

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHELIN AUSWALDT STECLAN

**Papel da quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1)
na multimerização da fibronectina.**



CURITIBA

2013

Chelin Auswaldt Steclan

Papel da quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1)
na multimerização da fibronectina.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lia Sumie Nakao

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marcia Helena Appel

Curitiba

2013

A todos que colaboraram, de qualquer forma com a produção deste trabalho, e com a construção científica de meu pensamento.

Muito Obrigada!

A minha orientadora Lia S. Nakao, muito obrigada pela confiança, vivência e ensinamento nestes anos de trabalho.

A minha família, que é a base de tudo. Principalmente aos meus pais, Jair e Dulce, que oportunizaram esta vivência.

Agradecimentos

A Deus. Pois sem Ele a fé, confiança e otimismo não existiriam em mim.

Aos meus pais, dedico todas as minhas conquistas. Pois graças aos ensinamentos repassados a mim, cheguei até aqui! E acredito que chegarei e conquistarei tudo o que almejo. Sem a vida que proporcionaram a mim, da forma que foi feita, não seria a pessoa de hoje. Muito Obrigada! Amo vocês!

Ao meu irmão, Cleyton Steclan, agradeço por você existir, do jeito que é, impreterivelmente pela sua razão e conselhos. Amo você.

Ao meu grande amor, amigo, e companheiro, João Miranda, agradeço por me mostrar o outro lado da vida. Sem você essa conquista tão teria tanta graça! Amo você João do Gás!

Aos meus amigos, que tive a sorte de poder escolher e que carregarei por toda a vida... Me faltam palavras para descrever o quanto vocês fazem parte deste trabalho. Este trabalho também é de vocês!

As minhas amigas Rafaela e Loriana, agradeço por existirem em minha vida, principalmente social!!!! Ambas com suas peculiaridades me fazem muito bem. Há anos tenho o prazer de dividir minha vida com vocês... E tenho certeza que continuarei dividindo... mesmo que vocês nunca entendam o que é QSOX! Obrigada por serem minhas irmãs escolhidas. Amo vocês!

A Dilza Trevisan, declaro que você foi um presente! A vida me concedeu o benefício de ter você ao meu lado, com toda a sua razão, visão crítica, bom senso, bondade, e felicidade! Tenho você como exemplo de boa cidadã! Pois com você, aprendi que os direitos e deveres são facultativos (infelizmente), mas que nós... podemos fazer a diferença! Obrigada também pelas jantinhas, cafés, churrascos, etc... compartilhar uma casa com você foi um golpe de sorte!

A Marcia H. Appel, falta-me palavras para expressar o quanto gosto de você, você é meu exemplo! Grande profissional, mulher, mãe, e amiga! Sem seus puxões de orelha eu não estaria onde estou hoje! Desejo que você fique em minha vida por muitos anos!

A Katya Naliwaiko, minha xuxu! Você é uma grande amiga que entrou aos poucos em minha vida e dominou geral! Você e os xuxuzinhos! Os nossos momentos são únicos, pois só com você os assuntos amor, ciência, política, família, moda, etc, se encaixam em qualquer conversa!

A Mariana Bóia, a pessoa com o maior sorriso do mundo, agradeço por você ser minha amiga! Adoro nossos encontros! A sua felicidade contagia! Mas, também agradeço, e muito, por você me ajudar nos experimentos! Sem suas mãos de fada esse trabalho seria prejudicado!

A Beatriz Essenfelder, agradeço por estes anos compartilhados, como amiga e companheira de trabalho! Trabalhar com você foi de grande ajuda! Com você aprendi que a sinceridade prevalece, custe o que custar!

A todos os meus colegas do Laboratório de NeuroBiologia e Patologia Redox! Tivemos bons momentos para recordar, boas experiências para compartilhar... e o mais importante de tudo: regras de convivência para seguir! Muito obrigada!

Aos meus colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, em especial para Fernando (japinha do meu coração), Gabriel (tijelinha querida), Olga (Canjica), Aline, Valéria, Luíza, Thiago, Adriano, Matheus, Larissa, e Alessandra! MUITÍSSIMO obrigada! Compartilhar com vocês a minha rotina de trabalho foi revigorante! Obrigada por todos os auxílios, dúvidas saciadas, e reuniões fora do trabalho!

Aos meus colegas do Laboratório de Fisiologia, em especial a Isa, Dani, Adri e Gina... vocês fizeram minhas idas ao tecan um evento! Foi muito bom compartilhar momentos com vocês... espero que isso se perca fora do laboratório!

Aos professores do LNB, Adriana Mercadante e Silvio Zanata, muito obrigada pela colaboração científica.

Ao professor Silvio Sanches, obrigada por ser meu avaliador nesses anos de doutoramento... tenho o Sr. Como um dos exemplos de boa ciência no Brasil!

Aos professores dos programas de Biologia Celular e Molecular, e também Patologia, que de alguma forma contribuíram para meu doutoramento.

Aos meus amigos da Universidade do Contestado, assim como a Universidade do Contestado/Mafra, em especial a Jaqueline e Renata, que me abriram oportunidades, acreditaram em mim e no meu trabalho, e me renovaram profissionalmente.

Aos funcionários da Universidade Federal do Paraná, que na sua maioria sempre tinha um sorriso, e preocupação conosco, e que por muitas vezes na madrugada me socorriam.

Aos cidadãos Brasileiros, que muitas vezes desconhecem sua contribuição para este trabalho. Espero retornar todo o investimento direcionado para minha formação.

A CAPES e ao INCT *Redoxoma* - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Processos Redox em Biomedicina, pelo apoio financeiro.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Profa. Dra. Lia sumie Nakao
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Prof. Dr. Leo Kei Iwai
Instituto Butantan-SP



Profa. Dra. Selene Elifio Esposito
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR



Prof. Dr. Augusto Savio Peixoto Ramos
Instituto Carlos Chagas - ICC



E tendo como suplentes,


Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Chelin Auswaldt Steclan**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Papel da quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) na multimerização da fobronectina" são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Outubro de 2013



Prof. Dr. Edvaldo de Souza Frindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Resumo

Quiescina/sulfidril oxidase isoforma 1b (QSOX1b) é uma enzima secretada, e catalisadora da oxidação de proteínas nascentes e mal dobradas. Esta oxidação induz a formação de pontes dissulfeto, que são cruciais para a conformação e estabilidade de diversas proteínas. A literatura propõe que a oxidação de proteínas intra e extracelular, ou aquelas de superfície celular, acarreta em mudanças no estado redox destes microambientes, e também em alterações conformacionais das micro e macroestruturas proteicas. Baseado nisso, tivemos como objetivo analisar o papel de QSOX1b recombinante de camundongo (mQSOX1b) como possível oxidase da fibronectina (FN), uma glicoproteína dimérica de matriz extracelular (MEC). Através das determinações de peróxido de hidrogênio e de tióis em ensaios cinéticos com mQSOX1b e FN reduzida (redFN), *in vitro*, constatamos que redFN é oxidada pela enzima. A constante de *Michaelis menten* medida foi de aproximadamente 456 nM (com uréia) e 290 nM (sem uréia). redFN, *per se*, auto fibrila, produzindo multímeros solubilizados por deoxicolato (DOC), contudo, verificamos que mQSOX1b acelera a formação destes multímeros. Estas estruturas fibrilares possuem massa molecular maior que 800 kDa, e são desfeitas por agentes redutores, mas não são desfeitas por DOC (2%), indicando que são mantidas por pontes dissulfeto. Os multímeros não afetam a interação de redFN com gelatina, como indicado por imunoenensaio. Coatings com multímeros de FN (nativa e reduzida) não alteraram a capacidade adesiva de *Rasm* (células musculares lisas de aorta de rato), *HeLa* (células de câncer cervical, Henrietta Lacks) ou *3t3* (Fibroblasto de camundongo), contudo, a proliferação foi aumentada quando *Rasm* e *HeLa* foram incubados sobre natFN junto a mQSOX1b. Ao analisar a superexpressão da mQSOX1b sobre o estado redox da MEC e superfície celular nas linhagens *Hek293t* (células de rim de embrião humano para transfecção) e *HeLa*, pudemos constatar a promoção do estado mais oxidado para estes ambientes. Sendo assim, propomos para QSOX1b funções biológicas sobre a formação e remodelamento de componentes da MEC, aqui demonstrado especificamente sobre FN. Sendo assim, a presença de QSOX1 pode estar associada com o controle do crescimento e sobrevivência celular, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas.

Palavras chaves: Quiescina/Sulfidril Oxidase 1b (QSOX1b); Matriz extracelular (MEC); Fibronectina (FN); oxidação; estado redox.

Abstract

Quiescin/Sulfhydryl Oxidase isoform 1b (QSOX1b) is a secreted enzyme, and catalyzes the oxidation of nascent and misfolded proteins. This oxidation leads to the formation of disulfide bonds which are critical to the conformation and stability of various proteins. The literature suggests that oxidation of intra-and extracellular proteins or those at cell surface leads to changes in the redox state of these microenvironments, as well as conformational changes in the protein micro and macrostructure. Based on that, we aimed to analyze the role of mouse recombinant QSOX1b (mQSOX1b) as a possible oxidase for fibronectin (FN), a dimeric glycoprotein of the extracellular matrix (ECM). *In vitro*, through enzyme kinetics assays and measurement of thiols in the presence of mQSOX1b and reduced FN (redFN), we found that redFN is oxidized by the enzyme. The K_M values found were approximately 456 nM (urea) and 290 nM (without urea). FN multimers are also generated by auto fibrillation and can be solubilized by deoxycholate (DOC), however, we found that the QSOX1b accelerates the formation of these multimers. These fibrillar structures have molecular mass greater than 800 kDa, and are lost in the presence of reducing agents but not DOC (2%), indicating that multimers are maintained by disulfide bonds. The multimers forms no affect the gelatin-redFN interaction, indicated by ELISA. Coatings with multimers of FN (native and reduced FN) did not alter the adhesive capacity of Rasm, HeLa or 3T3, however, the proliferation was increased when Rasm and HeLa were incubated on natFN along mQSOX1b. Analyzing mQSOX1b overexpression influence on the ECM redox state and cell surface protein thiols at HEK293T and HeLa cells, we found more oxidized state for these environments. Therefore, we propose as biological functions to QSOX1b the formation and remodeling ECM components, here specifically FN. Thus, the presence of QSOX1 may be associated with cellular growth and survival control, probably in physiological and pathological conditions.

Keywords: Quiescin/sulfhydryl oxidase 1b (QSOX1b), extracellular matrix (ECM), fibronectin (FN); oxidation; redox state.

Lista de figuras:

Figura 1: Esquema ilustrativo dos domínios da QSOX1 (isoforma curta).....	6
Figura 2: Estrutura molecular da FN, demonstrando quais regiões são afetadas pelo processamento alternativo do mRNA.....	12
Figura 3: Perfis das enzimas mQSOX1b ativa e mutada (C452S).....	28
Figura 4: Separação eletroforética por SDS – Page do processo de purificação da mQSOX1b.	29
Figura 5: SDS-PAGE das mQSOX1b selvagem e mutante C452S fusionadas ou não a etiqueta de tiorredoxina.	29
Figura 6: Esquema ilustrativo do método indireto de quantificação da atividade quiescina sulfidril oxidase por fluorescência contínua.....	30
Figura 7: Figura ilustrativa da catálise da QSOX1b.	31
Figura 8: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem e C452S.	33
Figura 9: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de GSH (A) e Lisozima (B) pela enzima mQSOX1b selvagem.	33
Figura 10: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem e C452S.....	34
Figura 11: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação do DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem.....	35
Figura 12: Perfil eletroforético da redFN e natFN.....	38
Figura 13: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação da redFN na ausência (A) e presença (B) de uréia, pela mQSOX1b (50 nM).	39
Figura 14: Ensaio de mensuração dos tióis livres pelo ensaio de TNB.	40
Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos derivados dos ensaios cinéticos da FN (reduzida e nativa) (400 nM) e mQSOX1b (50 nM).....	43
Figura 16: SDS-PAGE do produto de cinéticas enzimáticas com mQSOX1b selvagem e mQSOX1b mutada C452S (200 nM) sobre redFN.....	44

Figura 17: Solubilização dos multímeros de FN.....	45
Figura 18: Ensaio de multimerização da FN nativa.....	46
Figura 19: redFN multimerizada após separação eletroforética de cinco horas.	48
Figura 20: Ensaio de multimerização da FN reduzida (redFN) em tempos de cinética diferentes.....	50
Figura 21: Padrão dos fragmentos de FN plasmática encontrados após redução com DTT.....	51
Figura 22: Perfil da digestão tríptica da redFN multimerizada pela mQSOX1b.	52
Figura 23: Ensaio de ligação da redFN e natFN sobre gelatina.....	53
Figura 24: Análise de adesão celular das linhagens Rasm e HeLa, sobre natFN e redFN multimerizada.	56
Figura 25: Análise de proliferação celular das linhagens Rasm e HeLa, sobre natFN e redFN multimerizada.	58
Figura 26: Análise por microscopia confocal da expressão de GFP e mQSOX1b/GFP em Hek 293t e HeLa.....	60
Figura 27: Detecção de tios de superfície (celular e matriz extracelular) de células Hek 293t pelo método de TNB.....	62
Figura 28: Detecção de tios de superfície celular de Hek 293t pelo método de TNB. .	62
Figura 29: Detecção de tios de superfície celular de HeLa pelo método de TNB.	63

Lista de abreviaturas:

ALR, *Augmenter of Liver Regeneration*

bp, *base pairs*

C, aminoácido cisteína

Cys, cisteína

DTNB, ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)

DTT, ditioneitol

EDTA, ácido etilenodiamino tetra-acético

Ero, *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1*

Erv, *Essencial for Respiration and Viability*

FAD, flavina-adenina dinucleotídeo

FN, fibronectina

GFP, *Green fluorescent protein*

GSH, glutationa reduzida

GSSG, glutationa dissulfeto

HRP, *horseradish peroxidase*

HVA, *homovanilic acid*

IPTG, Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa, kilo Dalton

K_M , constante de Michaelis-Menten

LB, meio Luria-Bertani

MEC, matriz extracelular

NO, *nitric oxide*

PCR, *polymerase chain reaction*

PDI, proteína dissulfeto isomerase

PBS, *phosphate buffer solution*

QSOX, quiescina/ sulfidril oxidase

RNA_m, ácido ribonucleico mensageiro

ROS, *reactives oxygen species*

S, aminoácido serina

SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE, tampão tris-acetato-EDTA

