4 CAPÍTULO II

**Mecanismos redoxes envolvidos na ação de um peptídeo inibidor da proteína
dissulfeto isomerase sobre a agregação plaquetária induzida por ADP**

(a ser submetido à Revista *FEBS Letters*)

QUALIS A2 MEDICINA I

FATOR DE IMPACTO 3.582 DE ACORDO COM A THOMPSON REUTERS 2013.

**Mecanismos redoxes envolvidos na ação de um peptídeo inibidor da proteína
dissulfeto isomerase sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.**

***(Redox-dependent inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by a
protein disulfide isomerase-targeted peptide)***

Elyjany Morais Lima **Sena**¹, Renato Simões **Gaspar**¹, João Lucas Lima **Fontelles**¹, Thais
Araújo³, Samira Abdalla da **Silva**¹, Diana Marli **Fries**², Francisco Rafael Martins **Laurindo**³
e Antonio Marcus de Andrade **Paes**^{1*}

1. Laboratório de Fisiologia Experimental, Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.
2. Laboratório de Hemostasia, Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
3. Laboratório de Biologia Vascular, Instituto do Coração da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor correspondente:

Paes, A.M.A. – Avenida dos Portugueses, 1966 – Campus do Bacanga

65080-850 São Luís (MA), Brasil.

Tel: +55 (98) 3273 8547 E-mail: marcuspaes@ufma.br

ABSTRACT

Protein disulfide isomerase (PDI) plays a capital role in platelet aggregation in both ADP-dependent and –independent pathways. We previously showed that PDI activity is inhibited by a peptide (CxxC) targeting the CxxC redox active-site of PDI. Thus, we sought to investigate whether CxxC is also able to inhibit platelet aggregation. Firstly, predictive *in silico* analysis suggested that CxxC as well as its scrambled (Scr) and control (AxxA) peptides were all able to bind PDI's substrate binding-site. Secondly, pull-down of free thiol-containing proteins from platelet membrane showed only CxxC was able to decrease PDI pulling down, not affecting total free thiol pull-down. Finally, CxxC dose-dependently decreased ADP-evoked platelet aggregation. Taken together, our data suggest that CxxC might inhibit platelet aggregation by binding thiols/dithiols on PDI itself or associated substrates at platelet surface.

KEYWORDS

Protein disulfide isomerase, surface free thiols, platelet aggregation and antiaggregant peptides

HIGHLIGHTS

- PDI-targeted peptides closely interact with PDI peptide-binding site.
- CxxC peptide specifically binds to PDI free thiols.
- CxxC peptide impairs ADP-evoked platelet aggregation.

1 INTRODUÇÃO

Reagentes tiólicos tem sido descritos como importantes inibidores da agregação plaquetária ao longo dos últimos 50 anos. [1, 2]. Porém, foi somente nas últimas duas décadas que a proteína dissulfeto isomerase (PDI) passou a figurar como uma componente chave na fisiologia das plaquetas [3-5]. A PDI é uma oxidoredutase do retículo endoplasmático (RE), membro da superfamília das tioredoxinas, cuja função principal é catalisar reações de isomerização, ou seja, reorganizar pontes dissulfeto por meio de sucessivos ciclos de oxidação e redução intermediados pelo motivo catalítico ditiólico CGHC [6]. Além do RE, a PDI tem sido encontrada em uma variedade de superfícies celulares, incluindo a membrana de linfócitos, neutrófilos e plaquetas, onde se mostra funcionalmente ativa [3, 4, 7].

A adição de inibidores da PDI, tais como a bacitracina, *scrambled* RNase ou anticorpo anti-PDI, inibe tanto a agregação quanto a ativação plaquetária [4]. De forma semelhante, inibem também a ativação da integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ [8], uma glicoproteína politiólica exclusiva da superfície plaquetária e responsável pela ligação da plaqueta ao fibrinogênio solúvel e ao fator de von Willebrand [9]. A ativação da $\alpha\text{IIb}\beta 3$ induzida por Mn^{2+} , a qual independe de sinalização intracelular, também é inibida por anticorpos anti-PDI, sugerindo uma íntima interação entre a $\alpha\text{IIb}\beta 3$ e a PDI na superfície da plaqueta [10]. Outras proteínas tiólicas de membrana, tais como a glicoproteína $\text{Ib}\alpha$ ($\text{GPIb}\alpha$) [11] e o receptor de colágeno $\alpha 2\beta 1$ [12], também são reguladas pela PDI. Por outro lado, a PDI não interfere na ativação do receptor P2Y_{12} de adenosina dinucleotídeo fosfato (ADP), uma proteína cujos tióis livres são alvo de drogas antiagregantes como o clopidogrel, porém inibe a agregação induzida por este agonista [10, 13]. Sendo assim, a PDI tem se mostrado como um ponto de convergência de

diferentes rotas de sinalização da agregação plaquetária, especialmente por agir como um regulador da ativação da $\alpha\text{IIb}\beta 3$ via trocas tiol-dissulfeto [4, 10, 14].

Embora seja uma proteína ubíqua, a PDI tem sido proposta como um alvo promissor para terapia antitrombótica, especialmente por oferecer um mecanismo distinto das terapias atuais, as quais são centradas em proteínas da cascata de coagulação, receptores plaquetários ou proteínas intermediárias da sinalização plaquetária clássica [15, 16]. Trabalhos recentes tem mostrado que moléculas de baixo peso molecular, tanto naturais quanto sintéticas, podem agir como inibidores seletivos da PDI. Derivados de amidas metiladas do ácido carbamoil-propanóico (PACMAs) inibiram o crescimento de células OVCAR-8 de câncer de ovário humano via inibição irreversível da PDI [17]. Foi demonstrado que derivados do flavonóide quercetina, dotados de ligação O-glicosídica no anel 3 do composto, possuem potente atividade antiagregante plaquetária mediada pela inibição seletiva da PDI [16]. Além disso, o mastoparan, um tetradecapeptídeo extraído do veneno da vespa, inibiu a ativação do fator de crescimento tissular- 1β (TGF- 1β) secretado por plaquetas, via inibição da PDI e outras isomerases tiólicas plaquetárias [18].

