

Thaís Larissa Araujo de Oliveira Silva

**Estudo da rota de externalização da dissulfeto
isomerase protéica (PDIA1) em células endoteliais**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências**

Programa de Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Thaís Larissa Araujo de Oliveira

Estudo da rota de externalização da dissulfeto isomerase proteica (PDIA1) em células endoteliais / Thaís Larissa Araujo de Oliveira Silva. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.

Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

Descritores: 1.Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2.Espaço extracelular
3.Células endoteliais 4.Músculo liso vascular 5.Retículo endoplasmático
6.Biologia celular

USP/FM/DBD-257/15

*À minha mãe Luciana por ter dedicado sua vida
para que eu pudesse realizar meus sonhos...*

*Ao meu filho Lucas e meu esposo Guilherme pela
felicidade proporcionada diariamente...*

Amo vocês

Agradecimentos

À Deus, por tudo que o Senhor Jesus vêm fazendo na minha vida, por me fortalecer e me ajudar nos desafios diários.

Ao meu filho Lucas por ser a razão do meu viver e a alegria da minha casa. Meu filho, meu menino, meu gostozurinha, minha vida!

Ao meu esposo Guilherme pelo companherismo, amor e suporte incondicional.

Obrigada pelos 10 anos mais felizes da minha vida em que estamos juntos dividindo a primeira autoria do meu maior projeto: minha própria vida!

À minha mãe Luciana e meu pai Carlos pelo amor e dedicação que sempre tiveram comigo e por terem me ensinado os valores da vida.

Ao meu tio Ednaldo e minhas tias: Regina, Adriane, Elizabeth e Luziene por ter cuidado de mim com muito amor até hoje.

Ao meu amigo Max e minha amiga Carina por estarem presente em todos os momentos e me fornecerem apoio emocional.

Ao meu orientador Prof. Doutor Francisco Rafael Martins Laurindo, por ter me recebido no seu laboratório de forma gentil e ter me dado a oportunidade impar de conviver, fazer ciência e aprimorar a escrita científica com este grande cientista. Obrigada pela orientação, paciência e acima de tudo pela confiança.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório Percília Oliveira e Julianna Zeidler, por terem me auxiliado no desenvolvimento do projeto. Muito obrigada pela dedicação de vocês.

Às minhas amigas e companheira de laboratório Patrícia Nolasco, Ana Moretti e Thayna Meirelles pela amizade e disponibilidade.

À todos do laboratório de Biologia Vascular (LBV), pelas discussões de artigos e em especial ao Victor Debbas pela organização dos equipamentos e do laboratório no geral.

À Ana Garippo, pela assistência técnica no confocal e toda atenção fornecida.

Aos professores do Instituto de Biofísica da UFRJ, que me ensinaram muito sobre Ciência que sigo praticando até hoje na minha vida acadêmica.

A todos da banca, por terem aceitado o convite.

Este trabalho foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo), processos 2012/02372-0 (bolsa de doutorado) e 2009/54764-6 (projeto temático); *CEPID de Processos Redox em Biomedicina* (2013/07937-8) e pelo *INCT de Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma)* (CNPq e Fapesp).

“No fundo, somos o coelhinho branco que é tirado da cartola. A única diferença entre nós e o coelhinho branco é que o coelhinho não sabe que está participando de um truque de magia. Conosco é diferente. Sabemos que estamos fazendo parte de algo misterioso e gostaríamos de poder explicar como tudo funciona.”

“O mundo de Sofia” de Jostein Gaarder

Sumário

Lista de siglas

Resumo

Summary

1.	Introdução.....	1
1.1.	Dissulfeto isomerase protéica(PDI)	2
1.2.	O papel da PDI fora do retículo endoplasmático: foco na PDI epi/pericelular (pecPDI).....	6
1.3.	O retículo endoplasmático: organela central na via secretória clássica.....	12
1.4.	A secreção de chaperonas moleculares e seu papel fora da célula	16
1.5.	Hipótese.....	17
2.	Objetivos	19
2.1.	Objetivo geral	20
2.2.	Objetivos específicos	20
3.	Métodos	21
3.1.	Isolamento da célula muscular lisa de coelho/rato.....	22
3.2.	Modelo de indução de translocação/secreção da PDI.....	23
3.3.	Inibição das rotas de secreção convencional e não-convencional	24
3.4.	Ensaio de secreção de fibrilina-1	24
3.5.	Microscopia de fluorescência da célula muscular lisa vascular (VSMC) e célula endotelial da veia umbilical humana (HUVEC).....	25
3.6.	Dosagem de proteínas na membrana plasmática de VSMC e HUVEC.....	25
3.7.	Perda de função da GRASP55 por RNA de interferência	26
3.8.	Tabela de anticorpos utilizados.....	27
3.9.	Avaliação da morte celular por citometria de fluxo	28
3.10.	Avaliação da morte celular por atividade de lactato desidrogenase	28
3.11.	Análise estatística	29
4.	Resultados	30
4.1.	Investigação do envolvimento da rota de secreção clássica na externalização da PDI em células endoteliais	31
4.2.	O papel do citoesqueleto na rota de externalização da PDI em células endoteliais.....	43
4.3.	Investigação do papel de rotas não convencionais na externalização da PDI em células endoteliais	47

4.4. Investigação do papel de GRASP55 na externalização da PDI em células endoteliais	50
4.5. O papel de plataforma lipídicas (<i>lipid rafts</i>) na rota de externalização da PDI em células endoteliais	51
4.6. Investigação da reciclagem da PDI solúvel em células endoteliais	52
4.7. Investigação de possíveis moduladores da quantidade de pecPDI	53
4.8. Investigação do envolvimento da via convencional e o papel do citoesqueleto na externalização da PDI em células musculares lisa vascular	61
5. Discussão	73
6. Conclusões.....	78
7. Referências.....	80

Súmula curricular

Lista de siglas

BFA	Brefeldina A
CFTR	Regulador de condutância transmembrana da fibrose cística
CHX	Cicloheximida
CytD	Citocalasina D
DNP	2,4-dinitrofenol
DTNB	Ácido 5,5min-dithiobis-2-nitrobenzoico
EC	Célula endotelial
ERAD	Degradação associada ao RE
ERES	Locais de saída do RE
Ero1	Oxidoreductina do ER
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GP1 α	Glicoproteína 1 α
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana
iRhoA	Inibidor de RhoA
MEFs	Fibroblasto embrionário de camundongos
MPB	3-(<i>N</i> -maleimido propionyl) biocitina
MVB	Corpo multivesicular
Mon	Monensina
Neo	Neomicina
NEM	<i>N</i> -etilmaleimido
Noc	Nocodazol
pCMBS	Ácido p-cloromercuribenzenosulfônico
PDI	Dissulfeto isomerase protéica
pecPDI	PDI epi/pericelular
RASMC	Célula muscular lisa de rato ou coelho
RE	Retículo endoplasmático
SC	Clorato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TSP1	Trombospondina 1
VSMC	Célula muscular lisa vascular
vWF	Fator de Von Willebran

Resumo

2015 Silva T L A O. Estudo da rota de externalização da dissulfeto isomerase protéica (PDIA1) em células endoteliais [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Dissulfeto isomerase protéica (PDIA1 ou PDI) é uma chaperona e ditiol-dissulfeto oxido-redutase residente do retículo endoplasmático (RE). PDI é essencial à regulação da proteostase por ter função no enovelamento oxidativo de proteínas e na via de degradação associada ao RE (ERAD). Além disso, PDI interage fisicamente e regula a atividade de NADPH oxidases, e fora da célula é um regulador redox essencial à atividade de proteínas extracelulares. Este *pool* epi/pericelular da PDI (pecPDI) regula função de proteínas de membrana/secretadas, como integrinas, glicoproteínas gp120 do vírus HIV e outras, com múltiplas funções que incluem: trombose, ativação plaquetária, adesão celular, infecção viral e remodelamento vascular. A rota de externalização da PDI permanece obscura, e seu conhecimento pode indicar mecanismos dos efeitos (físio)patológicos da PDI. A secreção da PDI pela rota RE-Golgi foi sugerida em células endoteliais infectadas pelo vírus da dengue, células pancreáticas e tireoideanas. No entanto, uma varredura sistemática das possíveis rotas de externalização da PDI não foi previamente realizada. Neste estudo, mostramos que células endoteliais (EC) externalizam constitutivamente, por rotas distintas, dois *pools* de PDI, de superfície celular e solúvel, enquanto na EC não estimulada PDI não foi detectada significativamente em micropartículas. PDI externalizada corresponde a *ca.* 1,4% do *pool* total de PDI celular. Tanto a PDI de superfície celular como a solúvel foram majoritariamente secretadas pela via de secreção não-convencional do tipo IV independente de GRASP. Contudo, a via de secreção clássica também contribui para externalização basal da PDI de superfície celular, mas não da solúvel basal ou estimulada por PMA, ATP e trombina indicando que todas envolvem escape do Golgi. Além disso, a externalização constitutiva da PDI de superfície em célula muscular lisa vascular também ocorre por via independente de Golgi. Externalização da PDI não foi detectavelmente mediada pela secreção não-convencional do tipo I, II, III, lisossomos secretórios, endossoma de reciclagem e transporte ativo (dependente de ATP) em EC. Considerando que chaperonas são vias essenciais de resposta a estresses, investigamos o efeito de estresse do RE e choque térmico na pecPDI. Estresse do RE não altera a PDI de superfície celular, mas aumenta PDI solúvel. Ambos os *pools* de PDI não foram alterados por choque térmico, embora a recuperação desse estresse diminua a secreção de PDI. Estes dados sugerem que a liberação de PDI é um processo regulado, dependente da natureza do estresse. Bloqueio da síntese de proteínas com cicloheximida não altera pecPDI, indicando que PDI recém-sintetizada não é preferencialmente externalizada e que o tráfego da PDI independe de outras proteínas recém-sintetizadas. Um aspecto importante do estudo foi indicar uma resiliência da pecPDI à modulação individual de

distintas vias secretoras, consistente com uma estrita auto-regulação e possibilidade de vias sinérgicas e complementares. Estes resultados indicam que a externalização da PDI de superfície e PDI secretada possam ser externalizadas por mecanismos independentes. Estes processos compõem um processo regulado estritamente, consistente com papel homeostático da pecPDI.

Descritores: 1. Isomerasas de dissulfetos de proteínas 2. Espaço extracelular 3. Células endoteliais 4. Músculo liso vascular 5. Retículo endoplasmático 6. Biologia celular

Summary

Silva T L A O. Study of protein disulfide isomerase (PDIA1) externalization route in endothelial cells [Thesis] São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Protein disulfide isomerase (PDIA1 or PDI) is dithiol-disulfide oxidoreductase chaperone resident in the endoplasmic reticulum (ER). PDI is essential for proteostasis, due to its support of oxidative protein folding and ER-associated protein degradation (ERAD). In addition, PDI associates with NADPH oxidase(s) and regulate its activity, while outside of the cell, PDI redox-dependently modulates extracellular proteins. This epi/pericellular PDI (pecPDI) pool is known to regulate membrane/secreted proteins such as integrins, HIV glycoprotein gp120 and others, with functions that involve thrombosis, platelet function, cell adhesion, viral infection and vascular remodeling. PDI externalization route remains enigmatic and its elucidation can help understand some (patho)physiological PDI effects. An ER-Golgi route for PDI secretion has been as described on dengue virus-infected endothelial cells pancreatic and thyroid) cells. However, none of these papers addressed PDI secretion routes in a systematic fashion. Here, we show that endothelial cells (EC) constitutively externalize, through different routes, two PDI pools, a cell-surface and a secreted one, while in nonstimulated ECs PDI was not significantly detected in microparticles. Externalized PDI corresponds to <2% of total cellular PDI pool. Both cell-surface and soluble PDI were predominantly externalized through unconventional type IV GRASP-independent pathway(s). However, the classical secretory pathway also contributes to basal cell-surface, but not soluble, PDI externalization, as PMA, ATP or thrombin-stimulated secretion also involve Golgi bypass. Furthermore, constitutive cell-surface PDI externalization in vascular smooth muscle cells also occurs in a Golgi-independent way. PDI externalization was not detectably mediated by non-conventional type I, II and III secretion routes, secretory lysosomes, recycling endosomes and ATP dependent active transport in EC. Since chaperones are essential for cellular stress response, we assessed the effects of ER stress and heat-shock on pecPDI. ER stress did not affect cell-surface PDI but increased the soluble pool. Both PDI pools were unaltered by heat shock, while stress recovery decreased PDI secretion. These data suggest that PDI release is finely tuned and dependent on the type of stress. Blockade of protein synthesis with cycloheximide did not change pecPDI levels, suggesting that newly-synthesized PDI is not preferentially externalized and that PDI traffic does not require newly-synthesized proteins. An important aspect of the study was the evidence for pecPDI resilience to individual modulation of distinct secretion routes, consistent with strict auto-regulation and possible synergic or complementary pathways. Overall, our data suggest that cell-surface and secreted PDI pool externalization are regulated through independent mechanisms, which in both cases involve Type IV non-conventional routes, with some minor contribution of Golgi-dependent secretory pathway. These patterns compose a strictly regulated process, consistent with an important homeostatic role for pecPDI.

Descriptors: 1. Protein disulfide-isomerases 2. Extracellular space 3. Endothelial cells
4. Muscle, smooth, vascular 5. Reticulum endoplasmic 6. Cell Biology

1. Introdução

1.1 Dissulfeto isomerase protéica (PDI)

Em 1964, Anfinsen e colaboradores descobriram o primeiro catalista do enovelamento protéico com o isolamento de uma enzima microsomal capaz de introduzir pontes dissulfeto na RNase e lisozima (Goldberger *et al*, 1964), posteriormente (1975) denominada *dissulfeto isomerase protéica* (PDI, do inglês *protein disulfide isomerase*; para revisão, v. Hatahet & Ruddock, 2009). A função prioritária da dissulfeto isomerase protéica (PDIA1, doravante referida como PDI) é catalisar o enovelamento de proteínas secretadas/ membrana por meio da introdução, redução ou isomerização (organização) de pontes dissulfeto (Dobson, 2003). Exemplos de substratos *in vivo* da PDI incluem: procolágeno (Appenzeller-Herzog & Ellgaard L, 2008), tiroglobulina, peptídeo carregado no MHC classe I, fibrilina, imunoglobulinas, interferon-gama (Hatahet & Ruddock, 2009), albumina, transferrina, α -fetoproteína, α_2 -HS glicoproteína, (Rutkevich *et al*, 2010).

A PDI é uma proteína multidomínio de 55 kDa presente em altas concentrações (*ca.* mM) no retículo endoplasmático (Wilkinson & Gilbert, 2004) e apresenta dois domínios homólogos à tiorredoxina na sua estrutura (Turano *et al*, 2002). No lúmen do RE, o correto enovelamento protéico é desafiado pela alta concentração de macromoléculas (*macromolecular crowding*). As pontes dissulfeto restringem a flexibilidade da cadeia polipeptídica, diminuindo o número de conformações que a proteína pode assumir, de forma a favorecer a estrutura nativa (Christis *et al*, 2008).

De fato, pontes dissulfeto, juntamente com a glicosilação, tornam as proteínas de superfície ou secretadas termodinamicamente mais estáveis do que as proteínas citosólicas (Buchberger *et al*, 2010), protegendo-as de eventuais danos causados por oxidantes e enzimas proteolíticas, comumente encontradas no espaço extracelular (Hogg, 2003). Assim como o espaço extracelular, o retículo endoplasmático (ER) é uma

organela com ambiente redox favorável à formação de pontes dissulfeto, pois a razão glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG) é de 3-5:1, enquanto no citosol esta razão é ~ 100:1 (Wilkinson & Gilbert, 2004).

A introdução de pontes dissulfeto em proteínas nascentes pela PDI gera como subproduto a PDI reduzida, que necessita ser reoxidada para completar o ciclo catalítico. Esse processo de regeneração ocorre classicamente pela oxidoreductina do RE (Ero1), que é essencial à viabilidade celular em organismos como leveduras. A reoxidação da Ero1, por sua vez, é feita pela transferência de elétrons via FAD para o oxigênio molecular. Este processo gera, assim, peróxido de hidrogênio (Laurindo *et al*, 2012). Estudos recentes indicam que o peróxido de hidrogênio gerado pela Ero1 e talvez de outras fontes ainda indeterminadas, reage com glutathiona peroxidase 7 e 8 (Gpx7/8) ou com peroxiredoxina IV (Prdx4), que operam rotas alternativas de reoxidação da PDI em eucariotos superiores. Há evidências de que Gpx especificamente reduzem o peróxido derivado da Ero1, enquanto a Prdx4 reduz o peróxido gerado por fontes alternativas (Ramming *et al*, 2014). Outras rotas de regeneração da PDI incluem dissulfeto de glutathiona (GSSG), vitamina K epóxido oxido-redutase, arcobato/ácido dehidroascórbico (Laurindo *et al*, 2012).

Outra importante característica da PDI, além da sua atividade oxido-redutase ditiol/dissulfeto, é sua atividade chaperona, que permite sua associação com peptídeos e proteínas por meio do bolsão hidrofóbico presente na sua estrutura (Buchberger *et al*, 2010). Essa atividade não requer as cisteínas do sítio catalítico e capacita PDI a inibir agregação de proteínas, que em condições específicas se tornam mal-enoveladas e agregam, p.ex. gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase, citrato sintase, lisozima e rodanese (Wilkinson & Gilbert, 2004). Essa atividade chaperona da PDI sustenta e justifica sua heterodimerização (como subunidade β) com a proteína de

transferência de triacilglicerol microsomal ou prolil 4-hidroxilase do colágeno (Turano *et al*, 2002).

A relação estrutura-função da PDI tem sido ativamente estudada. PDI apresenta quatro domínios, a, a', b, b' e extensão C-terminal acídica, c (Figura 1A). Os domínios a e a' contêm as cisteínas catalíticas (Cys 53, 56, 397 e 400) e o domínios b e b' são essenciais para ligação ao substrato por conter o domínio hidrofóbico. A estrutura e a sequência de aminoácidos da PDI humana são esquematizados na Figura 1 B e C, respectivamente. A descoberta de que a oxidação do domínio a' leva a alteração conformacional da PDI, aumentando sua afinidade a substratos, indica que a função da PDI é regulada pelo seu estado redox (Wang *et al*, 2012).

A PDI (também chamada de PDIA1, P4HB) é o membro fundador de uma família que em células humanas conta com pelo menos 20 membros (Laurindo *et al*, 2012). Alguns desses diferem em quantidade de domínios, por exemplo, a Erp72 apresenta mais um domínio a além dos quatro domínios. Já a Hag3 é o menor membro, contendo apenas o domínio a. A expressão celular /tecido específica de alguns membros é notória, por exemplo, a PDIP é encontrada no pâncreas e neurônios dopaminérgicos. Há uma importante sobreposição de função dentro da família (Imaoka, 2011).

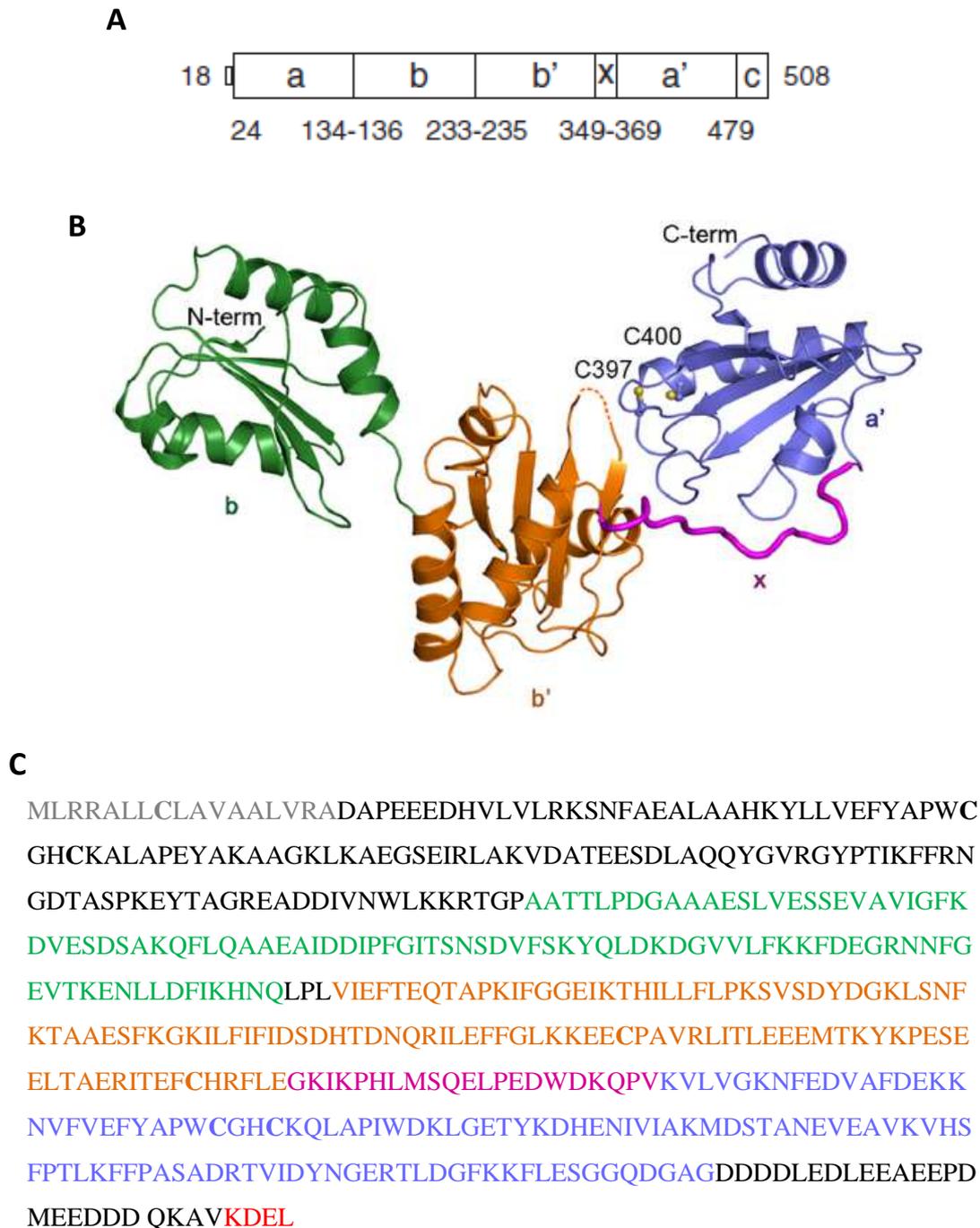


Figura 1. Estrutura da PDI humana. (A) A arquitetura dos domínios da PDI humana, sendo os 17 primeiros aminoácidos a sequência de endereçamento para o retículo endoplasmático (Hatahet & Ruddock, 2009), (B) estrutura da PDI humana truncada no N-terminal resolvida por cristalografia de raio-X. O domínio a não está presente neste esquema. N-term =N-terminal e C-term =C-terminal (Wang *et al*, 2012). (C) A sequência da PDI humana com os resíduos coloridos de acordo com a extensão dos domínios, como em B. O C-terminal possui a sequência de recuperação do RE, KDEL. Todas as sete cisteínas estão apresentadas em negrito.

1.2 O papel da PDI fora do retículo endoplasmático: foco na PDI epi/pericelular (pecPDI)

Todos os membros da família da PDI são canonicamente residentes no RE. No entanto, alguns membros da família tem sido encontrados no citosol (PDI e ERp57), núcleo (PDI e ERp57) e superfície celular (PDI, ERp57 e ERp72) (Turano *et al*, 2002). A PDI foi encontrada na fração citosólica de fígado humano e de primatas, em possível associação com degradação da insulina (Wroblewski *et al*, 1992), bem como em leucócitos humanos (de A Paes *et al*, 2011). A PDI também foi detectada na matriz nuclear de monócitos e linfócitos humanos (Gerner *et al*, 1999).

A presença de uma sequência C-terminal de recuperação do ER nos membros da família PDI torna intrigante os achados de que estas proteínas são detectadas em outros compartimentos (Turano *et al*, 2002; Laurindo *et al*, 2012). A secreção da PDI foi documentada em neutrófilos (Hahm *et al*, 2013), monócitos (Langer *et al*, 2013), plaquetas, células endoteliais da aorta bovina, hepatócito de ratos, células B humanas, leveduras e distintas linhagens de células: leucêmicas, fibrosarcoma e endotelial (Jordan & Gibbins, 2006). PDI foi ainda encontrada em micropartículas de células endoteliais (Banfi *et al*, 2005) e plaquetas (Raturi *et al*, 2008). PDI também foi detectada na superfície de eritrócitos, apresentando aumento de sua atividade em eritrócitos humanos de pacientes com anemia falciforme (hemoglobina SS) comparado à pessoas saudáveis (hemoglobina AA). Resultado similar foi obtido com eritrócitos de camundongos transgênicos para anemia falciforme. Inibição de pecPDI diminui atividade basal e estimulada por endotelina-1 (ET-1) do canal de Gardos (canal de cálcio). Tratamentos desses animais com antagonista do receptor de ET-1 diminui atividade de pecPDI com consequente melhora no parâmetros hematológicos (Prado *et al*, 2013).

A presença da PDI na superfície celular foi inicialmente observada em 1988. Análise ultraestrutural revelou a presença da PDI na membrana plasmática lateral e basal de células pancreáticas (Akiga *et al.*, 1988b) e traços de PDI foram encontrados na membrana de hepatócitos (Akiga *et al.*, 1988a). A presença da PDI na superfície de hepatócitos primários de ratos também foi confirmada por outras técnicas como imunofluorescência e imunoprecipitação. A lavagem das células com carbonato de sódio diminuiu a quantidade de proteína encontrada na superfície, sugerindo interação eletrostática entre PDI e a membrana plasmática. A PDI detectada no meio de cultura apresenta a sequência KDEL e tem um padrão de digestão similar à PDI intracelular (Terada *et al.*, 1995). Assim como em hepatócitos, a PDI foi secretada pela linhagem de célula exócrina pancreática de rato e o resultado da caracterização da PDI também foi similar (Yoshimori *et al.*, 1990).

Uma das primeiras evidências da funcionalidade da PDI na superfície celular foi obtida em células de ovário de hamster chinês. A incubação com bloqueadores de sulfidrilas impermeáveis a membranas (DTNB ou pCMBS) ou de inibidores de PDI (bacitracina ou anticorpos anti-PDI) inibiu a clivagem na superfície celular do conjugado poli D-lisina I¹²⁵iodotiramina ligado por dissulfeto, bem como o efeito citotóxico da toxina diftérica. Esses dados sugerem que a PDI extracelular tem atividade redutora (Mandel *et al.*, 1993). Considerando que tecnicamente a PDI de superfície celular pode ser indistinguível da PDI secretada peri-celular nestes ensaios de inibição extracelular, nosso grupo tem utilizado o termo PDI epi/pericelular (pecPDI) para designação geral dos dois *pools* de PDI externalizada.

É interessante notar que o sobrenadante de plaquetas ativadas tem atividade PDI medida por ensaios de renaturação de ribonuclease, sendo essa atividade perdida após fervura (100°C), dependente de pH e inibida por bacitracina e peptídeos inibidores da

PDI (Chen *et al*, 1992). Posteriormente, a presença de PDI na superfície de plaquetas humanas não ativadas foi mostrada por imunofluorescência, citometria de fluxo e medidas de atividade de renaturação de ribonuclease (Chen *et al*, 1995). Ero1 α de superfície foi descrita na superfície de plaquetas (embora até o momento não em outros tipos celulares), colocalizando com PDI e $\alpha_{IIb}\beta_3$, indicando uma possível cooperação entre Ero1 α e PDI na modulação do estado redox de integrinas. PDI ativa $\alpha_{IIb}\beta_3$ (ligante do fibrinogênio), receptor de colágeno $\alpha_2\beta_1$, entre outros. Ero1 α também foi detectada em micropartículas de plaquetas ativadas por trombina (Swiatkowska *et al*, 2010). É interessante que Ero1 α não contém a sequência C-terminal de retenção no RE e sua localização no lúmen do RE decorre de associação física com PDIs, por exemplo Erp44 (Otsu *et al*, 2006).

Em plaquetas ativadas, 81% da PDI de superfície está reduzida, comparada a 26% em plaquetas não ativadas. No mínimo 11 proteínas de superfície das plaquetas ativadas/agregadas apresentaram tióis livres quando comparadas a plaquetas controle, sendo uma dessas proteínas a glicoproteína 1b α (GP1b α), que é o receptor do fator de Von Willebrand (vWF). Um dado importante é que a ligação entre vWF e GP1b α foi inibida por anticorpo neutralizante anti-PDI. Esse resultado, juntamente com a evidência de que PDI e GP1b α estão fisicamente próximas na superfície celular, sugerem que a PDI estaria alterando a conformação da GP1b α (Burgess *et al*, 2000). Outra glicoproteína de plaquetas que interage com PDI é a trombospondina 1 (TSP1). A PDI é capaz de catalisar trocas tiol-dissulfeto em TSP1 de fibroblasto e de plaquetas *in vitro*, indicando que a PDI na superfície celular pode regular funções biológicas da TSP1 (Hotchkiss *et al*, 1996). A PDI extracelular de plaquetas é a mais estudada na literatura, sendo fundamental para agregação, secreção e adesão plaquetária (Essex, 2009).