TBST, tampão salina tamponada com Tris contendo Tween-20

V_0 , velocidade inicial da reação, velocidade zero (0)

BSA, *bovine serum albumin*

Sumário:

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. ESTADO REDOX INTRA- EXTRACELULAR	2
1.2. OXI/REDUÇÃO DE PROTEÍNAS	2
1.3. QSOX	5
1.4. QSOX1B NA MEC	9
1.5. ESTADO REDOX DA MEC	9
1.6. FIBRONECTINA	10
2. OBJETIVOS	13
2.1.1. <i>Geral</i>	13
2.1.2. <i>Específicos</i>	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES MQSOX1B DE CAMUNDONGO (MQSOX1B) SELVAGEM E MUTANTE	14
3.1.1. <i>Construção e clonagem da mQSOX1b</i>	14
3.1.2. <i>Transformação e clonagem</i>	15
3.1.3. <i>Sequenciamento</i>	15
3.1.4. <i>Expressão das enzimas recombinantes</i>	16
3.1.5. <i>Purificação das proteínas recombinantes</i>	16
3.1.6. <i>Caracterização espectrofotométrica</i>	17
3.1.7. <i>Determinação da concentração proteica</i>	17
3.2. OBTENÇÃO DA FIBRONECTINA	18
3.2.1. <i>Purificação da FN</i>	18
3.3. REDUÇÃO DA FN E LISOZIMA	18
3.3.1. <i>Redução</i>	18
3.3.2. <i>Mensuração de tióis totais</i>	19
3.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MQSOX1B	19
3.4.1. <i>Cinéticas enzimáticas</i>	19
3.4.2. <i>Tratamento matemático dos dados cinéticos</i>	20
3.5. ENSAIO DE LIGAÇÃO FN-GELATINA	20
3.6. ENSAIO DE DIGESTÃO TRÍPTICA	20
3.7. SEPARAÇÕES ELECTROFORÉTICAS	21
3.7.1. <i>SDS – PAGE para mQSOX1b e extratos celulares</i>	21
3.7.2. <i>SDS – PAGE para FN</i>	21
3.7.3. <i>SDS – PAGE para produtos da digestão triptica</i>	22
3.8. IMUNODETECÇÕES	22
3.8.1. <i>Western Blot</i>	22
3.8.2. <i>Imunoensaio de Elisa</i>	23
3.9. ENSAIOS COM LINHAGENS CELULARES	23
3.9.1. <i>Culturas celulares</i>	23
3.9.2. <i>Adesão celular</i>	24

3.9.3. <i>Proliferação Celular:</i>	24
3.9.4. <i>Vetores para expressão eucariótica:</i>	24
3.9.5. <i>Transfeção celular:</i>	25
3.9.6. <i>Microscopias</i>	25
3.9.7. <i>Mensuração de tíois de superfície celular, e MEC:</i>	26
3.10. EXTRATOS PROTÉICOS E DOSAGENS	26
3.10.1. <i>Extrato celular:</i>	26
3.10.2. <i>Dosagens proteicas:</i>	26
3.11. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA MQSOX1B	27
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MQSOX1B	30
4.2.1. <i>DTT, GSH e Lisozima como substratos padrão da QSOX1</i>	31
4.2.2. <i>FN como substrato</i>	37
4.2.3. <i>Multimerização da FN</i>	41
4.3. PERFIL DE CULTURAS CELULARES SOBRE FN MULTIMERIZADA	54
4.3.1. <i>Adesão celular</i>	55
4.3.2. <i>Proliferação celular</i>	57
4.3.3. SUPEREXPRESSION DA QSOX	59
4.3.4. <i>Tíois de superfície celular</i>	61
4.4. DISCUSSÃO GERAL: FUNÇÃO BIOLÓGICA DA QSOX1	64
5. CONCLUSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7. ANEXOS	78
7.1. TERMO DE CONSENTIMENTO	78
7.2. CURRÍCULO LATTES	80

1. Introdução

1.1. Estado redox intra- extracelular

As células eucariotas são altamente organizadas e controlam suas funções por mecanismos finamente regulados, sendo que evidências atuais mostram que o estado redox celular e organelar são responsáveis por controlar vários sistemas e vias de sinalização intra e extracelular. Sabe-se também que a perda da homeostasia redox é um dos passos pelo qual surgem processos patológicos (GO; JONES, 2011).

Há três sistemas centrais responsáveis por realizar a manutenção do estado redox: glutathiona reduzida (GSH)/ glutathiona oxidada (GSSG), cisteína (Cys)/ cistina (CysSS), proteínas oxiredutases, e algumas moléculas, como por exemplo, peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Todas estas moléculas controlam direta ou indiretamente não só o estado redox (oxidado ou reduzido) intra e extracelular como também o “pool” de tióis reativos em proteínas específicas, o que pode desencadear a regulação de eventos celulares chaves, como por exemplo, morte e proliferação celular (BANERJEE, 2012; GO; JONES, 2011; VAN DER WIJK; OVERVOORDE; DEN HERTOOG, 2004; WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

1.2. Oxi/Redução de Proteínas

Existem vários mecanismos moleculares envolvidos na oxidação/redução (oxiredução) de diversas proteínas, as quais por sua vez, podem ter suas funções reguladas, e por isso, são chamadas de tióis proteínas passíveis de regulação redox (GHEZZI, 2005). Os mecanismos de regulação redox envolvidos são exclusivos de proteínas que possuem resíduos de aminoácidos, ou cofatores, susceptíveis a oxidação e/ou redução, sendo os resíduos de aminoácidos metionina, triptofano, fenilalanina, tirosina e cisteína os mais facilmente oxidáveis (CHIARUGI; GIANNONI, 2008; LAHAV et al., 2002). As proteínas detentoras destes resíduos de aminoácidos em determinadas posições chaves são sensíveis a processos redox reversíveis, intracelular e/ou extracelular, caracterizando-as como elementos reguladores de processos de sinalização celular (CLAVREUL et al., 2006; GO; JONES, 2011).

Dentre os mecanismos redox que podem controlar funções protéicas está a S-nitrosação/de-nitrosação, glutationilação, e ligações dissulfetos (BROILLET, 1999; BULLEID; ELLGAARD, 2011; GHEZZI, 2005; SILVA et al., 2008). Em processos de nitrosação há a ligação de uma molécula de óxido nítrico (NO) a um metal ou a um grupo tiolato, em resíduos específicos de cisteína de peptídeos e proteínas. Esta reação, por exemplo, regula a atividade catalítica da proteína caspase 3 citosólica (BENHAR et al., 2009) e da proteína dissulfeto isomerase (PDI) (UEHARA et al., 2006). A glutationilação de proteínas define-se pela adição do tripeptídeo glutationa (GSH), por exemplo, a subunidade 20S do proteassomo (SILVA et al., 2008). As ligações dissulfeto geralmente envolvem a oxidação de cisteínas a ácido sulfênico ou a outras formas mais oxidadas por ligações intra ou intermoleculares, ou ainda a dissulfetos mistos onde o outro componente geralmente é a GSH, e neste mecanismo, assim como os descrito acima, podem ser reversíveis, o que propicia uma regulação redox do tipo “liga/desliga” (BULLEID; ELLGAARD, 2011; SEVIER; KAISER, 2006).

As formações de dissulfetos são também cruciais para a conformação tridimensional da maioria das proteínas. O arranjo estrutural e conformação das proteínas é dado desde a estrutura secundária da cadeia polipeptídica até as modificações pós traducionais, a qual envolve formação de pontes dissulfeto intra e/ou inter cadeias (SATO; INABA, 2012; WEDEMEYER et al., 2000). Dissulfetos oferecem várias outras vantagens importantes, como por exemplo, o fato de serem modificações pontuais, causarem mudanças estruturais bem definidas, serem estáveis e reversíveis e, todas implicando em alterações funcionais significantes, intervindo em outras interações moleculares (BULLEID; ELLGAARD, 2011).

Dentre as proteínas citoplasmáticas que são também passíveis de regulação redox reversível, têm-se exemplo a fosfatase supressora de tumor (Phosphatase and tensin homolog, PTEN) que é inibida quando suas cisteínas são oxidadas a ponte dissulfeto; consecutivamente a oxidação contribui para aumentar o sinal de fosforilação transmitido (MIKI; FUNATO, 2012). A oxidação a dissulfetos é necessária também para a estrutura de muitas proteínas de membrana e secretadas para o espaço extracelular, tais como anticorpos, diversas moléculas do complexo de histocompatibilidade, fatores de crescimento, insulina, etc (SATO; INABA, 2012). O estado reversível de pontes dissulfetos tem suma importância biológica tanto com sua inserção, quanto com sua redução, neste aspecto tem-se descrito que as funções de muitas proteínas solúveis e receptores de membrana celular, por exemplo, a plasmina

e a trombospondina1, são controladas pela clivagem de uma (ou mais) de suas pontes dissulfeto através de catálise direta através de redução enzimática (por exemplo, PGK, fosfoglicerato quinase), por meio de redutores específicos (ex. PDI), ou moléculas facilitadoras (por exemplo, GSH e N-acetil cisteína (NAC)) (HOGG, 2003).

A biossíntese dos dissulfetos ocorre intracelular, e possivelmente extracelular, sendo que na via intracelular a principal organela responsável por acomodar os processos de oxidação de grupos tióis a dissulfeto é o lúmen do retículo endoplasmático granular (RE) de eucariotos. Entretanto, sabe-se já que este evento pode ocorrer no citoplasma (SAARANEN; RUDDOCK, 2013), assim como no espaço periplasmático de procariotos (BENHAM, 2012; SEVIER; KAISER, 2006).

Já é bem conhecido que a formação de dissulfetos em eucariotos é principalmente responsabilidade de dois sistemas intra RE, a PDI e a *endoplasmic reticulum oxidoreductin 1* (Ero1), ambos altamente conservados desde fungos a mamíferos (SEVIER; KAISER, 2002). PDI é membro da superfamília das tioredoxinas (Trx) e Ero1 é uma enzima ligante do cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD), sendo que PDI é responsável pela oxidação da proteína cliente, e posteriormente é oxidada cataliticamente pela Ero1 através da formação “de novo” de pontes dissulfeto (INABA, 2010; SEVIER; KAISER, 2008). Na família das proteínas Ero1 são encontradas duas formas: Ero1 α que é expressa em todos os tecidos e Ero1 β expressa em tecidos secretórios, tais como o pâncreas (SATO; INABA, 2012). Ambas, em concerto com PDI, realizam a oxidação e isomerização de proteínas não dobradas ou mal dobradas (BULLEID; ELLGAARD, 2011; SATO; INABA, 2012; SEVIER et al., 2007). Entretanto, nocautes para Ero1 em modelo eucarioto não apresentaram grandes distúrbios no dobramento oxidativo de proteínas secretadas e de superfície celular, sugerindo assim rotas adicionais a Ero1/PDI intra RE (ZITO et al., 2010).

Interessantemente, outras enzimas vêm sendo descritas como integrantes deste sistema de formação de dissulfetos, e estas, são capazes de realizar a formação de dissulfetos nos três reinos: fungos, bactérias e mamíferos (BULLEID; ELLGAARD, 2011; SATO; INABA, 2012). A proteína quiescina sulfidril oxidase (QSOX) é uma das enzimas descritas como integrante de uma rota adicional para eventos de formação de dissulfetos intra e extracelular, e possivelmente com importante significância funcional (HECKLER et al., 2008). Diversos estudos vêm buscando elucidar o real papel biológico da QSOX (ALON et al., 2012), sendo que todos eles relatam e correlacionam hipotéticos substratos com a sua localização, que é predominantemente encontrada

no lúmen do RE, nas cisternas de Golgi, e no meio extracelular assim como em fluidos secretados (CHAKRAVARTHI et al., 2007; MAIRET-COELLO et al., 2004; SEVIER, 2012).

1.3. QSOX

QSOX foi inicialmente descrita como uma enzima presente no trato reprodutor masculino, capacitada a reconhecer grupos sulfidril livre (SH) como substrato *in vitro*, com participação na oxidação de tióis protéicos a dissulfetos à custa da redução do oxigênio molecular (CHANG; MORTON, 1975). Já em 1979, Ostrowski e colaboradores, que visavam encontrar potenciais marcadores endógenos com ação andrógena no líquido seminal de rato, identificaram também a mesma sulfidril oxidase dentre as proteínas presentes neste fluido (OSTROWSKI; KISTLER; KISTLER, 1979). No ano seguinte, constatou-se que estas sulfidril oxidases eram flavoproteínas, ou seja, ligadas ao cofator FAD, e detinham de intensa atividade oxidase no líquido seminal de rato (OSTROWSKI; KISTLER; WILLIAMS-ASHMAN, 1979; OSTROWSKI; KISTLER, 1980). Na década de 90, a proteína foi caracterizada como muito importante no processo de dobramento oxidativo (HOOBER et al., 1999; HOOBER; THORPE, 1999), principalmente caracterizada no líquido de vesícula seminal de rato (Benayoun et al., 2001).

QSOX1 de fato, é composta por um domínio Trx na sua porção N-terminal, seguido de um domínio espaçador característico de QSOX, e um domínio *essential for respiration and vegetative growth* (Erv)/ *augmenter of liver regeneration* (Alr) na porção C-terminal, sendo este último domínio o qual contém o sítio de ligação a FAD (Figura 1), e especula-se que esta proteína, assim como Erv, possa ter uma estrutura de pseudo-dímero de cadeia simples, e que pode ter origens comuns com proteínas primordiais ligantes de metal (SEVIER, 2012; THORPE et al., 2002). Estas proteínas (Erv e Alr) são pequenas tiol oxidases com diversas funções (COPPOCK; THORPE, 2006), entretanto, há uma significativa diferença entre o domínio ligante de FAD da QSOX e determinadas Erv, sendo estericamente o sítio catalítico da QSOX mais acessível aos substratos que o da Erv (ALON et al., 2012; SEVIER, 2012). Recentemente, Alon e colaboradores (2012), elucidaram a estrutura tridimensional da QSOX1 de *Homo sapiens* e *Trypanosoma brucei*, e demonstraram que a proximidade dos domínios Trx e Erv são cruciais para a atividade catalítica da enzima, pois

permitem a transferência dos elétrons provenientes do substrato entre os motivos catalíticos.