Em trabalho recente [19], nosso grupo demonstrou que um dodecapeptídeo (CxxC) contendo sequência peptídica semelhante ao sítio ativo da PDI foi capaz de inibir tanto a atividade redutase da enzima, quanto a geração de ânion radical superóxido pela Nox2 de neutrófilos, efeitos não observados em presença de peptídeos controle. Assim, defendemos a hipótese de que este peptídeo pode também inibir a PDI exposta na superfície da plaqueta. No presente trabalho, realizamos análises *in silico* para predição da interação do peptídeo CxxC com a PDI, demonstramos que o mesmo reduz a disponibilidade de tióis livres da PDI de superfície e inibe a agregação plaquetária induzida por ADP. Estes dados reforçam as potencialidades do peptídeo CxxC como agente terapêutico antitrombótico.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Peptídeos e outros reagentes

Os peptídeos foram desenhados com base na sequência linear dos sítios ativos ditiólicos da PDI (número de acesso P21195). O peptídeo CxxC (VEFYAPWCGHCK) contém exatamente o motivo redox CGHC da PDI, o peptídeo Scr (FCYPKACEWGHV) contém os mesmos resíduos encadeados de forma aleatória sem formar um ditiol e o peptídeo AxxA apresenta a mesma sequência do CxxC, porém com as cisteínas substituídas por alaninas (VEFYAPWAGHAK). Os peptídeos foram sintetizados na Divisão de Síntese de Peptídeos do Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração (InCor-FMUSP, São Paulo, Brasil) com grau de pureza superior a 90%. Para os ensaios, o estado redox dos peptídeos em solução aquosa foi verificado através do ensaio do reagente DTNB [20]. Em todos os ensaios, os peptídeos CxxC e Scr foram utilizados na forma reduzida. Os demais reagentes estão descritos nos respectivos métodos e, quando não especificado, foram obtidos da Sigma-Aldrich.

2.2 Análise computacional de ancoragem molecular

A estrutura reduzida da PDI humana (código PDB: 4EKZ) foi utilizada como modelo estrutural para análise computacional [21]. A delimitação do sítio de ligação dos substratos da PDI e a localização dos sítios ativos redox foram realizadas por homologia com dados previamente descritos [22]. Modelos estruturais dos peptídeos foram gerados com o auxílio do programa Discovery Studio Modeling Environment 4.0 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA). Os estudos de ancoragem molecular foram realizados com o programa “Autodock Vina” (<http://vina.scripps.edu>). O número de corridas independentes foi controlado pelo parâmetro de exaustividade do programa, sendo adotado um valor inicial de 8, que foi

aumentado progressivamente até um máximo de 512, totalizando 7 corridas com 9 posições de ligação geradas após cada uma delas. As moléculas dos peptídeos foram mantidas totalmente flexíveis em todas as corridas. As corridas com exaustividade de 8 a 128 foram realizadas como ancoragem cega com varredura de toda a estrutura da PDI. Naquelas com exaustividade de 256 e 512, foi delimitado um *grid box* de dimensões 40 x 40 x 50 Å centrado na face interna dos domínios b' e a' da proteína. Para predição das interações mais prováveis foram adotados dois critérios, o valor da energia de ligação fornecido pelo programa e a análise da interação entre as moléculas dos peptídeos e os resíduos da PDI que estivessem a uma distância máxima de 4,5 Å para interações hidrofóbicas [23] e 6,2 Å para formação de pontes dissulfeto [24].

2.3 Agregação plaquetária

Amostras de sangue foram obtidas de voluntários autodeclarados saudáveis, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, que não tivessem feito uso medicação que afetasse a função plaquetária. Amostras de sangue foram coletadas por punção venosa em tubos contendo citrato de sódio 3,2% (9:1 v/v, 20 mL) e centrifugadas ($200 \times g$, 10 min.) para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Os ensaios de agregação foram realizados em agregômetro de quatro canais (Modelo AggRam, Helena Biosciences, Gateshead, UK), segundo método descrito anteriormente [8]. Em termos gerais, PRP ($225 \mu\text{L}$, $2 - 3 \times 10^5$ plaquetas/ mm^3) foi incubado por 10 minutos com diferentes reagentes tiólicos, dentre eles os alquilantes de tióis, ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzóico (DTNB, 2,5 mM) e óxido fenilarsênico (PAO, 30 μM); os inibidores da PDI, bacitracina (5mM) e anticorpo anti-PDI (RL90, 1:250 – Novus Biologicals) ou os peptídeos CxxC, Scr e AxxA nas concentrações de 3, 10 e 30 μM . A ativação da agregação plaquetária foi realizada com ADP (5 μM) ou com os agentes redutores

ditiotreitól (DTT, 1 mM) ou tris 2-carboxietil fosfeno (TCEP, 1 mM), sendo seguidas por até 10 minutos.

2.4 Marcação de tióis livres na superfície da plaqueta

A marcação de tióis livres presentes na superfície de plaquetas humanas foi realizada como descrito por Burgess *et al* [11] com modificações. Alíquotas contendo $1,7 \times 10^7$ plaquetas em repouso, incubadas ou não com peptídeos CxxC, Scr ou AxxA (25 μ M) por 20 minutos a 37 °C, foram marcadas com 3-(N-maleimidilpropionil) biocitina (MPB, 100 μ M – Molecular Probes) por 30 minutos a 25 °C sob rotação contínua. A seguir, adicionou-se glutathiona reduzida (GSH, 200 μ M, 30 min., 25 °C). Os grupos sulfidrílicos residuais foram neutralizados com iodoacetamida (400 μ M, 10 min., 25 °C). As plaquetas foram resuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 0,1% Triton X-100, 5mM EDTA em pH 8, contendo inibidores de protease aprotinina, leupeptina e PMSF), incubadas por 50 minutos e sonicadas. Os homogenatos celulares foram incubados com microesferas magnéticas de estreptavidina (12 h, 4 °C) para interação com o MPB ligado aos tióis livres. As microesferas foram lavadas duas vezes com solução salina para remoção de ligações inespecíficas e fervidas em tampão Laemmli por 5 minutos. As proteínas ligadas à estreptavidina foram resolvidas em SDS/PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas por *western blot* utilizando-se os anticorpos anti-PDI (RL90, 1:2000) ou anti-biotina (1:1000) para análise do conteúdo total de tióis livres expostos na superfície das plaquetas. A detecção foi feita por infra-vermelho com escâner Odyssey (Li-Cor, Lincoln, EUA) ou quimiluminescência, respectivamente.

2.5 Análise estatística dos resultados

Os resultados quantitativos foram expressos como média $\pm$ erro padrão das médias de 3 a 6 experimentos independentes por protocolo. Análises comparativas dos experimentos teste *versus* a condição controle foram realizadas por Teste *t* paramétrico com o auxílio do programa *GraphPad Prism* Versão 5.0. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise computacional da interação dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA com a PDI.