A PDI também foi encontrada na superfície da célula endotelial da aorta bovina, em concentrações calculadas de *ca.* ~15µM. A incubação da PDI purificada com TSP1 acentua sua adesão à célula endotelial, sendo esse processo mediado por integrina ($\alpha_v\beta_3$) e envolvendo exposição da sequência RGD na TSP1 (Hotchkiss *et al.*, 1998, 1999). Células endoteliais estimuladas com manganês aumentam a quantidade de tióis livres expostos em PDI e integrina $\alpha_v\beta_3$; esta última é convertida para uma conformação ativa de modo inibido por bacitracina e anticorpo bloqueador da PDI. Este dado é corroborado pela interação desta integrina via ponte dissulfeto com PDI (Swiatkowska *et al.*, 2008). A PDI da superfície também controla adesão de plaquetas mediada por integrinas β_1 e β_3 , sugerindo um papel mais geral da PDI na ativação de integrinas em distintas células (Lahav *et al.*, 2000).

A pecPDI regula negativamente a liberação de proteínas (*shedding*) por ADAM17, uma metaloprotease disintegrina que promove liberação proteolítica de TNF-alfa e de ligantes do fator de crescimento epidermal. Bacitracina e anti-PDI acentuam a atividade da ADAM17 e experimentos *in vitro* confirmam a inibição da ADAM17 pela PDI, provavelmente via alterações no domínio não catalítico de ADAM17 dependentes de isomerização de pontes dissulfeto por pecPDI (Willems *et al.*, 2010). Ao contrário, a inibição da PDI abole a liberação induzida por trombina do marcador-5 endotelial de tumor (TEM5), expresso em células endoteliais e pericitos durante angiogênese. PDI reduz pontes dissulfeto em TEM5, expondo sítio de clivagem por trombina, que por sua vez regula a exposição do motivo RGD envolvido em adesão e migração (Vallon *et al.*, 2012).

Uma função importante da PDI de superfície é modular a assimetria de fosfolípidos na membrana de células endoteliais, importantes para a homeostase celular e trombose. Inibição da pecPDI, assim como silenciamento desta proteína, acentuam

atividade procoagulante do fator tecidual e a internalização de fosfatidilserina (PS). Dessa forma, a PDI é um regulador do início da coagulação (Popescu *et al*, 2010). A pecPDI também está envolvida na liberação do ectodomínio do receptor de tirotropina (TSHR) de cultura de tirócitos humanos e de linhagem celular estavelmente transfectada com receptor TSH. Bacitracina e imunoinibição da PDI diminuem drasticamente a liberação do ectodomínio do TSHR nesses modelos. Propõe-se que esse fenômeno resulte em diminuição da ação hormonal (Couët *et al*, 1996).

Um exemplo interessante da função da pecPDI é a inibição da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) por bacitracina, anti-PDI e reagentes de tiol impermeáveis a membrana, sugerindo um efeito da pecPDI no início da infecção viral (Ryser *et al*, 1994). Além disso, inibidores da PDI diminuem a transmissão célula a célula do vírus HIV. Quando a PDI exógena foi adicionada após o tratamento da célula CD4+CXCR4+ (receptores fundamentais para infecção) com o reagente de tiol (DTNB), a fusão do envelope viral, antes inibida, foi restaurada (Markovic *et al*, 2004). O efeito da PDI pode estar relacionado à redução de dissulfetos da glicoproteína gp120 (subunidade do envelope viral). Evidências para esta proposta incluem: (1) após ligar ao CD4, a gp120 sofre redução de seus dissulfetos (Gallina *et al*, 2002), (2) gp120 tem tióis livres acessíveis a reagentes como DTNB e (3) a PDI, CD4 e CXCR4 colocalizam na presença de gp120 (Markovic *et al*, 2004). A pecPDI também funciona como receptor para galectina-9, que por sua vez aumenta a atividade da PDI, bem como a migração de células T mediada por integrinas e infectividade do HIV (Bi *et al*, 2011).

O efeito da pecPDI na trombose é o mais bem caracterizado até o momento. Microscopia de fluorescência intravital revela que a infusão de micropartículas de monócitos contendo TF na veia jugular do camundongo após ligação da artéria carótida (modelo de trombose) acelera a produção de fibrina, sendo esse efeito inibido pelo

anticorpo inibitório da PDI (RL90). A PDI intracelular oriunda de células da parede do vaso rompida contribui para este efeito, mas a diminuição da PDI no local da lesão em camundongos trombocitopênicos (plaquetas depletadas) indica contribuição da PDI secretada por plaquetas neste modelo. Estudos *in vitro* sugerem que ativação de TF por PDI envolva isomerização (Reinhardt *et al*, 2008).

Em outro modelo de trombose, lesão arteriolar induzida por laser, foi mostrado que RL90 inibe geração de fibrina e acúmulo de plaquetas. Camundongos *Par4^{-/-}* (não responde a trombina) não acumulam plaquetas, mas depositam fibrina, sendo esta também dependente de *pecPDI* (Cho *et al*, 2008). Um fato intrigante é como a PDI extracelular permanece no local do trombo. Utilizando camundongos nocaute, mostrou-se que os efeitos anteriormente descritos, foram dependentes da associação da PDI com $\beta 3$ integrinas presentes na superfície de células endoteliais e plaquetas (Cho *et al*, 2012). A atividade antitrombótica do anticorpo anti-PDI, e o fato da *pecPDI* de plaqueta afetar pouco a hemostasia fisiológica (Kim *et al*, 2013) sugerem a *pecPDI* como um novo alvo antitrombótico (Flaumenhaft, 2013). O flavonóide quercetina 3 rutinosídeo (rutina) foi caracterizado como inibidor específico da PDI, e quando administrado em camundongos evita a formação do trombo no modelo de lesão induzida por laser ou por FeCl_3 (Jasuja *et al*, 2012). Baseado no potencial anti-trombótico de inibidores da *pecPDI*, ensaios clínicos foram já desenhados e iniciados (Furie & Flaumenhaft, 2014). A modulação terapêutica farmacológica da PDI tem potencial aplicação em trombose associada à doença coronariana, acidente vascular cerebral e tromboembolismo venoso.

Resultados de nosso laboratório (Tanaka *et al*, 2015- artigo submetido) mostram que a imuno-inibição da *pecPDI in vivo* (artérias ilíacas de coelho durante reparação à lesão) levou a perda sustentada do calibre vascular, sem espessamento da parede arterial, associada a remodelamento constritivo e desorganização do citoesqueleto e

matriz extracelular. Além disso, há aumento na quantidade de tióis livres expostos na superfície das artérias 14 dias após a lesão. Esses achados indicam que a pecPDI tenha papel fundamental na reconstrução e na regulação fina da arquitetura da parede vascular. Estes dados indicam um papel da pecPDI na função de células musculares lisas da parede vascular, cujos detalhes são ainda pouco estudados na literatura.

Como visto até o momento com relação às funções da pecPDI (Benham, 2012), as pontes dissulfeto não somente estabilizam, como também são capazes de modular a função de proteínas. Essas pontes dissulfeto são ditas alostéricas (Hogg, 2003). A modulação de tióis redox de superfície parece, de fato, uma atividade geral da PDI. A superexpressão da PDI em células de fibrosarcoma humano leva ao aumento na intensidade da marcação com reagente tiol específico impermeável a membranas (MPB) de 11 proteínas, enquanto a menor expressão da PDI diminui a marcação de 3 dessas 11 proteínas. Além disso, as células superexpressando PDI evidenciaram aumento da secreção e translocação da PDI para superfície e o contrário foi visto quando a PDI foi silenciada. A imunoinibição da pecPDI diminui a marcação do MPB, indicando que PDI controla o estado redox de pelo menos 14 proteínas tiol/dissulfeto na superfície celular (Jiang *et al*, 1999).

1.3 O retículo endoplasmático: organela central na via secretória clássica

Um terço de todas as proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* se enovela no RE e esse número parece ser ainda maior para as células humanas (Christis *et al*, 2008). Estudos proteômicos foram capazes de detectar 832 proteínas exclusivas do RE, 193 exclusivas do complexo de Golgi e 405 em ambas organelas. Dessas 1430 proteínas, 1424 foram encontradas no banco de dados humanos de predição de proteínas para RE (Scott *et al*, 2004).

O RE apresenta subdomínios como RE liso, rugoso, envelope nuclear e locais enriquecidos com COPII (*coat protein complex II*), entre outros (Christis *et al*, 2008). A via secretória RE-Golgi em mamíferos é constituída pelo RE rugoso, locais de saída do RE (ERES), compartimento intermediário RE-Golgi (ERGIC), complexo de Golgi e carreadores pós-Golgi (Grieve & Rabouille, 2011). As proteínas nascentes contendo peptídeo de sinal são reconhecidas e direcionadas para o RE via partícula de reconhecimento de sinal (SRP). Na maioria dos casos, a transferência para o RE se dá co-traducionalmente e a proteína se enovela no RE com auxílio de chaperonas, como Bip, Calnexina e Calreticulina, além dos catalistas do enovelamento protéico, como a PDI e peptidilprolil-isomerasas (Christis *et al*, 2008). Após passar pelo sistema de controle de qualidade de enovelamento do RE, a proteína segue a via secretória RE-Golgi, também denominada via clássica de secreção. As proteínas que não saem por esta rota são externalizadas pela via não-convencional de secreção (Figura 2).

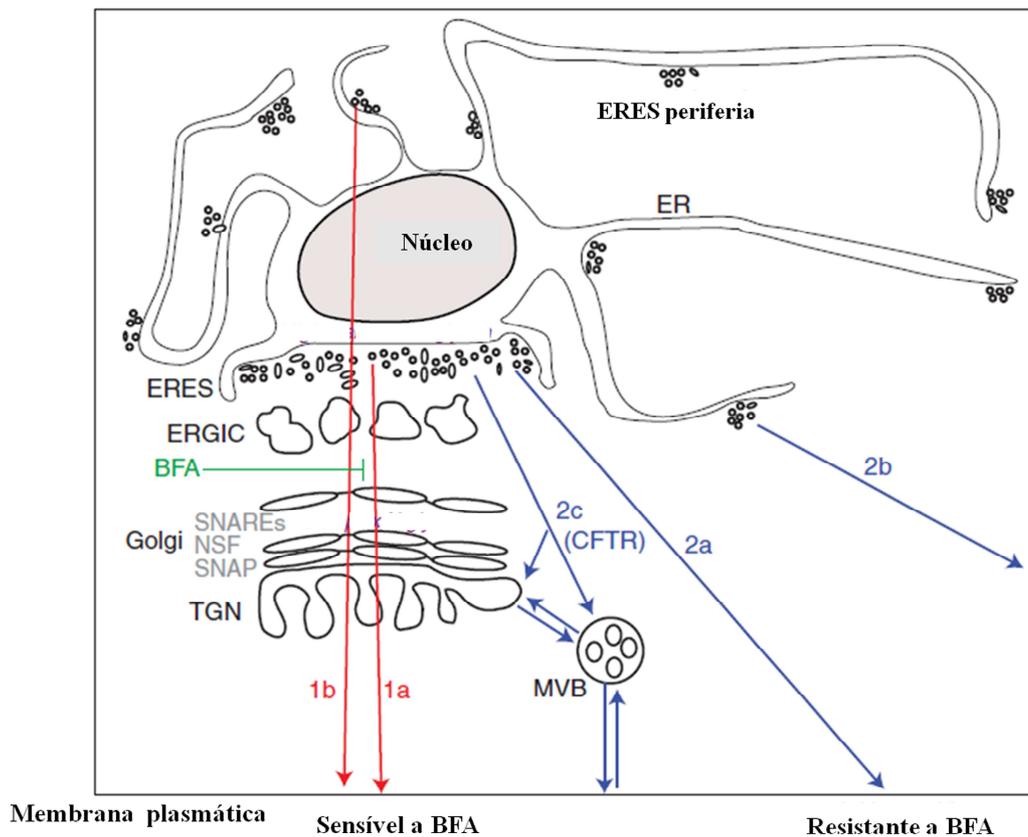


Figura 2. Secreção clássica e não-convencional de proteínas. A proteína pode sair de locais de saída do RE (ERES) próximos ao cis-Golgi (rota 1a) ou de ERES da periferia (rota 1b). Independente da rota seguida, as proteínas que passam através do complexo de Golgi até membrana plasmática associam-se a eventos de fusão dependente de proteínas como SNAREs, NSF e SNAP. A rota de secreção clássica é inibida por Brefeldina A (BFA). Rotas que desviam do complexo de Golgi (não convencionais) estão em azul e são resistentes à BFA. Nesse caso a saída pode ser também via ERES próximos ao cis-Golgi (rota 2a e c) ou periféricos (rota 2b). Enquanto a rota 2a e b envolve intermediário vesicular oriundo do RE, a rota 2c utiliza intermediário endossomal. Em alguns casos, por exemplo, no caso da secreção do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) há envolvimento do corpo multivesicular (MVB). Modificado de Grieve & Rabouille, 2011.

A maioria das proteínas secretadas que passam pelo RE seguem a via clássica de secreção. No entanto, são cada vez mais identificadas proteínas que não passam através do Golgi (*Golgi bypass*) e ao invés disso seguem uma via de tráfego denominada não-convencional do tipo IV, ou independente do Golgi, sendo um ponto marcante dessa secreção a resistência a BFA (Grieve & Rabouille, 2011, Rabouille *et al.*, 2012). A secreção não-convencional do tipo IV pode ainda ser dependente ou não de GRASP. A

família de proteínas GRASP (do inglês, *Golgi reassembly stacking protein*) possui dois membros: GRASP55 (Shorter *et al*, 1999) e GRASP65 (Barr *et al*, 1997) de 55 e 65kDa, respectivamente. GRASPs são ubiquamente expressas em mamíferos e amplamente conservadas em eucariotos (Levi & Glick, 2007) e curiosamente (considerando o nome da proteína) envolvidas no tráfego independente do Golgi.

A secreção de IL1 β por macrófagos depende de componentes envolvidos em autofagia, Atg5 e GRASP55 (Dupont *et al*, 2011). A externalização de alfa integrina durante desenvolvimento de *Drosófila* é dependente de GRASP (Schotman *et al*, 2008). GRASP também está envolvida no tráfego não-convencional da proteína ligadora de acil coenzima A (AcbA) que ocorre durante privação de soro em *Dictyostelium discoideum* (Kinseth *et al*, 2007), de Acb1 em *Pichia pastoris* (Manjithaya *et al*, 2010) e em *Saccharomyces cerevisiae* (Duran, 2010). GRASP55 também promove a secreção não-convencional de Δ F508CFTR. A superexpressão de GRASP55 em camundongos com a mutação Δ F508-CFTR promove recuperação fenotípica desses animais, tornando essa via um alvo terapêutico em potencial para tratamento da fibrose cística (Gee *et al*, 2011)

Outros exemplos de tráfego não-convencional (Zhang & Schekman, 2013) incluem: 1) entrega de panexinas e conexina 26 nas junções *gap* de separação entre células vizinhas; 2) serglicina, um proteoglicano com papel na imunidade, hemostase, crescimento e polaridade celular Rabouille *et al*, 2012); 3) CD45, uma tirosinofosfatase essencial para desenvolvimento de timócito e célula T. É interessante notar que CD45 é dividida em dois *pools* secretados pela via clássica e não-convencional, esta última sendo três vezes mais rápida e ocorrendo em condições de crescimento normal (constitutivamente) (Baldwin *et al*, 2002). As panexinas 1 e 3 também podem ser

secretadas pelas duas vias. BFA em altas concentrações é capaz de estimular a secreção de serglicina (Grieve & Rabouille, 2011).

Há também secreção não-convencional envolvendo proteínas citoplasmáticas (não têm sequência de sinal), que é dividida nos tipos I, II e III. A do tipo I envolve a translocação direta da proteína à membrana plasmática. Exemplos incluem o fator 2 de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), FGF1, HIV Tat e anexina A2. Em todos os casos, a ligação a fosfoinosítídeos e formação de oligômeros antecede a secreção. A secreção do tipo II também é não-vesicular e dependente de transportador ABC, sendo utilizada por peptídeos lipídicos como fator feromonal de leveduras ou proteínas aciladas como proteína B de superfície acilada hidrofílica (HASPB) de *Leishmania*. A secreção do tipo III envolve intermediários de transporte vesiculares e é utilizada por interleucina 1 β (IL1 β) via lisossomos secretórios, microvesículas ou MVB, e AcbA, sendo que esta utiliza o autofagossomo secretório (Rabouille *et al*, 2012).

1.4. A secreção de chaperonas moleculares e seu papel fora da célula

Outras chaperonas, como as proteínas de choque térmico (Hsps), proteínas reguladas por glicose (Grp) e calreticulina, antes tidas como exclusivas do citosol ou RE, também têm sido detectadas extracelularmente e regulam processos inflamatórios (Calderwood *et al*, 2007). O acoplamento de biotilação de proteínas de superfície com proteômica tem permitido identificar as chaperonas moleculares (Grps e Hsps) nas superfícies de outros tipos celulares, incluindo neuroblastoma, carcinoma de colon, adenocarcinoma de pulmão, célula B leucêmica e tumoral ovariana. A PDI foi encontrada na superfície celular destes três últimos tipos celulares, enquanto a Bip (Hsp70 do RE ou Grp78) foi presente em todos os tipos celulares, considerado um marcador do fenótipo tumoral (Shin *et al*, 2003). A externalização da Grp78 induzida

por estresse do RE é pela via clássica em células de câncer cervical (HeLa), mas não em células de câncer de colon (HCT-116) (Tsai *et al*, 2015).

Bip e PDI foram encontradas também no lúmen dos folículos tireoideanos. Os autores sugerem que PDI e Bip poderiam exercer papel similar ao do ER e controlar multimerização de tiroglobulina (Delom *et al*, 2001). Calreticulina, também residente no RE, atua extracelularmente no reconhecimento de células apoptóticas e tumorais. Pacientes com doença autoimune têm quantidade aumentada de calreticulina circulante. A sua externalização envolve sua retrotanslocação do RE para citosol durante apoptose e ocorre junto com fosfatidilserina por vias dependentes de S-nitrosotiois e independentes de caspase (Tarr *et al*, 2010).

Já a proteína citosólica Hsp70 é secretada por várias vias: (1) por exossomos e independente de *lipid rafts*, em células mononucleares no estado basal e após choque térmico, (Lancaster *et al*, 2005) e em células endoteliais após tratamento com LDL oxidada e homocisteína (Zhan *et al*, 2009); (2) por lisossomos secretórios e dependente de transportador ABC (Mambula *et al*, 2006). Em todos os estudos acima, foi documentada a independência do Golgi.

Em geral, a externalização/secreção de chaperonas é um mecanismo fisiológico relevante, comum a diferentes tipos celulares. As vias envolvidas no tráfego dessas proteínas parecem ser complexas e dependentes do contexto celular.

1.5. Hipótese

Há evidências de que a pecPDI regula desde função plaquetária, trombose, adesão celular, infecção viral (Essex *et al*, 2009, Jordan *et al*, 2006) e remodelamento constritivo vascular (Tanaka *et al*, 2015- artigo submetido). Apesar de sua importância em inúmeras condições fisio/patológicas, aspectos fundamentais do processo de

externalização da PDI permanecem um enigma (Henderson & Pockley, 2012, Furie & Flaumenhaft, 2014). Entender os mecanismos da rota secretória da PDI é importante para: (1) aprofundamento da compreensão dos efeitos (físio)patológicos da PDI, (2) compreensão de mecanismos importantes em sinalização redox e (3) manipulação da externalização da PDI como importante ferramenta de estudo ou intervenção terapêutica. A externalização da PDI pode envolver a via clássica e/ou não-convencional de secreção de proteínas (Figura 3), embora o fato de a PDI ser uma proteína residente do RE aumenta a probabilidade de sua saída ser dependente do Golgi. O estudo destas rotas requer um minucioso rastreamento sistemático das vias potencialmente envolvidas, o que não foi até o momento realizado.

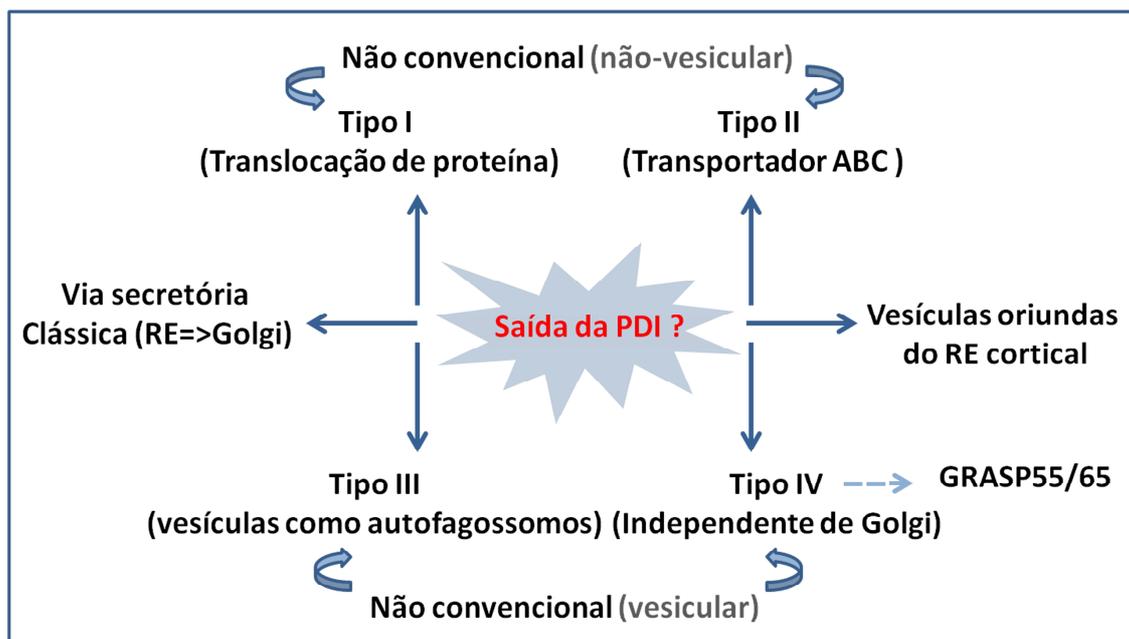


Figura 3. Esquema das possíveis vias pela qual a PDI é externalizada. A PDI pode sair da célula através da via clássica ou através das vias não convencionais do tipo I, II, III ou IV (dependente ou independente de GRASP55/65). A saída da PDI também pode envolver vesículas oriundas do RE cortical

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste estudo é entender mecanismos envolvidos na externalização da PDI, com particular ênfase à investigação de rotas subcelulares desse tráfego, mediante um rastreamento sistemático de possíveis vias secretórias e estímulos específicos.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar se a PDI basal ou estimulada por trombina, PMA ou ATP é externalizada pela via clássica de secreção de proteínas.
- Investigar se o tráfego não-convencional está envolvido na secreção constitutiva da PDI.
- Avaliar o efeito do estresse do RE e choque térmico no tráfego da PDI.
- Desenvolver modelo(s) in vitro de secreção/translocação da PDI para superfície celular utilizando, em células musculares lisas ou endoteliais, estímulos específicos incluindo: ionóforo cálcico, PMA, trombina, ATP e citocinas (TNF-alfa, TGF-beta).

3. Métodos

3.1. Isolamento da célula muscular lisa de coelho/rato

As células musculares lisas foram isoladas da aorta de coelhos machos albinos da raça New Zealand com peso aproximado de 3,0 kg ou de ratos Wistar machos com 250-300g. A aorta foi removida após sacrifício dos animais com CO₂, e então colocada em PBS com antibióticos (penicilina e estreptomicina) a 4°C. Posteriormente, restos de outros tecidos e a camada adventícia externa visível foram retirados com bisturi. No fluxo laminar, a aorta passou por lavagem em PBS com antibiótico, seguida de incubação em solução de digestão contendo colagenase IV (1mg/mL), elastase (160 ng/mL) e inibidor de tripsina (0,375 mg/mL) diluídos em DMEM com antibióticos a 37°C por 1,5h. Após esse período, a aorta foi lavada e cortada transversalmente, expondo o lúmen do vaso. Em seguida, a camada endotelial foi removida cuidadosamente com o auxílio do bisturi. A aorta foi fragmentada em quadrados de aproximadamente 0.5 cm e quatro a cinco pedaços foram colocados em cada poço (placa de 6 poços), previamente tratado com gelatina 0.1% e riscado com lâmina estéril para aumentar adesão. Cada fragmento de aorta ficou com uma gota de DMEM com antibióticos e 10% soro fetal bovino (SFB) por 4-5h em estufa de 5% CO₂ a 37°C. Foi adicionado mais DMEM com 10% SFB até todos os fragmentos estivessem cobertos, com cuidado para que os fragmentos não ficassem suspensos. A adição de meio com SFB foi feita todos os dias de acordo com a necessidade, tomando-se cuidado para que os fragmentos não descolassem. Após 6-7 dias, o fragmento foi removido e as células cresceram por 1-2 dias. Quando a placa estava confluenta, foi realizada a primeira passagem das células musculares lisas vasculares (VSMCs), sendo utilizada até a quarta passagem.

3.2. Modelo de indução de translocação/secreção da PDI

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC), imortalizadas espontaneamente por passagens sucessivas, foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB) contendo os antibióticos sulfato de estreptomicina (100 mg/L) e ampicilina (25 mg/L). Para subcultura, células foram lavadas com PBS (NaCl 140 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ anidro; KH₂PO₄ 1,5 mM; pH 7,4), tratadas com tripsina e após se destacarem da placa, ressuspendidas em meio de cultura com 10% de SFB para então serem distribuídas em garrafas ou placas, as quais foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células plaqueadas de acordo com o tipo de avaliação ao qual serão submetidas, como explicada em detalhe abaixo, serão cultivadas por 24h em DMEM (VSMC linhagem/primária) e RPMI (HUVEC) contendo 10% soro fetal bovino (SFB). Os estímulos serão adicionados em meio sem SFB nas concentrações e pelos tempos indicados nas legendas das figuras. No caso da PDI solúvel no sobrenadante, 2,5x10⁶ HUVEC foram dispensadas em placas de 100 mm (Corning) e a PDI foi isolada por centrifugação utilizando filtro Centricon de 10kDa (ultracell YM-10; Millipore). Após concentrado, o meio condicionado (CM) foi estocado a -80°C e utilizado quando necessário. Para o choque térmico, placas de cultura foram seladas com *parafilm* e posicionadas em banho-maria ajustado para 42°C (±0,1°C), por 1h, de forma que apenas o fundo da placa fosse coberto por água. CM foi coletado logo após o choque térmico ou após as células retornarem para estufa para recuperação do choque térmico, conforme indicado na legenda. Os seguintes compostos foram utilizados na concentração e tempos indicados: CHX (d'Alessio *et al*, 1998 e Barry *et al*, 1997), TNF- α (Yang *et al*, 2005), tunicamicina (Zemskov *et al*, 2011), BAPTA-AM (Kaczmarek *et al*, 2005), filipina e nistatina (Greene & Gao, 2009),

dynasore (Kawamoto et al 2012), PitStop 2 (Gourlaouen *et al*, 2013), A23187, forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e trombina (Jasuja *et al*, 2010).

3.3. Inibição das rotas de secreção convencional e não-convencional

Os seguintes compostos foram utilizados nas concentrações e tempos indicados: BFA (Tellier *et al*, 2007), Noc (Di Pietro *et al*, 2006), Cyt D (d'Alessio *et al*, 1998), Mon, SC, Neomicina e NEM (Zemskov *et al*, 2011), bafilomicina (Zemskov *et al*, 2011, Horie *et al*, 2000), methy, gliburide, DNP (Rubartelli *et al*, 1990, Morgan 1992).

3.4. Ensaio de secreção de fibrilina-1

Fibroblastos embrionário de camundongos (MEFs, 2×10^5 células) foram cultivados por 24h (placa de 6 poços) em meio com SFB, e submetidos a duas lavagens com PBS e incubação com 1mL de meio sem SFB (controle) ou com 1mL de meio sem SFB contendo BFA $10 \mu\text{M}$ por 4,5h. Após esse período, o meio condicionado foi coletado e centrifugado a 3000g por 10min a 4°C para remoção de células/debris. O sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C até o uso. O dot-blot foi realizado com 200 μL de cada amostra em membrana de nitrocelulose, seguido de bloqueio com 5% de leite desnatado por 1h sob agitação. As membranas foram incubadas 15h-18h com 1:1000 em TBS-T de anti-fibrilina-1 (gentilmente doado pela Profa. Lynn Sakai, da Oregon Health and Science University). Posteriormente, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (diluído 1:2000 em 3% de leite em TBS-T) por 2h a 25°C . A revelação foi feita por método quimioluminescente (peroxidase- H_2O_2 -luminol) com o kit ECL (Amersham).