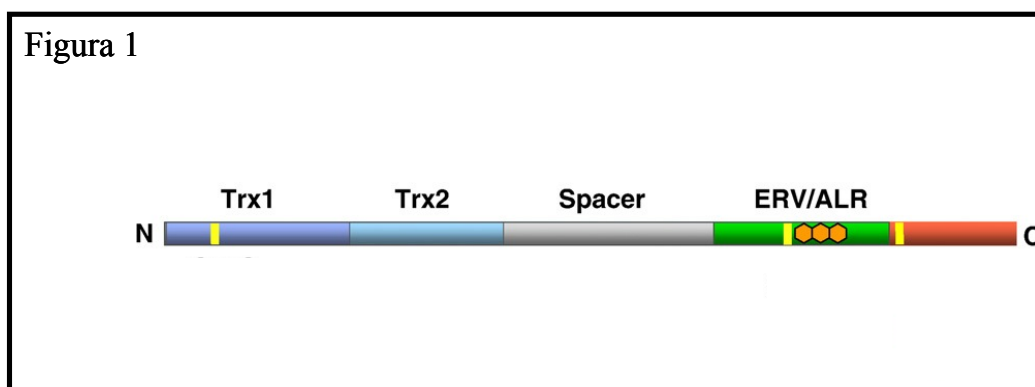


Figura 1: Esquema ilustrativo dos domínios da QSOX1 (isoforma curta).

Figura adaptada de Heckler et al. (2008).

A atividade catalítica da QSOX é dada através da catálise (oxidação) de dissulfetos em proteínas cliente reduzidas, com a redução do seu domínio CxxC_{Trx} proximal, o qual repassa subsequentemente os equivalentes eletrônicos ao domínio Erv/Alr, e posteriormente a FAD que realiza a transferência dos elétrons para os substratos receptores, como o oxigênio molecular e citocromo-c (HECKLER et al., 2008). O cofator FAD fica localizado dentro do cone formado pelas α -hélices 1, 2, e 4 no domínio ALR (WU et al., 2003), e através de uma série de reações de troca tiol-dissulfeto, este participa da oxidação de di(tióis) a dissulfeto com a redução concomitante de oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (reação 1). Esta reação é principalmente encontrada no lúmen do retículo endoplasmático granular (HECKLER et al., 2008; KODALI; THORPE, 2010; RAJE; THORPE, 2003; THORPE et al., 2002). Este modelo catalítico não é o mesmo para a enzima de aves; nesta espécie a forma dimérica da QSOX1 oxida o substrato reduzido através da redução de seus dois motivos CxxC_{Trx} (proximal) e CxxC_{distal} de uma subunidade, e posteriormente também o motivo CxxC_{prox} da outra subunidade (HOOBER; THORPE, 1999; RAJE; THORPE, 2003).

Reação 1



O gene da QSOX (*QSCN6*) já foi encontrado abundantemente em diversos eucariotos (animal e vegetal), e também em protistas e metazoários (HECKLER et al., 2008; THORPE et al., 2002). Há descrito em humanos duas formas para o gene QSOX, *QSOX1* (cromossomo 1q25.2) e *QSOX2* (cromossomo 9q34.3) (COPPOCK; THORPE, 2006). Radom e colaboradores (2006) descreveram para ratos a existência de duas sequências de cDNA para *QSOX1* em córtex cerebral de rato, sendo um transcrito longo e um transcrito curto que diferem por 851 nucleotídeos devido ao processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm). Sabe-se então, que o gene da *QSOX1* pode ou não sofrer processamento alternativo do seu RNAm gerando duas isoformas: Isoforma longa, com 12 éxons (*QSOX1a*), a qual possui um domínio transmembrana na região C-terminal; e uma isoforma curta, com 11 éxons (*QSOX1b*) que perde este domínio transmembrana após o processamento alternativo do RNAm (COPPOCK; THORPE, 2006). *A priori*, não há evidências de que os dois produtos da *QSOX1* possuam diferença em sua especificidade catalítica intrínseca, pois ambas detêm o mesmo conjunto de domínios catalíticos (HECKLER et al., 2008); entretanto, o nível de expressão protéica é significativamente diferente entre as duas isoformas (KODALI; THORPE, 2010), sendo a proteína *QSOX1b* a mais expressa na maioria dos tecidos (COPPOCK et al., 1993; HOOBER et al., 1996; OSTROWSKI; KISTLER, 1980).

Wittke e colaboradores (2003) descreveram a segunda forma do gene da *QSOX* (*QSOXN* ou *QSOX2*) em linhagem celular de neuroblastoma humano, a qual compreende 12 éxons, possui alta homologia com os membros da família *QSOX1*, e é predominantemente localizada próxima as membranas plasmática e nuclear. Este mesmo grupo de pesquisa demonstrou também que a inativação do gene *QSOX2* confere resistência a apoptose induzida por interferon (IFN), e que a indução da expressão de *QSOX2* sensibiliza as células se a apoptose.

A expressão de *QSOX1* já foi demonstrada em diversos ambientes intra (organelar e citoplasmática) e extracelulares, como trato reprodutor masculino (BENAYOUN et al., 2001; OSTROWSKI; KISTLER, 1980), fibroblastos de pulmão

(COPPOCK et al., 1993), tecido uterino (MUSARD et al., 2001), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (COPPOCK; THORPE, 2006), cérebro, epiderme (MATSUBA et al., 2002), glândula sebácea, placenta (THORPE; COPPOCK, 2007), leite bovino (JAJE et al., 2007), plasma sanguíneo e pâncreas (ANTWI et al., 2009; KATCHMAN et al., 2011), endotélio (DE ANDRADE et al., 2011), glândula mamária (PERNODET et al., 2012). Em nosso grupo demonstramos que a QSOX1 está presente em soro fetal bovino (ZANATA et al., 2005), como também em tecidos fetais derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (PORTES et al., 2008). Nesse trabalho (PORTES et al., 2008), mostra-se ainda que a expressão desta enzima em tecidos epiteliais aumenta durante o desenvolvimento fetal, indicando um papel regulatório no período da embriogênese.

Interessantemente, apesar de existirem muitos dados sobre a expressão e a atividade catalítica da QSOX, seus papéis biológicos ainda não foram estabelecidos. A enzima já se mostrou participante de eventos fisiológicos e fisiopatológicos, e muitas vezes com funções ambíguas. É conhecida a associação entre a expressão de QSOX1 e inibição da proliferação de diversas linhagens celulares (MUSARD et al., 2001; HELLEBREKERS et al., 2007), assim como possível biomarcador de malignidade em adenocarcinoma pancreático, provavelmente pela ativação da capacidade metastática (Antwi et al., 2009). Em eventos de morte celular, enquanto a QSOX2 foi descrita como pró-apoptótica (WITTKÉ et al., 2003), a QSOX1 já foi descrita como reguladora de eventos de: 1. Inibição de morte celular: anti-apoptótica (MOREL et al., 2007), biomarcadora de bom prognóstico em câncer de mama humano (possivelmente através da inibição de tumorigênese (PERNODET et al., 2012); 2. Ativação de morte celular: indução de processos apoptóticos e de diferenciação em células endoteliais e macrófagos na aterosclerose (DE ANDRADE et al., 2011), e proliferativa através da ativação de metaloproteases de matriz extracelular (MMP) -2 e -9 (KATCHMAN et al., 2011). Sendo assim, baseando-se em sua atividade catalítica e sua vasta localização intra e extracelular, entende-se o envolvimento da QSOX1 tanto em fenômenos de proliferação, quanto morte e diferenciação celular, provavelmente devido a sua atuação no dobramento e redobramento oxidativo de diversas proteínas chaves para estes processos.

1.4. QSOX1b na MEC

Como já mencionado, a isoforma QSOX1b é a mais abundante e prevalentemente secretada para o meio extracelular (HOOBER et al., 1996; OSTROWSKI; KISTLER, 1980; ZANATA et al., 2005). Para este ambiente a literatura propõe desde funções antimicrobianas pelo produto de sua catálise, o peróxido de hidrogênio, a funções relacionadas à geração de estruturas protéicas ligadas/estabilizadas por pontes dissulfeto (ALON et al., 2012; SEVIER, 2012). Entre estas especulações, o dobramento de cadeias polipeptídicas que sejam muito grandes para serem montadas intracelularmente, e que necessitam ser finalizados no meio extracelular (HECKLER et al., 2008), ou ainda o remodelamento da matriz extracelular são possíveis funções biológicas da QSOX1. Dentre as evidências já apresentadas aqui, sabe-se também que a expressão de QSOX1 acompanha a expressão de várias proteínas de matriz extracelular (MEC), como subunidades de colágeno e decorina (COPPOCK et al., 1993), e também lisil oxidase (HECKLER et al., 2008). Recentemente, Ilani e colaboradores (2013), mostraram que a correta deposição de laminina na MEC secretada por fibroblastos é dependente da presença de QSOX1 ativa.

1.5. Estado redox da MEC

Nos dias de hoje, o microambiente da MEC não tem recebido apenas importante participação e suporte e nutrição para as células, mas têm-se revelado um dos fatores mais cruciais para a ativação de proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular (LUKASHEV; WERB, 1998). De fato, a literatura propõe que enzimas redox presentes da MEC são cruciais em eventos de modelamento e remodelamento de constituintes da matriz, atuando sobre modificações pós-traducionais, por exemplo, formação de pontes dissulfeto (WEDEMEYER et al., 2000), ou na catálise da degradação, rearranjo e concentração de diferentes moléculas responsáveis pela ampla diversidade de MEC em diferentes tecidos (VAKONAKIS; CAMPBELL, 2007). Interessantemente, diversas proteínas de superfície celular são reguladas pelo estado de oxidação de seus tióis voltados para o lado extracelular (GELDERMAN et al., 2006; JIANG et al., 1999; LARAGIONE et al., 2003; SAHAF et al., 2005). Embora este processo ainda não seja bem conhecido, é possível que tal estado seja controlado

pelo estado redox do ambiente extracelular, ou por enzimas extracelulares (SAHAF et al., 2005), atuando por exemplo, sobre tióis de dissulfetos alostéricos (CHEN; HOGG, 2006), de integrinas e entre outras proteínas de superfície celular e extracelular (JORDAN; GIBBINS, 2006).

O arranjo estrutural dos constituintes da MEC é uma situação crucial para a regulação de fenômenos fisiológicos e fisiopatológicos (LUKASHEV; WERB, 1998). A estrutura tridimensional da MEC pode determinar o comprometimento celular em diversas situações, por exemplo, as neoplasias, onde a extensiva remodelação da MEC normal pela degradação de moléculas pré-existentes e a neo-síntese de componentes da MEC está relacionada com o crescimento e a progressão tumoral (WONG; RUSTGI, 2013). Estudos já comprovaram que é factível a utilização de moléculas de MEC como alvo para terapia anti-tumoral, como por exemplo, a glicoproteína Fibronectina (FN) (KASPAR; ZARDI; NERI, 2006) e o colágeno tipo IV, este último possibilita não só a modulação na expressão de integrinas como também é um ligante para a metaloprotease 2 (A), altamente secretadas por células de neuroblastoma (TZINIA et al., 2002).

1.6. Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína encontrada na MEC, onde tem como função interagir com moléculas de fibrina, heparina, colágeno, integrina e outras de superfície celular, através da sua alta capacidade adesiva. Ela está localizada na MEC dos tecidos conjuntivos (FN celular) e é secretada principalmente por fibroblastos, e também é encontrada na forma solúvel nos fluidos corporais de vertebrados, principalmente no plasma sanguíneo (FN plasmática), (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010; VAKONAKIS; CAMPBELL, 2007).

Ambas as formas de FN (celular e plasmática) são constituídas de duas subunidades proteicas, cada uma com aproximadamente 230 – 270 kDa, ligadas por duas pontes dissulfeto (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010). O transcrito originado do gene *FN* também sofre processamento alternativo do RNAm, levando a ocorrência de 20 isoformas diferentes de FN em humanos. Este processamento do RNAm afeta alternativamente dois domínios extras da molécula, domínio extra A (DEA) e domínio extra B (DEB), culminando em propriedades distintas e variação na

função entre as isoformas (WHITE; BARALLE; MURO, 2008), sendo que mutações nestes genes codificantes para FN acarreta em várias desordens fisiológicas (WHITE; MURO, 2011).

A FN plasmática é secretada por hepatócitos diretamente na circulação, e não possui os domínios DEA e DEB (WHITE; MURO, 2011), contudo, esta forma de FN é amplamente depositada na MEC de diversos tecidos de forma significativamente alta (MORETTI et al., 2007). Antes de ser secretada para o meio extracelular ela passa pelo RE e cisternas de Golgi, onde recebe modificações pós traducionais como glicosilação, fosforilação, e adição das duas pontes dissulfeto inter-cadeias localizadas na região C-terminal, que resulta na estrutura dimérica da molécula (ROMBERGER, 1997).

A forma de FN celular é encontrada primordialmente depositada na MEC de diversos tecidos na forma multimérica (fibrilar), formando assim uma plataforma de MEC junto às outras proteínas de matriz, entretanto, a forma plasmática também pode ser encontrada depositada na MEC ou em solução do plasma sanguíneo (ROMBERGER, 1997; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010). Uma molécula do dímero de FN possui aproximadamente 28 pontes dissulfeto intra-cadeia e dois grupos sulfidril livres por monômero, e estes são capazes de interagir com receptores celulares ou moléculas da matriz como colágeno, fibrina e proteoglicanos de heparan sulfato (Figura 2) (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011; TANZER, 2006; VARTIO; KUUSELA, 1991).