Com o objetivo de prever o provável sítio da interação do peptídeo CxxC com a PDI, realizamos experimentos *in silico* utilizando o software Autodock Vina. A estrutura molecular da PDI humana utilizada nos experimentos de ancoragem cega está mostrada na Fig. 1, painel superior. Ela é composta pelos domínios a, b, b' e a', os quais apresentam enovelamento semelhante à tioredoxina, além de uma região ligadora x localizada entre os domínios b' e a'. As cisteínas dos sítios ativos CGHC localizados nos domínios a e a' foram mantidas na forma reduzida ditiólica, conforme proposta de Wang e colaboradores [21]. Inicialmente, a molécula da PDI foi inteiramente perscrutada com os modelos moleculares dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA para identificação das potenciais posições de interação. Adotando um parâmetro de exaustividade de 128, todos os três peptídeos apresentaram posições de ligação com energia de ligação inferior a $-5,0$ kcal/mol, sendo que as posições de menor energia de ligação estavam centradas no domínio b'.

Considerando que o número de corridas independentes, controlado pelo parâmetro de exaustividade no Autodock Vina, é determinante da qualidade da posição de ligação predita [23], elevamos este parâmetro para 256 e 512. Ao mesmo tempo,

restringimos a área de escaneamento a um *grid box* centrado na face interna dos domínios b' e a' (Fig 1, painel superior). Os resultados mostrados na Fig. 1 (painel inferior) representam as posições de ligação que apresentaram menor energia de ligação nesta etapa. O peptídeo AxxA apresentou a menor energia de ligação com um valor predito de $-9,9$ kcal/mol, seguido pelos peptídeos CxxC e Scr com energias de ligação de $-8,9$ e -8.5 kcal/mol, respectivamente. Tal afinidade de ligação parece ser mediada principalmente por interações hidrofóbicas dos resíduos Trp e Phe dos peptídeos com os resíduos Phe²⁴⁹, Phe²⁹⁰, Phe³⁰⁴ e Phe³⁰⁵ do domínio b' da PDI. Nas três posições apresentadas, o Trp peptídico posiciona-se em interação *face-to-face* com a Phe³⁰⁴, com distância inferior a 4.0 Å em todas elas. Além disso, uma interação *face-to-face* adicional entre o resíduo de Tyr do peptídeo AxxA e a Phe²⁴⁹ parece conferir maior estabilidade que pode ser responsável pela menor energia de ligação predita para esta posição. Por outro lado, os peptídeos CxxC e Scr mostram-se como potenciais candidatos a formar pontes dissulfeto mistas com o sítio ativo do domínio a', uma vez que, apresentam resíduos de Cys distantes 3.8 e 4.5 Å, respectivamente, da Cys³⁹⁷.

A existência de um bolso hidrofóbico de interação com substratos, localizado na superfície interna do domínio b', tem sido demonstrada tanto para a PDI da levedura [22] quanto para a PDI humana [25]. Na isoforma humana, a superfície delimitada pelos resíduos Phe²⁴⁰, Phe²⁴⁹ e Phe³⁰⁴ compõe o sítio de interação da PDI com a ERO1 α , responsável pela (re)oxidação da PDI no RE [25]. Estes resíduos também intermedeiam a associação de peptídeos hidrofóbicos curtos e da Δ -somatostatina com o domínio b' da PDI humana via interações hidrofóbicas do tipo *face-to-face* entre resíduos aromáticos [26], corroborando as interações aqui descritas. Não obstante, trabalho recente demonstrou que os domínios b'xa' formam um módulo estrutural compacto responsável pela regulação mediada por

mecanismos redox na PDI *in natura* [21]. Os dados da Figura 1 (painel inferior) deixam claro que ambos os peptídeos CxxC e Scr não apenas associam-se ao bolso hidrofóbico do domínio b', como também estão hábeis a formar uma ponte dissulfeto mista com a Cys³⁹⁷. Considerando que a oxidação do motivo CGHC do domínio a' é necessária à ativação da PDI [21], a formação desta ponte dissulfeto entre o peptídeo e a PDI constitui um possível mecanismo para a inibição da atividade redutase desta enzima pelo peptídeo CxxC, efeito já descrito pelo nosso grupo [19].