3.5. Microscopia de fluorescência da célula muscular lisa (VSMC) e célula endotelial da veia umbilical humana (HUVEC)

As células RASMC ($1,5 \times 10^4$ células), VSCM ($1,5 \times 10^4$ células) ou HUVEC (3×10^4 células) foram plaqueadas em lamínulas de vidro (em placa de 24 poços) e após estímulos específicos, fixadas em paraformaldeído 4% por 20min a 25°C. Após fixação, as células foram lavadas com PBS por duas vezes e permeabilizadas (quando pertinente) com Nonidet P40 (NP-40) 0.1% por 0,5h a 37°C. O bloqueio foi feito com BSA 2% em PBS por 0,5h a 37°C. As lamínulas de vidro foram transferidas para câmara úmida (placa contendo papel de filtro molhado e Parafilm®). Os anticorpos primários 1:200 (diluídos em BSA 1% em PBS) e o *Alexa Fluor^R 635 phalloidin* (quando indicado) foram incubados durante a noite, e em seguida foram realizadas três lavagens com BSA 1%. Após incubação com anticorpos secundários *Alexa Fluor^R 488 goat anti-rabbit* ou *Alexa Fluor^R 546 goat anti-mouse* 1:200, Hoechst 1:200 ou DAPI 1:300 (marcadores do núcleo) por 1,5h à temperatura ambiente (protegido da luz), as lamínulas foram montadas nas lâminas de microscopia em glicerol: PBS (2:1) e guardadas a 4°C até análise em microscópio confocal a laser (Zeiss LSM510 Meta).

3.6. Dosagem de proteínas na membrana plasmática de VSMC e HUVEC

As proteínas da superfície das RASMC/VSMC subconfluentes ($3,5 \times 10^5$ células) e HUVEC (4×10^5 células) em placa de 15x60mm antes e após estímulos foram biotiniladas com EZ-Link sulfo-NHS [(N-hidroxisuccinimido)-biotina] (Thermo Scientific) em PBS por 1h a 4°C para marcar amino-grupos. A reação foi interrompida com 50mM Tris/HCl (pH=7.5) por 10min a 4°C. No caso da marcação para tióis livres, células foram incubadas com MPB [3-(N-maleimido-propionil) biocitina; Molecular Probes]; a reação foi interrompida com GSH 200µM a 4°C por 20min, seguido de

iodoacetamida 400 μ M por 5min a 4°C. Posteriormente, as células foram lisadas em tampão de lise (50mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 150mM NaCl) contendo inibidores de protease ([leupeptina (1:100), aprotinina (1:100), PMSF (*phenylmethane-sulfonylfluoride*, 1:50)]) por 10min a 4°C. As células foram removidas (com espátula) das placas e transferidas para tubo eppendorf de 1,5mL e após 50min de lise a 4°C foram incubadas com 150 μ L de *beads* magnéticas (2mg/mL) conjugadas a streptavidina por 15h a 4°C. Posteriormente, as *beads* foram lavadas e incubadas com tampão de amostra por 30min a 25°C e depois fervidas por 5min, submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (30mA/gel por 1,5h). As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (100mA por 1h), seguido de bloqueio da membrana por 1h com 5% leite desnatado. As membranas foram incubadas a 4°C por 15-18h com anticorpo primário anti-PDI ABR e em seguida lavadas três vezes com TBS-T (Tris 10mM, NaCl 150mM, tween 0,1%) e incubadas com o anticorpo fluorescente *donkey anti-mouse* IRDye^R 800 CW por 1h sob agitação a 25°C. Após três lavagens com TBS-T, procedeu-se à revelação no equipamento Odyssey (LI-COR). Posteriormente, as membranas foram incubadas com anti-Biotina-HRP (peroxidase) e incubadas a 4°C por 15-18h, seguido de três lavagens com TBS-T e revelação pela reação de quimiluminescência.

3.7. Perda de função da GRASP55 por RNA de interferência

HUVEC (2×10^6 células) foram ressuspensas em 100 μ L do reagente de transfecção AMAXA Cell line Nucleofactor kit V (Lonza, cat# VCA-1003) com 500 nM de siRNA para GRASP55 (CAGAGCUGGUUUGGAGCCUUUCUUU/AAAGAAAGGCUCCAAACCAGCUCUG) ou sequência embaralhada (CAGGUCUUGGGUCGAUUCUAGUUU/AAACUAGGAAUCGACCCAAGACCU

G) (Invitrogen), submetidas a eletroporação no aparelho Nucleofector™ Device utilizando-se o programa A-034.

3.8. Tabela de anticorpos utilizados

Anticorpo	Classe	Origem	Clone	Fabricante	Imunógeno
anti-PDI	Monoclonal	Camundongo	RL90	Affinity Bioreagents/ Thermo scientific	PDI de rato
anti-PDI	Monoclonal	Camundongo	1D3	Stressgen/ Enzo life science	C-terminal da PDI de rato (499-509)
anti-PDI	Policlonal	Coelho	-	Stressgen/ Enzo life science	PDI de fígado bovino
Anti-Erp57	Policlonal	Coelho	-	Enzo life science	Erp57 nativa de fígado de rato
Anti-Erp72	Policlonal	Coelho	-	Abcam	Aminoácidos 623-638 de Erp72 de camundongo
Anti-Grp78	Policlonal	Coelho	-	Abcam	C-terminal da Grp78 de camundongo.
Anti- Golgina 97	Monoclonal	Camundongo	CDF4	Invitrogen	Não descrito
Anti-GM130	Monoclonal	Camundongo	35/GM 130	BD Transduction Laboratories	GM130 de rato aa. 869- 982
,Anti-KDEL	Monoclonal	Camundongo	10C3	Enzo Life Science	Peptídeo sintético do a.a 649-654 (S ⁶⁴⁹ EKDEL ⁶⁵ ⁴) da Grp78 de rato.
Anti-beta actina	Monoclonal	Camundongo	AC-74	Sigma	N-terminal da isoforma β da actina

Anti-tubulina	Monoclonal	Coelho	EP1332 Y	Abcam	Peptídeo sintético do N-terminal da tubulina
Anti- Hsp70	Monoclonal	Camundongo	3A3	Thermo scientific	a.a 504-617 Hsp70 humana recombinante
Anti-GORASP2 (GRASP55)	Policlonal	Coelho	-	Abcam	C-terminal a.a 392-441
Anti-Biotina HRP	Monoclonal	Camundongo	BN-34	Sigma	Biotinilado KLH.

3.9. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo

Após incubação das células (6×10^4 células /poço, placa de 12 poços) com os estímulos investigados, estas foram descoladas com 250 μ L de tripsina/poço a 37°C durante 3-5min. A proteólise foi interrompida com adição de 500 μ L de meio a 4°C e todo meio presente no poço foi coletado em tubo eppendorf e centrifugado a 1600 rpm por 8min a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com 900 μ L de PBS a 4°C. Para a marcação de morte celular, as células foram ressuspensas em 30 μ L de anexina V (Invitrogen/Molecular Probes) 1:20 em tampão de ligação e incubadas no escuro por 15min a 25°C. Após a incubação, as células foram ressuspensas em 140 μ L de tampão de ligação para anexina V e foi adicionado 20 μ L de iodeto de propídio (1mg/ml em PBS) diretamente na placa, seguido de leitura no citômetro.

3.10. Avaliação da morte celular por atividade da lactato desidrogenase

Medidas da atividade de desidrogenase láctica (LDH) no meio condicionado foram realizadas utilizando os kits *Cytotoxicity Detection Kit* (Roche), seguindo os procedimentos recomendado pelo fabricante. A atividade percentual foi calculada em relação ao valor da atividade de LDH do lisado de HUVEC ($2,5 \times 10^6$ células) preparado

a partir da incubação das células com 5mL meio sem SFB (volume utilizados nos ensaios) com 2% triton X-100, conforme recomendação do fabricante.

3.11. Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), exceto quando especificado. Utilizando o software GraphPad Prism 5.0, foram realizados: 1) análise de variância de uma via (ANOVA) com teste pós teste Newman-Keuls, para comparações entre 3 ou mais grupos; 2) teste t pareado, para as comparações entre 2 dados na mesma amostra. Em ambos os casos, o nível de significância foi 0,05.

4. Resultados

4.1. Investigação do envolvimento da rota de secreção clássica na externalização da PDI em células endoteliais

Como descrito anteriormente, a PDI humana tem uma sequência N-terminal de endereçamento para o RE. Proteínas solúveis residentes do RE, como a PDI, que possuem no C-terminal a sequência KDEL (sinal de recuperação do RE), são reconhecidas no compartimento intermediário RE-Golgi (ERGIC) ou no complexo de Golgi pelo receptor KDEL e recicladas de volta para o RE (Wilkinson & Gilbert, 2004, Dancourt *et al*, 2010). O receptor KDEL é localizado no RE, ERGIC e no cis-Golgi (Capitani & Sallese, 2009) e sua afinidade à sequência KDEL é favorecida em pH mais ácido como encontrado no Golgi (pH~ 6,4), enquanto no RE (pH~ 7.2) essa interação é desfavorecida, permitindo assim que proteínas que interagiram no Golgi sejam liberadas no RE (Dancourt & Barlowe, 2010).

Esse estágio da PDI no complexo de Golgi levanta a possibilidade de que sua externalização ocorra através da via clássica de secreção de proteínas. No entanto, não encontramos na literatura nenhuma evidência (imunofluorescência, por exemplo) da PDI no complexo de Golgi. A Figura 4A mostra a marcação usual da PDI condizente com predominância do perfil de retículo endoplasmático e também comprova a presença de um pool de PDI no mesmo compartimento onde se encontra o marcador de cis-Golgi, GM130.

A principal rota de saída da célula utilizada pelas proteínas que se renovam no RE é a via RE-Golgi (Lee *et al*, 2004) e dois tradicionais inibidores desta via são: a Brefeldina A (BFA) e a Monensina (Misumi *et al*, 1986). A brefeldina A é um metabólito de fungo que inibe recrutamento de COP-I (*coatmer protein complex I*) pelo fator de ribosilação de ADP (ARF) via estabilização do complexo ARF-ADP-GEF (fator de troca de nucleotídeo guanina de ARF), impedindo assim a ativação da ARF

por GTP. Como o principal responsável pelo transporte anterógrado RE-Golgi é COP-I, a presença de BFA promove bloqueio da saída de proteínas do RE e esse fenômeno é seguido pela fusão do complexo de Golgi com RE e bloqueio total da secreção (Barzilay *et al*, 2005, Grieve *et al*, 2011). Já a monensina (Mon) é um ionóforo catiônico (H^+/Na^+) que mantém a integridade do complexo de Golgi, mas aumenta o pH desse compartimento, e conseqüentemente bloqueia o tráfego Golgi-Membrana plasmática (Barzilay *et al*, 2005).

O tratamento da HUVEC com BFA leva GM130 (marcador de cis-Golgi) e golgina 97 (marcador do trans-Golgi) deixar sua distribuição característica perinuclear para uma distribuição difusa, indicando colapso do complexo de Golgi (Figura 4A e B). Condizente com essa evidência morfológica de eficiência da BFA nessas condições experimentais, a secreção de fibrilina-1 (uma proteína de matriz extracelular) por MEF foi abolida (redução de 77%) após tratamento com BFA (Figura 4C). A monensina, por sua vez, foi capaz de inibir 43% da secreção de fibrilina-1 (Figura 4C). O tempo de exposição e o mecanismo de ação de cada inibidor justifica essa diferença. A monensina, ao contrário da BFA, não rompe o Golgi, mas causa dilatação do mesmo, com retenção da fibrilina-1 (Meirelles *et al*, 2015- artigo submetido).

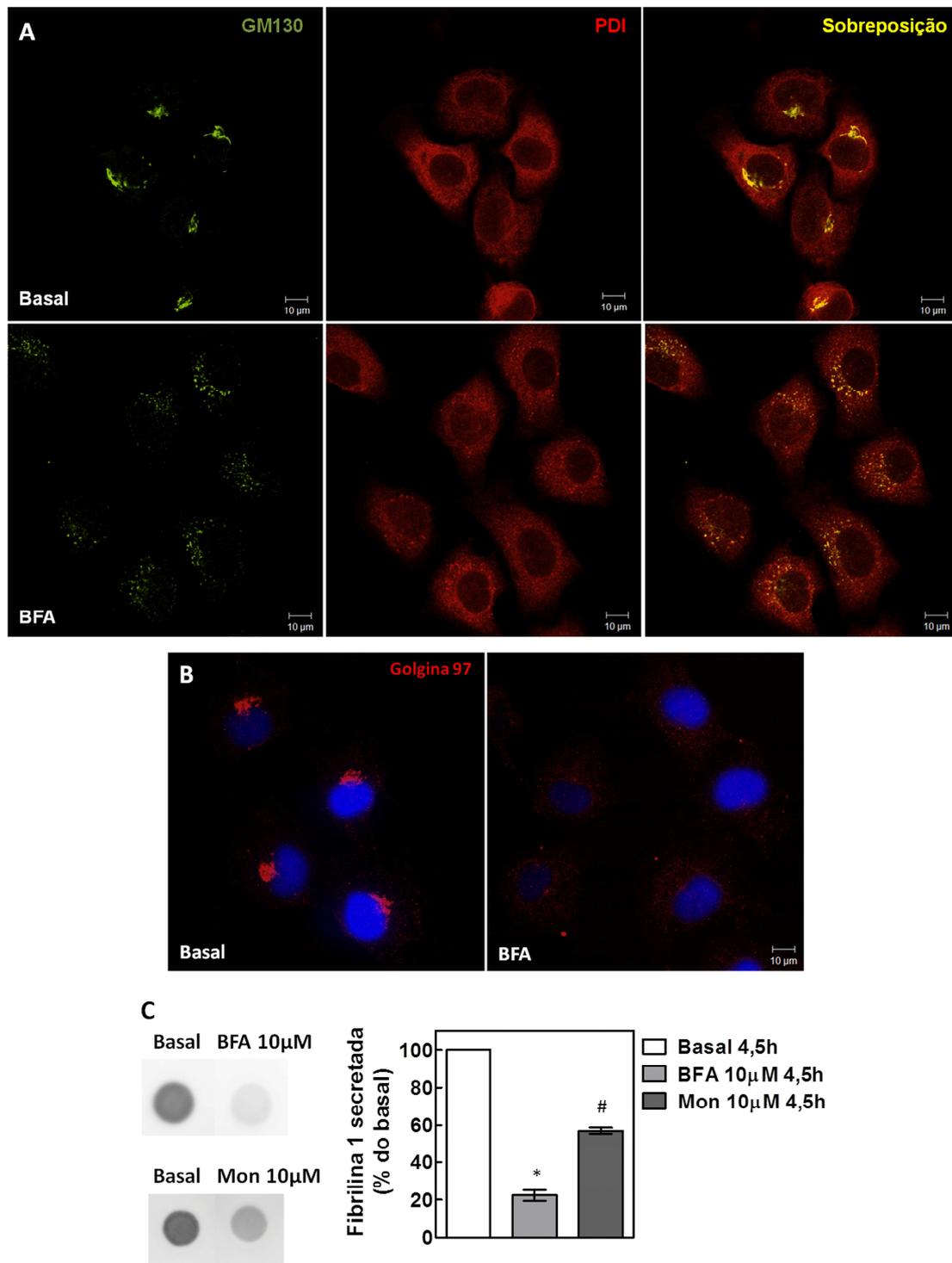


Figura 4. Efeito da brefeldina A (BFA) no Golgi e na distribuição intracelular da PDI. A HUVEC foi incubada por 4,5h com BFA 10 μ M. As micrografias são representativas da imunofluorescência indireta das células *permeabilizadas* com NP-40 utilizando (A) anti-GM130 e anti-PDI e (B) anti-golgi 97, n=2. (C) O meio condicionado de MEFs tratados com BFA ou Mon 10 μ M por 4,5h investigado por *dot blot* como descrito na metodologia foi marcado com anti-fibrilina-1. As barras representam média \pm erro padrão (n=3) da densitometria do *dot blot*. Com (* e #) p < 0,05 em relação ao controle (ANOVA com pós teste Newman-Keuls).

Análise da cinética de ação da BFA 10 μ M mostra que esse inibidor é capaz de promover a difusão do marcador de cis-Golgi (anti-GM130) com apenas 0,25h (15min). Este efeito drástico na alteração da marcação perinuclear do complexo de Golgi permaneceu após um período de 4,5h (Figura 5). O rompimento da estrutura do Golgi, bem como a absorção de membranas do complexo de Golgi dentro do RE é observado também em outros tipos celulares (Grieve *et al*, 2011).

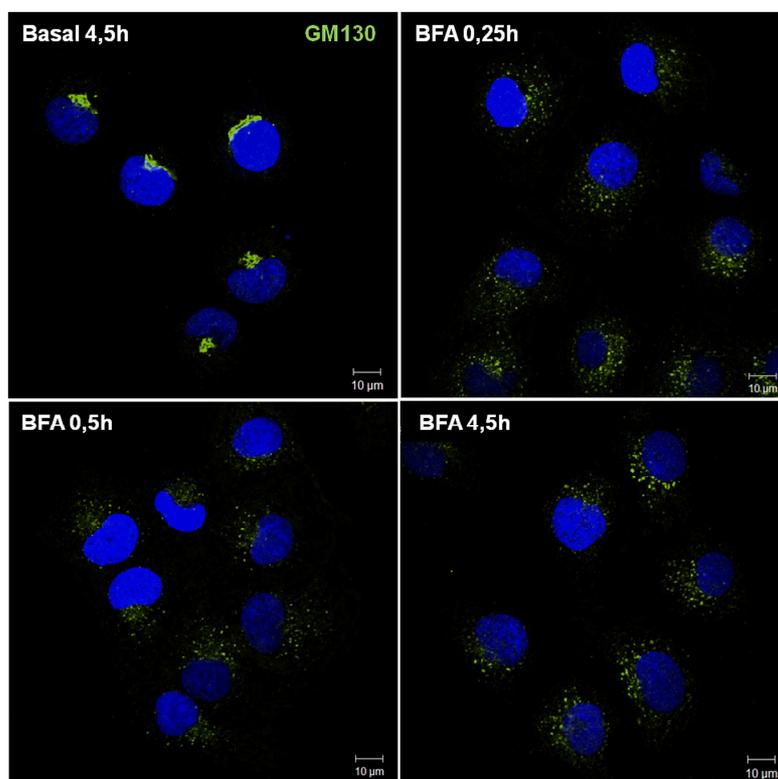


Figura 5. Cinética de ação da Brefeldina A. HUVECs foram incubadas por 0,25h (n=2), 0,5h (n=2) e 4,5h (n=3) com BFA 10 μ M. As micrografias são representativas da imunofluorescência indireta das células permeabilizadas utilizando anti-GM130.

Confirmada a funcionalidade desses inibidores, o passo seguinte foi validar uma técnica sensível e reproduzível para quantificar a PDI na superfície celular. A biotilação de proteínas é uma técnica bastante utilizada e sob vários aspectos o padrão de referência para quantificar proteínas de superfície (Gee *et al*, 2011, Scheurer *et al*, 2005, Shin *et al*, 2003, Zemskov *et al*, 2011), inclusive chaperonas oriundas do RE

como calnexina, calreticulina, BIP, Grp94 (Okazaki *et al*, 2000, Wiest *et al*, 1997, Robert *et al*, 1999, Xiao *et al*, 1999) e PDI (Ahamed *et al*, 2006, Burgess *et al*, 2000, Hahm *et al*, 2013, Hotchkiss *et al*, 1998, Söderberg *et al*, 2013, Willems *et al*, 2010, Xiao *et al*, 1999). Padronizamos essa técnica no laboratório com alteração no protocolo original (Willems *et al*, 2010).

A PDI foi facilmente detectada na superfície celular assim como trombomodulina, um receptor específico de célula endotelial que se liga a trombina (Figura 6A). A presença da PDI na superfície celular foi confirmada com experimentos de proteólise da superfície celular com Pronase (uma mistura com no mínimo três atividades proteolíticas incluindo serino-proteases). A PDI foi removida da superfície celular após tratamento com Pronase (Figura 6B, Basal *vs* Pronase). A recuperação parcial da expressão da PDI de superfície foi observada após relaxação (Relax) já após 5,5h, mostrando uma auto-regulação eficiente e relativamente rápida da PDI de superfície (Figura 6B). Estes ensaios apresentaram dificuldades técnicas significativas, principalmente a suscetibilidade ao descolamento em uma fração das células tratadas com Pronase, durante ensaio de biotinição. Além disso, os inibidores poderiam adicionar complexidade maior ao ensaio. Desta forma, optamos por não prosseguir com esses ensaios de re-expressão da PDI de superfície.

O estado redox da PDI é essencial para sua função (Laurindo *et al*, 2014) e foi avaliado através de ensaio de biotinição de proteínas de superfície com MPB. Em concordância com resultados prévios da literatura (Swiatkowska *et al*, 2008), nossos dados indicam presença de PDI reduzida na superfície da célula endotelial (Figura 6C, Basal). Uma curta exposição à diamida é capaz de oxidar uma fração importante da PDI de superfície, como mostrado pela diminuição na quantidade de tiol livre na PDI de superfície após o tratamento (Figura 6C, Diamida). Esses dados em conjunto

contribuem para validar a técnica de biotinição de proteínas de superfície utilizada em nosso estudo. Além disso, sugerem o papel da PDI na isomerização e redução de pontes dissulfeto na superfície celular, pois para realizar tais funções a PDI deve estar reduzida. De fato, vários substratos foram reduzidos ou isomerizados por pecPDI, como descrito na Introdução.

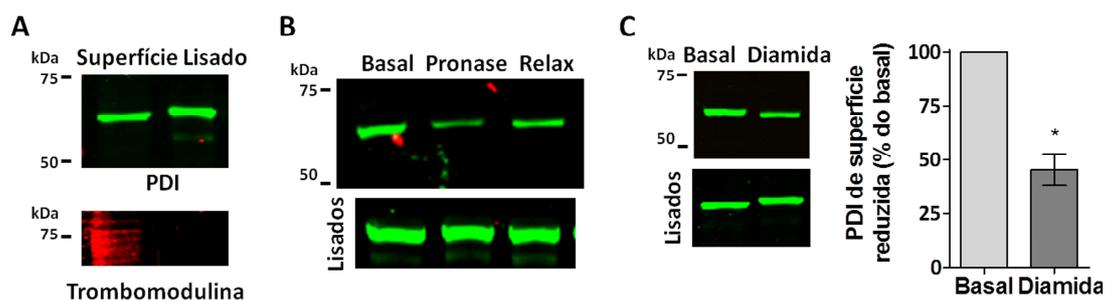


Figura 6. PDI de superfície celular total e reduzida, detectada por biotinição de proteínas de superfície. (A) HUVECs foram incubadas por 4,5h em meio sem SFB, seguida de biotinição na superfície e western blot com anti-PDI (ABR) e anti-trombomodulina (n=3) na mesma membrana. (B) HUVECs foram incubadas por 1h com 10% SFB e posteriormente por 4,5h em meio sem SFB (Basal), tratadas com Pronase 0,02mg/ml por 7 min (Pronase) ou tratadas com Pronase seguida da incubação por 1h com 10% SFB e posteriormente por 4,5h sem SFB (Relax), n=2. (C) HUVECs foram incubadas por 1h em meio sem SFB e tratadas ou não (Basal) com diamida 0,1mM nos últimos 15 min. Após o tratamento, as células foram submetidas a ensaio de biotinição de proteínas reduzidas com MPB, conforme descrito na metodologia. Barras representam média \pm erro padrão (n=3) com (*) $p < 0,05$ em relação ao Basal (teste t).

O próximo passo foi investigar se a PDI de superfície celular é externalizada pela via clássica de secreção. Um aumento de 32% na quantidade de PDI na superfície foi observado após tratamento com Brefeldina 5 μ M (BFA 5 μ M), enquanto diminuições significativas de 24% e 25% ocorreram com BFA 10 μ M e Monensina 10 μ M (Mon 10 μ M), respectivamente (Figura 7A e B). Uma redução significativa média de 49% da PDI de superfície foi observada com Mon 5 μ M (Figura 7A e B). O western blot da PDI intracelular (lisados) comprova que as diferenças encontradas na superfície celular não são devidas a diferentes quantidades de células (Figura 7A, painel inferior). Além disso,

a presença de inúmeras proteínas biotiniladas em todas as amostras (Figura 7C) comprova a eficácia do protocolo de biotinilação de proteínas de superfície.

Como esperado, os efeitos da Mon e BFA não foram específicos para a PDI, sendo observados para outras proteínas, como mostrado à Figura 7C. Esse resultado também indica que os inibidores são funcionais e que a biotinilação possui sensibilidade para essa avaliação. Outro controle importante é que o lisado (sobrenadante após a remoção das *beads* magnéticas) não tem marcação, indicando que a vasta maioria das proteínas de superfície foram captadas pelas *beads* (Figura 7C). Ainda, para investigar a hipótese da saída da PDI pela via ER-Golgi, realizamos a incubação com BFA por longo período de tempo (Figura 7D), no qual as células mantiveram morfologia normal. A inibição do tráfego RE-Golgi-Membrana plasmática não promoveu redução, mas, ao contrário, aumento significativo da PDI de superfície celular em 44% (Figura 7 D e E), confirmando assim que a via clássica não é predominante. Experimentos por citometria de fluxo indicam que a morte celular não foi aumentada após tratamento com BFA ou Mon comparado ao basal (Figura 7F) reforçando o efeito específico dos inibidores na via secretória investigada.

Estes resultados mostram que a externalização da PDI de superfície pela via clássica é possível e de fato, ocorre para pelo menos *ca.* 1/4 da PDI em célula endotelial (Figura 7A e B). No entanto, nossos dados sugerem que essa não é a rota majoritária para a externalização da PDI basal.

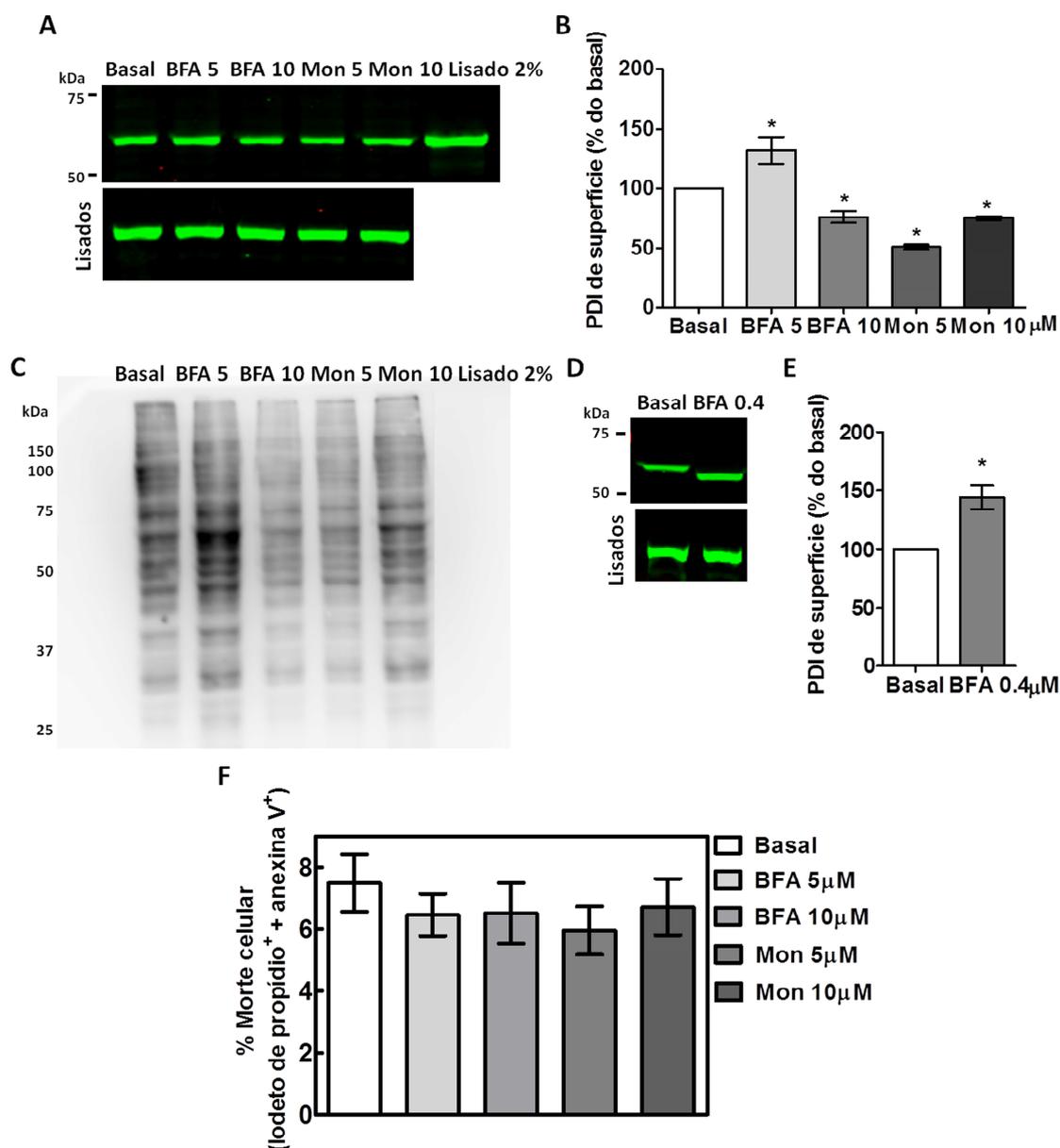


Figura 7. PDI de superfície celular detectada por biotinição de proteínas de superfície. (A) HUVECs foram incubadas por 4,5h com BFA e Mon 5 ou 10 µM, seguido de biotinição na superfície e western blot com anti-PDI (ABR). A última banda é 2% do lisado controle. (B) Quantificação da PDI de superfície celular de A. Barras representam média ± erro padrão (n=3) com (*) $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com pós teste Newman-keuls). (C) A membrana superior do painel (A) foi incubada com anticorpo anti-biotina-HRP. (D) HUVEC foi incubada com BFA 0,4µM por 15h40' seguida de biotinição na superfície e western blot com anti-PDI ABR. (E) Quantificação do painel superior em (D) com barras representando média ± erro padrão (n=3) com (*) $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado). (F) Viabilidade celular de HUVEC tratadas ou não com BFA ou Mon por 4,5h, medida por citometria de fluxo, evidenciando apoptose (anexina V) e necrose (iodeto de propídio) (n=3). Barras representam média±erro padrão (n=3) com $p > 0,05$ para todos os grupos (ANOVA com pós teste Newman-keuls).