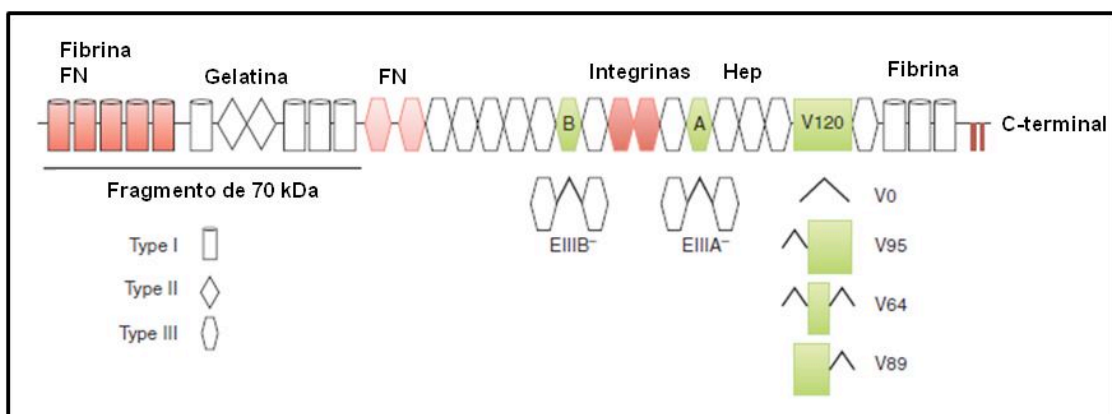


Figura 2: Estrutura molecular da FN, demonstrando quais regiões são afetadas pelo processamento alternativo do mRNA.

Cada monômero possui 12 repetições do tipo I (cilindros), duas do tipo II (Diamantes), e quinze constitutivas do tipo III (hexágono). Duas repetições do tipo III são incluídas ou excluídas pelo processamento alternativo do mRNA (EIIIA ou DEA, e EIIB ou DEB, em verde). Há ainda uma terceira região susceptível ao processamento que é a região V (caixa verde), esta pode ser incluída (V120), excluída (V0), ou parcialmente incluída (V95, V64, V89). Acima tem-se as região ligantes com outras moléculas. Os domínios relacionados com a formação da forma fibrilar (multimérica) são indicados em vermelho, atentar para a presença desta região dentro do fragmento gerado de 70 kDa. Na porção carboxi terminal há a presença de duas pontes dissulfetos para dimerização da molécula. Esquema adaptado de Schwarzbauer and DeSimone, 2011, pág. 2.

A FN é secretada através da rota secretória convencional das células. Contudo, o dobramento final da FN é realizado no meio extracelular, através da ajuda de integrinas de superfície celular, o estado redox deste ambiente, e também outros processos enzimáticos ainda desconhecidos (ENGLER et al., 2009; SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999). Este dobramento e redobramento da FN, assim como outras proteínas de MEC, são cruciais para a homeostase tecidual e manutenção de uma matriz íntegra e funcional (SAHAF et al., 2005). O que é confirmado por Castelletti e colaboradores (CASTELLETTI et al., 2008), os quais demonstram que mutações no gene da FN culminam em alguns tipos de glomerulopatias.

Langenbach e Sottiles (LANGENBACH; SOTTILE, 1999), descreveram que FN possui sua própria atividade dissulfeto isomerase catalisada por seus motivos CxxC, o que poderia promover o seu dobramento extracelular, e vai de acordo com o descrito por Vartio & Kussela (1991), de que a dimerização e formação de pontes dissulfetos intra-cadeia da FN podem ocorrer espontaneamente. Entretanto, sabe-se que a completa formação de pontes dissulfetos e uma exata conformação estrutural necessitam de outros fatores coadjuvantes encontrados apenas no meio extracelular (ENGLER et al., 2009).

Com base no que foi exposto e no fato de que a isoforma curta da QSOX1 foi primeiramente identificada em cultivo de fibroblastos humanos em quiescência, propõe-se e se reforça a hipótese de que QSOX1 isoforma curta possa atuar como catalisadora oxidativa para a elaboração e arranjo das moléculas de MEC que não estejam apropriadamente estruturadas. Neste trabalho, foram realizados experimentos para evidenciar de que a FN possa ser substrato para enzimas tiol oxidases, especificamente a QSOX1b recombinante.

2. Objetivos

2.1.1. Geral

Avaliar se a fibronectina pode atuar como um substrato extracelular da QSOX1b e as possíveis implicações biológicas deste processo oxidativo.

2.1.2. Específicos

1. Produção e caracterização da atividade sulfidril oxidase da QSOX1b recombinante de camundongo.
2. Análise da FN como possível substrato para a QSOX1b.
3. Análise da FN multimerizada pela enzima, e dos seus efeitos biológicos.
4. Análise do efeito da superexpressão da QSOX1b no conteúdo de tióis extracelulares.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção das Proteínas Recombinantes mQSOX1b de camundongo (mQSOX1b) selvagem e mutante

3.1.1. Construção e clonagem da mQSOX1b:

A construção dos vetores de expressão codificantes para a QSOX1b de *Mus musculus* selvagem e mutada (C452S) já havia sido realizada por nosso grupo de pesquisa (PORTES et al., 2008, e STECLAN, C.A. 2011). Brevemente, para a construção da enzima selvagem houve a clonagem de um fragmento de 1533 pares de bases (nt + 215 a + 1747, NM 023268) correspondente a maior parte da região codificadora da proteína, através da extração de RNAm de extrato tecidual de vesícula seminal de camundongo. Este fragmento obtido foi ligado ao vetor pET32a+ (Invitrogen), o qual possui o promotor do fago T7, repressão em *cis*, resistência ao antibiótico ampicilina e origina proteínas fusionadas a uma sequência de 6 histidinas na região C-terminal, originando assim o vetor *pET32a+/QSOX selvagem* codificante para a proteína mQSOX1b. Para a obtenção da proteína mutada foi realizada a subclonagem da enzima com a inserção de uma mutação do aminoácido 452, resultando na substituição de um aminoácido cisteína (C) para serina (S) (C452S), através da técnica do MegaPrimer (LING; ROBINSON, 1997). Este objetivo foi alcançado através da construção de um iniciador (megaprimer) com a mutação inserida, o qual foi através da realização de uma PCR com os seguintes iniciadores: *Mut 452 forward*, 5'- CTTCTTTGGCAGTCGTGACTGTGC – 3' (IDT); e o iniciador reverso da clonagem 5' – CCCAAGCTTTCAAGAAGAGTCTATGACGAT – 3' (PORTES et al., 2008). O produto obtido (com 304 pb) foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose 1%, por 50 minutos sob corrente constante de 70 volts (V), com tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). O gel foi exposto à coloração em brometo de etídeo e a banda do gel correspondente ao megaprimer foi purificada com o Kit Perfect Prep Gel – CleanUp (Eppendorf), seguindo recomendações do fabricante. Esta sequência foi denominada MegaPrimer *Mut C452S reverso*. Em outra PCR utilizando-se o os iniciadores *Mut C452S reverso* e T7 promotor 5'- TAATACGACTCACTAT – 3' (Novagen), houve a obtenção da sequência mutada e posterior subclonagem em *pET32a+*. A mutação então, foi dada através da troca de

uma timina (*t*) (códon UGU) por uma adenina (*a*) (códon AGU), convertendo assim de C para S, com isso originou-se o vetor *pET32a+/QSOX mutante* codificante para a proteína mQSOX1b C452S.

3.1.2. Transformação e clonagem

Cepas de bactérias DH5 α (Novagen) (*Escherichia coli*) eletrocompetentes foram transformadas com os respectivos vetores de expressão seguindo recomendações *pET System Manuall – 11th Edition*). Resumidamente, as bactérias foram transformadas por eletroporação (2,5 kvolts) com 1 – 4 ng de plasmídeo, em eletroporador Gene Pulser X-Cell (BioRad). Em seguida, foram resuspendidas em meio SOC (triptona 20 g/L, extrato de levedura 5 g/L, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glicose 0,2 M), e incubadas a 37° C a 100 rotações por minuto (rpm) por 1 hora (período de recuperação). Após este período, os cultivos foram plaqueados em meio sólido LB Ágar (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, Agar-ágar 15 g/L) contendo os antibióticos pertinentes para o vetor (Ampicilina, 50 μ g/ml) por 16 horas a 37° C. Das colônias transformantes para cada vetor, foram escolhidas 15 colônias para confirmação da presença da sequência clonada.

3.1.3. Sequenciamento:

Antes da expressão dos vetores, foram realizadas reações de sequenciamento automático dos insertos, utilizando-se o Kit ABL PrismTM Big Dye *Termination Cycle Sequencing Ready Reaction* (Perkin Elmer) conforme instruções do fabricante, e o processamento do mesmo foi realizado no sequenciador automático ABL Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer). Utilizou-se os iniciadores *T7 Promotor* e *T7 reverso 5' – CGCTGAGCAATAACTAGC – 3'*, específicos para o vetor pET32a+.

3.1.4. Expressão das enzimas recombinantes

Após confirmação da sequência codificadora clonada, foi escolhida a cepa bacteriana AD494, que expressa uma *tiorredoxina redutase* (TrxB) mutada, favorecendo a formação de pontes dissulfeto no citoplasma, e a produção de proteínas corretamente dobradas e ativas para transformação com os vetores e expressão das enzimas recombinantes. O procedimento de transformação e recuperação das cepas transformantes foi feito conforme já descrito anteriormente. Contudo, os antibióticos utilizados foram pertinentes para a cepa AD494 (canamicina, 75 µg/ml) e vetor (ampicilina, 50 µg/ml). Dentre as colônias positivas para o crescimento em meio seletivo, apenas uma colônia para cada vetor (selvagem e mutante) foi selecionado para o preparo do pré-inóculo (10 ml) em meio LB mais antibióticos. O meio foi crescido através de incubação por 16 hrs a 20° C, sob agitação de 200 rpm. Das culturas resultantes, 5 ml do meio saturado foi inoculado em 500 ml de meio LB/antibióticos e então foram novamente crescidos nas condições anteriores, até atingirem densidade ótica (D.O.) de 0,4 – 0,6 em 550 nm. Atingida a D.O., a expressão protéica foi induzida com 0,1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) por 16 hrs a 20° C, sob agitação de 200 rpm.

3.1.5. Purificação das proteínas recombinantes:

A cultura resultante da expressão foi sedimentada por centrifugação a 4.000 x g por 30 minutos (min), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 40 ml de água deionizada gelada, e a cada lavagem uma nova centrifugação. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 40 ml de tampão de lise nativa (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) e armazenado por 16 horas a -80° C para facilitação da lise bacteriana. Após esta etapa, as suspensões bacterianas foram lisadas por aplicação de alta pressão mecânica fornecida pela prensa de French (French Press). O extrato bacteriano obtido foi submetido à sedimentação (9.000 x g, por 30 min, a 4° C), o sobrenadante coletado e acrescido com FAD (50 µM) (Promega). A purificação foi realizada por cromatografia (resina de agarose) de afinidade a metal imobilizado (Ni²⁺-NTA (Quiagen), seguindo recomendações do fabricante. Rapidamente, os sobrenadantes recuperados dos extratos bacterianos foram individualmente incubados sob agitação com 1 ml de resina de níquel (resina

pré-equilibrada com tampão de lise nativa por 1 hr a 4° C) para ligação da etiqueta de histidina ao Ni²⁺. Após ligação, a solução (sobrenadante + resina) foi sedimentada sobre coluna empacotadora (Bio-Rad). Após empacotamento da resina, foram retirados contaminantes através de lavagens (aproximadamente 40 ml) com tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0). Subsequentemente, as proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). A presença de proteína foi acompanhada pela coloração amarelada do eluato e determinada através de leitura em 280 nm. Alíquotas de 10 µl de cada fase da purificação (*pellet* do lisado; sobrenadante da ligação com a resina (Void); lavado; e eluato) foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE 10%) com corrente constante de 30 mA.

3.1.6. Caracterização espectrofotométrica

A caracterização fotométrica das enzimas recombinantes foi realizada no espectrofluorímetro Tecan i-control (Infinite M-200) entre as faixas de 280 – 600 nm. As varreduras do espectro UV visível foram realizadas nas proteínas purificadas, dialisadas e diluídas em solução salina.

3.1.7. Determinação da concentração proteica

A concentração das proteínas recombinantes mQSOX1b foram determinadas através do perfil fotométrico em 456 nm, utilizando-se do coeficiente de extinção ($\epsilon_{456 \text{ nm}} = 12,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (HECKLER et al., 2008).

3.2. Obtenção da Fibronectina

3.2.1. Purificação da FN

A metodologia utilizada para purificação da molécula foi aprovada comitê de ética provido pela Plataforma Brasil, sobre o número CAAE: 12144613.2.0000.0105, “Dinâmica da multimerização da fibronectina "in vitro", sendo a coleta autorizada após leitura e aprovação do termo de consentimento (Anexo 1). O método utilizado foi adaptado de acordo com Poulouin e colaboradores (POULOUIN et al., 1999). Sucintamente, foram realizadas coletas de plasma sanguíneo humano a cada procedimento experimental, e todos os procedimentos foram realizados a 4° C. Para determinado volume de plasma coletado foram adicionados EDTA (2 mM) como anticoagulante, e PMSF (1 mM) (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma) como inibidor de proteases. O volume resultando foi filtrado em papel filtro comum, e igual volume foi adicionado do tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,3 contendo EDTA (2 mM) e DTPA (1 mM). A solução foi submetida a ligação em resina de Sepharose 4B CNBr – activated (Amersham – Biosciences) (6 ml) mobilizada em coluna de acrílico (30 cm) acoplada a um sistema de pressão e recirculação através de bomba peristáltica, por 16 hr a 4° C. Após período de ligação a resina foi lavada com 500 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 7,3), e a FN foi sequencialmente eluída da resina com a adição gradiente de uréia (2 - 4 M) diluída no mesmo tampão Tris-HCl. As frações coletadas foram analisadas em 280 nm, e a purificação confirmada através separação eletroforética em SDS-PAGE 5%, com corrente constante de 30 mA.