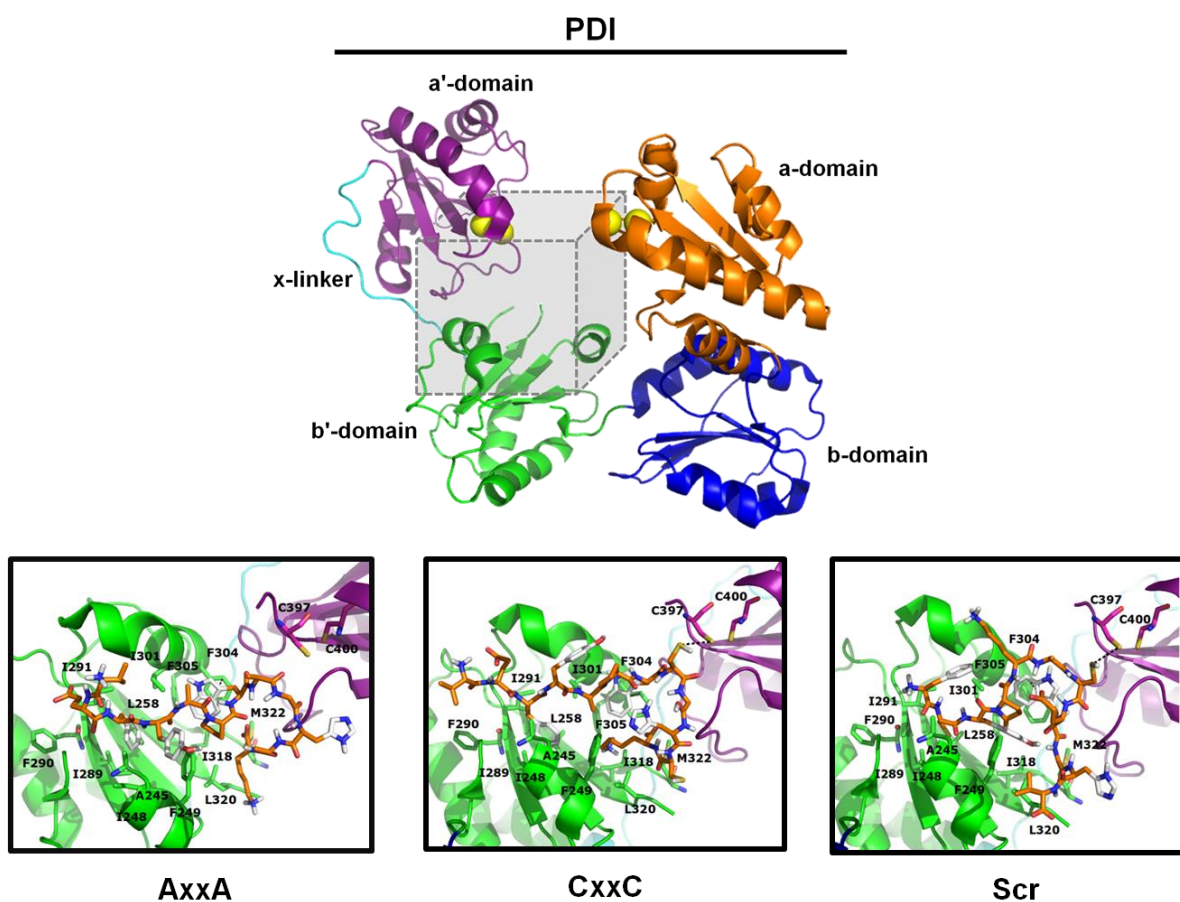


FIGURA 1: Predição computacional da ancoragem dos peptídeos AxxA, CxxC e Scr à PDI humana. Painel superior, estrutura multi-domínio da PDI humana (código PDB 4EKZ) composta pelo domínios a (laranja), b (azul), b' (verde), a' (lilás), mais a região ligadora x (azul), mostrada como diagrama em fita. As esferas amarelas indicam as cisteínas dos sítios ativos localizados nos domínios a e a' da PDI. A caixa cinza indica a área delimitada para os ensaios de ancoragem molecular da PDI com os peptídeos AxxA, CxxC e Scr. Painel inferior, visão da interface de interação não covalente dos peptídeos com a PDI. Os peptídeos são mostrados em estrutura palito colorida de acordo com os átomos que os compõem. As cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos do domínio b' são mostradas em verde e as cisteínas do sítio ativo do domínio a' são mostradas em lilás. Linhas pontilhadas indicam potenciais pontos de interação.

3.2 Caracterização da associação entre os peptídeos CxxC, Scr, AxxA e os tióis livres expostos na superfície da plaqueta

Para analisar a possível associação dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA com os tióis da PDI e demais proteínas tiólicas expostas na superfície da plaqueta, submetemos plaquetas em repouso, pré-incubadas ou não com os peptídeos, à marcação com MPB, um reagente biotinilado específico para tióis e impermeável à membrana. A Fig. 2A mostra que a maioria das cisteínas expostas na superfície da membrana da plaqueta está em estado oxidado, uma vez que, a exposição de plaquetas ao TCEP (1 mM), um agente redutor hidrossolúvel e impermeável à membrana, resultou em aumento de aproximadamente 3 vezes na marcação de tióis livres pelo MPB. Por outro lado, a incubação dos peptídeos não modificou de maneira significativa a marcação dos tióis totais expostos na superfície da plaqueta (Fig. 2B). Burgess e colaboradores [11] encontraram que a ativação da agregação plaquetária com trombina elevava em 460% a marcação de tióis livres pelo MPB. Porém, quando as plaquetas eram impedidas de agregar, esta elevação era de apenas 60%. Mais recentemente, demonstrou-se que sucessivas trocas tiol-dissulfeto entre cisteínas críticas, mais que a redução de dissulfetos *per si*, constituem um evento chave na ativação–agregação plaquetária, para o qual a PDI é um componente indispensável [5, 10].

Sendo assim, dada a predição da íntima associação dos peptídeos CxxC e Scr com a PDI via formação de uma ponte dissulfeto mista (Fig. 1, painel inferior), resolvemos investigar a possibilidade de uma ligação específica destes peptídeos com a PDI através da precipitação das proteínas marcadas com MPB. A Figura 2C mostra que a redução de dissulfetos com o TCEP dobrou a marcação da PDI. Este dado é corroborado por evidências já descritas de que os sítios ativos dos domínios a e a' coexistem nas formas reduzida e

oxidada [27]. Além disso, redução dos tióis da superfície não interferiu no conteúdo de PDI intracelular, analisado no sobrenadante obtido após a lise das plaquetas e precipitação da PDI de membrana marcada com MPB (Fig. 2C, inserto).