Esse dado de biotilação foi confirmado com ensaios de imunofluorescência confocal em células não permeabilizadas, nos quais foi observado que BFA 10 μ M e Monensina 5 ou 10 μ M promovem uma redução visível na quantidade PDI de superfície celular (Figura 8). É importante ressaltar que os controles negativos somente com anticorpos secundários foram devidamente realizados em todas as imagens de confocal presentes nesta tese.

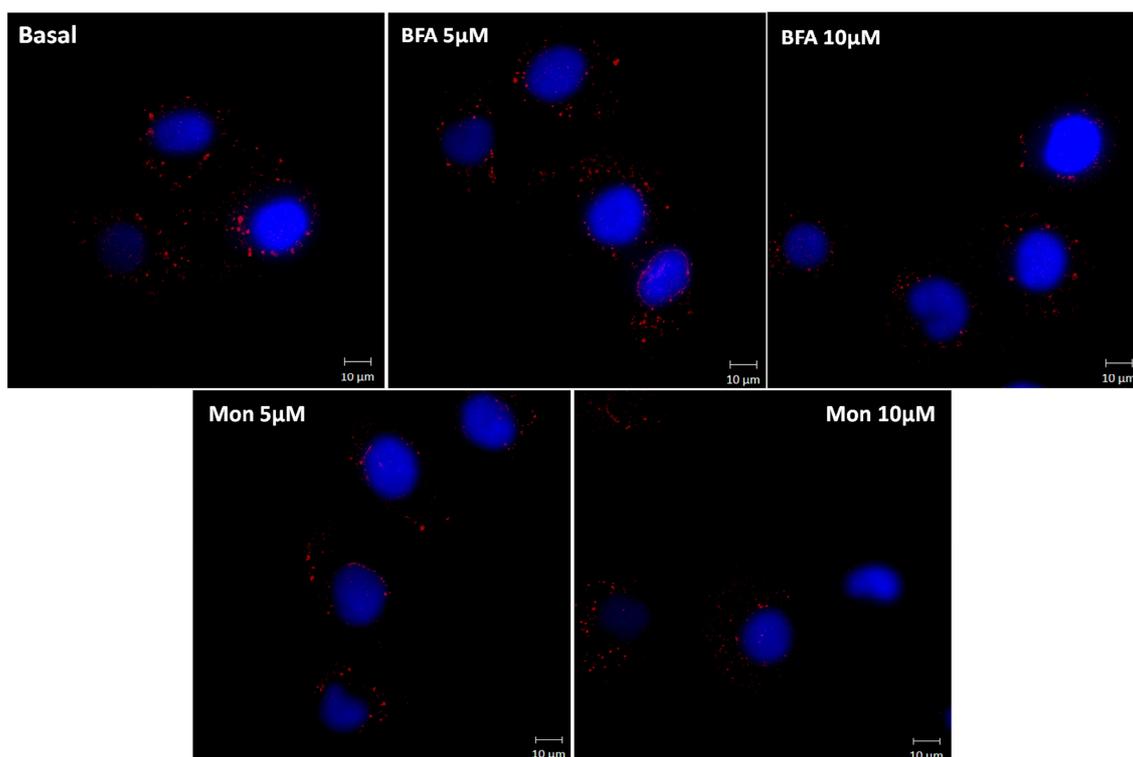


Figura 8. Efeito de BFA e Mon na externalização da PDI. HUVECs foram incubadas por 4,5h com BFA 5, 10 μ M e Mon 5 ou 10 μ M, como descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=4) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (Stressgen).

Uma investigação minuciosa da externalização da pecPDI requer a análise do tráfego dos outros *pools* de PDI existente nas células, a saber, PDI secretada solúvel no meio condicionado (CM) ou presente em micropartículas, e possivelmente um pool de PDI transmembrana. Quanto à última, embora a PDIA1 não seja de fato conhecida como transmembrana (Cho, 2013), confirmamos essa informação submetendo a

sequência da PDIA1 humana (P07237) à análise pelo TMpred, que é um programa de predição de sequência e orientação transmembrana baseado no banco de dados de proteínas constitutivamente proteínas transmembranas. Dessa forma, seguimos analisando a presença da PDI solúvel e presente em micropartículas por ensaios em frações concentradas de CM de células endoteliais. A PDI está presente na fração solúvel, mas não de micropartícula (Figura 9A, ABR), definida neste caso como a fração inferior (“*pellet*”) do CM submetido a 100.000 g por 1h (Jasuja *et al*, 2010, Théry *et al*, 2006) indicando que a secreção constitutiva da PDI não é por micropartícula.

Além disso, a PDI na fração solúvel foi também detectada utilizando anticorpo que reconhece C-terminal contendo a sequência KDEL de recuperação do RE (Figura 9 A, SPA891) o que está de acordo com o peso molecular da PDI secretada na condição basal (Figura 9 B). A ausência de β actina na secreção basal de PDI por HUVEC (Figura 9B) indica que a PDI solúvel detectada não é devida à morte celular. Essa é uma forma simples de avaliar se a secreção foi acompanhada de morte celular (principalmente necrose), ou se de fato a proteína é secretada sem a existência de comprometimento da membrana plasmática da célula, o que parece ser o caso. O ionóforo cálcico (A23187), na concentração utilizada, foi um controle positivo para marcação com β actina (Figura 9B) devido a morte celular. A cinética da secreção da PDI mostra que há um aumento dependente do tempo da PDI no CM (Figura 9C). A escolha de 4h como 100% da secreção foi arbitrária, porém justificada pelo tempo utilizado nos ensaios posteriores. Em todos os ensaios os lisados funcionam como controle de carregamento e como garantia de que a mesma quantidade de células foram plaqueadas em todas as placas.

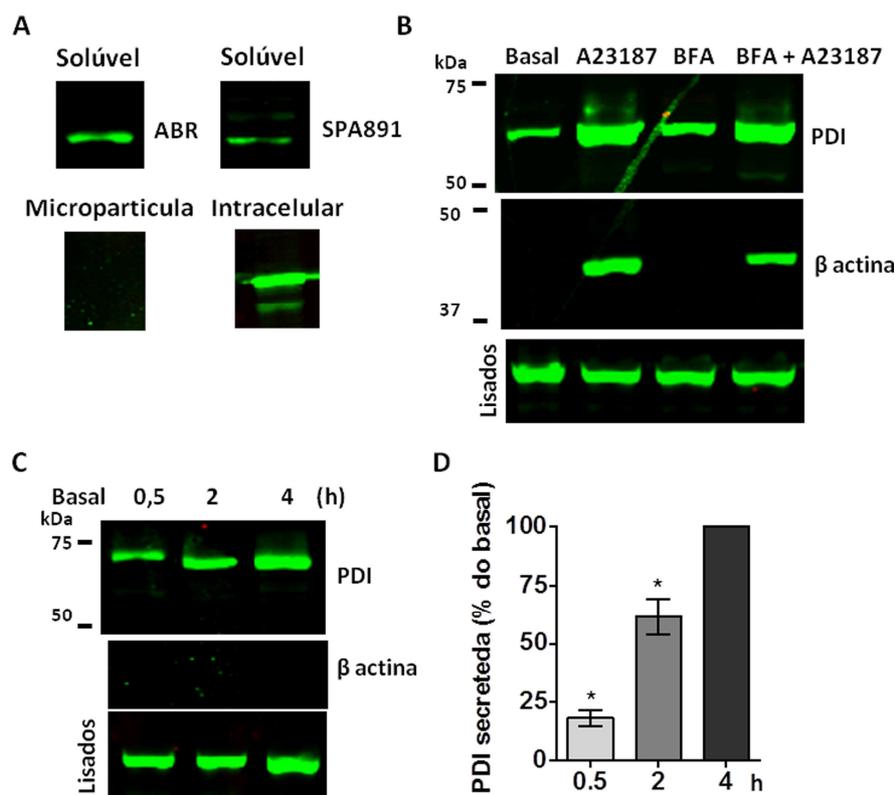


Figura 9. Cinética da secreção de PDI por HUVEC. (A) A fração solúvel e de micropartícula do meio condicionado de HUVEC, e lisado (intracelular) da mesma amostra foram submetidas a western blot seguida de marcação com anti-PDI ABR, exceto a fração solúvel de igual amostra marcada com anti-PDI (Stressgen SPA891) que detecta C-terminal da PDI humana. (B) O CM de HUVEC após 4,5h de incubação em meio sem SFB na ausência ou presença de A23187 1,8 μ M (últimos 30min) ou BFA 10 μ M. Foram realizadas sucessivas marcações da mesma membrana com anti-PDI ABR e com anti- β actina. (C) O CM foi coletado 0,5, 2 e 4 h após incubação de meio sem SFB nas células, seguido de western blot com anti-PDI ABR ou β -actina. (E) Quantificação do painel à esquerda com barras representando média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (ANOVA com pós teste Newman-keuls).

Após a realização de todos os controles, foi investigado se a PDI solúvel no CM seria secretada pela via convencional. O tratamento com BFA ou Mon por 0,5h não afetou a secreção da PDI (Figura 10A). Por outro lado, tratamento das células por 1h (Figura 10B) e por 4,5h (Figura 10C) aumenta de forma significativa a quantidade de PDI solúvel no CM. Não foi possível detectar β actina após tratamento com BFA e Mon nos diferentes tempos (Figura 11). Portanto, a PDI secretada não segue a via clássica de

secreção de proteínas, e o fato de BFA até mesmo estimular a liberação da PDI indica secreção não-convencional do tipo IV. Apenas uma pequena fração da PDI intracelular é externalizada na condição basal, esse valor sendo de $0,83 \pm 0,11\%$ (média \pm erro padrão) para PDI de superfície celular e de $0,43 \pm 0,06\%$ (média \pm erro padrão) para PDI solúvel, com as células incubadas em meio sem SFB por 15h40min e 4h, respectivamente.

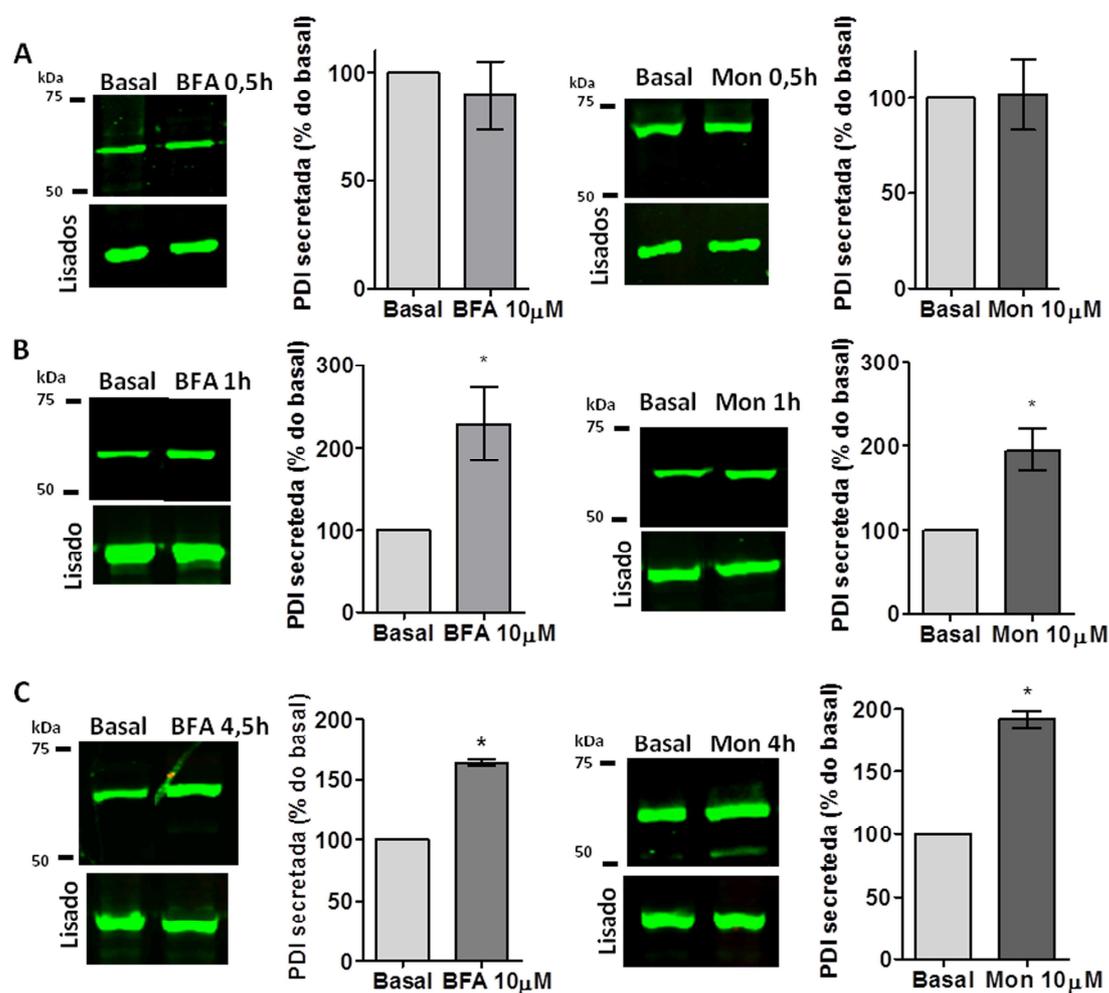


Figura 10. Avaliação de BFA e Mon na secreção da PDI por HUVEC. (A) CM foi coletado por 0,5h, (B) por 1h e (C) por 4,5 h para BFA 10 μ M e 4h para Mon 10 μ M após incubação de meio sem SFB na presença dos inibidores seguido de western blot com anti-PDI ABR. No tempo de 4h ocorreu uma incubação prévia das células por 0,5h com Mon, assim as células foram expostas à Mon por 4,5h. Quantificação dos painéis à esquerda com barras representando média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t).

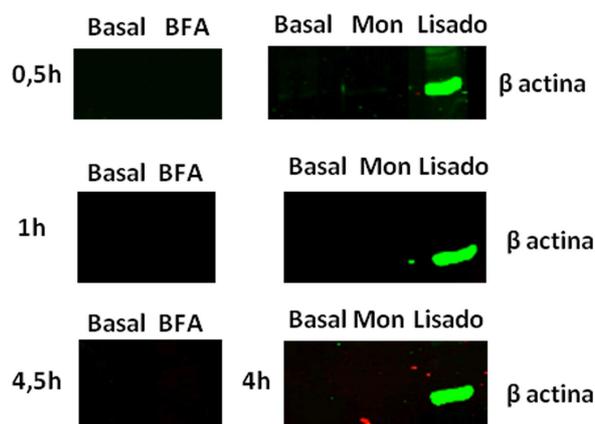


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com BFA e Mon 10 μ M. CMs após tratamentos (Figura 10) foram coletados, seguido de western blot com anti- β actina (n=3).

4.2. O papel do citoesqueleto na rota de externalização da PDI em células

endoteliais

A seguir, investigamos o papel do citoesqueleto na externalização da PDI. O citoesqueleto de actina está envolvido em eventos tardios do transporte de vesículas até a membrana plasmática, mas a actina cortical funciona como uma barreira, dificultando processos de aproximação e fusão de vesículas (Manneville *et al*, 2003). A inibição da polimerização de actina por uma toxina de fungo, citocalasina D (CytD), aumentou em 22,6% a externalização da PDI de superfície celular (Figura 12A, CytD). Um efeito similar foi observado com a PDI solúvel no CM (Figura 12B). Os ensaios de imunofluorescência confocal em células não permeabilizadas corroboram o dado de PDI de superfície celular após tratamento com CytD (Figura 13A). A CytD foi eficaz, visto que foi capaz de romper as fibras de estresse marcadas com faloidina já com 30 minutos de exposição (Figura 13B).

Avaliamos também se microtúbulos seriam importantes para externalização da PDI. O tráfego de vesículas por longas distâncias depende de microtúbulos e é essencial para secreção vesicular de inúmeras citocinas (Stow *et al*, 2013). Para avaliar se esse tipo de transporte ocorre para PDI, incubamos as células com nocodazol (Noc), um

agente despolimerizador de microtúbulo que se liga diretamente à tubulina, alterando sua conformação. O nocodazol aumentou a quantidade de PDI secretada (Figura 12C), mas não alterou a quantidade de PDI de superfície celular (Figura 12D). Nas concentrações e tempo utilizados, nocodazol de fato promoveu desorganização dos microtúbulos já com 15min de exposição, que permaneceu efetiva durante no mínimo 1h (Figura 14). A ausência de inibição da externalização da PDI por nocodazol é uma sugestão adicional de que o tráfego majoritário da PDI não é mediado pela via clássica, já que a integridade dos microtúbulos é essencial para a manutenção da estrutura perinuclear do complexo de Golgi (Di Pietro *et al*, 2006). Esse resultado também sugere que o tráfego vesicular por longas distâncias provavelmente não é utilizado para secreção da PDI.

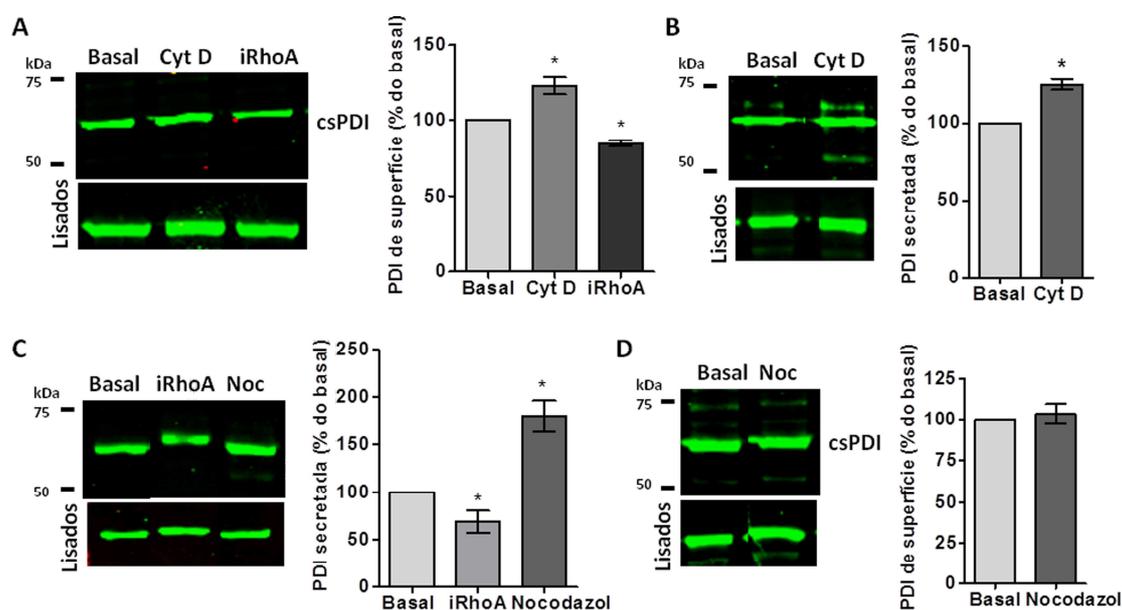


Figura 12. Papel do citoesqueleto de actina e microtúbulos na externalização da PDI. (A e D) HUVECs foram incubadas por 1h com citocalasina D (CytD) 0,5 μ M, inibidor de RhoA (iRho) 1,5 μ g/mL ou nocodazol (Noc) 10 μ M, seguido de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR. (B e C) O meio condicionado foi coletado por 2h de tratamento com Cyt 3 μ M (com incubação prévia por 30 minutos), com iRhoA 4 μ g/mL e Noc 20 μ M. Quantificação do painel superior com barras representando média \pm erro padrão (n=3), com (*) $p < 0,05$ teste t em (B e D) e ANOVA com pós teste Newman-keuls (A e C).

RhoA é um membro da família de Rho GTPase que regula citoesqueleto de actina cortical, induzindo nucleação e alongamento da actina e está envolvido na exocitose, por exemplo, resposta neurosecretória dependente de Ca^{2+} (de Curtis *et al*, 2012). O inibidor de RhoA (iRhoA) promoveu diminuição na PDI de superfície celular (Figura 12A) e PDI secretada (Figura 12C), mostrando papel de RhoA na secreção da PDI. As diferenças observadas acima não foram devido aumento na morte celular após tratamento com os inibidores (Figura 15).

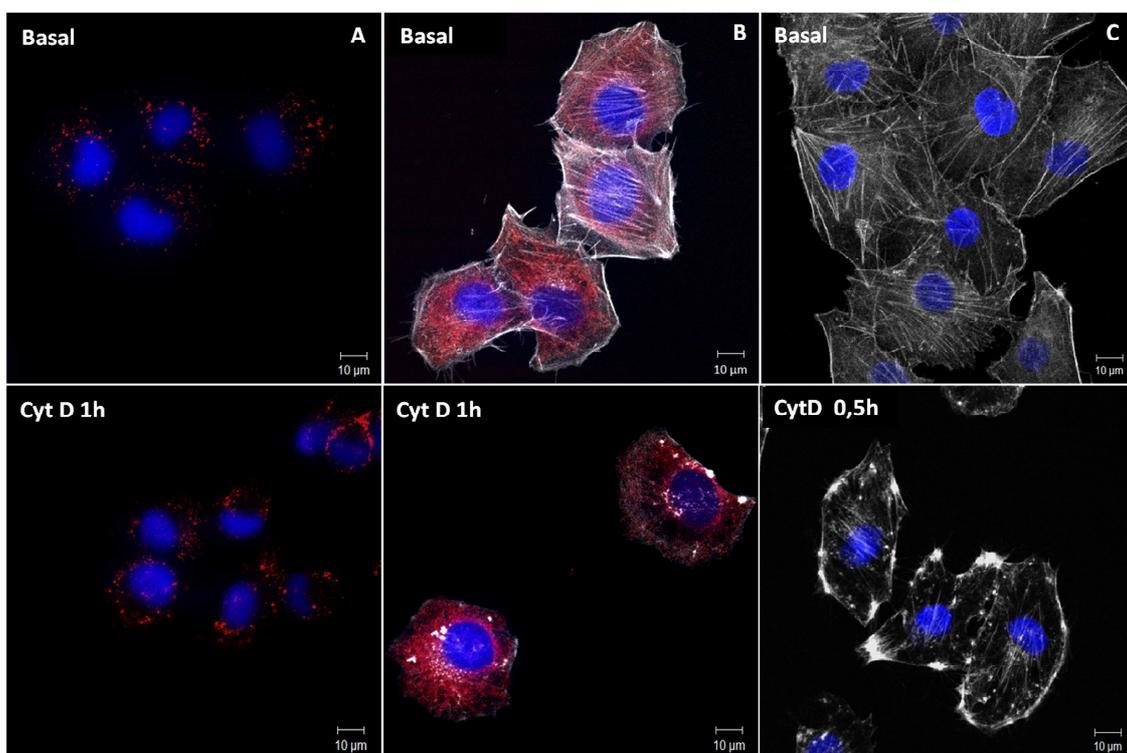


Figura 13. Efeito da citocalasina D (Cyt D) na externalização da PDI. (A) HUVECS foram incubadas por 1h com Cyt D $0.5\mu\text{M}$. As micrografias são representativas ($n=3$) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (StressGen). (B) Similar a (A), exceto que as células foram permeabilizadas com NP-40 e também incubadas com *Alexa Fluor^R 635 phalloidin*. (C) Similar a (B), exceto que o tempo de incubação com CytD foi de 0,5h.

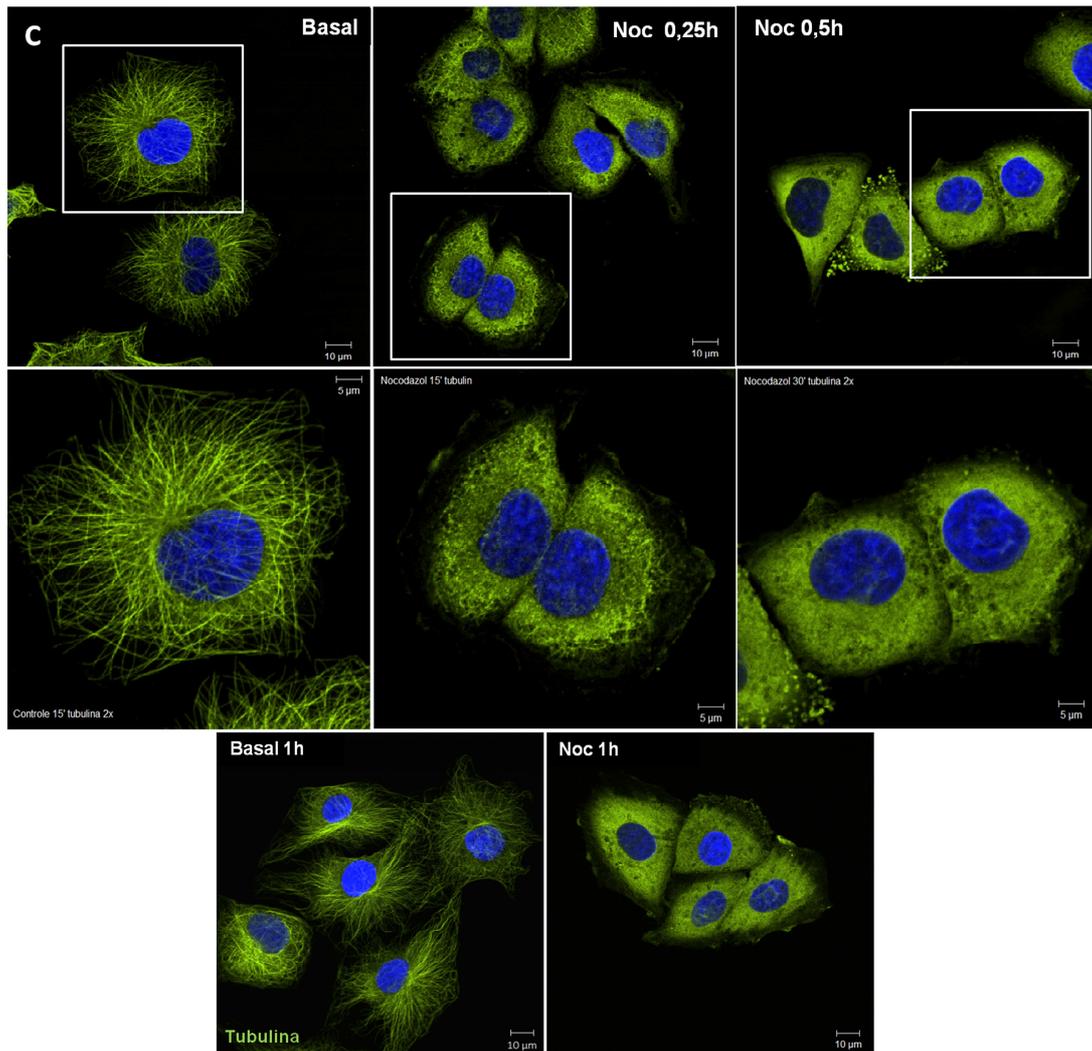


Figura 14. Comprovação do efeito do nocodazol (Noc) 10 μ M na desorganização de microtúbulos. HUVECs foram incubadas por 0,25, 0,5 (n=2) ou 1h (n=3) com nocodazol. As micrografias são representativas da imunofluorescência utilizando o anti-tubulina nas células permeabilizadas.