3.3. Redução da FN e Lisozima

3.3.1. Redução:

FN, 6 mg da proteína (purificada de plasma humano), e Lisozima, 2 mg de proteína (de clara de ovo, SIGMA), foram reduzidas na presença de: DTT (50x excesso sobre tióis da FN) em tampão Tris-HCl (50 mM) pH 7,3; contendo EDTA (2 mM); e uréia (8 M). Após 2 - 16 horas de incubação a 37° C no escuro, as proteínas (Lisozima e FN) foram ultrafiltradas (Millipore, 10 e 100 kDa, respectivamente) contra

tampão Tris-HCl (100 mM) pH 8,0; contendo EDTA (0,3 mM); DTPA (0,1 mM); Chellex; com e sem uréia (2 M) para FN, e sem ureia para lisozima. As frações resultantes foram dosadas pelo método de Bradford (1976) e a concentração de tióis determinada com utilização de DTNB (5 mM).

3.3.2. Mensuração de tióis totais:

A concentração de tióis livres foi determinada pela reação de Ellman (BENAYOUN et al., 2001), usando DTNB (5 mM), após o *desalting* e concentração das frações reduzidas por ultrafiltração (Millipore, 100 kDa). As concentrações de tióis foram calculadas pela reação de Ellman (TNB $\epsilon_{415\text{nm}} = \text{Abs}/14.140 \text{ M. cm}^{-1}$). Para avaliar o perfil de redução das moléculas, foi correlacionado o número de tióis totais passíveis de redução por molécula (1 mol de FN reduzida = 128 mol de -SH; e 1 mol de lisozima = 8 mol -SH) com aqueles achados pelo método de TNB, sendo que para FN a média de redução foi de 80 - 100% (na presença de ureia) e 20 a 40% (na ausência de ureia), e para lisozima 100% de redução na ausência de uréia.

3.4. Atividade enzimática da mQSOX1b

3.4.1. Cinéticas enzimáticas:

Foram realizados ensaios de cinética enzimática com mQSOX1b (selvagem e mutada) e hsQSOX1b (HECKLER et al., 2008) (vetor gentilmente cedido por Colin Thorpe, Universidade de Delaware, Estados Unidos). As atividades sulfidril oxidase das enzimas foram determinadas pelo método do ácido homovanílico/peroxidase de raiz forte (HVA/HRP) (RAJE; GLYNN; THORPE, 2002), usando DTT (50 μM a 500 μM), GSH (0,1 mM a 5 mM) e lisozima (20 μM a 100 μM) como substratos já conhecidos, e fibronectina (50 nM a 1 μM) nativa e reduzida como substrato hipotético. Uma curva padrão de calibração com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 μM) foi feita a cada ensaio. A fluorescência da reação foi monitorada pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 320\text{nm}$.

3.4.2. Tratamento matemático dos dados cinéticos:

Os valores de velocidade inicial (V_0) e velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) foram obtidos dos gráficos de fluorescência do “produto *versus* tempo” na sua porção linear (0-60 segundos), para cada condição experimental. As diferenças nas fluorescências entre este intervalo de tempo (ΔF) foram convertidas em valores de concentração de peróxido de hidrogênio através da curva de calibração com peróxido de hidrogênio autêntico. Para a obtenção de valores de K_M , os dados foram tratados pelo program GraphPad Prism 5.0, com parâmetros de regressão não linear, Michaelis-Menten.

3.5. Ensaio de Ligação FN-Gelatina

A interação adesiva entre FN e gelatina foi testada através do ensaio de ligação a gelatina conforme descrito por Majors e colaboradores (2002), com algumas alterações. Resumidamente, 200 ng de gelatina (Sigma) foram adsorvidas por poço em placa de 96 poços durante 16 hr, a 4° C. Após adsorção, as regiões não adsorvidas foram bloqueadas com a adição de 100 μ l de solução BSA (0,1 %). A solução de bloqueio foi retirada através de 5 lavagens com PBS, e então os produtos das cinéticas entre FN (nat e red) e mQSOX1b (total de 100 μ l, FN (400 nM) e mqsox1b (50 nM)) foram incubados por 1 hr, a 30° C. Em seguida, os poços foram lavados com solução salina (3x), e a interação FN-gelatina determinada por imunomarcção. Para a detecção foram utilizados anticorpo primário α -FN mouse (Sigma, 1:300) e anticorpo secundário α -mouse HRP (Sigma, 1:2000), as condições experimentais são descritas conforme segue no tópic *Imunoensaio Elisa*.

3.6. Ensaio de Digestão Triptica

A digestão triptica das frações de FN foi realizada de acordo com Garcia-Pardo e colaboradores (GARCIA-PARDO; PEARLSTEIN; FRANGIONE, 1985). Brevemente, foram utilizadas razões de massa entre enzima (tripsina bovina, Sigma) e substrato de 1 μ g : 1000 μ g, respectivamente. A solução de digestão foi condicionada por 30 min á

30° C, e parada com PMSF (4 mM). Concluída a digestão, as amostras foram analisadas por separação eletroforética em SDS-PAGE (ver tópico *Separações eletroforéticas*).

3.7. Separações electroforéticas

3.7.1. SDS – PAGE para mQSOX1b e extratos celulares:

Foi utilizada a técnica de SDS-PAGE para a separação eletroforética das proteínas e extratos celulares. Quatro por cento de acrilamida/bis acrilamida em tampão 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) contendo 0,4% SDS foi utilizado para o gel de empilhamento. Para o gel de separação, foi utilizada proporção padrão de 10% de acrilamida/bis acrilamida (1:40) em tampão 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) contendo 0,4% SDS. Agentes catalisadores (persulfato de amônio e *N*-tetrametil 20-etilenodiamina, TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos. Quantidades em microgramas de proteínas de cada amostra foram misturadas aos tampões de amostra, não redutor (62 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,2% SDS, 10% glicerol, 0,005% azul de bromofenol) ou redutor (com adição de 50 mM β -mercaptoetanol), na proporção de 1:5 (tampão de amostra: amostra), e quando necessário fervidas durante aproximadamente 5 minutos. A separação eletroforética foi realizada com aplicação de corrente constante de 10 mA para o empilhamento, e corrente constante de 20 mA para separação eletroforética. Marcadores de pesos moleculares foram utilizados para determinação das massas das proteínas de interesse.

3.7.2. SDS – PAGE para FN:

Para os ensaios de multimerização, a proporção de acrilamida/bis acrilamida (em tampão 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; 0,4% SDS) foi alterada de 1:40 para 1:80, para facilitação da entrada de agregados protéicos na malha de acrilamida. Em muitas condições experimentais o gel de empilhamento não foi utilizado, apenas de

separação, visto que as proteínas eram oriundas de processos de purificação consecutivos. A corrente constante aplicada foi de aproximadamente 20 mA para todas as experimentações, contudo o tempo de corrida variou conforme o propósito.

3.7.3. SDS – PAGE para produtos da digestão triptica:

Para as separações eletroforéticas de diversos tamanhos de fragmentos gerados pela digestão triptica, foi realizada a confecção de uma malha para separação com gradiente de concentração de acrilamida entre 5 – 12 %. As condições de preparação e corrida foram às mesmas do tópico acima.

3.8. Imunodeteccões

3.8.1. Western Blot:

A partir das separações eletroforéticas das proteínas por SDS-PAGE, as proteínas aprisionadas na malha de acrilamida foram transferidas e imobilizadas sobre membrana de nitrocelulose (0,45 μm – Amersham Biosciences, USA) durante 2 horas sob voltagem constante de 10 V em sistema de transferência *semidry* (BioRad). Para transferência foi utilizado tampão contendo Glicina (192 mM), Tris (25 mM), SDS (0,037%) e Metanol (20%). Após transferência o restante da membrana foi bloqueado com proteínas de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé) (5%) diluídas em tampão TBST (NaCl 129 mM, Tris 20 mM, e Tween 20 0,05%) por duas horas. Finalizado o bloqueio, a membrana foi imunomarcada com os respectivos anticorpos primários (α -Q6 goat, Santa Cruz, 1:1000; e α -FN mouse, Sigma, 1:1500) em tampão de bloqueio, durante 16 horas, a 4°C, e consecutivamente com os anticorpos secundários (conjugado a peroxidase, HRP) (α -goat, BD, diluição 1:4000; e α -mouse, Sigma, diluição 1:5000) também em tampão de bloqueio, incubados durante uma hora à temperatura ambiente. Entre a incubação com os anticorpos, e após, a membrana foi

lavada cinco vezes, com duração de 5 - 10 min cada lavagem, com TBST. As membranas resultantes foram incubadas com substrato para a reação quimioluminescente (GE) por 5 min, e após este tempo foram expostas a filme de auto-radiograma (Kodak) para a visualização adequada da presença do antígeno.

3.8.2. *Imunoensaio de Elisa:*

Os respectivos antígenos ou coatings foram adsorvidos em placa de poliestireno para ELISA durante 16 hrs a 4° C, e após lavada 5 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05 % de Tween 20). Para bloqueio, foram adicionados tampão de lavagem com BSA (1%) por 1 hr a 37° C, seguida de ciclo de 3 lavagens. Para detecção do antígeno esperado, foi adicionado anticorpo primário correspondente (16 hrs, a 4° C), e anticorpo secundário anti IgG acoplado a HRP (BD) (2 hrs, a 25° C), ambos diluídos em tampão de bloqueio, sempre tomando cuidado para o secundário ser condizente com o animal imunizado para o primário. Após imunomarcação, novo ciclo de lavagens foi efetivado com 50 µl de tampão citrato (pH 5,0). A detecção foi realizada com o uso de o-dihidroclorato de fenilenodiamina (OPD) diluído em tampão citrato contendo H₂O₂. A reação foi parada com a adição de H₂SO₄ [4 M] (100 µl), e leitura da coloração gerada foi detectada com leitura em 490 nm.

3.9. Ensaaios com linhagens celulares

3.9.1. *Culturas celulares:*

As linhagens utilizadas foram: 3T3 (fibroblasto de camundongo), *Hek 293t* (do inglês: Transfection of Human Embryonic Kidney Cell-line 293, linhagem celular de rim de embrião humano voltado para transfecção), *HeLa* (células de câncer cervical, Henrietta Lacks), e *Rasm* (células de músculo liso de aorta de rato) todas providas pela ATCC, e cultivadas conforme recomendações da ATCC. Todas as culturas foram mantidas em uma estufa com 5% de CO₂ e temperatura constante de 37° C, o meio era trocado três vezes por semana, e quando confluentes às células eram expandidas ou descartadas. A contagem de células foi feita com câmara de Neubauer espelhada.

3.9.2. Adesão celular:

O perfil de adesão celular foi realizado através do plaqueamento de células sobre diferentes *coatings* adsorvidos. As proteínas adsorvidas foram os produtos da cinética, matrigel (controle positivo de adesão), e BSA (controle negativo de adesão), todas na concentração de 15 µg/ml, diluídas em PBS (adsorção durante 16 hrs, a 4° C). Após adsorção dos *coatings* testes, as regiões com ausência de proteína foram bloqueadas com solução BSA 0,1% por uma hora a temperatura ambiente. Após todo este processo, as respectivas células foram soltas (tripsina/EDTA 0,25%) das placas de origem, e aproximadamente $5 - 10 \cdot 10^3$ células foram plaqueadas sobre as moléculas previamente adsorvidas. Após plaqueamento as culturas voltavam para estufa de CO₂, e eram mantidas lá por 2 hrs. Após este período, as células foram lavadas com PBS (3 vezes, sob T.A.), fixadas com metanol e coradas com azul de metileno (0,4% de azul de metileno em 30% metanol, por 30 min). O corante foi eluído com ácido acético (1%) diluído em metanol, e a absorbância determinada em 650 nm.

3.9.3. Proliferação Celular:

As células foram soltas conforme o item anterior, e foram plaqueadas cerca de $1,5 \cdot 10^3$ células por poço em placas com 96 poços, já com as proteínas adsorvidas (nas mesmas condições do item anterior, *adesão celular*). A proliferação das células foi determinada por uma medida indireta de densidade celular após 24, 48 e 72 hrs do plaqueamento. Para isso, as células foram coradas com violeta cristal (0,5% Cristal Violeta em 20% metanol, por 10 min), lavadas com PBS, e posterior lise com citrato de sódio (0,1 M). A absorbância foi determinada em 550 nm.

3.9.4. Vetores para expressão eucariótica:

Foram utilizados os vetores pEGFP-N2 (Clontech) e pEGFPmQSOX1b-GFP (inserto codificando QSOX1 de *Mus musculus*), produzido por nosso laboratório, utilizando a sequência de referência NM_023268.2 (NCBI Reference Sequence). Os

métodos de clonagem e obtenção do vetor foram realizados como descrito por Sambrook & Russel (2001).

3.9.5. *Transfecção celular:*

Células HEK 293T (4.10^5 células) foram transfectadas pelo método de co-precipitação por cálcio (PÜSCHEL; ADAMS; BETZ, 1995). Células HeLa (80% de confluência) foram transfectadas utilizando FuGENE (Roche, Indianápolis, IN), seguindo recomendações do fabricante. Em ambas as transfecções, foi utilizado 10 µg do vetor de interesse. As células transfectadas foram cultivadas em seus respectivos meios cultura, contendo SFB (10%) e mantidas a 37° C em estufa de CO₂ 5% para expressão das proteínas GFP e QSOX1-GFP. Após tempo de expressão necessário, as células eram lavadas com PBS gelado, soltas com adição de tripsina/EDTA 0,25% ou scraper (rodinho), centrifugadas a 2.000 rpm para sedimentação, e o sobrenadante e pellet celular destinado conforme sua finalidade.