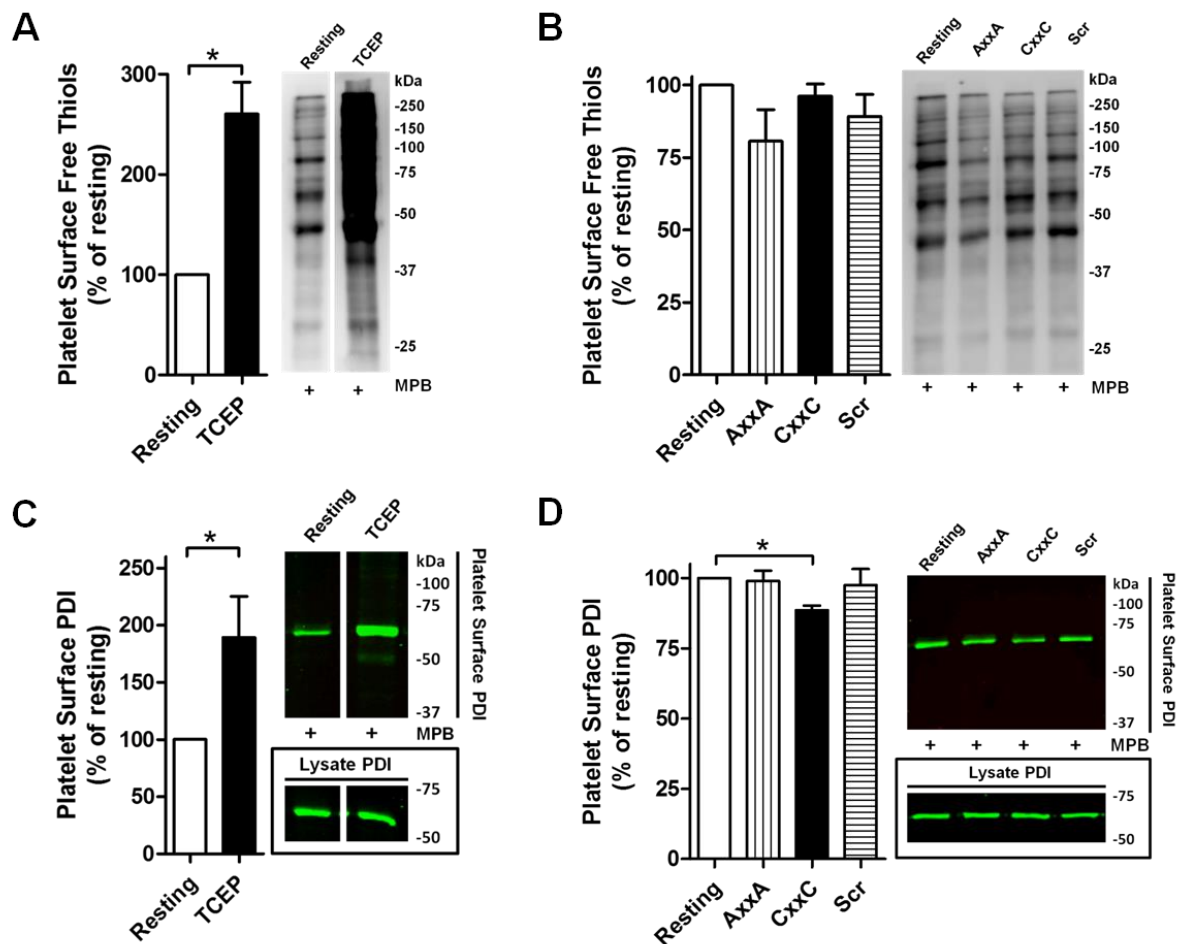


FIGURA 2. Peptídeo CxxC diminui a quantidade de tióis livres na PDI de membrana de plaquetas marcadas com MPB. A, plaquetas humanas em repouso ou incubadas com TCEP (1 mM, 13 min, 25 °C) tiveram os grupamentos sulfidrílicos extracelulares marcados com MPB e precipitados com o auxílio de micro-esferas magnéticas de estreptavidina, segundo descrição em Material e Métodos, para detecção por western blot dos tióis livres totais expostos na membrana. B, plaquetas em repouso foram incubadas ou não com os peptídeos CxxC, Scr ou AxxA (25 µM, 20 min, 25 °C) e submetidas aos mesmos procedimentos descritos em A. C e D, as membranas de nitrocelulose dos procedimentos A e B foram reblotadas com anticorpo anti-PDI (RL90, 1:2000). Os insertos em C e D são representantes do conteúdo intracelular de PDI detectado no sobrenadante do lisado celular após precipitação das micro-esferas de estreptavidina ligadas aos tióis livres da superfície das plaquetas. Em todos os painéis, as barras verticais representam análises densitométricas expressas como média ± EPM do percentual relativo à condição de repouso e obtidas de 3 – 4 experimentos independentes. As médias foram comparadas por teste t pareado entre a condição teste e a condição de repouso para $p < 0,05$. * $p < 0,05$ vs. repouso.

Quando as plaquetas foram incubadas com os peptídeos, observou-se que o peptídeo CxxC (25 μ M) promoveu uma discreta, mas importante, redução da marcação de tióis livres da PDI pelo MPB, o que resultou em menor precipitação da proteína (Fig. 2D). O mesmo não foi observado nas amostras incubadas com os peptídeos Scr e AxxA, na mesma concentração. Estes dados reforçam a hipótese de formação de uma ponte dissulfeto entre o peptídeo CxxC e a PDI, talvez por um mecanismo semelhante ao descrito para a bacitracina. Embora o mecanismo da inibição da PDI pela bacitracina seja alvo de debate, foi demonstrado que ela age via formação de pontes dissulfeto com as Cys³¹⁴ e Cys³⁴⁵, localizadas no domínio b' e na região ligadora x, respectivamente. Além disso, tipos mais hidrofóbicos de bacitracina, tais como bacitracina F e H, promovem maior efeito inibidor da atividade redutase da PDI [28]. Neste contexto, é notável que nossos dados mostrem que o peptídeo CxxC associa-se à PDI via interações hidrofóbicas (Fig. 1) e também iniba a atividade redutase desta enzima [19].

3.3 Avaliação do efeito dos peptídeos CxxC, Scr e AxxA sobre a agregação plaquetária induzida por ADP.

Frente aos achados recentes de que peptídeos curtos e moléculas fenólicas inibidoras da PDI são potenciais agentes antitrombóticos [16], testamos a capacidade do peptídeo CxxC, bem como seus controles Scr e AxxA, de inibir a agregação plaquetária induzida por ADP (5 μ M) em plasma rico em plaquetas (PRP). A escolha do ADP como agonista deveu-se ao fato de ser um agente de grande relevância fisiológica, cujo padrão bifásico da resposta agregante está plenamente caracterizado no PRP. A primeira fase ocorre pela ligação do agonista ao seu receptor e culmina na ativação da α IIb β 3. A segunda ocorre com a ligação da α IIb β 3 ao fibrinogênio e promove uma agregação mais estável e irreversível [8, 10].

Inicialmente, caracterizamos o papel de moduladores do estado redox de proteínas tiólicas e da própria PDI de superfície sobre a agregação plaquetária. A adição de 3 mM dos agentes redutores TCEP e DTT promoveu lenta e progressiva agregação plaquetária, com efeito máximo de 50% da agregação induzida por ADP (Fig. 3A). A semelhança dos perfis da agregação mostra que a permeabilidade do DTT à membrana não promove efeito adicional à agregação plaquetária induzida pela redução de dissulfetos da superfície da plaqueta pelo TCEP. Por outro lado, a atividade agregante do ADP foi drasticamente reduzida pela adição de DTNB (2,5 mM), um alquilante de tióis, ou totalmente abolida pelo PAO (30 μ M), um bloqueador de tióis vicinais (Fig. 3B). Por tióis vicinais compreendem-se grupamentos tiólicos que estão suficientemente próximos para realizarem trocas tiol-dissulfeto, tais como aquelas realizadas pelo sítio ativo CGHC da PDI [14]. Os dados apresentados na Figura 3C mostram que tanto a adição de bacitracina (5 mM) quanto do anticorpo anti-PDI RL90 (1:250) resultou na redução de aproximadamente 50% da agregação máxima induzida por ADP (Fig. 3C). Estes dados são corroborados por outros autores que mostraram que o anticorpo RL90 inibe apenas parcialmente a agregação plaquetária induzida por este agonista [8]. Ademais, foi demonstrado recentemente que o anticorpo RL90 inibe apenas a atividade redutase da PDI, comprometendo a atividade isomerase, sem interferir com a atividade oxidase [18].

Quando analisada a capacidade dos peptídeos de interferir com a agregação plaquetária induzida por ADP, encontramos que o peptídeo CxxC reduziu a agregação máxima em 14%, 27% e 30% nas concentrações de 3, 10 e 30 μ M, respectivamente (Fig. 4A). Concentrações maiores não resultaram em redução adicional (dados não mostrados). O peptídeo Scr que continha os mesmos aminoácidos do CxxC, porém em sequência aleatória sem tióis vicinais, e o peptídeo AxxA, no qual as cisteínas foram substituídas por alanina, não afetaram a agregação plaquetária induzida por ADP (Fig. 4B).