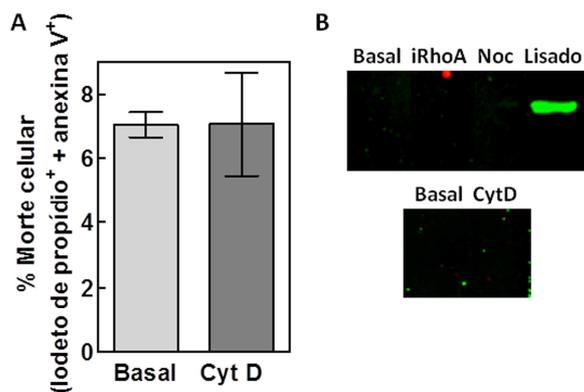


Figura 15. Avaliação da viabilidade celular após tratamento com inibidores do citoesqueleto. (A) Avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo (exps. da Figura 12 A). Barras representam média \pm erro padrão (n=3) com $p > 0,05$ para todos os grupos (teste t pareado). CMs após tratamentos (Exps. da Figura 12B e C) foram coletados, seguido de western blot com anti- β actina (n=3).

4.3. Investigação do papel de rotas não convencionais na externalização da PDI em células endoteliais

Tendo abordado a rota convencional de secreção, investigamos a seguir se a externalização basal da PDI é dependente da secreção não-convencional do tipo I de proteínas (Nickel *et al*, 2009). O clorato de sódio (SC) é um inibidor da biossíntese de proteoglicano heparan sulfato, o qual bloqueia a secreção não-convencional de FGF2 (Zehe *et al*, 2006). O SC aumentou de forma significativa (55%) a quantidade de PDI de superfície celular (Figura 16A), mas não afetou de forma significativa a quantidade de PDI secretada (Figura 16B).

Outro inibidor da externalização pela via não-convencional de proteínas do tipo I é a Neomicina, que sequestra fosfatidilinositol 4,5 difosfato [PI(4,5)P₂], e assim bloqueia a interação de proteínas com fosfoinosítídeos. Por exemplo, neomicina bloqueia a externalização de transglutaminase tecidual em 70% (Zemskov *et al*, 2011). Não houve alteração significativa nos níveis de PDI de superfície celular (Figura 16C) ou PDI secretada (Figura 16D), indicando que a interação com fosfoinosítídeos não ocorre durante tráfego de PDI para fora da célula. O papel do tráfego não-convencional do tipo II também foi avaliado por meio da inibição do transportador ABC com gliburide (Glyb) (Flieger *et al*, 2003, Rabouille *et al*, 2012, Zemskov *et al*, 2011). Glyb não diminuiu de forma significativa a quantidade de PDI de superfície celular (Figura 17A) ou PDI secretada (Figura 17B). Globalmente, esses ensaios sugerem que o tráfego não-convencional (não-vesicular) do tipo I e do tipo II não estão envolvidos na externalização da PDI em células endoteliais. Não foi detectada atividade LDH no CM das células tratadas com Glyb.

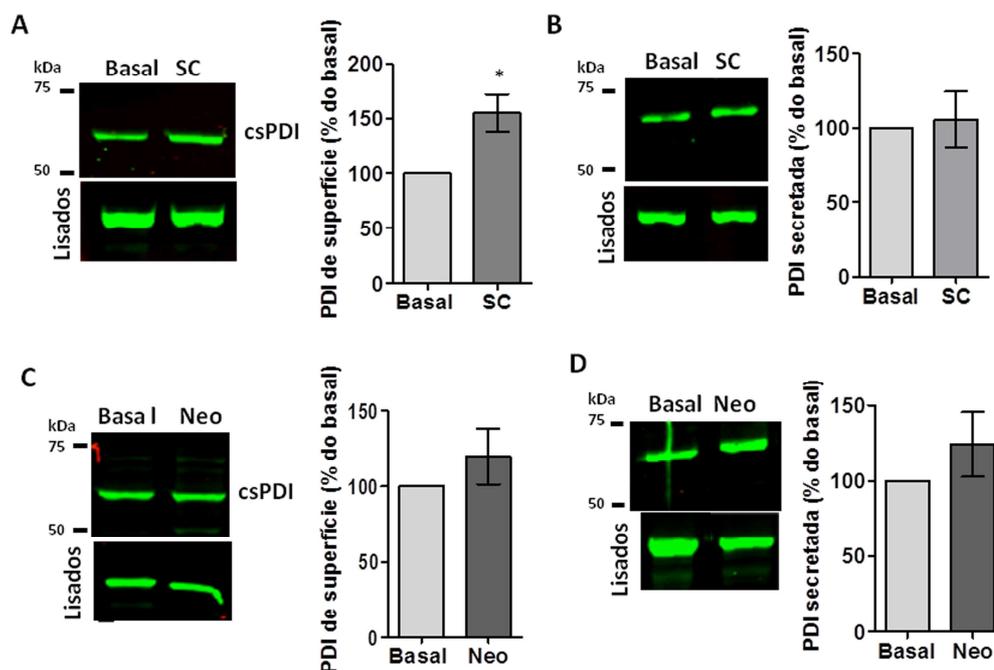


Figura 16. Efeitos dos inibidores da secreção não-convencional do tipo I de proteínas na externalização da PDI. (A) HUVECs foram incubadas por 15h40min com clorato de sódio (SC) ou (C) neomicina (Neo), seguido de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR. Gráficos de barras representam média \pm erro padrão ($n=3-4$), com (*) $p < 0,05$ em relação ao basal (teste t pareado). (B e D) CM de células incubadas por 16h com Neo ou SC foi submetido a western blot revelado com anti-PDI ABR. Após esse período, as células foram incubadas por 30min com meio sem SFB, seguido de troca por novo meio sem SFB por mais 30 min, sendo esta fração a coleta para análise da presença da PDI no CM. Gráficos de barras representam média \pm erro padrão ($n=3$) com $p > 0,05$ em relação ao basal (teste t pareado).

A secreção não-convencional de inúmeras proteínas, como: IL-1 β (Rubartelli *et al*, 1990), galectina 3, fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) e tioredoxina (Hughes, 1999) é inibida por metilamina. Como visto à Figura 17A e B, a metilamina (Methy) não altera os níveis de pecPDI. Além disso, Methy assim como bafilomicina (Baf), inibem secreção não-convencional por lisossomos secretórios (Mambula *et al*, 2006), por induzirem neutralização deste compartimento (Okasaki *et al*, 2000), e potencialmente bloqueiam também secreção não-convencional do tipo III. No caso da PDI, inibição da função lisossomal com Methy ou Baf não altera a quantidade de

pecPDI (Figura 17A e B). Não foi detectada atividade de LDH no CM das células tratadas com Methy e Baf.

A seguir, investigamos se a externalização de PDI seria realizada por um transporte ativo dependente de ATP ou endossomos de reciclagem. Depleção de ATP com 2,4-dinitrofenol (DNP) não afeta a secreção da PDI (Figura 17A e B). A secreção não-convencional envolvendo endossomos de reciclagem de transglutaminase tecidual é drasticamente inibida pelo tratamento com NEM (Zemskov *et al*, 2011), o qual inibe processos envolvendo NSF ATPase (importante para eventos de fusão de membrana). NEM aumenta os níveis de PDI secretada, ao invés de inibir, indicando que esta via não é utilizada pela PDI (Figura 18A). Avaliamos também o efeito da depleção de cálcio com BAPTA na secreção da PDI, e observamos que este aumenta os níveis de PDI solúvel (Figura 18B), mostrando que modulações na concentração de cálcio regulam tráfego da PDI.

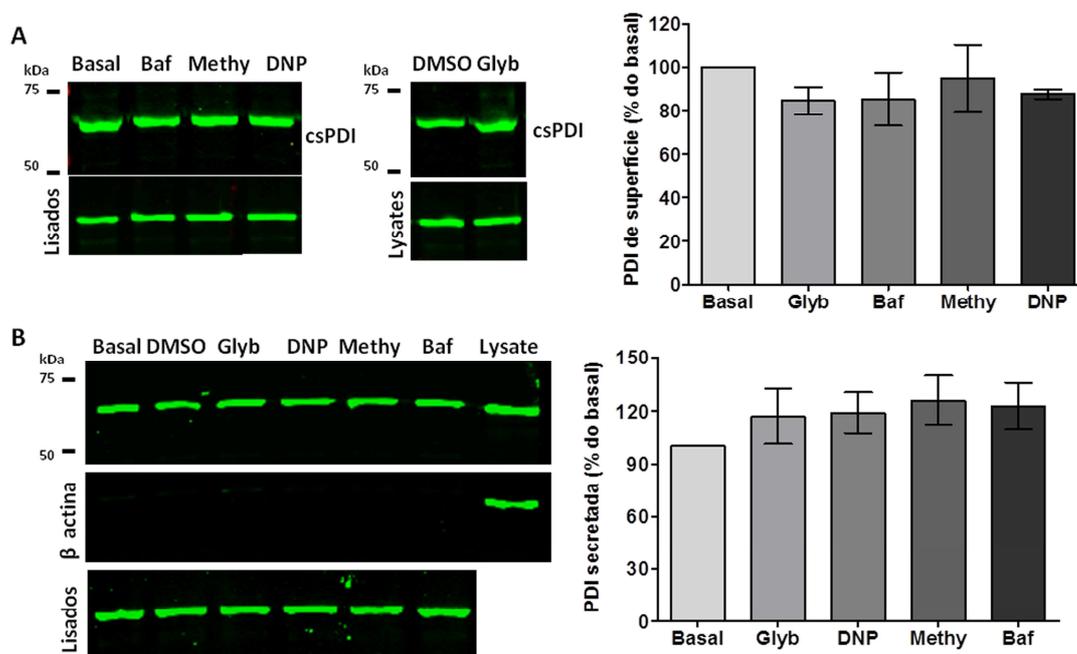


Figura 17. Avaliação de tráfego não-convencional por HUVEC. (A) As células foram tratadas por 1h com Glyb 100 μ M, DNP 0,2mM, Methy 8mM e Baf 40nM, seguido de biotinylação na superfície e western blot com anti-PDI ABR. Gráficos de barras representam média \pm erro padrão (n=3-4), com $p > 0,05$ em

relação ao basal (ANOVA com pós teste Newman-keuls). (B) CM de células tratadas por 2h com Glyb 100 μ M, DNP 0,6mM, Methy 6mM e Baf 40nM foi submetido a western blot com anti-PDI ABR (n=3).

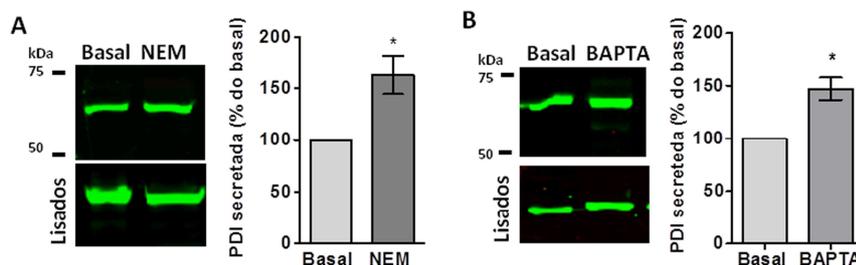


Figura 18. Avaliação de tráfego dependente de endossomo de reciclagem e cálcio na secreção da PDI. (A) CMs de HUVEC tratadas com NEM 0,05mM nos últimos 15 minutos de 4,5h de incubação em meio sem SFB ou (B) tratadas com BAPTA 10 μ M por 2h foram submetidos a western blot com anti-PDI ABR. Gráficos de barras representam média \pm erro padrão (n=3-4), com * $p < 0,05$ em relação ao basal (teste t pareado).

4.4. Investigação do papel de GRASP55 na externalização da PDI em células endoteliais

O bloqueio das vias não-convencionais do tipo I, II, III, dependente de endossomo de reciclagem ou lisossomos secretórios não inibe a externalização da PDI. A via clássica de secreção afeta apenas parcialmente o tráfego da PDI de superfície celular e até mesmo estimula a secreção da PDI e de PDI de superfície celular (após inibição sustentada da via RE-Golgi). Portanto, os resultados sugerem que a secreção majoritária da PDI se enquadra dentro da via de secreção não-convencional do tipo IV. O próximo passo foi avaliar se o tráfego da PDI seria dependente ou não de GRASP. Após a diminuição da expressão de GRASP55 com RNA de interferência (Figura 19A), avaliamos o impacto desta proteína no tráfego da PDI. Não há alteração significativa na quantidade de PDI de superfície celular (Figura 19 B) e PDI secretada (Figura 19 C) após silenciamento de GRASP55, indicando que a externalização da PDI é independente de GRASP55. Não foi detectada atividade de LDH no CM de células Scrambled ou siGRASP.

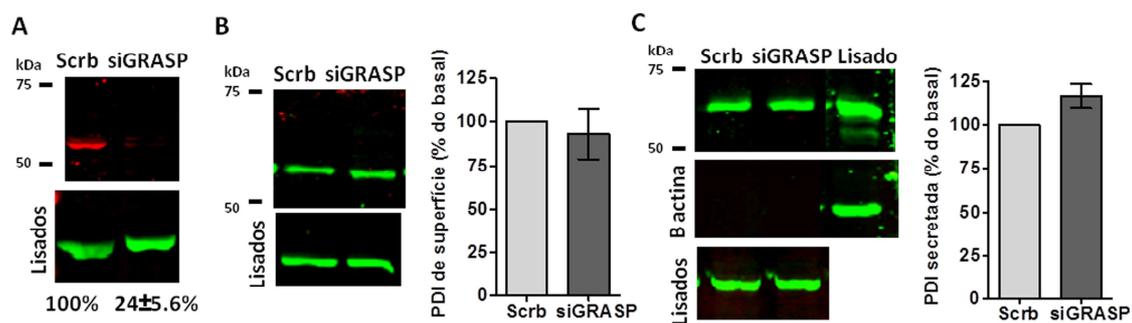


Figura 19. Avaliação da externalização da PDI após silenciamento de GRASP55 (GORASP2). (A) HUVEC foram previamente transfectadas com RNA de interferência para GRASP55 (siGRASP55) ou sequência Scrambled (Scrb) em HUVEC conforme descrito na metodologia. Quantificação de GRASP55 (painel superior) / β actina (painel inferior/ lisados) com média \pm erro padrão, $n=6$. (B) HUVEC transfectadas com Scrb ou siGRASP incubadas em meio sem SFB por 1h seguida de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR (C) CMs de HUVEC transfectadas com Scrb ou siGRASP incubadas em meio sem SFB por 1h foram submetidos a western blot com anti-PDI ABR.

4.5. O papel de plataforma lipídicas (*lipid rafts*) na rota de externalização da PDI em células endoteliais

As plataformas lipídicas são importantes para o ancoramento de proteínas, modulação da sinalização e endocitose mediada por cavéola. A filipina III (Fil III) e nistatina (Nyst) depletam colesterol da membrana plasmática (Greene & Gao, 2009). Esses agentes não foram capazes de diminuir as quantidades de PDI de superfície celular (Figura 20 A) e PDI secretada (Figura 20 B), sugerindo que eventos dependentes de colesterol não inibem diretamente a saída da PDI. No entanto, o aumento observado na pecPDI indica três possíveis eventos: (1) diminuição na endocitose/reciclagem da pecPDI que possivelmente ocorre via *lipid rafts* levaria a aumento da PDI solúvel e em menor extensão da PDI de superfície celular, (2) a depleção de colesterol poderia estar rompendo vias de sinalização que regulam a inibição do tráfego da pecPDI e (3) a alteração na arquitetura da membrana estimularia diretamente a secreção da PDI.

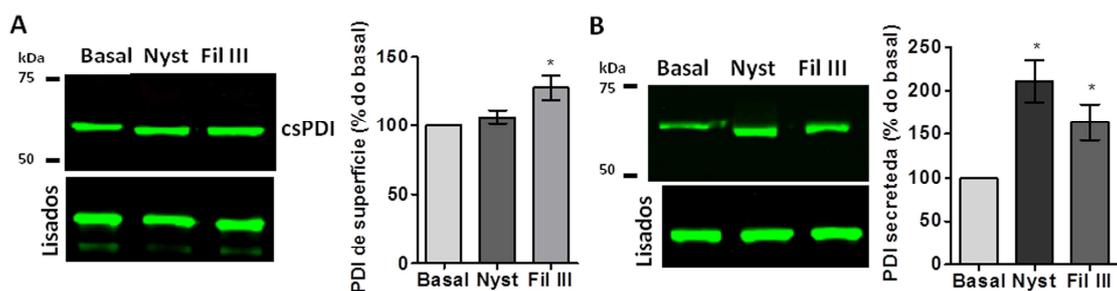


Figura 20. Efeito da depleção do colesterol na externalização da PDI. (A) HUVECs foram tratadas com nistatina (Nyst) 10 μ g/mL e filipina III (Fil III) 2,5 μ g/mL por 1h. Quantificação do painel com barras representando média \pm erro padrão (n=3) com * p < 0,05 em relação ao basal (ANOVA com pós teste Newman-keuls). (B) CM de HUVECs HUVECs foram tratadas com Nyst 10 μ g/mL Fil III 2,4 μ g/mL por 1h. Gráficos de barras representam média \pm erro padrão (n=3) com * p < 0,05 em relação ao basal (ANOVA com pós teste Newman-keuls).

4.6. Investigação da reciclagem da PDI solúvel em células endoteliais

A questão da endocitose da PDI é relevante e recorrente. Dessa forma, avaliamos qual tipo de endocitose seria responsável pela reciclagem da PDI. O tratamento das células com um inibidor clássico de endocitose mediada por clatrina (Pitstop2) aumenta os níveis de PDI solúvel e nenhum efeito significativo foi observado com inibidor de endocitose mediada por dinamina (*dynasore*) (Figura 21). Esses dados sugerem que a endocitose da PDI seja via clatrina.

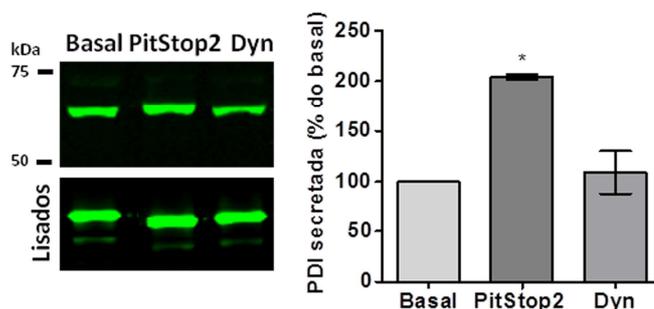


Figura 21. Avaliação da endocitose mediada por clatrina e dinamina. CMs de HUVEC tratadas com *PitStop2* 2 μ M e *dynasore* (Dyn) 30 μ M por 1h em meio sem SFB foram submetidas a western blot com anti-PDI ABR (n=3). Gráficos de barras representam média \pm erro padrão (n=3), * p < 0,05 em relação ao basal (ANOVA com pós teste Newman-keuls).

4.7. Investigação de possíveis moduladores da quantidade de pecPDI

Além da investigação da externalização constitutiva da PDI em células endoteliais, outro fator importante e estudado na literatura é a secreção estimulada da PDI, sendo PMA e trombina dois agonistas já utilizados previamente em HUVEC (Jasuja *et al*, 2010). Os aumentos nos níveis de PDI solúvel por PMA, trombina e ATP não foram inibidos por BFA (Figura 22), sugerindo que a secreção estimulada da PDI, assim como a basal, não é pela via clássica de secreção de proteínas. É importante ressaltar que BFA por 0,5h não altera os níveis de PDI secretada (Figura 10), indicando que esse aumento observado na presença de BFA provavelmente é devido à presença dos estímulos.

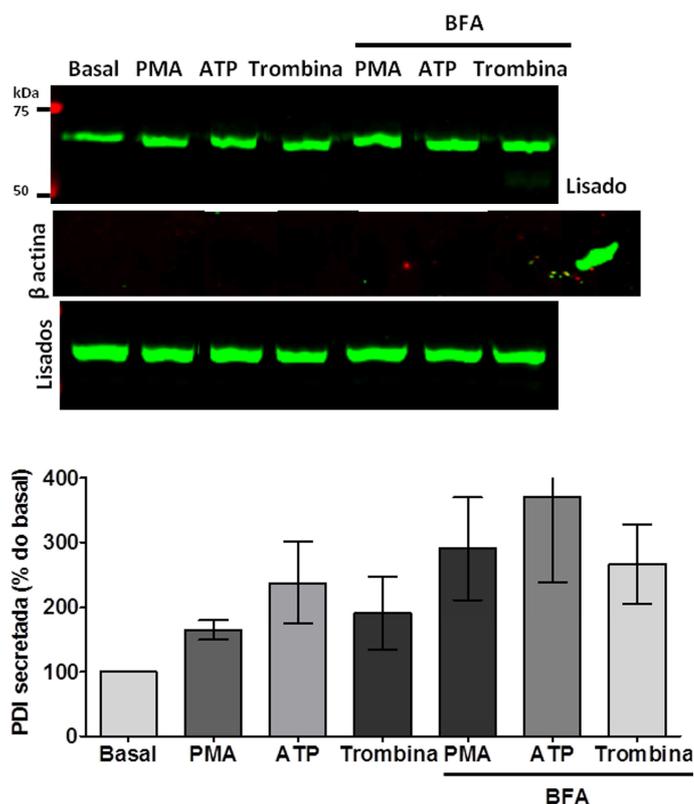


Figura 22. Efeito de PMA, ATP e trombina na secreção da PDI. CMs de HUVEC incubadas com PMA 10ng/mL, ATP 0,5mM e trombina 1U/mL nos últimos 30' de 1h em meio sem SFB na ausência ou presença de BFA 10 μ M foram submetidas a western blot com anti-PDI ABR (n=3). Gráficos de barras representam média \pm erro padrão (n=3).

Além de estudar a rota secretória da PDI na condição basal ou estimulada, é essencial entender seu comportamento diante de diferentes condições que mimetizam estresse fisiológico ou patológico, ambos relevantes à função de uma chaperona redox como a PDI. Inicialmente, avaliamos o efeito do choque térmico na secreção da PDI, e observamos que não afeta a quantidade de PDI secretada (Figura 23A, comparar Basal com 42°C) e de PDI de superfície celular (Figura 23B). No entanto, uma redução significativa na quantidade de PDI solúvel foi observada após recuperação do choque térmico (Figura 23, Comparar Basal R com 42°C R). Este resultado é similar ao previamente reportado em hepatócitos de rato após recuperação de choque térmico *overnight* (Terada *et al*, 1995).

Como esperado, o choque térmico induziu um aumento na expressão da Hsc70 intracelular (Figura 23A). Especulamos que o choque térmico promova um aumento na carga de processamento de proteínas no RE, de modo que a quantidade de PDI secretada é diminuída devido a maior demanda de enovelamento protéico dependente de PDI no RE. Não se detectou atividade de LDH no CM das células no Basal e Basal R. No entanto, a média da atividade de LDH no CM foi de 0.8% e 4% no choque térmico e na recuperação, respectivamente.

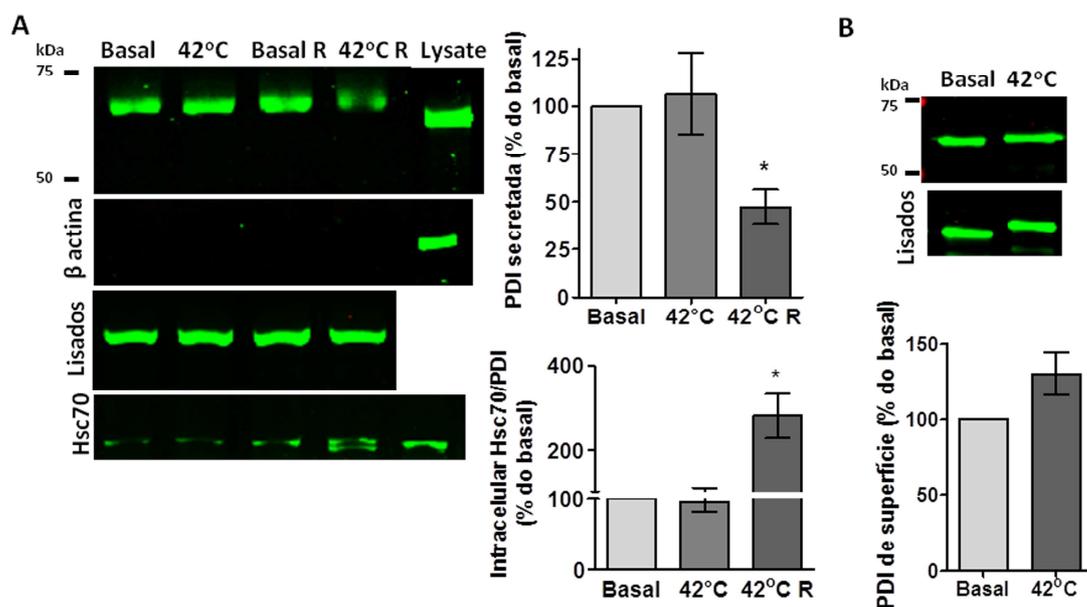


Figura 23. Efeito do choque térmico na secreção da PDI. (A) CMs de HUVEC foram incubadas por 42°C na última 1h de incubação por 2h em meio sem SFB. Após o choque térmico ou na condição basal (Basal R), as células foram deixadas em recuperação por 6h a 37°C (42°C R), seguido de western blot com anti-PDI ABR. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao basal (ANOVA com pós teste Newman-keuls). Quantificação das proteínas intracelulares PDI (lisados) e Hsc70, com * $p < 0,05$. (B) HUVEC incubadas a 42°C por 30 minutos finais de 1h em meio sem SFB, n=3. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com $p > 0,05$ em relação ao basal (teste t pareado).

Outro tipo de estresse relevante a doenças vasculares é o estresse do retículo endoplasmático. Um indutor clássico de estresse do RE é a tunicamicina, que bloqueia N-glicosilação que ocorre no RE, levando assim a acúmulo de proteínas mal-enoveladas. O protocolo de indução de estresse RE com tunicamicina foi eficaz, já que promoveu um aumento significativo nos níveis das chaperonas Grp78 e Grp94 (Figura 24A), conhecidos marcadores de estresse do RE. A indução do estresse do RE não promoveu alteração significativa na PDI de superfície celular (Figura 24B), mas causou diminuição significativa de 31,6% na chaperona Hsc70 de superfície, utilizada como controle (Figura 24C).

O aumento de proteínas mal-enoveladas no RE resulta no seu transporte para o citosol, seguido de degradação mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma, denominada *degradação associada ao RE* (ERAD). Embora a Hsc70 seja chaperona citosólica, sua participação na degradação via ERAD de CFTR e TCR α é relatada na literatura (Araki *et al*, 2011). Uma possibilidade é que no citosol, substratos da via ERAD se liguem à Hsc70 e que a quantidade de Hsc70 disponível para externalização diminua. Além disso, a Hsc70 de levedura, Ssa1, é necessária para degradar inúmeras proteínas integrais de membrana pela via ERAD (Fewell *et al*, 2001).

Embora não tenha afetado a quantidade de PDI de superfície celular, o estresse do RE estimula a secreção da PDI (Figura 24D), mas não foi detectada β -actina no CM após tratamento com tunicamicina (dados não mostrados). Essa diferença pode ser pelo tempo de exposição à tunicamicina, já que a incubação com tunicamicina 0,02 μ g/mL por 24h leva aumento na quantidade PDI de superfície celular (média=157, n=2). No caso de hepatócitos de rato, o estresse do RE promove a redução na PDI secretada (Terada *et al*, 1995).