3.9.6. *Microscopias*

Nas imagens de fluorescência e contraste de fase (DIC) as células foram fotografadas a fresco, em microscópio Zeiss (Zeiss Axiophot). Já para as imagens de microscopia confocal as imagens foram capturadas em microscópio confocal Leica (SP5 laser-scanning confocal microscope). Para visualização da expressão das proteínas GFP e mQSOX1b-GFP, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 4% paraformaldeído (PFA) por 20 min, após isso, foram lavadas novamente (3 vezes com PBS) e permeabilizadas por 30 min com saponina (0,01%) em PBS, foi então realizada a marcação do núcleo com 4', 6-diaminidino-2-fenilindol (DAPI) (3 µM) (Invitrogen) durante 10 min à temperatura ambiente. As células foram lavadas (3 vezes com PBS) e então foi realizada a montagem das lâminas utilizando meio de conservação Gel Mount Aqueous (Sigma).

3.9.7. Mensuração de tióis de superfície celular, e MEC:

As células cultivadas em seus respectivos meios foram soltas (com PBS/EDTA 0,5%), em seguida o pellet celular foi lavado com PBS gelado (3 vezes), e após lavagem as células eram resuspensas e incubados por 20 min a 37° C com DTNB (200 µM). A suspensão de células foi centrifugada a 2.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante coletado e a absorbância lida em 412 nm, e o pellet reservado para determinação da concentração proteica. A determinação de tióis foi realizada com a normalização pela concentração proteica (SH mol/mg).

3.10. Extratos protéicos e dosagens

3.10.1. Extrato celular:

O sedimento de células foi acrescido de tampão de lise Tris-HCl (50 mM) pH 7,4; NaCl (150 mM); DTT (1 mM); MgCl₂ (1,5 mM); EDTA (4 mM); glicerol (10%); Triton X-100 (1%) e inibidores de proteases, e incubado por 30 minutos em banho de gelo, Posteriormente o extrato proteico foi clareado por centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C e realizada a dosagem proteica.

3.10.2. Dosagens proteicas:

O teor de proteínas das amostras foi dosado segundo o método de Bradford (Bradford, 1976).

3.11. Tratamento estatístico

A análise estatística dos experimentos realizados foi computada nos programas GraphPad Prism 5 software (San Diego, CA) e Sigma Stat 32, ambos com acesso livre pela internet no formato demo.

4. Resultados e discussão

Desde a descrição da proteína QSOX nos anos 80 (OSTROWSKI; KISTLER; KISTLER, 1979; OSTROWSKI; KISTLER; WILLIAMS-ASHMAN, 1979; OSTROWSKI; KISTLER, 1980), muitos trabalhos buscam elucidar sua estrutura e atividade catalítica (ARAKI; INABA, 2012; COPPOCK; THORPE, 2006; HECKLER et al., 2008; KODALI; THORPE, 2010; THORPE et al., 2002), e poucos outros trabalhos recentes mostram evidências e algumas especulações sobre o papel biológico desta enzima (DE ANDRADE et al., 2011; ILANI et al., 2013; KATCHMAN et al., 2011). Neste trabalho, nós realizamos a expressão da QSOX1 isoforma curta recombinante de camundongo (*Mus musculus*) (mQSOX1b), buscando elucidar seu possível papel biológico frente a proteínas secretadas para a matriz extracelular, especificamente fibronectina, que é uma proteína de alta massa molecular, e rica em tióis.

4.1. Caracterização espectrofotométrica da mQSOX1b

Para a obtenção da proteína mQSOX1b foi realizada a transformação do vetor na cepa bacteriana *Escherichia coli* AD494. Esta cepa favorece a formação de pontes dissulfeto no citoplasma, permitindo a produção de proteínas corretamente dobradas e ativas, o que é de crucial importância para QSOX1, visto a presença de suas duas pontes dissulfetos determinantes para sua atividade oxidase descrita para a enzima recombinante humana (ALON et al., 2010; HECKLER et al., 2008). Foi realizado também a clonagem e produção da proteína recombinante mQSOX1b mutante no segundo sítio catalítico (mQSOX1b C452S), onde há a substituição no aminoácido 452 de uma cisteína (C) para uma serina (S), sendo que a atividade oxidase foi abolida na forma mutada. Em ambas as enzimas, selvagem e mutada, foram obtidas características compatíveis com as esperadas e já preditas pela literatura, como, por

exemplo, massa molecular (Figura 3A, e B) e perfil espectrofotométrico (Figura 3C), e também o perfil das etapas de purificação da enzima recombinante (Figura 4) (RANCY & (HECKLER et al., 2008; KODALI; THORPE, 2010; RANCY; THORPE, 2008; ZHENG et al., 2011) (NCBI Reference Sequence: NP_075757.1). Ao comparar o perfil espectrofotométrico das duas enzimas, percebe-se que a absorvância em 456 nm é menos pronunciada na mQSOX1b C452S, isto acontece porque a capacidade de retenção do cofator FAD é prejudicada devido a alteração conformacional acarretada pela ausência do dissulfeto no motivo proximal, sendo este alterado de CxxC_{Prox} para CxxS_{Prox} (HECKLER et al., 2008).

Ambas as sequencias codificadoras para as proteínas recombinantes (selvagem e mutada) foram inseridas no vetor pET32a+ (Novagen). Este vetor confere às proteínas recombinantes a fusão de uma etiqueta de tiorredoxina, a qual viabiliza maior solubilidade e rendimento proteico para aquelas proteínas com dissulfeto intracadeia polipeptídica. Entretanto, como o interesse do trabalho era sobre as propriedades redox destas proteínas, a etiqueta foi removida após digestão com trombina. A identidade da mQSOX1b digerida foi confirmada pelo espectro, pela massa molecular em ensaios de eletroforese (Figura 5).

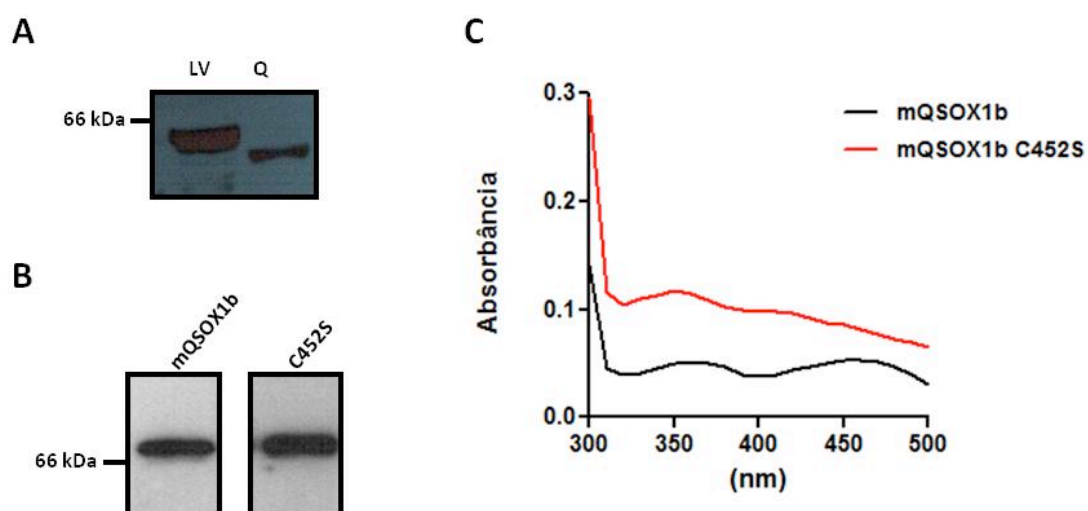


Figura 3: Perfis das enzimas mQSOX1b ativa e mutada (C452S).

A, Western Blotting da proteína recombinante mQSOX1b. **Q**, para proteína QSOX recombinante digerida (5 µg); **LV**, extrato de vesícula mais líquido seminal de rato (50 µg), controle positivo para a presença da enzima (Benayoun et al., 2001). **B**, as enzimas não digeridas mQSOX1b ativa e inativa (C452S), (5 µg).

Em ambas, imunomarcação com anticorpo primário anti-Q6 (goat) (1:1000) (Santa Cruz) e anticorpo secundário anti-goat HRP (1:4000) (BD). **C**, Perfil espectrofotométrico das proteínas recombinantes QSOX1b de camundongo ativa (mQSOX1b) (3 μ M) e mutada (mQSOX1b C452S) (5 μ M). Perfil espectrofotométrico entre 280 – 600 nm. Notar pico de absorvância proeminente em \pm 456 nm.

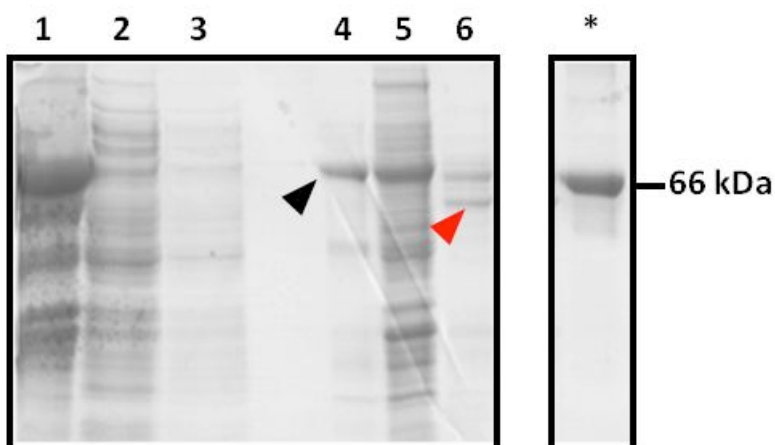


Figura 4: Separação eletroforética por SDS – Page do processo de purificação da mQSOX1b.

1. Pellet do lisado bacteriano; 2. *Void*, sobrenadante do pellet que não ligou na resina; 3. Lavado, produto da lavagem da resina; 4. *Eluato*, representativo do *eluato* após concentração em Amicon (50 kDa); 5. Pellet do *eluato*; 6. mQSOX1b após digestão com tripsina (0,15 U/3 μ g) para retirada da etiqueta de tiorredoxina, com aproximadamente massa molecular de 55 kDa (cabeça de seta vermelha); * BSA, utilizado como padrão de massa, (5 μ g). Cabeça de seta preta indica mQSOX1b sem digerir. Coloração com azul de *coomassie*.

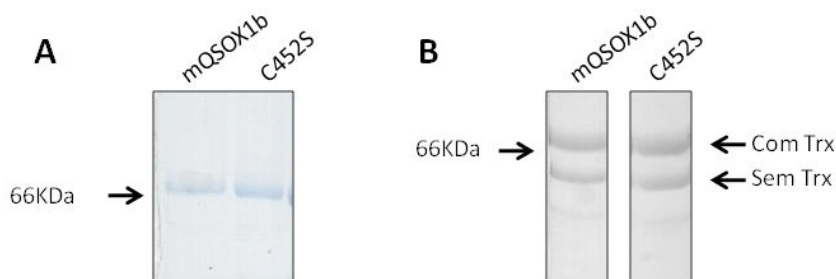


Figura 5: SDS-PAGE das mQSOX1b selvagem e mutante C452S fusionadas ou não a etiqueta de tiorredoxina.

A, Perfil eletroforético de ambas as enzimas, em gel de acrilamida 10%, com massa aproximada de 70 kDa. **B**, Perfil da digestão parcial das enzimas com trombina (0,03 U/3 µg) (10 µg por canaleta). Na figura **B**, as setas indicam as proteínas com e sem etiqueta de tiorredoxina, presentes devido baixa concentração de trombina para digestão. Coloração com azul de *coomassie*.

4.2. Caracterização da atividade enzimática da mQSOX1b

Para as caracterizações enzimáticas das enzimas recombinantes foi utilizado o método de fluorescência contínua descrito por Raje e colaboradores (RAJE; GLYNN; THORPE, 2002). Neste método, o produto da reação de oxidação do substrato pela QSOX1, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), é utilizado pela enzima peroxidase de raiz forte (HRP) para a dimerização de dois ácidos homovanílico (HVA). Esta reação de dimerização do HVA gera um composto fluorescente que pode ser quantificado (Figura 6).

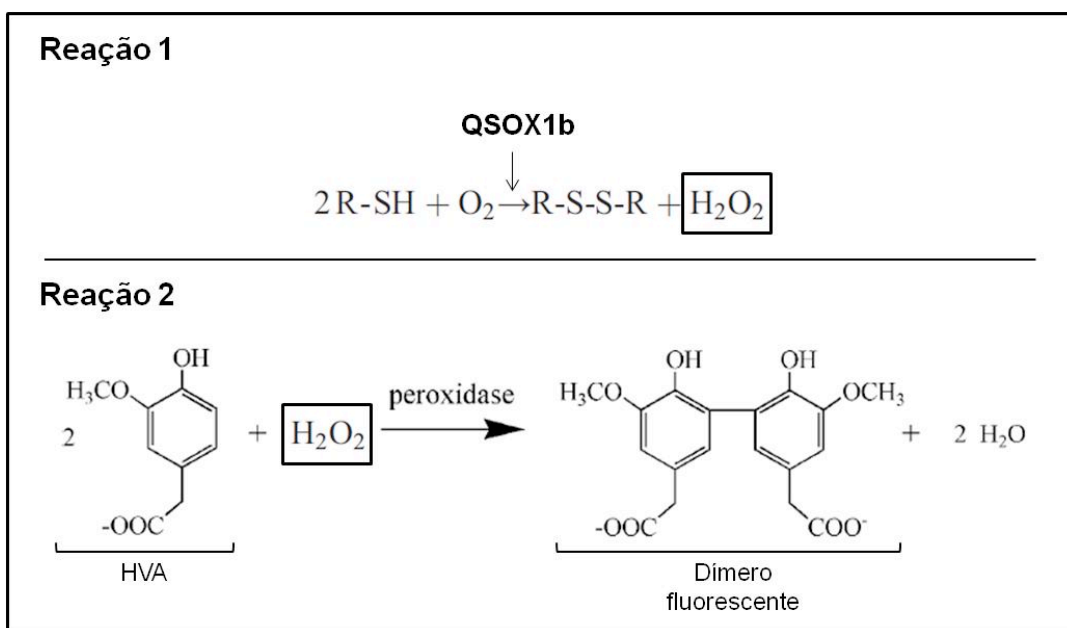


Figura 6: Esquema ilustrativo do método indireto de quantificação da atividade quiescina sulfidril oxidase por fluorescência contínua.