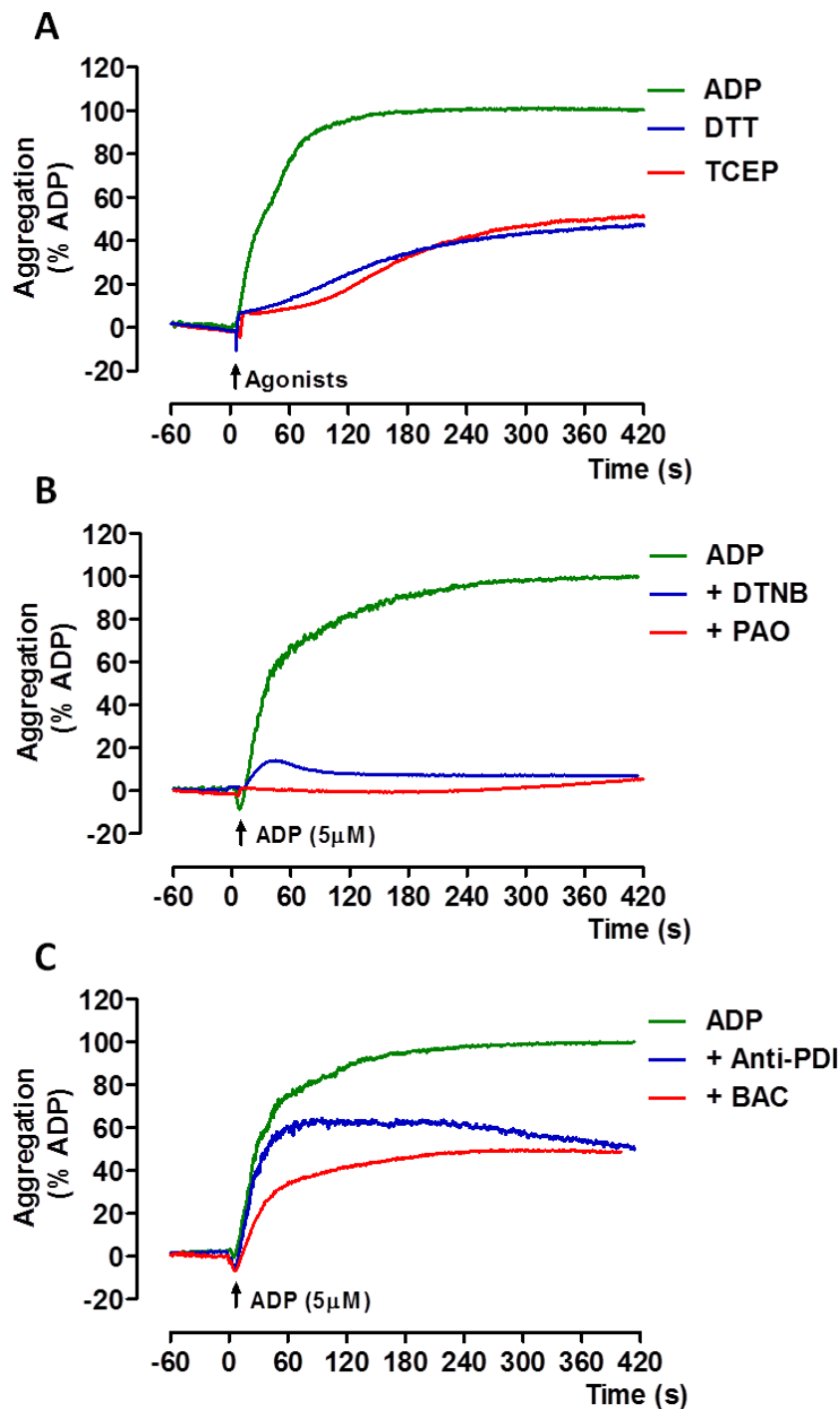


Figura 3. Agregação plaquetária induzida por ADP é dependente do estado redox de proteínas tiólicas da superfície da membrana. A, plasma rico em plaquetas (PRP, $2-3 \times 10^5$ plaquetas/ mm^3 , 25°C) foi induzido à agregação pela adição de ADP ($5\ \mu\text{M}$) ou dos agentes redutores DTT ($3\ \text{mM}$) e TCEP ($3\ \text{mM}$). B, PRP sob as mesmas condições de A foi pré-incubado por 10 minutos com DTNB ($1\ \text{mM}$), um bloqueador de tióis livres, ou PAO ($30\ \mu\text{M}$), um bloqueador de tióis vicinais, antes da ativação da agregação com ADP ($5\ \mu\text{M}$). C, bacitracina (BAC, $5,0\ \text{mM}$) e anticorpo anti-PDI RL90 (1:250) inibidores foram incubados nas mesmas condições descritas em B. As curvas representam a agregação média de 3-4 experimentos independentes, a seta indica o momento de adição do agonista.