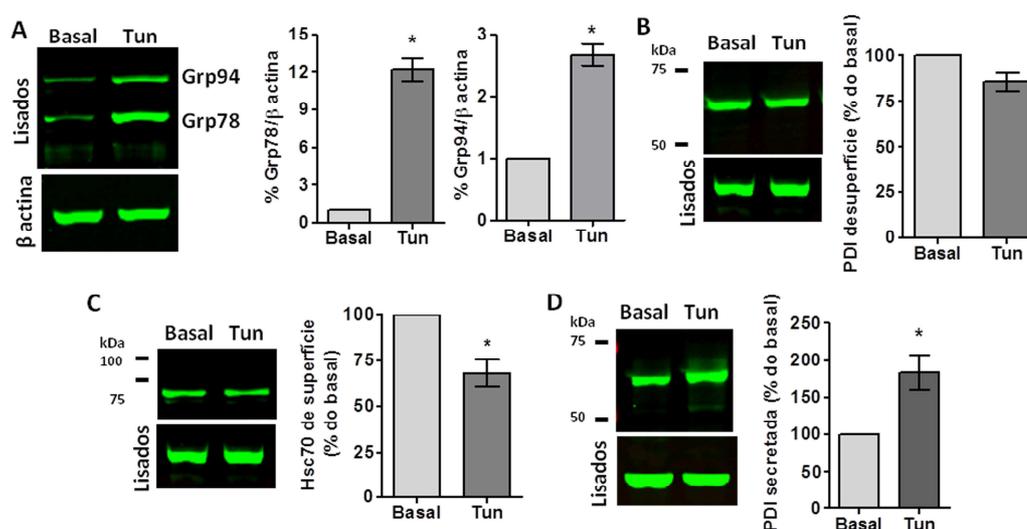


Figura 24. Efeito do estresse do RE na externalização da PDI e da Hsc70. (A) HUVEC foi incubada por 16,5h min com tunicamicina e o lisado intracelular foi coletado, seguido do western blot com anti-KDEL, o qual reconhece o C-terminal das chaperonas Grp78 e Grp94 e β -actina. Gráfico de barras

representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado). (B) HUVEC foi incubada por 16,5h com tunicamicina 0,2 μ g/mL seguida de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR e (C) anti-Hsc70. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado). (D) CMs de HUVEC incubadas por 24h com tunicamicina 0,1 μ g/mL foram submetidas a western blot com anti-PDI ABR. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado)

Os dados acima corroboram outros resultados deste trabalho indicando que o *pool* secretado da PDI e o *pool* da superfície celular são governados por distintos mecanismos de externalização. Embora o efeito estimulatório de alguns compostos seja conhecido para PDI solúvel (Jasuja *et al*, 2010, Sharda *et al*, 2015), estes não têm sido investigados para PDI de superfície celular. A23187, por exemplo, estimula a secreção de PDI em fibroblastos, célula de ovário de hamster chinês, plaquetas e HUVEC (Booth *et al*, 1989, Dorner *et al*, 1990, Chen *et al*, 1992, Jasuja *et al*, 2010, respectivamente). Julgamos oportuno, assim, avaliar efeitos de ionóforo de cálcio (A23187) e de citocinas (ainda não estudado para PDI), na quantidade de PDI de superfície celular.

O A23187 aumenta a concentração intracelular de Ca^{2+} (Jasuja *et al*, 2010) e aumentou os níveis de PDI de superfície celular (Figura 25A). Tratamento das células por tempos curtos (0,5h ou 1h) com fator de crescimento transformante- β_1 (TGF- β_1) não teve efeito na quantidade de pecPDI (dado não mostrado). Resultado similar foi observado após o tratamento das células por longo período com TGF- β_1 (Figura 25B). O estímulo das células com uma citocina pró-inflamatória, o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), levou a aumento significativo de 58% na PDI de superfície celular (Figura 25B). TNF- α 25ng/mL ($\geq 4h$) ocasiona aumentos dos níveis de expressão da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) em HUVEC (Yang *et al*, 2005), que por sua vez é importante mediador da adesão de leucócitos. Adesão de neutrófilo em HUVEC

estimulada com TNF e fluxo (shear), provavelmente via ICAM-1, é mediada por $\alpha\text{M}\beta 2$, uma integrina de neutrófilo cuja atividade é regulada de forma positiva pela PDI extracelular (Hahm *et al*, 2013). Portanto, esse aumento de pecPDI poderia sustentar maior ativação de integrinas na superfície da HUVEC (Swiatkowska *et al*, 2008), além de atuar na ativação da integrina de neutrófilo durante a adesão.

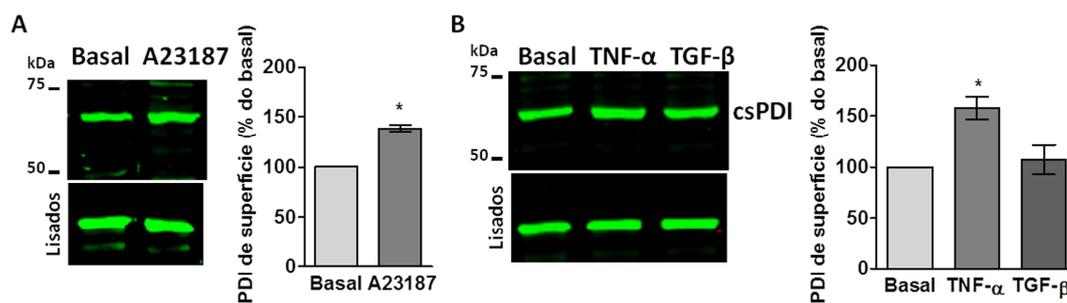


Figura 25. Efeito de ionóforo de cálcio (A23187) e citocinas na externalização da PDI. (A) HUVEC foi incubada com A23187 0,1 μM nos 30min finais de 1h em meio sem SFB e (B) TNF- α 10ng/mL ou TGF- β_1 25ng/mL por 16h40min seguida de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao basal em (A) teste t pareado e (B) ANOVA com pós teste Newman-keuls.

Outro tema pouco estudado quanto à PDI de superfície celular é qual o tipo de força que mantém a PDI ligada à superfície celular. No hepatócito de rato, a interação entre PDI e membrana plasmática envolve interações eletrostáticas, já que lavagem das células com carbonato de sódio 0.1M pH=9.0 elimina a presença da PDI na superfície celular (Terada *et al*, 1995). No entanto, nenhuma alteração significativa na PDI de superfície celular foi observada em nosso estudo após lavagem das células endoteliais (Figura 26A). Por outro lado, nas mesmas condições, ocorreu redução significativa na Hsc70 da superfície celular (Figura 26A), corroborando dado da literatura que mostra interação eletrostática entre Hsp70 e lipossomas (Armijo *et al*, 2014). Utilizamos a Hsc70 como controle em inúmeros ensaios e investigamos o perfil de sua distribuição na superfície de células endoteliais. Observamos que Hsc70 se localiza em placas na

superfície celular, não diretamente correspondentes à sua disposição citoplasmática (Figura 26B).

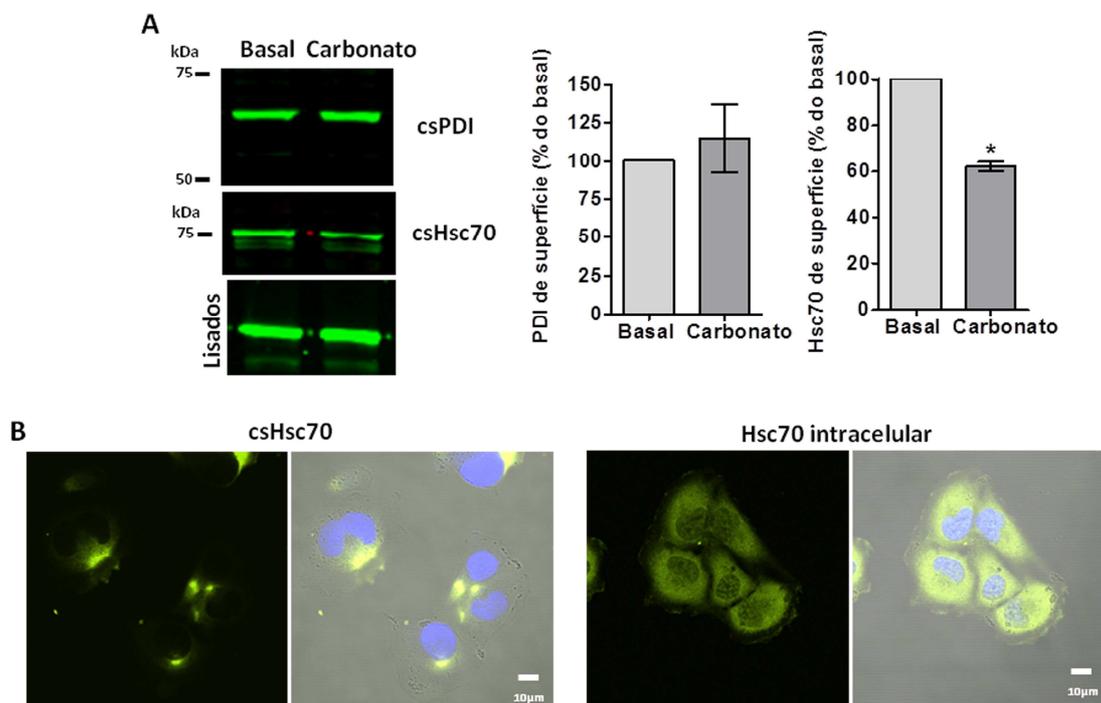


Figura 26. Efeito da lavagem com carbonato de sódio em células endoteliais. (A) As células foram incubadas com carbonato de sódio 0.1M pH=9.0 por 5min antes da biotinação de proteínas de superfície, seguido de western blot com anti-PDI ABR e a seguir marcação para Hsc70. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao basal (teste t pareado). (B) As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-Hsc70 mostrando Hsc70 de superfície (csHsc70) e das células permeabilizadas (Hsc70 intracelular). As imagens contrastadas à direita mostram o contorno celular.

Considerando que no caso de chaperonas como calnexina e calreticulina (Wiest *et al*, 1997) as proteínas externalizadas são preferencialmente recém-sintetizadas, investigamos se o mesmo ocorreria para PDI. Incubação por 1h e 16h40min com cicloheximida (CHX), inibidor da síntese protéica, não afetou a externalização da PDI de superfície celular (Figura 27A). É interessante notar que o tempo de meia vida da PDI em hepatócitos é longo, de 96h (Terada *et al*, 1995). Em células HeLa não proliferativas o tempo previsto de meia vida da PDI foi de 116,8h (Cambridge *et al*,

2011). Logo, quando utilizamos CHX por tempos curtos não estamos avaliando o efeito da inibição da síntese de PDI em si, e sim de proteínas com tempo de meia vida curto que poderiam ser essenciais para a externalização da PDI. Um experimento importante é calcular o exato de tempo de meia vida da PDI na HUVEC. Nós pretendemos fazer esses ensaios em futuro próximo.

É possível que em células proliferativas como as utilizadas aqui, esse tempo seja menor, já que a demanda de enovelamento protéico é maior para permitir que as células se dividam. De fato, o tratamento com CHX por tempos mais prolongados (16h40min) promoveu redução de $34 \pm 5\%$ (média \pm SEM, $n=3$) na expressão intracelular da PDI (Figura 27A, painel inferior CHX 16h), confirmando que diminuição da PDI recém-sintetizada não afeta a quantidade de PDI na superfície celular. Portanto, PDI recém-sintetizada não constitui um pool de PDI preferencialmente externalizado em células na condição basal. No entanto, esse tempo de tratamento com CHX é suficiente para reduzir de forma importante os níveis das proteínas de superfície total (Figura 27 B). Além disso, o tratamento com CHX por 16h40min diminui de forma significativa a Hsc70 intracelular, bem como a Hsc70 de superfície, sugerindo que aproximadamente metade desta é oriunda da Hsc70 recém-sintetizada.

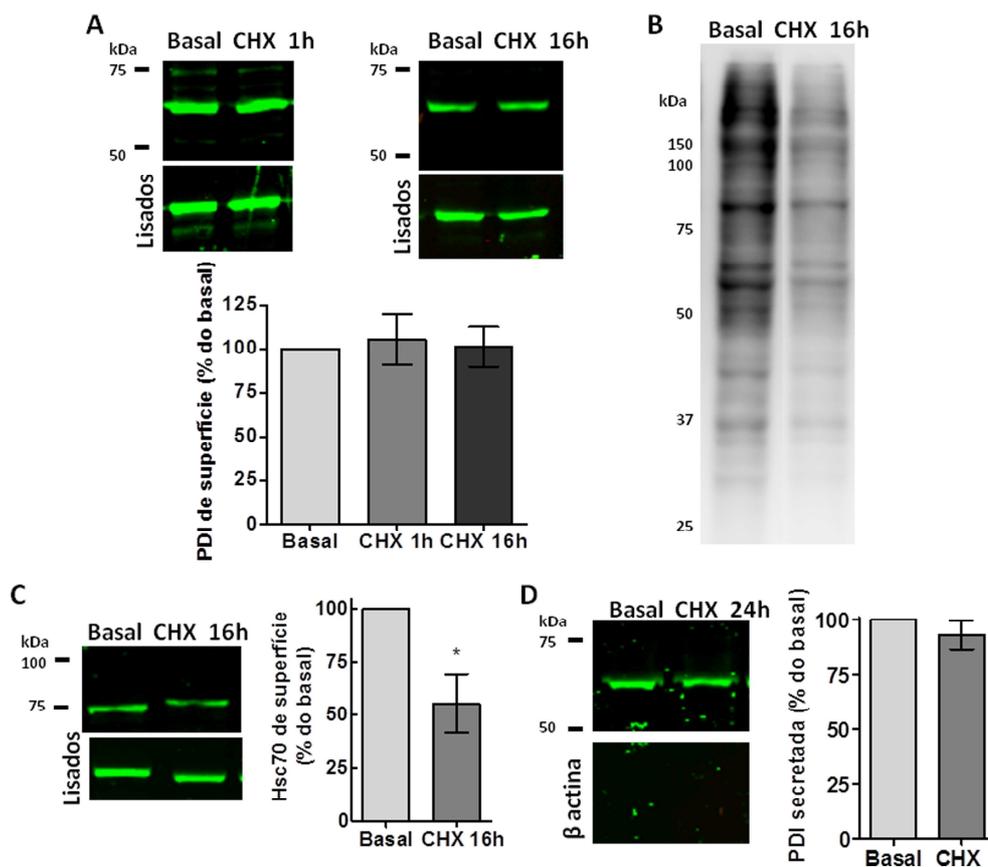


Figura 27. Efeitos da cicloheximida na externalização da PDI. HUVEC foi incubada por 1h ou 16h40min com cicloheximida 10 μ g/mL e 0,5 μ g/mL, respectivamente; seguida de biotilação na superfície e western blot com anti-PDI ABR. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3) com $p > 0,05$ (ANOVA com pós teste Newman-keuls). (B) A membrana do painel à direita em (A) foi incubada com anticorpo anti-biotina-HRP. (C) HUVEC foi incubada por 16h40min com cicloheximida seguida de biotilação na superfície e western blot com anti-Hsc70. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com * $p < 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado). (D) CMs de HUVEC incubadas com cicloheximida por 24h. Gráfico de barras representa média \pm erro padrão (n=3), com $p > 0,05$ em relação ao controle (teste t pareado).

4.8. Investigação do envolvimento da via convencional e o papel do citoesqueleto na externalização da PDI em células musculares lisas vascular

Conforme discutido à introdução, um dos objetivos de nosso estudo é investigar a pecPDI em células musculares lisas vasculares primárias (VSMC) e de linhagem (RASMC). O primeiro passo foi investigar se a PDI estaria presente na superfície dessas

células. A análise por biotinição das proteínas de superfície na RASMC revelou duas bandas: uma banda no peso esperado 52kDa e uma segunda banda abundante com peso *ca.* 40kDa (Figura 28). O tratamento com BFA ou Mon não afetou a banda de 52kDa ou de 40kDa, exceto pela ligeira diminuição na banda de 40kDa. Resultado similar foi encontrado na VSMC (Figura 28B). Esses dados indicam que a via RE-Golgi-Membrana plasmática não contribui na externalização da PDI nessas células.

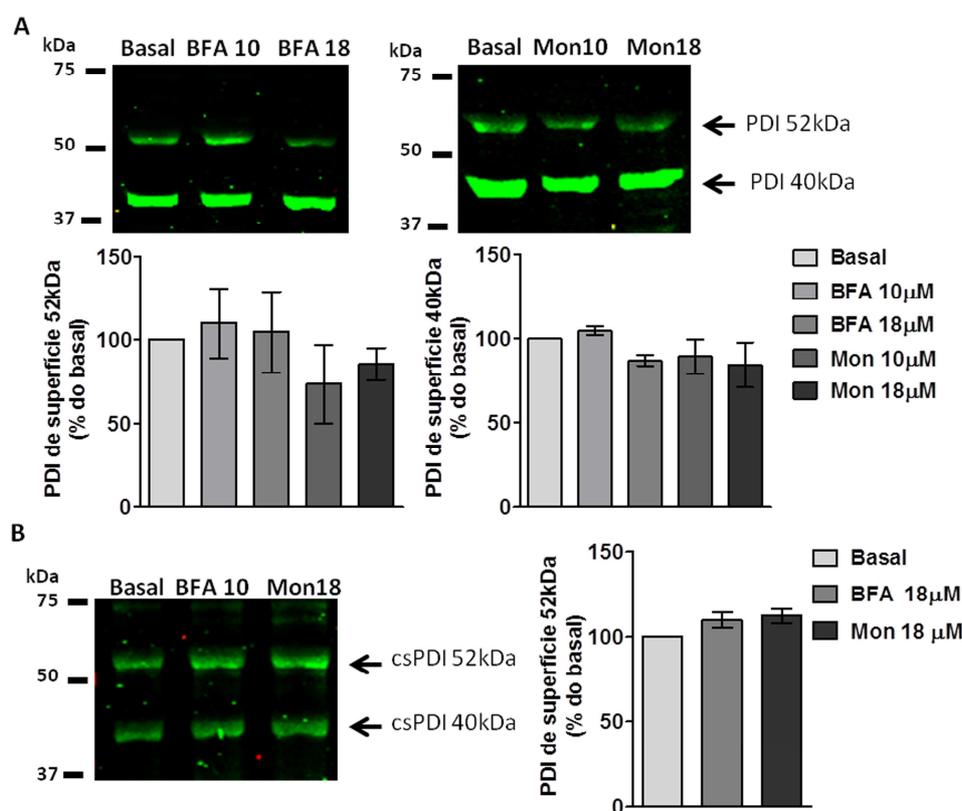


Figura 28. Efeito do tratamento com BFA e Mon na célula muscular lisa (A) RASMC foi incubada por 4,5h com BFA e Mon 10/18 μ M seguida de biotinição de proteínas de superfície e western blot utilizando anti-PDI (ABR). Barras representam média \pm erro padrão (n=3) com $p > 0,05$ para todos os grupos (ANOVA com pós teste Newman-keuls), exceto para Mon 52kDa (n=2). (B) VSMC foi incubada por 4,5h com BFA e Mon 18 μ M seguida de biotinição de proteínas de superfície e western blot utilizando anti-PDI (ABR). Barras representam média \pm erro padrão (n=3) com $p > 0,05$ para todos os grupos (ANOVA com pós teste Newman-keuls)

É importante ressaltar que o tampão de lise contém inibidores de protease e em todo procedimento a célula/lisado celular foi mantido a 4°C. Essa provável clivagem da PDI de superfície celular está sendo investigada e resultado preliminar mostra que não é realizada por metaloprotease. Outras possibilidades são que (1) seja realizada por outra protease extracelular e (2) que ocorra durante o processo de externalização. Dados recentes do laboratório indicam que esta forma mais curta é detectada preferencialmente em ensaios de biotilação em artérias intactas (Tanaka et al, 2015-paper submetido). Assim, esta banda de menor tamanho parece ser uma particularidade da VSMC, já que não foi usualmente observada na HUVEC.

A imunofluorescência indireta por microscopia confocal em células musculares lisas de linhagem (RASMC, Basal Figura 29), cultura primária da aorta de coelho (Basal Figura 33) e de rato (Basal Figura 39) *não permeabilizadas* revelou que a PDI estava presente na superfície destas células de modo independente da espécie ou se a célula é de linhagem ou primária. Em todos os casos, a PDI de superfície celular parece exibir o sinal de recuperação KDEL, como sugerido pela marcação com o anticorpo que reconhece esta porção C-terminal da PDI. A PDI de superfície celular de VSMC tem padrão de marcação puntiforme análogo a descrições prévias da literatura para a linhagem imortalizada de célula endotelial- EA.hy926 cells (Popescu *et al*, 2010).

Como visto em células *não permeabilizadas* na Figura 29, o tráfego da PDI para superfície não foi inibido na presença da BFA ou Mon. Resultado similar ao da Mon 18µM foi obtido com Mon 10µM (dado não mostrado). A *não-permeabilização* das células como requisito para garantir a detecção de proteínas de superfície é utilizada por vários autores (Popescu *et al*, 2010, Swiatkowska *et al*, 2008 Shin *et al*, 2003, Mezghrani *et al*, 2000). Além disso, utilizamos tempo curto de fixação (20 min) e o laser foi ajustado de acordo com o controle negativo (incubação somente com o

secundário) para obtenção das imagens. Outro ponto que valida que a marcação observada é na superfície celular é o fato de ser nitidamente mais fraca do que a marcação da PDI presente no lúmen do retículo endoplasmático (comparar Basal Figura 29 com Basal Figura 30).

Um resultado chamativo neste experimento foi a detecção de placas contendo PDI de superfície celular, também observadas com 2,5h após o tratamento com BFA (dado não mostrado). Para investigar se essas placas da superfície celular são acompanhadas de alteração de distribuição da PDI intracelular, observamos que RASMC permeabilizada apresenta padrão alterado, também em aglomerados/placas, de distribuição da PDI intracelular após o tratamento com BFA (comparar BFA Figura 29 e 30). Especulamos, deste modo, que a placa observada à superfície seja reflexo de um aglomerado e/ou complexo intracelular contendo PDI que de alguma forma tem capacidade de exteriorização parcial. Este fenômeno foi específico desse tipo celular, visto que esse padrão não foi observado em HUVEC ou MEF (dado não mostrado).

Essa formação de placas contendo proteína após tratamento com BFA não foi específica para PDI, pois a Erp72 (membro da família da PDI) também perde sua distribuição difusa e perinuclear (Figura 31A) e forma agregados intracelulares após tratamento com BFA (Figura 31B). A marcação de uma banda única utilizando o anticorpo que reconhece a Erp72 (Figura 31C) valida o resultado obtido. Em geral, esses dados são consistentes com a possibilidade que essas placas sejam plataformas que otimizam o processo de externalização da PDI e de outras proteínas.

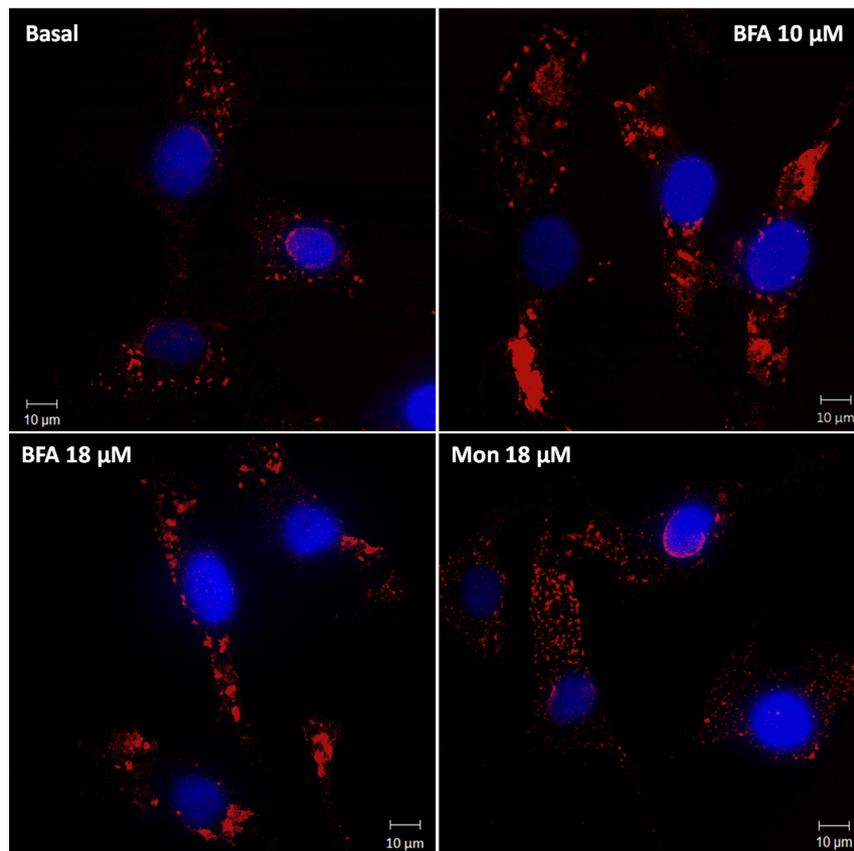


Figura 29. Efeito da brefeldina A e monensina na externalização da PDI. As células musculares lisas de linhagem da aorta de coelho (RASMC) foram incubadas por 4,5h com BFA 10 e 18 μ M e Mon 10 (não mostrado) e 18 μ M como descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=5) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI que reconhece o C-terminal da PDI (StressGen).

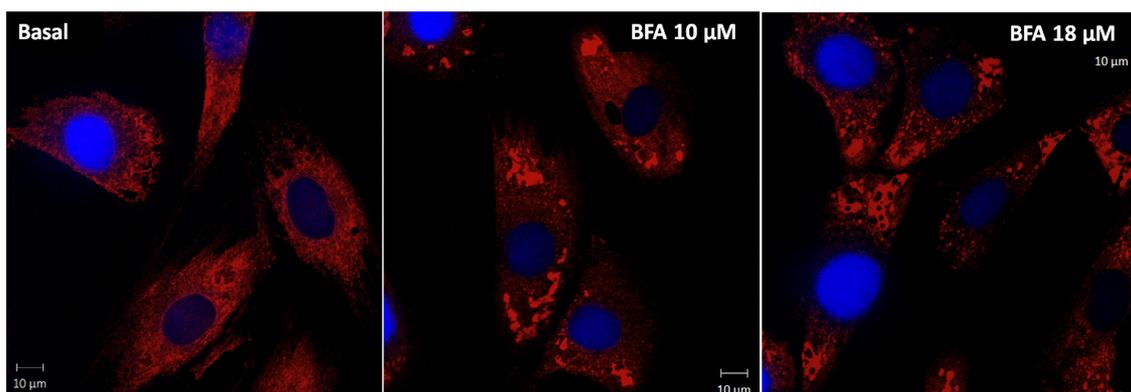


Figura 30. Efeito da brefeldina A na distribuição intracelular da PDI. As células musculares lisas de linhagem (RASMC) foram incubadas por 4,5h com BFA 10 e 18 μ M, conforme descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células permeabilizadas com NP40 e incubada com anti-PDI (Stressgen).

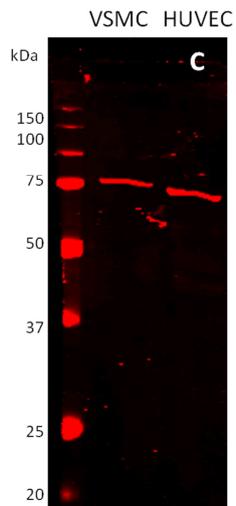
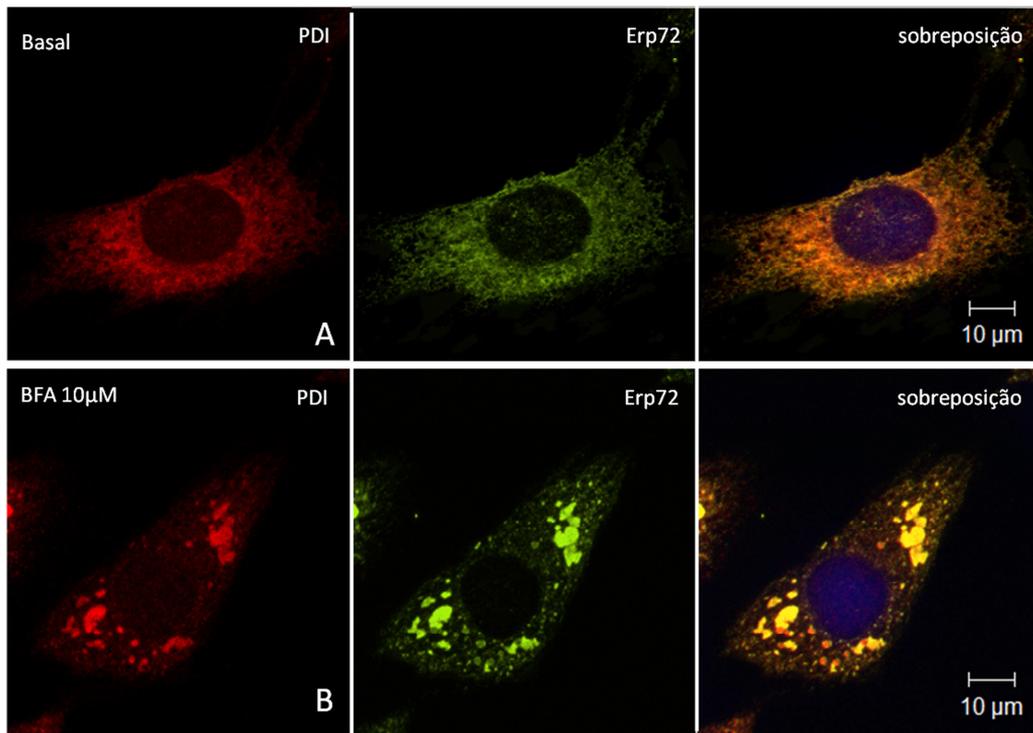


Figura 31. Efeito da brefeldina A na distribuição intracelular da PDI e Erp72. (A) As células musculares lisa linhagem (RASMC) foram incubadas por 4,5h (B) com BFA 10 μ M conforme descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células permeabilizadas e marcadas com anti-PDI (StressGen) e Erp72. (C) Avaliação da expressão da Erp72 por western blot na célula muscular lisa vascular (VSMC) da aorta de coelho e HUVEC.