Na **reação 1**, há a oxidação de dois grupos sulfidril livre (-SH) a dissulfeto (S-S) com a concomitante produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), pela enzima em questão, QSOX1. Na reação 2, o H₂O₂ gerado pela reação 1 é utilizado como substrato pela peroxidase (HRP) para a dimerização de dois ácidos homovanílico (HVA), resultando em um dímero de HVA e água (H₂O). A fluorescência deste dímero pode

ser quantificada ($\lambda_{exc} = 320 \text{ nm}$, e $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$). Esquema adaptado de Raje e colaboradores (2002), e Heckler & Thorpe (2008b).

4.2.1. DTT, GSH e Lisozima como substratos padrão da QSOX1

Resumidamente, o modelo catalítico proposto para QSOX1 humana, assim como provavelmente outros mamíferos, é através da utilização de apenas dois dos seus motivos CxxC, tiorredoxina e proximal, onde o CxxC_{Trx} recebe os elétrons provenientes da proteína cliente reduzida, os quais são transferidos para o motivo CxxC_{prox}, e subsequentemente para o cofator FAD, o qual tem por função fechar o ciclo de oxi/redução da molécula, através da transferência dos equivalentes redutores para o oxigênio molecular, gerando como produto da reação o peróxido de hidrogênio (Figura 7) (ALON et al., 2012; HECKLER et al., 2008; THORPE et al., 2002).

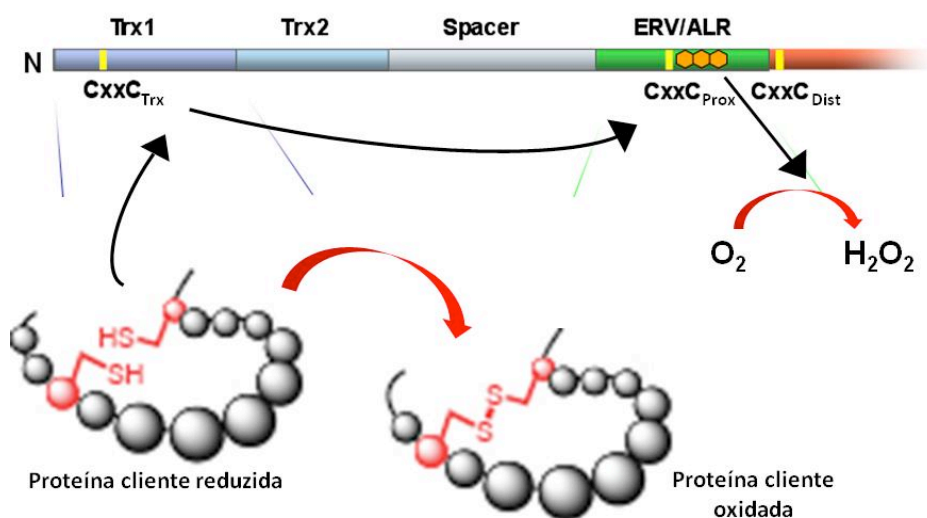


Figura 7: Figura ilustrativa da catálise da QSOX1b.

No esquema acima temos esquematizado a estrutura proteica da QSOX1b (Adaptado de Heckler & Thorpe, 2008b), a qual é composta por um domínio tiorredoxina1 na porção N-terminal, em que está presente o motivo CxxC_{Trx}, seguido de um domínio tiorredoxina2, um domínio espaçador característico da família das QSOX, e então um por último um domínio Erv/ALR, o qual abriga o cofator FAD (hexágonos laranjas) e o domínio CxxC_{prox}. Abaixo da estrutura proteica, há a ilustração da oxidação de uma proteína cliente reduzida (adaptada de <http://www.udel.edu/chem/facultyres/OEBPS/thorpe.html>).

Para a validação e confirmação da atividade sulfidril oxidase de nossa proteína recombinante de camundongo (*Mus musculus*), realizamos ensaios cinéticos utilizando substratos já conhecidos da QSOX de aves, de humano e tripanossoma (*T. brucei*), todos tióis com baixa massa molecular, tais como ditioneitol (DTT), lisozima (lys), e glutationa (GSH) (HECKLER et al., 2008; RAJE; GLYNN; THORPE, 2002; RANCY; THORPE, 2008). A QSOX de aves já foi bem caracterizada com atividade oxidase sobre outros peptídeos e substratos protéicos reduzidos como: insulina A e B, ovoalbumina e RNase (HOOBER et al., 1999). Dados na literatura mostram que proteínas secretadas de baixa massa molecular são bons substratos para QSOX1, entretanto, não há especificidade quanto ao tamanho molecular do substrato, mas sim a acessibilidade dos tióis oxidáveis (CODDING; ISRAEL; THORPE, 2012; HECKLER et al., 2008). Os valores de K_M encontrados para estes substratos foram de 40 μ M a 330 μ M para DTT, diferentemente dos valores encontrados para ovoalbumina, GSH e β -mercaptoetanol que foram valores de K_M iguais a 1,7 mM, 20 mM e 50 mM, respectivamente (KODALI; THORPE, 2010; RANCY; THORPE, 2008; THORPE; COPPOCK, 2007; ZHENG et al., 2012). Corroborando os dados descritos pela literatura, nossos valores para as enzimas mQSOX1b selvagem e C452S recombinante foram de encontro com aqueles já preditos, sendo encontrado valores aproximados de K_M iguais a 80 μ M, 200 μ M e 24 mM, para DTT, lisozima, e GSH, respectivamente (Figuras 8A e B, e 9A e B).

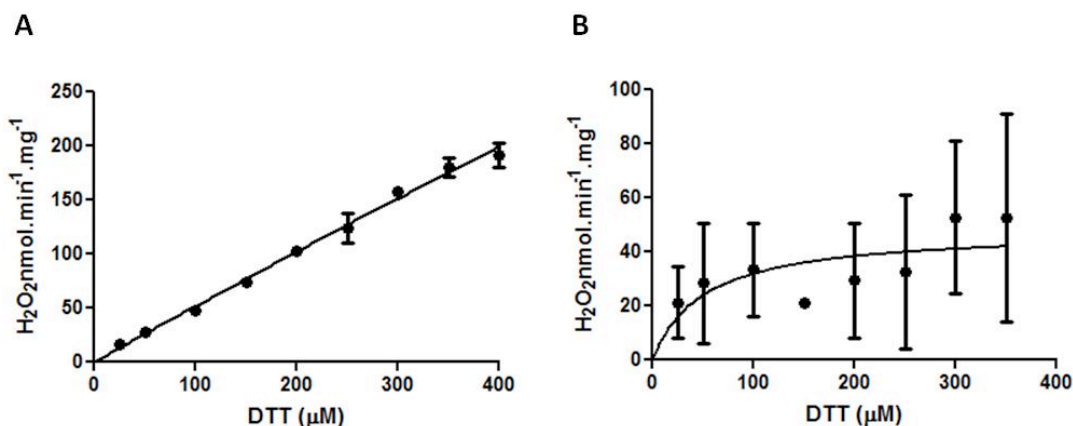


Figura 8: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem e C452S.

Os valores de K_M encontrados para mQSOX1b e mQSOX1b C452S foram de $80 \pm 0.9 \mu\text{M}$ e $49 \pm 19 \mu\text{M}$ em pH 7,4 ($n=3$), respectivamente. O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua Raje et al. (2002). Para a obtenção de valores de K_M , os dados foram tratados pelo program GrapgPad 6 Prism, com parâmetros de regressão não linear, Michaelis-Menten.

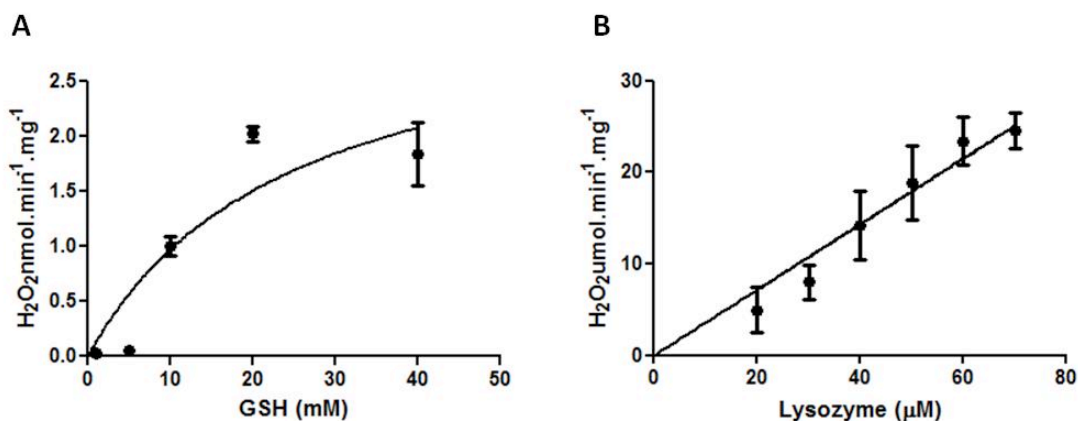


Figura 9: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de GSH (A) e Lisozima (B) pela enzima mQSOX1b selvagem.

Os valores de K_M encontrados para mQSOX1b foram de 24 mM e 200 μM em pH 7,4 ($n=3$), para GSH e Lisozima, respectivamente. O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (Raje et al., 2002). Para a obtenção de valores de K_M , os dados foram tratados pelo programa GraphPad 5 Prism, com parâmetros de regressão não linear, Michaelis-Menten.

A enzima mutante mQSOX1b C452S perdeu de maneira significativa a capacidade de transferir os equivalentes redutores do motivo CxxC_{prox} para o motivo CxxC_{Trx}, pois este agora apresenta-se como CxxS_{Trx}, o qual inviabiliza a produção do dissulfeto, e que pode ser refletido na baixa fluorescência emitida durante o ensaio cinético (Figura 10), Contudo, a baixa, mas presente, atividade oxidase da mQSOX1b C452S é justificável devido ao fato de que a enzima mutante é uma oxidase ainda habilitada para a o recebimento de equivalentes eletrônicos de moléculas não tiol, como, por exemplo, o agente redutor tris [2-carboxyethyl] phosphine (TCEP), sem a participação do motivo CxxC_{Prox}, o que abre o espectro de seus possíveis papéis biológicos (ZHENG et al., 2011).

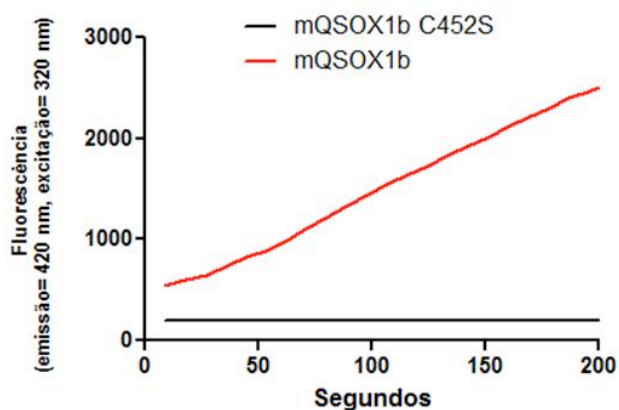


Figura 10: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação de DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem e C452S.

Perfil da emissão de fluorescência gerada da oxidação do DTT pelas enzimas selvagem e mutada (100 nM), em relação ao tempo (segundos). O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (Raje et al., 2002). Os dados foram tratados pelo programa GraphPad 5 Prism.

A fim de compararmos a atividade de nossa recombinante com a descrita na literatura, avaliamos as atividades da mQSOX1b com a hsQSOX1b (QSOX1b recombinante de humano). A mQSOX1b teve velocidade inicial de reação maior, em aproximadamente 5 vezes na ausência de ureia, se comparado com hsQSOX1b (Figura 11). A análise do perfil cinético das enzimas mQSOX1b e hsQSOX1b na presença de ureia foi realizado para confirmar o perfil enzimático descrito por Coding

e Thorpe (2012), os quais demonstraram que QSOX1 recombinante de *Trypanosoma brucei* e *Homo sapiens* possuem atividade oxidase sobre DTT mesmo na presença de até 5 M de ureia.

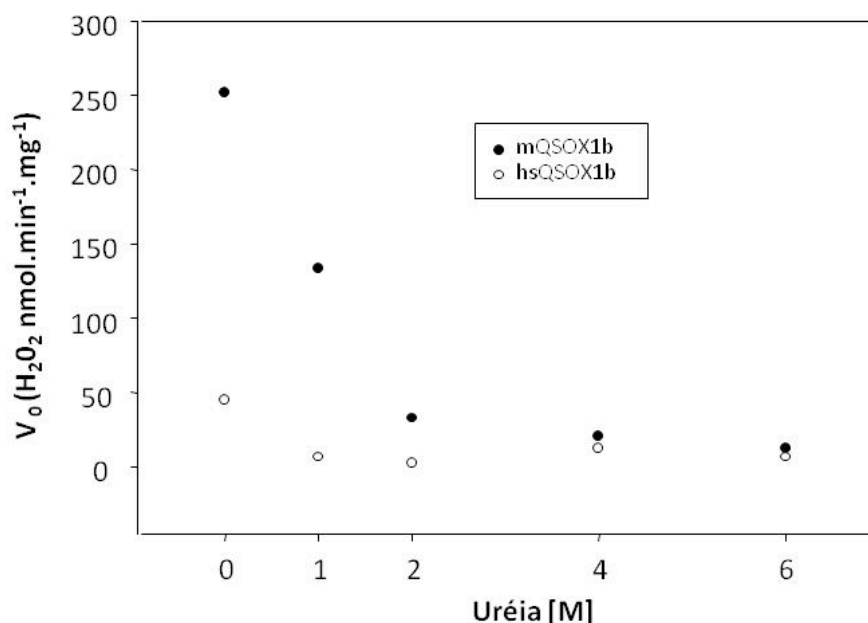


Figura 11: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação do DTT pelas enzimas mQSOX1b selvagem.

DTT (150 μ M) foi incubado com 50 nM das respectivas enzimas. O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua Rajee et al. (2002). Os dados foram computados pelo programa Sigma Stat32.