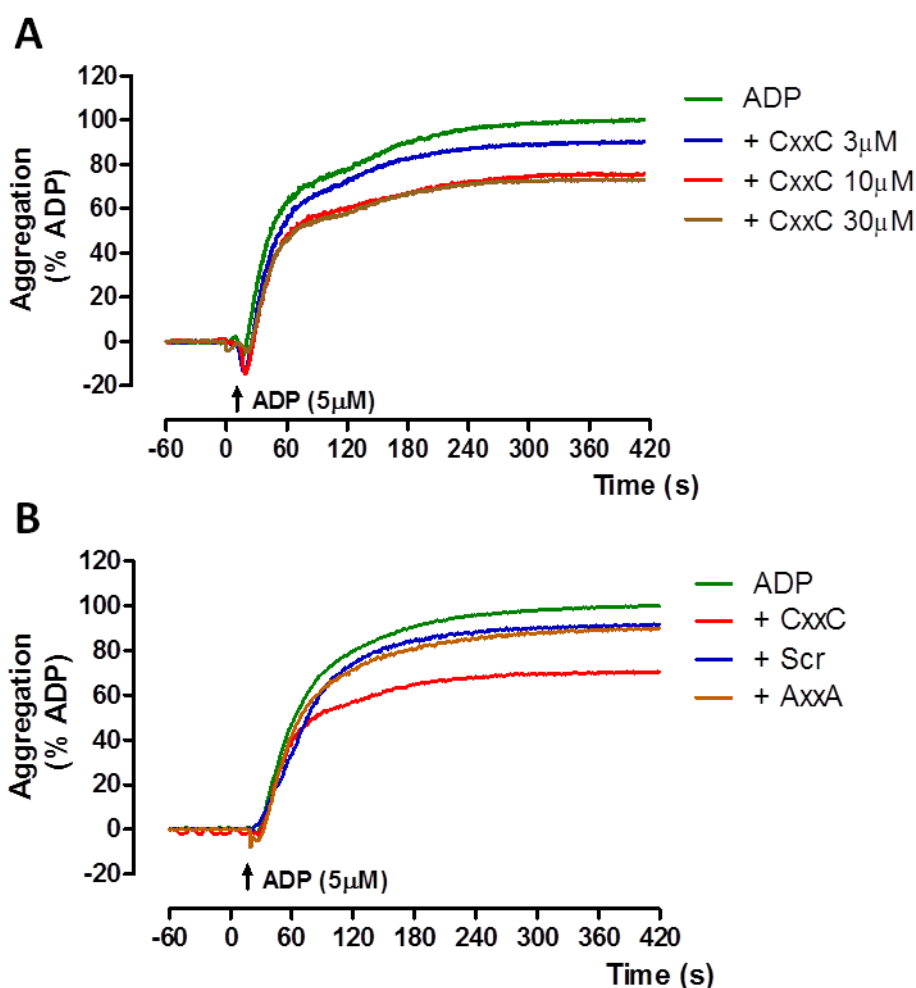


Figura 4. Agregação plaquetária induzida por ADP é inibida pelo peptídeo CxxC. A, plasma rico em plaquetas (PRP, $2-3 \times 10^8$ plaquetas/mL, 25 °C) foi induzido à agregação pela adição de ADP (5 μM) em presença do peptídeo CxxC nas concentrações indicadas na figura. B, PRP sob as mesmas condições de A foi pré-incubado por 10 minutos com os peptídeos Scr e AxxA em comparação ao CxxC, todos na concentração de 30 μM. As curvas representam a agregação média de 3-4 experimentos independentes, a seta indica o momento de adição do agonista.

Dada a predição da formação de pontes dissulfeto entre os peptídeos CxxC e Scr com a Cys³⁹⁷ do domínio a' da PDI, parece estranho que o peptídeo Scr não tenha interferido nem com a marcação da PDI pelo MPB (Fig 2D), tampouco inibido a agregação plaquetária (Fig. 4B). É sabido que a cisteína N-terminal do sítio ativo CGHC do domínio a da PDI tem pKa 6,7 que favorece a sua desprotonação em pH fisiológico, adquirindo a forma de ânion tiolado [29]. Além disso, a protonação da His³² vicinal estabiliza a forma tiolado da Cys³⁰ e

lhe confere maior reatividade [30]. Levando-se em conta que os peptídeos CxxC e Scr estavam na forma reduzida, parece-nos plausível supor que a sequência CGHC do peptídeo CxxC possa favorecer a forma tiolado, promovendo estabilização da predita ponte dissulfeto com a Cys³⁹⁷ do domínio a' da PDI plaquetária, o que não ocorreria como peptídeo Scr. Um outro aspecto a ser discutido, é a magnitude da inibição feita pelo peptídeo CxxC sobre a agregação máxima induzida por ADP (Fig. 4A). Foi demonstrado que o efeito inibidor da N-etilmaleimida, um alquilante de tióis, sobre a ação agregante do ADP é até 25 vezes menor quando avaliada em PRP em comparação ao efeito obtido em plaquetas lavadas [31]. Isto abre a perspectiva de que esta ação seja aumentada se testada em plaquetas purificadas, embora insistamos na relevância do PRP como um sistema mais representativo do ponto de vista fisiológico.

Sendo assim, o conjunto dos dados aqui apresentados sugerem que o peptídeo CxxC associa-se à PDI de superfície e inibe parcialmente a agregação plaquetária via mecanismos mediados por trocas tiol-dissulfeto. No entanto, há análises adicionais a serem realizadas em estudos futuros. Especialmente, há a necessidade de se avaliar a possibilidade de interação direta do peptídeo CxxC com tióis críticos da $\alpha\text{IIb}\beta 3$. Além disso, realizar estudos de ancoragem molecular dos peptídeos com a forma oxidada da PDI, a qual é predominante nas plaquetas em repouso. Em todo caso, este trabalho reforça o potencial uso do peptídeo CxxC, ou moléculas similares, como agente antiagregante plaquetário.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há qualquer conflito de interesse a ser declarado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA (Proc. APP- 00395/12) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Proc. 485251/2012-4). Nossos agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida a **Sena, E.M.L.**; à FAPEMA pela bolsa BITI concedida a **Gaspar, R.S.** e ao CNPq pela bolsa PIBITI concedida a **Fontelles, J.L.L.** Nossos agradecimentos especiais ao Prof. Dario Nicolau e ao Centro de Hematologia e Hemoterapia do Maranhão – HEMOMAR pela disponibilização da estrutura necessária à realização dos ensaios de agregação plaquetária.

REFERÊNCIAS

1. Aledort, L.M., S.B. Troup, and R.I. Weed, *Inhibition of sulfhydryl-dependent platelet functions by penetrating and non-penetrating analogues of parachloromercuribenzene*. Blood, 1968. **31**(4): p. 471-9.
2. MacIntyre, D.E., et al., *Effect of thio reagents on platelet transport processes and responses to stimuli*. Biochem Pharmacol, 1977. **26**(4): p. 319-23.
3. Essex, D.W., K. Chen, and M. Swiatkowska, *Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane*. Blood, 1995. **86**(6): p. 2168-73.
4. Essex, D.W. and M. Li, *Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion*. Br J Haematol, 1999. **104**(3): p. 448-54.
5. Essex, D.W., *The role of thiols and disulfides in platelet function*. Antioxid Redox Signal, 2004. **6**(4): p. 736-46.
6. Noiva, R., *Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**(5): p. 481-93.
7. Barbouche, R., et al., *Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion*. J Biol Chem, 2003. **278**(5): p. 3131-6.
8. Lahav, J., et al., *Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2472-8.
9. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3363-9.

10. Essex, D.W., *Redox control of platelet function*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(5): p. 1191-225.
11. Burgess, J.K., et al., *Physical proximity and functional association of glycoprotein 1b α and protein-disulfide isomerase on the platelet plasma membrane*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9758-66.
12. Lahav, J., et al., *Enzymatically catalyzed disulfide exchange is required for platelet adhesion to collagen via integrin α 2 β 1*. Blood, 2003. **102**(6): p. 2085-92.
13. Manickam, N., et al., *Protein disulphide isomerase in platelet function*. Br J Haematol, 2008. **140**(2): p. 223-9.
14. Manickam, N., S.S. Ahmad, and D.W. Essex, *Vicinal thiols are required for activation of the α IIb β 3 platelet integrin*. J Thromb Haemost, 2011. **9**(6): p. 1207-15.
15. Flaumenhaft, R., *Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target*. Trends Cardiovasc Med, 2013. **23**(7): p. 264-8.
16. Jasuja, R., et al., *Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 2104-13.
17. Xu, S., et al., *Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(40): p. 16348-53.
18. Brophy, T.M., B.S. Coller, and J. Ahamed, *Identification of the thiol isomerase-binding peptide, mastoparan, as a novel inhibitor of shear-induced transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) activation*. J Biol Chem, 2013. **288**(15): p. 10628-39.
19. de, A.P.A.M., et al., *Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(4): p. 799-810.