Investigamos também se o efeito da BFA na PDI de superfície celular na VSMC da aorta de coelho. O resultado com a RASMC se reproduziu na VSMC (Figura 32). Com objetivo de avaliar se a especificidade do anticorpo contra C-terminal da proteína não estaria subestimando a quantidade de PDI na superfície celular, utilizamos outro anticorpo, o anti-PDI ABR. A marcação do anti-PDI ABR foi ligeiramente mais acentuada do que a marcação com anti-PDI StressGen (comparar Figura 32 com Figura 33). Após tratamento com BFA, a presença dos aglomerados foi também visível e nenhuma alteração foi observada após incubação com Mon (Figura 33). Os resultados mostram que a via de externalização da PDI na célula muscular lisa vascular não é pela via de secreção clássica de proteínas.

É importante ressaltar que não foi detectada a presença de PDI no CM após 15h de incubação de RASMC ou VSMC na presença ou ausência de BFA em meio sem SFB. Desta forma, apenas o *pool* de PDI de superfície celular foi investigado neste tipo celular. Por outro lado, foi possível detectar PDI solúvel em artérias ilíacas (recém retiradas do animal) incubadas em meio sem SFB por 1h (dados não mostrados).

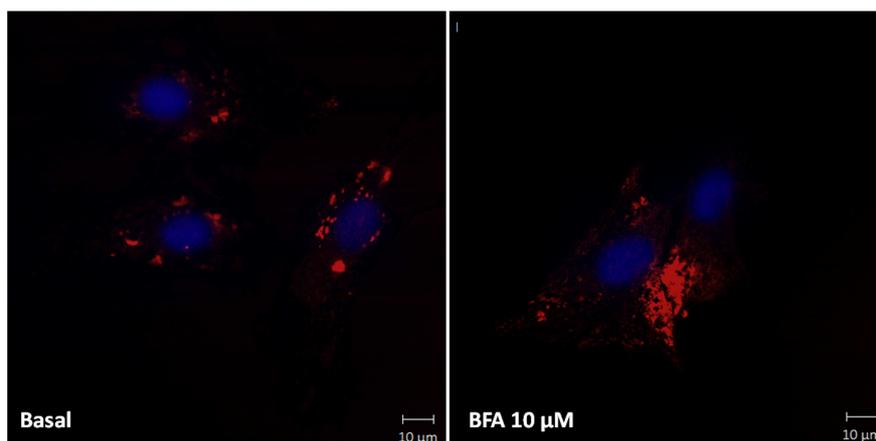


Figura 32. Efeito da brefeldina A na externalização da PDI. VSMC da aorta de coelho foram incubadas por 4,5h com BFA 10 μ M como descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI dirigido contra o C-terminal da PDI (Stressgen).

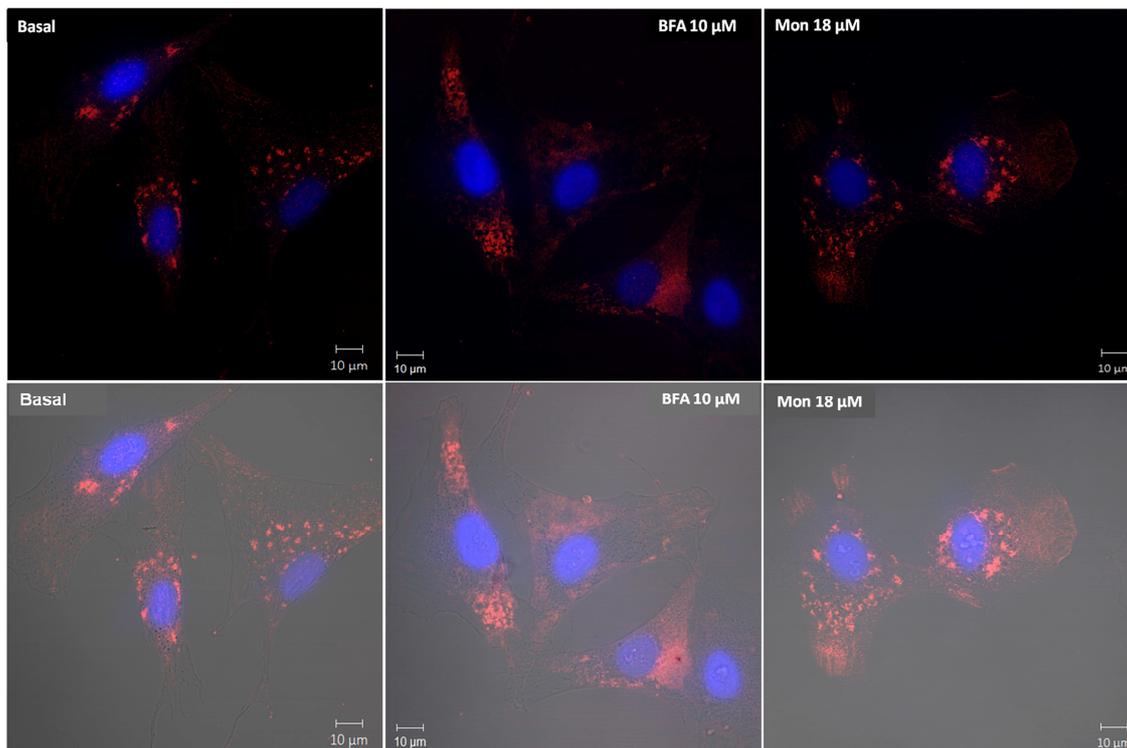


Figura 33. Efeito da brefeldina A e Monensina na externalização da PDI. VSMC da aorta de coelho foram incubadas por 4,5h com BFA 10, 18 μ M (não mostrado), Mon 10 e 18 μ M (não mostrado) como descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (ABR). As imagens contrastadas dos painéis inferiores evidenciam os contornos celulares.

Processos de tráfego subcelular de proteínas são estreitamente governados pelo citoesqueleto celular. Para investigar se o citoesqueleto de actina participaria da externalização basal da PDI em células musculares lisas, realizamos experimentos com CytD, capaz de romper as fibras de estresse. Este efeito foi documentado pela marcação com faloidina (Figura 34A, painel inferior). CytD promoveu aumento pequeno detectável na quantidade de PDI de superfície celular (Figura 34A, painel superior), enquanto Methy induz mudança no padrão de marcação da PDI de superfície sem uma alteração clara da quantidade (Figura 34A, painel superior). Investigamos também se a externalização da PDI de superfície celular em VSCM é modulada com padrão similar ao das HUVECs em resposta aos mesmos estímulos. O ionóforo de cálcio foi eficiente

em aumentar a quantidade de PDI de superfície celular em RASMC (Figura 35, painel superior), bem como TNF- α (Figura 35, painel inferior). Ambos mostraram um padrão de marcação com aglomerados de proteínas, distintos da célula endotelial.

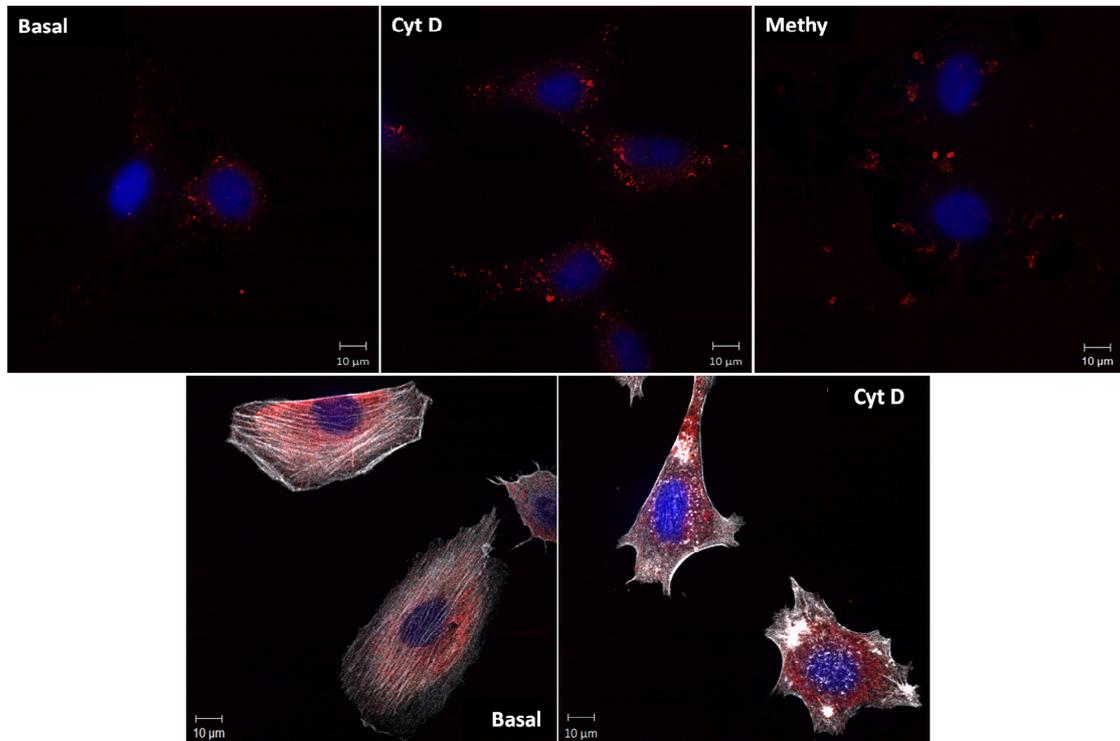


Figura 34. Efeito da citocalasina D (Cyt D) e metilamina (Methy) na externalização da PDI. RASMC foram incubadas por 1,5h com Cyt D 0,5 μM e Methy 10mM, como descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (Stressgen). As imagens abaixo são de imunofluorescência indireta utilizando anti-PDI (Stressgen) e *Alexa Fluor^R 635 phalloidin* das células *permeabilizadas* com NP-40.

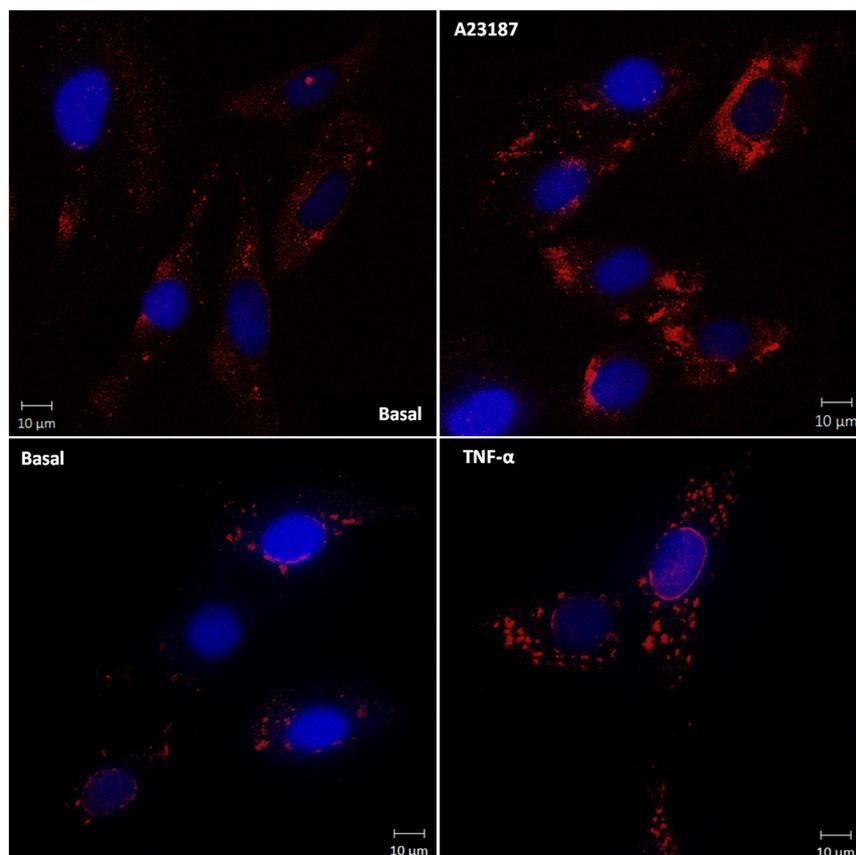


Figura 35. Efeito A23187 e TNF- α na externalização da PDI. RASMC foram incubadas por 4,5h em meio sem SFB e nos últimos 30min com ionóforo de cálcio A23187 5 μ M e TNF- α 50ng/mL. As micrografias são representativas (n=3 para cada estímulo) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (Stressgen).

Avaliamos também se o bloqueio da via clássica seria capaz de abolir o aparecimento da PDI de superfície celular estimulada por A23187. Como mostrado à Figura 36, BFA e Mon não inibiram a externalização da PDI na RASMC. Na tentativa de entender como a PDI seria mantida na superfície celular, realizamos ensaio para avaliar a importância da interação eletrostática nesse contexto. A lavagem das células com carbonato de sódio 0.1M pH=9.0 não afeta os níveis de PDI de superfície celular basal e estimulada por A23187 em VSCM de rato (Figura 37), indicando que a interação eletrostática não é a principal força responsável por manter a PDI na superfície neste tipo celular. Resultado similar foi obtido com RASMC (dado não mostrado).

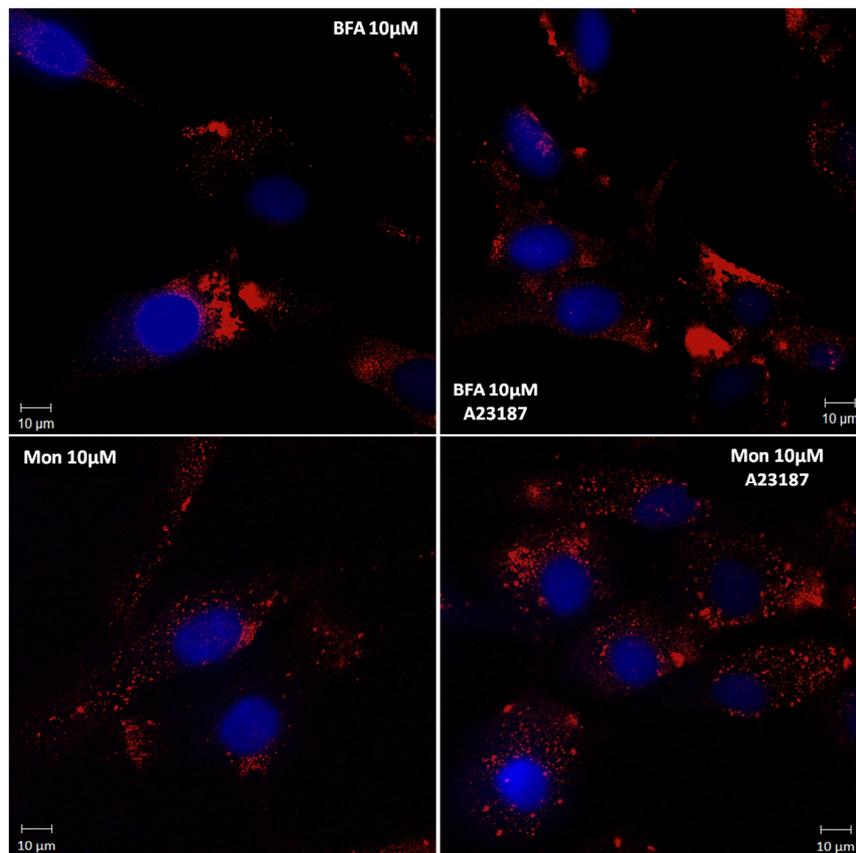


Figura 36. Efeito de inibidores da via clássica de secreção na externalização da PDI estimulada por A23187. A RASMC foi incubada por 4,5h com BFA 10µM e Mon 18µM e nos últimos 30 minutos incubados com A23187 5µM conforme descrito na metodologia. As micrografias são representativas (n=3) da imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* utilizando anti-PDI (Stressgen).

As células apresentavam uma morfologia similar ao basal após todos os tratamentos realizados até o momento. Com objetivo de validar os dados, quantificamos a morte celular total em alguns ensaios específicos (Figura 38). De uma forma geral estes não foram citotóxicos, exceto um baixo nível de citotoxicidade (aumento de 7,1% de morte celular total) detectado após o tratamento da RASMC com BFA 18µM seguido do estímulo com A23187 (BFA 18µM A23) comparado ao basal.

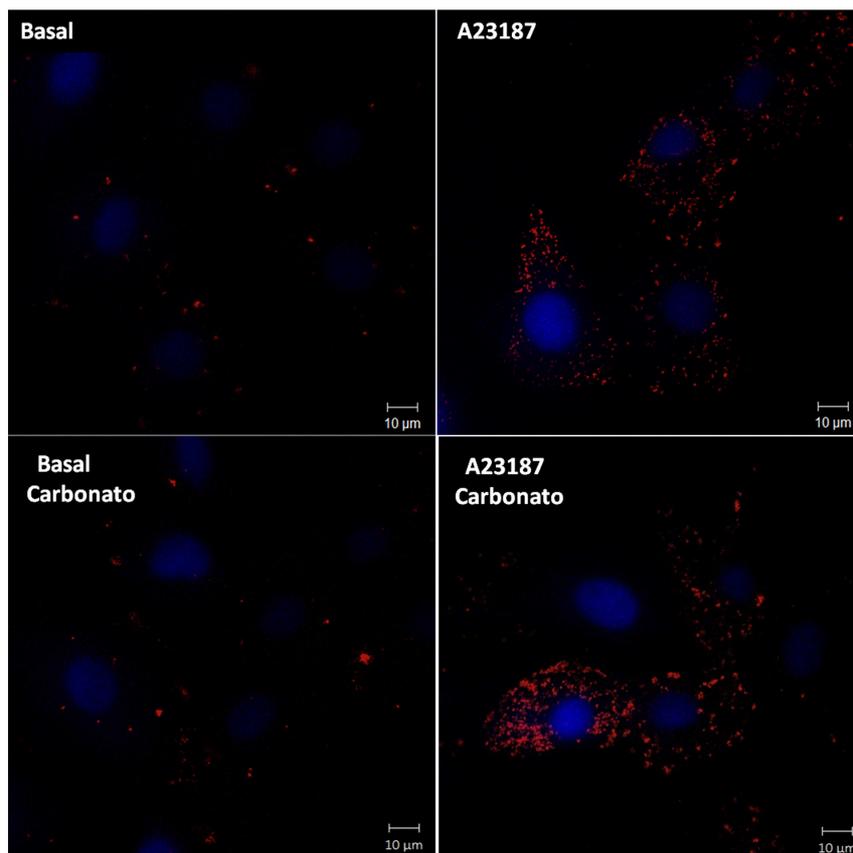


Figura 37. Efeito do A23187 e carbonato de sódio na externalização da PDI. A VSCM de rato foi incubada por 0,5h em meio sem SFB com ionóforo de cálcio A23187 5 μ M (n=3). As células foram lavadas com carbonato de sódio 0.1M pH=9.0 por 5min (n=3), seguido imunofluorescência indireta das células *não permeabilizadas* com anti-PDI (Stressgen).

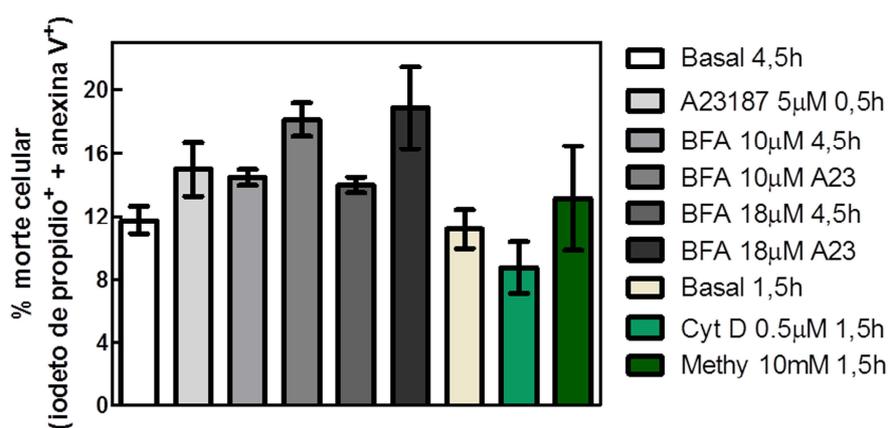


Figura 38. Viabilidade celular da RASMC medida pela apoptose e necrose por citometria de fluxo como descrito na legenda das figuras anteriores e conforme descrito na metodologia. A23=A23187 5 μ M nos 30 minutos (0,5h) finais. Barras representam média \pm erro padrão (n=33) com $p > 0,05$ para quase todos os grupos, exceto Cyt D x BFA 10 μ M A23 ou BFA 18 μ M A23 (ANOVA com pós teste Newman-keuls).

4. Discussão

Globalmente, nossos dados indicam que 1/4 do pool de PDI de superfície celular é externalizado pela via clássica de secreção de proteínas (Figura 7 e 8). Há duas possibilidades para justificar a saída da PDI via Golgi: (1) seus substratos seriam responsáveis por esconder a sua sequência KDEL, diretamente ou indiretamente (por promover alteração conformacional da PDI) impedindo assim o reconhecimento da PDI pelo receptor KDEL e (2) a sua sequência KDEL seria clivada permitindo escape (Turano *et al.*, 2002, Furie & Flaumenhaft *et al.*, 2014). A segunda opção é improvável já que a PDI de superfície celular apresenta o peso molecular correto. Embora o tráfego RE-Golgi contribua para a externalização da PDI para superfície, a rota majoritária é independente de Golgi e de GRASP55 (Figura 19 B).

A PDI solúvel no meio condicionado, denominada PDI secretada, é estimulada por brefeldina A (Figura 10), sugerindo assim que a secreção constitutiva da PDI seja não-convencional do tipo IV independente de GRASP55 (Figura 19 C). Uma secreção independente de Golgi é corroborada pela ausência de inibição com nocodazole (Figura 12), já que o transporte vesicular oriundo do Golgi depende de microtúbulos (Lee *et al.*, 2004). A secreção da PDI estimulada por nocodazole e em menor extensão por Citocalasina D (Figura 12) indica que o transporte da PDI é dependente de vesículas já que é afetado pelo rompimento do citoesqueleto (Manneville *et al.*, 2003). Além disso, este transporte poderia ser regulado por RhoA de forma direta ou indireta já que o inibidor de RhoA reduz de forma significativa a externalização da PDI (Figura 12 A e C).

PDI é detectada em vesículas que não contêm vWF e colocaliza parcialmente com a quimiocina Gro- α em grânulos pequenos em células endoteliais (Jasuja *et al.*, 2010) e silenciamento de HPS6 (proteína envolvida na biogênese grânulos denso em plaquetas, outros grânulos e de lisossomos em células endoteliais) inibe secreção da PDI

estimulada por trombina em HUVEC e plaquetas (Shardan *et al*, 2015). O tráfego constitutivo da PDI de superfície celular e PDI secretada por uma via vesicular também é sugerido pelo fato da secreção não-convencional (não-vesicular) do tipo I e do tipo II inibidas por clorato de sódio/neomicina e gliburide, respectivamente, não inibirem a externalização da PDI (Figura 16 e 17). Uma via secretória da PDI dependente de lisossomos ou autofagossomos (secreção não-convencional do tipo III), inibidos pela exposição à bafilomicina e metilamina, foi descartada (Figura 17).

A rota utilizada pela PDI também não é pela via dependente de endossoma de reciclagem ou de ATP, pois *N*-etilmaleimida (Figura 18 A) e 2,4-dinitrofenol (DNP) não foram capazes de inibir a externalização da PDI (Figura 17). Alguns pontos marcantes da secreção da PDI são: (1) regulação por cálcio (Figura 18 B e 25 A), (2) por *lipid rafts* (Figura 20) e (3) sua endocitose ocorre preferencialmente via clatrina (Figura 21). Outro fator relevante é que a PDI recém-sintetizada não parece constituir o *pool* de PDI que sai da célula (Figura 27). É possível também que a inibição de síntese protéica aumente a mobilização da PDI direcionada para a secreção, e que outro *pool* além do recém-sintetizado passe a ser utilizado.

É interessante ressaltar que apenas uma pequena fração da PDI intracelular foi externalizada. No entanto, o fato da PDI ser uma enzima, a mesma PDI pode interagir e modular inúmeros substratos de forma sequencial, reduzindo um e posteriormente oxidado outro, ou ainda isomerizando pontes dissulfetos. Portanto, um pequeno aumento na quantidade de pecPDI pode ter um grande impacto. Nossos dados dão suporte à idéia de que ocorre uma estrita regulação dos níveis de pecPDI e que a ausência de efeito ou até mesmo efeito estimulatório de alguns inibidores reflita a importância da manutenção da quantidade de pecPDI para sobrevivência e homeostase da célula.

Em termos de resposta patológica a externalização da PDI não é afetada pelo choque térmico, mas é reduzida no período de recuperação (Figura 23). Já o estresse do RE promove efeito imediato de aumento da PDI secretada, mas não afeta PDI de superfície celular (Figura 24). Esta diferença na PDI de superfície celular e PDI solúvel pode ser justificada pela atuação mais abrangente autócrina e parácrina da PDI solúvel, ao contrário da PDI de superfície celular que tem atuação apenas autócrina. Em conjunto esses dados indicam que a regulação dos níveis de PDI são dependentes do estresse celular e do tipo celular (Terada *et al*, 1995).

De forma geral, nossos resultados sugerem que a externalização da PDI por células endoteliais é parcialmente pela via clássica de secreção de proteínas para PDI de superfície celular. A fração majoritária da PDI de superfície celular e toda PDI secretada segue uma rota não-convencional do tipo IV independente de GRASP55 (Figura 39). Não podemos descartar que a secreção da PDI ocorra via fusão de vesículas oriundas do RE cortical com a membrana plasmática, e por isso seus níveis não seriam reduzidos pela inibição das rotas testadas (Figura 39). Essa hipótese é plausível (Fox *et al*, 2013), pois a PDI é detectada no RE cortical em células HeLa por criomicroscopia eletrônica (Giordano *et al*, 2013, Jasuja *et al*, 2010).

Nós temos evidências de que a PDI segue uma via independente de golgi também em células musculares lisas vascular na condição basal (Figura 28 e 29) e na presença dos agonistas PMA, trombina e ATP em células endoteliais. É interessante notar que estresses que gerem dano celular, e conseqüente aumento das concentrações extracelulares de ATP, podem promover de forma indireta secreção estimulada da PDI em células endoteliais. Um ponto importante é se modificações pós-traducionais poderiam funcionar como sinal para endereçar PDI para a rota secretória, como é o caso da anexina 2 (Deora *et al*, 2004).

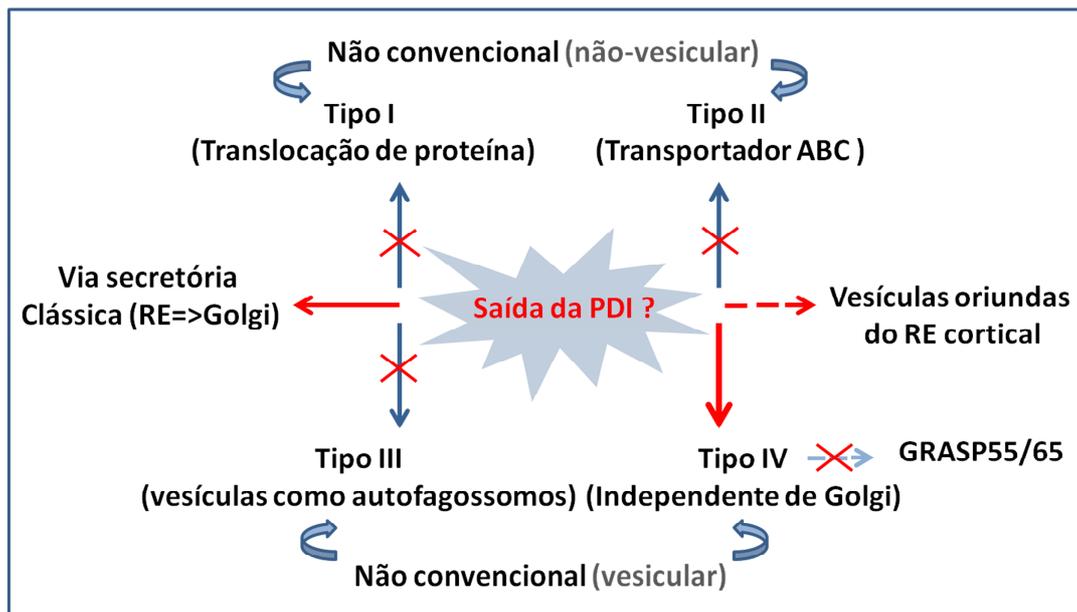


Figura 39. Esquema das possíveis vias pela qual a PDI é externalizada. A PDI pode sair da célula através da via clássica no caso da PDI de superfície celular, mas a fração majoritária da PDI de superfície celular e toda PDI secretada sai pela via não convencional do tipo IV independente de GRASP55. A saída da PDI também pode envolver vesículas oriundas do RE cortical. As vias de secreção não-convencional do tipo I, II e III foram descartadas.

5. Conclusões

- Um *pool* da PDI de superfície em células endoteliais é externalizado pela via clássica de secreção de proteínas, enquanto a fração majoritária sai pela via não-convencional independente de golgi e de GRASP55.
- O tráfego da PDI de superfície em célula muscular lisa vascular é independente de golgi.
- A associação da PDI na superfície de células endoteliais e musculares lisas vascular não é dependente de interação eletroestática.
- A PDI solúvel no meio condicionado de célula endotelial é secretada pela via não-convencional de secreção do tipo IV independente de GRASP55.
- A secreção não-convencional do tipo I, II, III, lisossomos secretórios e endossoma de reciclagem não participam do tráfego basal da PDI em células endoteliais.
- A rota secretória da PDI estimulada por PMA, ATP e trombina em células endoteliais é independente de Golgi.
- A endocitose da PDI solúvel é mediada por clatrina em células endoteliais.
- Estresse do RE aumenta os níveis de PDI solúvel, mas não afeta a quantidade de PDI de superfície.
- Choque térmico não altera a secreção da PDI, enquanto a recuperação ao estresse diminui os níveis de PDI solúvel.

6. Referências

- Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, et al. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(38):13932-7.
- Akagi S, Yamamoto A, Yoshimori T, Masaki R, Ogawa R, Tashiro Y. Distribution of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Histochem Cytochem*. 1988a;36(12):1533-42.
- Akagi S, Yamamoto A, Yoshimori T, Masaki R, Ogawa R, Tashiro Y. Localization of protein disulfide isomerase on plasma membranes of rat exocrine pancreatic cells. *J Histochem Cytochem*. 1988b;36(8):1069-74.
- Appenzeller-Herzog C, Ellgaard L. The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(4):535-48.
- Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(11):a007526.
- Armijo G, Okerblom J, Cauvi DM, Lopez V, Schlamadinger DE, Kim J, et al. Interaction of heat shock protein 70 with membranes depends on the lipid environment. *Cell Stress Chaperones*. 2014;19(6):877-86.
- Baldwin TA, Ostergaard HL. The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via golgi-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50333-40.
- Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, et al. Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics*. 2005;5(17):4443-55.
- Barr FA, Puype M, Vandekerckhove J, Warren G. GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):253-62.
- Barry OP, Pratico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*. 1997;99(9):2118-27.
- Barzilay E, Ben-Califa N, Hirschberg K, Neumann D. Uncoupling of brefeldin A-mediated coatamer protein complex-I dissociation from Golgi redistribution. *Traffic*. 2005;6(9):794-802.
- Benham AM. The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(8):781-9.

- Bi S, Hong PW, Lee B, Baum LG. Galectin-9 binding to cell surface protein disulfide isomerase regulates the redox environment to enhance T-cell migration and HIV entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(26):10650-5.
- Booth C, Koch GL. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 1989;59(4):729-37.
- Buchberger A, Bukau B, Sommer T. Protein quality control in the cytosol and the endoplasmic reticulum: brothers in arms. *Mol Cell*. 2010;40(2):238-52.
- Burgess JK, Hotchkiss KA, Suter C, Dudman NP, Szöllösi J, Chesterman CN, 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):9758-66.
- Calderwood SK, Mambula SS, Gray PJ, Theriault JR. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett*. 2007;581(19):3689-94.
- Cambridge SB, Gnad F, Nguyen C, Bermejo JL, Krüger M, Mann M. Systems-wide proteomic analysis in mammalian cells reveals conserved, functional protein turnover. *J Proteome Res*. 2011;10(12):5275-84.
- Capitani M, Sallèse M. The KDEL receptor: new functions for an old protein. *FEBS Lett*. 2009;583(23):3863-71.
- Chen K, Detwiler TC, Essex DW. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol*. 1995;90(2):425-31.
- Chen K, Lin Y, Detwiler TC. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood*. 1992;79(9):2226-8.
- Cho J. Protein disulfide isomerase in thrombosis and vascular inflammation. *J Thromb Haemost*. 2013;11(12):2084-91.
- Cho J, Furie BC, Coughlin SR, Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(3):1123-31.
- Cho J, Kennedy DR, Lin L, Huang M, Merrill-Skoloff G, Furie BC, et al. Protein disulfide isomerase capture during thrombus formation in vivo depends on the presence of β 3 integrins. *Blood*. 2012;120(3):647-55.

Christis C, Lubsen NH, Braakman I. Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *FEBS J.* 2008;275(19):4700-27.

Couët J, de Bernard S, Loosfelt H, Saunier B, Milgrom E, Misrahi M. Cell surface protein disulfide-isomerase is involved in the shedding of human thyrotropin receptor ectodomain. *Biochemistry.* 1996;35(47):14800-5.

d'Alessio P, Moutet M, Coudrier E, Darquenne S, Chaudiere J. ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(6):979-87.

Dancourt J, Barlowe C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu Rev Biochem.* 2010;79:777-802.

de A Paes AM, Veríssimo-Filho S, Guimarães LL, Silva AC, Takiuti JT, Santos CX, 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):799-810.

de Curtis I, Meldolesi J. Cell surface dynamics - how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 19):4435-44.

Delom F, Mallet B, Carayon P, Lejeune PJ. Role of extracellular molecular chaperones in the folding of oxidized proteins. Refolding of colloidal thyroglobulin by protein disulfide isomerase and immunoglobulin heavy chain-binding protein. *J Biol Chem.* 2001;276(24):21337-42.

Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem.* 2004;279(42):43411-8.

Di Pietro R, Marigliò MA, Guarnieri S, Sancilio S, Giardinelli A, Di Silvestre S, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) regulates endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity and its localization within the human vein endothelial cells (HUVEC) in culture. *J Cell Biochem.* 2006;97(4):782-94.

Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature.* 2003;426(6968):884-90.

Dorner AJ, Wasley LC, Raney P, Haugejorden S, Green M, Kaufman RJ. The stress response in Chinese hamster ovary cells. Regulation of ERp72 and protein disulfide isomerase expression and secretion. *J Biol Chem.* 1990;265(35):22029-34.

- Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, Deretic V. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1 β . *EMBO J*. 2011;30(23):4701-11.
- Duran JM, Anjard C, Stefan C, Loomis WF, Malhotra V. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *J Cell Biol*. 2010 Feb 22;188(4):527-36.
- Essex DW. Redox control of platelet function. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(5):1191-225.
- Essex DW, Chen K, Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. *Blood*. 1995;86(6):2168-73.
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*. 2001;35:149-91.
- Flaumenhaft R. Protein disulfide isomerase as an antithrombotic target. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(7):264-8.
- Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett*. 2003;551(1-3):78-86.
- Fox PD, Haberkorn CJ, Weigel AV, Higgins JL, Akin EJ, Kennedy MJ, et al. Plasma membrane domains enriched in cortical endoplasmic reticulum function as membrane protein trafficking hubs. *Mol Biol Cell*. 2013;24(17):2703-13.
- Furie B, Flaumenhaft R. Thiol isomerases in thrombus formation. *Circ Res*. 2014;114(7):1162-73.
- Furlan-Freguia C, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(7):2932-44.
- Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, et al. Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J Biol Chem*. 2002;277(52):50579-88.
- Gee HY, Noh SH, Tang BL, Kim KH, Lee MG. Rescue of Δ F508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell*. 2011;146(5):746-60.
- Gerner C, Holzmann K, Meissner M, Gotzmann J, Grimm R, Saueremann G. Reassembling proteins and chaperones in human nuclear matrix protein fractions. *J Cell Biochem*. 1999;74(2):145-51.

Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, et al. PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell*. 2013;153(7):1494-509.

Goldberger RF, Epstein CJ, Anfisen CB. Purification and Properties of a Microsomal Enzyme System Catalyzing the Reactivation of Reduced Ribonuclease and Lysozyme. *J Biol Chem*. 1964 May;239:1406-10.

Gourlaouen M, Welti JC, Vasudev NS, Reynolds AR. Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2013;288(11):7467-80.

Greene W, Gao SJ. Actin dynamics regulate multiple endosomal steps during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus entry and trafficking in endothelial cells. *PLoS Pathog*. 2009;5(7):e1000512.

Grieve AG, Rabouille C. Golgi bypass: skirting around the heart of classical secretion. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(4).

Hahm E, Li J, Kim K, Huh S, Rogelj S, Cho J. Extracellular protein disulfide isomerase regulates ligand-binding activity of $\alpha\text{M}\beta\text{2}$ integrin and neutrophil recruitment during vascular inflammation. *Blood*. 2013;121(19):3789-800, S1-15.

Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(11):2807-50.

Henderson B, Pockley AG. Proteotoxic stress and circulating cell stress proteins in the cardiovascular diseases. *Cell Stress Chaperones*. 2012;17(3):303-11.

Hogg PJ. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci*. 2003;28(4):210-4.

Horie S, Hiraishi S, Hirata Y, Kazama M, Matsuda J. Oxidized low-density lipoprotein impairs the anti-coagulant function of tissue-factor-pathway inhibitor through oxidative modification by its high association and accelerated degradation in cultured human endothelial cells. *Biochem J*. 2000;352 Pt 2:277-85.

Hotchkiss KA, Chesterman CN, Hogg PJ. Catalysis of disulfide isomerization in thrombospondin 1 by protein disulfide isomerase. *Biochemistry*. 1996;35(30):9761-7.

Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1388(2):478-88.

Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. Corrigendum to: "Exposure of the cryptic arg-gly-Asp sequence in thrombospondin-1 by protein disulfide isomerase". *Biochim Biophys Acta*. 1999;1434(1):210.

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):172-85.

Imaoka S. Chemical stress on protein disulfide isomerases and inhibition of their functions. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;290:121-66.

Jasuja R, Furie B, Furie BC. Endothelium-derived but not platelet-derived protein disulfide isomerase is required for thrombus formation in vivo. *Blood*. 2010;116(22):4665-74.

Jasuja R, Passam FH, Kennedy DR, Kim SH, van Hessem L, Lin L, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents. *J Clin Invest*. 2012;122(6):2104-13.

Jiang XM, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem*. 1999;274(4):2416-23.

Jordan PA, Gibbins JM. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(3-4):312-24.

Kaczmarek E, Erb L, Koziak K, Jarzyna R, Wink MR, Guckelberger O, et al. Modulation of endothelial cell migration by extracellular nucleotides: involvement of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathways. *Thromb Haemost*. 2005;93(4):735-42.

Kawamoto T, Ohga N, Akiyama K, Hirata N, Kitahara S, Maishi N, et al. Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. *PLoS One*. 2012;7(3):e34045.

Kim K, Hahm E, Li J, Holbrook LM, Sasikumar P, Stanley RG, et al. Platelet protein disulfide isomerase is required for thrombus formation but not for hemostasis in mice. *Blood*. 2013;122(6):1052-61.

Kinseth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF, Malhotra V. The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development. *Cell*. 2007 Aug 10;130(3):524-34.

Lahav J, Gofer-Dadosh N, Luboshitz J, Hess O, Shaklai M. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Lett*. 2000;475(2):89-92.

Lancaster GI, Febbraio MA. Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for

cellular stress proteins. *J Biol Chem.* 2005;280(24):23349-55.

Langer F, Spath B, Fischer C, Stolz M, Ayuk FA, Kröger N, et al. Rapid activation of monocyte tissue factor by antithymocyte globulin is dependent on complement and protein disulfide isomerase. *Blood.* 2013;121(12):2324-35.

Laurindo FR, Araujo TL, Abrahão TB. Nox NADPH oxidases and the endoplasmic reticulum. *Antioxid Redox Signal.* 2014;20(17):2755-75.

Laurindo FR, Pescatore LA, Fernandes DeC. Protein disulfide isomerase in redox cell signaling and homeostasis. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(9):1954-69.

Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:87-123.

Levi SK, Glick BS. GRASping unconventional secretion. *Cell.* 2007 Aug 10;130(3):407-9.

Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol.* 2006;177(11):7849-57.

Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(9):4112-6.

Manjithaya R, Anjard C, Loomis WF, Subramani S. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *J Cell Biol.* 2010 Feb 22;188(4):537-46.

Manneville JB, Etienne-Manneville S, Skehel P, Carter T, Ogden D, Ferenczi M. Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 19):3927-38.

Markovic I, Stantchev TS, Fields KH, Tiffany LJ, Tomić M, Weiss CD, et al. Thiol/disulfide exchange is a prerequisite for CXCR4-tropic HIV-1 envelope-mediated T-cell fusion during viral entry. *Blood.* 2004;103(5):1586-94.

Mezghrani A, Courageot J, Mani JC, Pugniere M, Bastiani P, Miquelis R. Protein-disulfide isomerase (PDI) in FRTL5 cells. pH-dependent thyroglobulin/PDI interactions determine a novel PDI function in the post-endoplasmic reticulum of thyrocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1920-9.

Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1986;261(24):11398-403.

Morgan DM. Uptake of polyamines by human endothelial cells. Characterization and lack of effect of agonists of endothelial function. *Biochem J.* 1992;286 (Pt 2):413-7.

Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):148-55.

Okazaki Y, Ohno H, Takase K, Ochiai T, Saito T. Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2000;275(46):35751-8.

Otsu M, Bertoli G, Fagioli C, Guerini-Rocco E, Nerini-Molteni S, Ruffato E, et al. Dynamic retention of Ero1alpha and Ero1beta in the endoplasmic reticulum by interactions with PDI and ERp44. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8(3-4):274-82.

Popescu NI, Lupu C, Lupu F. Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood.* 2010;116(6):993-1001.

Prado GN, Romero JR, Rivera A. Endothelin-1 receptor antagonists regulate cell surface-associated protein disulfide isomerase in sickle cell disease. *FASEB J.* 2013;27(11):4619-29.

Rabouille C, Malhotra V, Nickel W. Diversity in unconventional protein secretion. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 22):5251-5.

Raturi A, Miersch S, Hudson JW, Mutus B. Platelet microparticle-associated protein disulfide isomerase promotes platelet aggregation and inactivates insulin. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(12):2790-6.

Reinhardt C, von Brühl ML, Manukyan D, Grahl L, Lorenz M, Altmann B, et al. Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest.* 2008;118(3):1110-22.

Robert J, Ménoret A, Cohen N. Cell surface expression of the endoplasmic reticular heat shock protein gp96 is phylogenetically conserved. *J Immunol.* 1999;163(8):4133-9.

Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J.* 1990;9(5):1503-10.

Rutkevich LA, Cohen-Doyle MF, Brockmeier U, Williams DB. Functional relationship between protein

disulfide isomerase family members during the oxidative folding of human secretory proteins. *Mol Biol Cell*. 2010;21(18):3093-105.

Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4559-63.

Scheurer SB, Rybak JN, Roesli C, Brunisholz RA, Potthast F, Schlapbach R, et al. Identification and relative quantification of membrane proteins by surface biotinylation and two-dimensional peptide mapping. *Proteomics*. 2005;5(11):2718-28.

Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for *Drosophila* epithelial remodeling. *Dev Cell*. 2008;14(2):171-82.

Scott MS, Thomas DY, Hallett MT. Predicting subcellular localization via protein motif co-occurrence. *Genome Res*. 2004;14(10A):1957-66.

Sharda A, Kim SH, Jasuja R, Gopal S, Flaumenhaft R, Furie BC, et al. Defective PDI release from platelets and endothelial cells impairs thrombus formation in Hermansky-Pudlak syndrome. *Blood*. 2015;125(10):1633-42.

Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. *J Biol Chem*. 2003;278(9):7607-16.

Shorter J, Watson R, Giannakou ME, Clarke M, Warren G, Barr FA. GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *EMBO J*. 1999 Sep 15;18(18):4949-60.

Söderberg A, Hossain A, Rosén A. A protein disulfide isomerase/thioredoxin-1 complex is physically attached to exofacial membrane tumor necrosis factor receptors: overexpression in chronic lymphocytic leukemia cells. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(4):363-75.

Stow JL, Murray RZ. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):227-39.

Swiatkowska M, Padula G, Michalec L, Stasiak M, Skurzynski S, Cierniewski CS. Ero1alpha is expressed on blood platelets in association with protein-disulfide isomerase and contributes to redox-controlled remodeling of alphaIIb beta3. *J Biol Chem*. 2010;285(39):29874-83.

Swiatkowska M, Szymański J, Padula G, Cierniewski CS. Interaction and functional association of protein disulfide isomerase with alphaVbeta3 integrin on endothelial cells. *FEBS J.* 2008;275(8):1813-23.

Tarr JM, Young PJ, Morse R, Shaw DJ, Haigh R, Petrov PG, et al. A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J Mol Biol.* 2010;401(5):799-812.

Tellier E, Nègre-Salvayre A, Bocquet B, Itohara S, Hannun YA, Salvayre R, Augé N. Role for furin in tumor necrosis factor alpha-induced activation of the matrix metalloproteinase/sphingolipid mitogenic pathway. *Mol Cell Biol.* 2007 Apr;27(8):2997-3007.

Terada K, Manchikalapudi P, Noiva R, Jauregui HO, Stockert RJ, Schilsky ML. Secretion, surface localization, turnover, and steady state expression of protein disulfide isomerase in rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20410-6.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol.* 2006;Chapter 3:Unit 3.22.

Tsai YL, Zhang Y, Tseng CC, Stanciauskas R, Pinaud F, Lee AS. Characterization and mechanism of stress-induced translocation of 78-kilodalton glucose-regulated protein (GRP78) to the cell surface. *J Biol Chem.* 2015;290(13):8049-64.

Turano C, Coppari S, Altieri F, Ferraro A. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol.* 2002;193(2):154-63.

Vallon M, Aubele P, Janssen KP, Essler M. Thrombin-induced shedding of tumour endothelial marker 5 and exposure of its RGD motif are regulated by cell-surface protein disulfide-isomerase. *Biochem J.* 2012;441(3):937-44.

Wang C, Yu J, Huo L, Wang L, Feng W, Wang CC. Human protein-disulfide isomerase is a redox regulated chaperone activated by oxidation of domain a'. *J Biol Chem.* 2012;287(2):1139-49.

Wiest DL, Bhandoola A, Punt J, Kreibich G, McKean D, Singer A. Incomplete endoplasmic reticulum (ER) retention in immature thymocytes as revealed by surface expression of "ER-resident" molecular chaperones. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(5):1884-9.

Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1699(1-2):35-44.

Willems SH, Tape CJ, Stanley PL, Taylor NA, Mills IG, Neal DE, et al. Thiol isomerases negatively regulate the cellular shedding activity of ADAM17. *Biochem J.* 2010;428(3):439-50.

Wroblewski VJ, Masnyk M, Khambatta SS, Becker GW. Mechanisms involved in degradation of human insulin by cytosolic fractions of human, monkey, and rat liver. *Diabetes*. 1992;41(4):539-47.

Xiao G, Chung TF, Fine RE, Johnson RJ. Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment. *J Neurosci Res*. 1999;58(5):652-62.

Yang L, Froio RM, Sciuto TE, Dvorak AM, Alon R, Luscinskas FW. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. 2005;106(2):584-92.

Yoshimori T, Semba T, Takemoto H, Akagi S, Yamamoto A, Tashiro Y. Protein disulfide-isomerase in rat exocrine pancreatic cells is exported from the endoplasmic reticulum despite possessing the retention signal. *J Biol Chem*. 1990;265(26):15984-90.

Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schäfer T, Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(42):15479-84.

Zemskov EA, Mikhailenko I, Hsia RC, Zaritskaya L, Belkin AM. Unconventional secretion of tissue transglutaminase involves phospholipid-dependent delivery into recycling endosomes. *PLoS One*. 2011;6(4):e19414.

Zhan R, Leng X, Liu X, Wang X, Gong J, Yan L, et al. Heat shock protein 70 is secreted from endothelial cells by a non-classical pathway involving exosomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(2):229-33.

Zhang M, Schekman R. Cell biology. Unconventional secretion, unconventional solutions. *Science*. 2013;340(6132):559-61.

Súmula Curricular

1) Formação

Ano	Título ou atividade	Instituição
2006 – 2009	Graduação	Bacharelado em Ciências Biológicas-Biofísica com ênfase em Biotecnologia- UFRJ, Rio de Janeiro
2010 - 2011	Mestrado	Química Biológica- UFRJ, Rio de Janeiro
2012 - atual	Doutorado	Ciências- FMUSP, São Paulo

2) Histórico profissional

2006-2009: Iniciação Científica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ.

2009: Iniciação Científica, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ.

2010-2011: Mestrado, Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ.

2011-atual: Doutorado, Instituto de Coração, Faculdade de Medicina da USP.

3) Lista de publicações científicas:

1- Laurindo, Francisco R.M. ; **Araujo, Thaís L.S.** ; Abrahão, Thalita B. Nox NADPH Oxidases and the Endoplasmic Reticulum. **Antioxidants & Redox Signaling**^{JCR} 2014; 20: 2755-2775. **Citações:** 15. *Esta revisão, escrita durante o doutorado, mostra a importância do RE não somente no enovelamento das Noxs, bem como ressalta o papel da PDI, uma chaperona redox residente do RE, como um possível organizador de Nox.*

2- **Araujo, Thaís L. S.** ; Borges, Julio Cesar; Ramos, Carlos H.I; Meyer-Fernandes, José Roberto; Oliveira Junior, Reinaldo S, Pascutti, Pedro Geraldo; Foguel, Debora, Palhano, Fernando L. Conformational changes in human Hsp70 induced by high hydrostatic pressure produce oligomers with ATPase activity but without chaperone activity. **Biochemistry** (Easton)^{JCR} 2014; 53: 2884-2889. **Citações:** 1. *Esse trabalho corresponde ao tema central do mestrado, mostra que Hsp70, uma chaperona citosólica fundamental para o enovelamento protéico, não é capaz de se re-enovelar in vitro após desnaturação por alta pressão hidrostática. Provavelmente o enovelamento ou reenovelamento da Hsp70 após estresse é dependente do auxílio de chaperonas.*

3- , Sara Teixeira de Macedo-Silva; **Thais** Larissa **Araujo** de Oliveira Silva; Urbina, Julio A. ; Souza, Wanderley de ; Rodrigues, Juliany Cola Fernandes. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Molecular Biology International** 2011; 2011:876021 (12pp) . **Citações:** 15. *Esse trabalho, escrito durante **iniciação científica** que fiz durante a graduação, mostra que a amiodarona, um fármaco comumente utilizado na clínica, tem efeitos deletérios importantes em formas promastigotas e amastigotas de Leishmania.*

Manuscritos submetidos:

Thaís L. S. Araujo, Julianna Zeidler, Percília Oliveira and Francisco R. M. Laurindo. *A systematic screening suggest type IV unconventional route for protein disulfide isomerase cellular externalization in endothelial cells.* Esse trabalho corresponde ao tema central do doutorado, mostra que a PDI não é externalizada pela via clássica de secreção e sim por rotas não clássicas do tipo IV.

Thayna Meirelles, **Thaís L.S. Araujo**, Patrícia Nolasco, Ana I Moretti, Maria C Guido, Victor Debbas, Lygia V Pereira, Francisco Laurindo. *Wild-type but not mutated fibrillin-1 undergoes delayed endoplasmic reticulum processing associated with quality control by protein disulfide isomerase A1.*

Leonardo Y. Tanaka, Haniel A. Araújo, Gustavo K. Hironaka, **Thaís L.S. Araujo**, Celso K. Takimura, Andres I. Rodriguez, Annelise S. Casagrande, Paulo S. Gutierrez, Pedro Alves Lemos-Neto, Francisco R. M. Laurindo. *Peri/epicellular protein disulfide isomerase supports structural vascular remodeling to preserve lumen patency during post-injury repair.*

Elyjany Morais Lima Sena, Renato Simões Gaspar , João Lucas de Lima Fontelles, **Thaís L. S. Araujo**, Samira Abdalla da Silva, Diana Marli Fries, Francisco R. M. Laurindo and Antonio Marcus de Andrade Paes. *Redox-dependent inhibition of ADP-evoked platelet aggregation by a protein disulfide isomerase-targeted peptide*

Manuscritos em preparação:

Guido MC, Meirelles T, **Thaís L.S Araujo**, Nolasco P, Debbas V, Salemi VM, Takimura CS, Pereira LV, Laurindo FR. *Oxidant generation is protective against cardiovascular phenotype progression in Marfan Syndrome mice*, to be submitted.

Capítulo de livro:

Medicina Cardiovascular - Reduzindo a Carga de Doenças, 2015. Capítulo 9, Seção 2- Biologia da parede do vaso. Francisco R. M. Laurindo, **Thaís L. S. Araujo** e Denise C. Fernandes. NO PRELO.

4) **Lista de financiamentos à pesquisa vigentes, de qualquer agência ou empresa, sob a responsabilidade do Pesquisador.**

Bolsista Doutorado FAPESP (Maio/2012-Agosto/2015). Mecanismos e efeitos redox da dissulfeto isomerase protéica epi ou pericelular (epcPDI). Orientador: Francisco Rafael Martins Laurindo.

5) **Indicadores quantitativos.** Indicação separada das quantidades totais de:

- 1) livros publicados **(0)**;
- 2) publicações em periódicos com seletiva política editorial **(3)** ;
- 3) capítulos de livros **(1)**;
- 4) teses de mestrado orientadas e já defendidas **(1 defendida)**;
- 5) teses de doutorado orientadas e já defendidas **(0)**;
- 6) Quantidade de citações recebidas na literatura científica internacional, segundo o ISI, Scopus ou Google Scholar; **(31)**

6) **Link** para a página MyResearcherID (ISI) ou MyCitations (Google Scholar).

<https://scholar.google.com.br/citations?hl=pt-BR&user=0KiouXQAAAAJ>

7) **Outras informações**

Prêmios

2013- Prêmio Jovem Investigador Michel Jamra/ AMGEN, Reunião Anual da Federação de

Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

2011- The best poster presented, The XL Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq).

2010- Mention of honor at Poster Presentation Session, III Latin American Postgraduate Program of Biophysics Course I Colloquium Brazil/Africa of Biophysic.

2008- Prêmio Zigman Brenner, Sociedade Brasileira de Protozoologia.

Participação em congressos

1- Gordon Research conferences. Stress Proteins in Growth, Development & Disease. Unconventional pathways contribute to cell surface externalization of protein disulfide isomerase in vascular cells. 2013.

2- Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. Cell surface externalization of protein disulfide isomerase is independent of classical secretory pathway in vascular cells. 2013.

3- The 4th EMBO Meeting - Advancing the life sciences. Cell surface externalization of protein disulfide isomerase is independent of classical secretory pathway in vascular cells. 2012.

4- The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology - SBBq. 2011.

5- Gordon Research Conferences. Stress Proteins in Growth, Development & Disease. How is the Folding Pathway of a Cellular Folder ?The Case of the 70-kDa Heat Shock Inducible Protein (Hsp70). 2011.

Co-orientações de iniciação científica concluídas:

Percília Victória Santos de Oliveira. Investigação da rota de secreção da dissulfeto isomerase protéica (PDI) por células vasculares. 2014. Iniciação Científica. (Graduando em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Patricia Nolasco Santos. Papel da dissulfeto isomerase protéica (PDI) na Síndrome de

Marfan. 2014. Iniciação Científica. (Graduando em Biotecnologia) - Universidade Federal da Bahia, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Mateus Zapparoli Claro. Mecanismos redox associados à externalização da dissulfeto isomerase protéica (PDI) na superfície celular: potenciais implicações no remodelamento vascular. 2013. Iniciação Científica. (Graduando em Medicina) - Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Currículo Lattes: <http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4255625A9>