20. Ellman, G.L., *Tissue sulfhydryl groups*. Archives of biochemistry and biophysics, 1959. **82**(1): p. 70-7.
21. Wang, C., et al., *Human protein-disulfide isomerase is a redox-regulated chaperone activated by oxidation of domain a'*. J Biol Chem, 2012. **287**(2): p. 1139-49.
22. Pirneskoski, A., et al., *Molecular Characterization of the Principal Substrate Binding Site of the Ubiquitous Folding Catalyst Protein Disulfide Isomerase*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(11): p. 10374-10381.
23. Schneider, M., et al., *The structure of active opsin as a basis for identification of GPCR agonists by dynamic homology modelling and virtual screening assays*. FEBS letters, 2011. **585**(22): p. 3587-92.
24. Sanchez, R., et al., *Prediction of reversibly oxidized protein cysteine thiols using protein structure properties*. Protein Science, 2008. **17**(3): p. 473-481.
25. Masui, S., et al., *Molecular bases of cyclic and specific disulfide interchange between human ERO1alpha protein and protein-disulfide isomerase (PDI)*. J Biol Chem, 2011. **286**(18): p. 16261-71.
26. Byrne, L.J., et al., *Mapping of the ligand-binding site on the b' domain of human PDI: interaction with peptide ligands and the x-linker region*. Biochem J, 2009. **423**(2): p. 209-17.
27. Appenzeller-Herzog, C. and L. Ellgaard, *In vivo reduction-oxidation state of protein disulfide isomerase: the two active sites independently occur in the reduced and oxidized forms*. Antioxid Redox Signal, 2008. **10**(1): p. 55-64.
28. 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 J, 2011. **278**(12): p. 2034-43.

29. Hawkins, H.C. and R.B. Freedman, *The reactivities and ionization properties of the active-site dithiol groups of mammalian protein disulphide-isomerase*. Biochem J, 1991. **275 (Pt 2)**: p. 335-9.
30. Gane, P.J., R.B. Freedman, and J. Warwicker, *A molecular model for the redox potential difference between thioredoxin and DsbA, based on electrostatics calculations*. J Mol Biol, 1995. **249**(2): p. 376-87.
31. Margaritis, A., et al., *The role of protein sulfhydryl groups and protein disulfides of the platelet surface in aggregation processes involving thiol exchange reactions*. Pharmacol Res, 2011. **63**(1): p. 77-84.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A investigação proposta neste trabalho sugere que a formação de uma ponte dissulfeto mista entre o peptídeo CxxC e o domínio a' da PDI pode ser o responsável pelo efeito inibidor da atividade redutase desta enzima.

O peptídeo CxxC promoveu uma discreta, mas importante redução da marcação de tióis livres da PDI pelo MPB, um efeito que não foi observado com os peptídeos controle e que reforçam a hipótese de formação de uma ponte dissulfeto entre o peptídeo CxxC e a PDI.

Sendo assim, o conjunto dos dados aqui apresentados sugerem que o peptídeo CxxC associa-se à PDI de superfície e inibe parcialmente a agregação plaquetária via mecanismos mediados por trocas tiol-dissulfeto.

Embora o mecanismo pelo qual a PDI participa da ativação/agregação plaquetária não esteja exatamente compreendido nem como sua atividade é regulada, é fato que sua presença é essencial para a adequada função plaquetária. Mais investigações nesse campo são necessárias, não apenas direcionadas a PDI, mas a outras tiol –isomerases que também podem interferir na formação do trombo, para estabelecer e consolidar os inibidores dessas proteínas como uma nova e promissora classe de agentes antitrombóticos.

REFERÊNCIAS

- ALVARES F.; PÁDUA A.; TERRA FILHO J. Tromboembolismo pulmonar: diagnóstico e tratamento. **Ribeirão Preto: Medicina**, abr./dez v. 36, p. 214-240, 2003.
- BIZZACCHI, J.M.A. Tromboses Arteriais. In: Zago, M.A. (Org.). **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, p. 879-88, 2004.
- ESSEX, D.W. Redox Control of Platelet Function. **Antioxid Redox Signal**, v.11, n. 5, p. 1191–225, 2009.
- ESSEX D.W., CHEN K., AND SWIATKOWSKA M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane, **Blood**, v. 86, p. 2168–73, 1995.
- ESSEX, D.W. The role of thiols and disulfides in platelet function. **Antioxid Redox Signal**, v. 6, p. 736–46, 2004.
- KASPER, L.D et. al. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. EUA: McGraw-Hill, 17 ed. 2008.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE – Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS), DATASUS, Brasil, 2010. Disponível em www.saude.gov.br/http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def
- MORELLI, V.M. Estrutura e funções das plaquetas e das células endoteliais. In: Zago, M. A., Falcão, R. P., Pasquini, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, p.731-38, 2004.
- PAES, A. M. A.; VERÍSSIMO-FILHO, S.; GUIMARÃES, L. L.; SILVA, A. C. B.; TAKIUTI, J. T.; SANTOS, C. X. C.; JANISZEWSKI, M.; LAURINDO, F. R. M.; LOPES, L. R. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47^{phox}: evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. **J. of Leukocyte Biology**, v.90, p.799-810, 2011.
- SHATTIL, S. J.; NEWMAN P. J. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. **Blood**, v.104, p. 1606–15, 2004.

ANEXO 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:

Elyjany Moraes Lima Sena
TEL: (98) 8113-2325

Prof. Dr. Antonio Marcus de A. Paes
Tel: (98) 8234-0404

ANEXO B – 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 Luís - 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 executora:	Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, Profa. Dra. Ana Paula dos Santos, Elyjany Morais 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 ditilólicos 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 ditilólicos PDI – miméticos, de modo a ser capaz de propor um mecanismo de ação que os eleve 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.

"A Universidade que cresce com
inovação e inclusão social"

Av. dos Portugueses Campus Universitário do Bacanga, s/n – Prédio do CEB Velho bl "c" sala 7
São Luís-MA - CEP: 65085-580 Fone (98) 3301-8708 Fax (98) 3301-8701 - e-mail: cepufma@ufma.br