A utilização de bioferramentas como proteínas recombinantes podem proporcionar a elucidação de diversos eventos biológicos ainda desconhecidos. Para QSOX1b, ainda com função desconhecida, tem-se como principal indício para sua função a sua localização em ambientes extracelulares (HOOBER et al., 1996; OSTROWSKI; KISTLER, 1980; ZANATA et al., 2005). Para esta isoforma amplamente secretada há principalmente duas funções propostas, sendo, o envolvimento na geração de estruturas protéicas ligadas/estabilizadas por pontes dissulfeto, e também ação antimicrobiana através do produto da catálise, o peróxido de hidrogênio (LIMOR-WAISBERG; BEN-DOR; FASS, 2013). De fato, já foi descrito que a expressão da QSOX1 acompanha a rota secretória de algumas proteínas detentoras de dissulfeto, e endereçadas para a matriz extracelular, como subunidades de colágeno e decorina

(COPPOCK et al., 1993), e lisil oxidase (HECKLER et al., 2008). E estas proteínas com alta massa molecular endereçadas aos microambiente da MEC necessitam que seu arranjo terciário e quaternário muitas vezes seja finalizado e reestruturado, envolvendo eventos de dobramento provavelmente mediado por enzimas oxireduções presentes na matriz (DEPUYDT; MESSENS; COLLET, 2011; SATO; INABA, 2012).

No âmbito da família de proteínas oxireduções, diversos processos celulares (intra e extracelular) envolvidos com estrutura proteica e sinalização celular são mediados e/ou controlados por estas enzimas amplamente distribuídas (WOUTERS; FAN; HAWORTH, 2010). Dentre as enzimas mais bem conhecidas e caracterizadas estão a PDI, Trx e Ero (COLLET; MESSENS, 2010; SEVIER, 2010). Contudo, em estudo com *Drosophila melanogaster*, Tien e colaboradores (TIEN et al., 2008), relatam que quando o gene *Ero11* é comprometido, há uma resposta compensatória para a formação de dissulfetos em proteínas nascentes por proteínas da família QSOX.

De fato, há várias propostas de mecanismos enzimáticos bem regulados para a formação de pontes dissulfeto (SEVIER; KAISER, 2006), visto que a presença, ausência, ou modificação destas, acarreta em modificações estruturas em sítios protéicos capazes de controlar diversos mecanismos celulares, como, por exemplo, adesão, proliferação, diferenciação e apoptose, tanto de formas diretas ou indiretas (VOGEL, 2006; WEDEMEYER et al., 2000). A presença de dissulfetos alostéricos em várias classes de proteínas de superfície celular e extracelulares suportam a hipótese de que deve existir proteínas reguladora dos mesmos (CHEN; HOGG, 2006; ZHANG; HOGG, 2005). Além disso, sabe-se que diversas proteínas de membrana plasmática são voltadas para o meio extracelular e muitas são reguladas pelo estado de oxidação de seus tióis (GELDERMAN et al., 2006; JIANG et al., 1999; LARAGIONE et al., 2003; SAHAF et al., 2005). Embora estes eventos não sejam bem conhecidos, acredita-se que os tióis de dissulfetos alostéricos sejam os principais alvos (CHEN; HOGG, 2006), os quais já foram bem descritos presentes em integrinas e outras proteínas de superfície celular (JORDAN; GIBBINS, 2006).

Atualmente, dentre as proteínas mais aceitas para esta função oxidativa no contexto extracelular, propôs-se a QSOX1 (HECKLER et al., 2008; ILANI et al., 2013; RANCY; THORPE, 2008). Sendo assim, nosso trabalho buscou validar a hipótese de que a secreção da QSOX1b, aqui mQSOX1b, está relacionada a eventos de

dobramento oxidativo em proteínas depositadas na matriz extracelular, especificamente fibronectina.

4.2.2. FN como substrato

A molécula FN foi eleita como hipotético substrato por se tratar de uma glicoproteína de alta massa molecular, rica em tióis intracadeia e dois dissulfetos intercadeia, é amplamente secretada por diversas células, e pode ou não ser depositada na MEC (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011). A molécula de FN é secretada pela rota secretória padrão, sendo disponibilizada para a MEC já com suas duas pontes dissulfeto intercadeia, mas sem o arranjo estrutural final que é concluído apenas fora da célula (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010). Já é bem descrito que esta conformação estrutural final da FN só ocorre com o auxílio de fatores coadjuvantes contidos no meio intracelular e extracelular (ex. integrina $\alpha 5\beta 1$) (ENGLER et al., 2009; VARTIO; KUUSELA, 1991), e aqui, trabalhamos com a hipótese de que a QSOX1, uma proteína majoritariamente secretada possa ser um destes coadjuvantes.

Dentro dessas evidências, nosso grupo é o primeiro a caracterizar um substrato de alta massa molecular para QSOX1, sendo este substrato rico em tióis, e integrante dos mesmos ambientes celulares que QSOX1 (Golgi, MEC, e plasma). Para isso, a FN plasmática humana purificada e submetida à redução com DTT, foi submetida a testes enzimáticos *in vitro*, para oxidação de seus tióis pela mQSOX1b. Para todos os ensaios cinéticos utilizamos FN nativa (natFN), com a maioria de seus tióis na forma dissulfeto, e FN reduzida (redFN), com 40 – 95% de eficiência de redução (Figura 12).

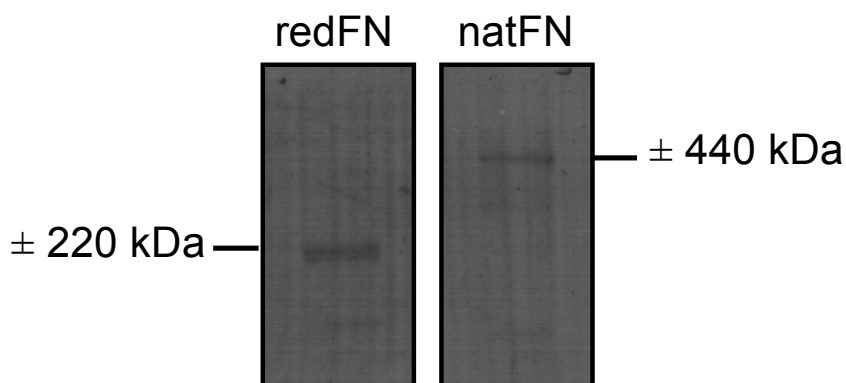


Figura 12: Perfil eletroforético da redFN e natFN.

Separação eletroforética das FN, reduzida e nativa, em SDS-PAGE, malha de 6%. Foram adicionados 5 µg de proteína, na presença de uréia 2 M, e tampão de amostra não redutor. Ambas as proteínas foram submetidas ao protocolo de redução para manter as mesmas condições experimentais. Reação por 16 horas, a 37° C, com DTT DTT (50x excesso sobre tióis da FN) em tampão Tris-HCl (100 mM) pH 8,0; contendo EDTA (0,3 mM); e uréia (8 M). Os géis foram corados com azul de *coomassie*.

Como podemos notar na figura 13, houve a detecção de atividade sulfidril oxidase da mQSOX1b com FN reduzida (redFN), obtendo-se valores de K_M de aproximadamente 456 nM (com uréia) e 290 nM (sem uréia). Notadamente, esta atividade oxidase foi deflagrada pela presença dos 58 grupos –SH livres por monômero de FN, produzidos pela redução da molécula. A presença de atividade oxidase pela mQSOX1b mesmo na presença de ureia foi um fator facilitador para as experimentações com FN, pois a manutenção da proteína em condições solúveis era dificultada após as etapas de purificação e redução da molécula, pois sítios de interação FN-FN são expostos e facilitam a agregação protéica (POULOUIN et al., 1999; WILLIAMS; JANMEY, 1983), principalmente se em concentrações superiores a 0,4 mg/ml, as quais são indispensáveis para realização dos experimentos cinéticos. RedFN sem mQSOX1b, ou com mQSOX1b inativa não produziram nenhum incremento da fluorescência basal (dados não mostrados).

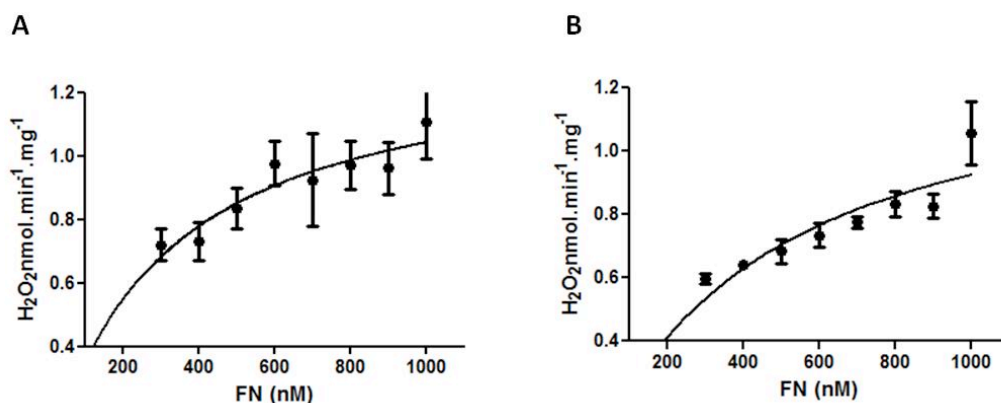


Figura 13: Representação gráfica do comportamento cinético da oxidação da redFN na ausência (A) e presença (B) de uréia, pela mQSOX1b (50 nM).

O mesmo ensaio foi realizado com mQSOX1b C452S mutada, ou FN em condições nativas (não reduzida), em ambas as condições não foram detectadas atividade sulfidril oxidase. O valor de K_M preliminar encontrado para FN é de aproximadamente 456 nM (com uréia) e 290 nM (sem uréia), em pH 7,4 (n= 3). O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua Raje et al. (2002) e os dados tratados pelo program GrapgPad 5 Prism, com parâmetros de regressão não linear, Michaelis-Menten.

Acredita-se então, que QSOX1 possa atuar em diversos eventos de regulação do tipo “switch on/off” sobre várias proteínas suscetíveis a oxi/redução, até mesmo aquelas de grande massa molecular. Os dados cinéticos obtidos aqui suportam as especulações que QSOX1 participe da montagem de proteínas nascentes, assim como, aquelas secretadas para a MEC, provavelmente atuando no arranjo final desta (FN) e de outras proteínas e estruturas extracelulares. A atuação de QSOX1 pode estar relacionada diretamente com a oxidação de proteínas clientes reduzidas, ou então, conjuntamente com outras enzimas isomereses, e oxi/reduases (BULLEID; ELLGAARD, 2011; SATO; INABA, 2012).

Os valores obtidos de K_M foram na escala de nM, muito diferente e inferiores daqueles descritos pela literatura, μM (CODDING; ISRAEL; THORPE, 2012; HECKLER et al., 2008; KODALI; THORPE, 2010). Estas diferenças podem estar associadas ao fato da FN ser uma glicoproteína de alta massa molecular, e rica em dissulfetos. Para analisar a estequiometria da oxidação da FN pela mQSOX1b, determinamos as concentrações de tióis livres na redFN, antes e após incubação com mQSOX1b ativa e inativa. Os resultados mostraram que enquanto a enzima inativa não alterou a quantidade de -SH na redFN, em nenhuma das concentrações testadas,

a enzima ativa diminuiu a quantidade de -SH, possivelmente comprometendo-as em ligações dissulfeto (figura 14).

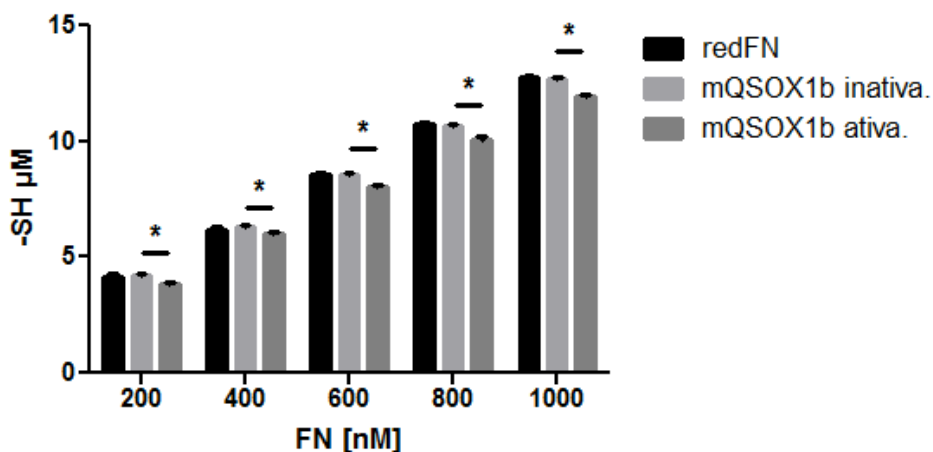


Figura 14: Ensaio de mensuração dos tióis livres pelo ensaio de TNB.

Os tióis livres foram mensurados após ensaio cinético com QSOX1 (50 nM) (ativa e inativa) sobre fibronectina (neste ensaio, \pm 40% dos tióis foram reduzidos). Ensaio feito em triplicata, com análise estatística de dados pelo programa GraphPad 5 Prism, teste *t* de pareado, com valor de $p < 0,002$.

Várias particularidades são descritas para a FN, dentre uma delas está sua atividade isomerase intrínseca, decorrente de regiões específicas em sua estrutura proteica e que acredita estar envolvida com o arranjo estrutural final da própria molécula já na MEC (LANGENBACH; SOTTILE, 1999; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010; VARTIO; KUUSELA, 1991). De fato, em nossos achados experimentais, constatou-se que a as soluções de FN reduzida eram muito instáveis, tornando-se precipitada em poucos dias em 4° C, mesmo na presença de uréia (4 M), possivelmente por agregação (WILLIAMS; JANMEY, 1983). A FN reduzida também não mantinha seus tióis livres estáveis mesmo que em condições ótimas para isso (condições desnaturantes na presença de ureia, e também dos quelantes EDTA e DTPA), o que proporcionava a sua auto-oxidação e agregação de forma tempo dependente (Dados não mostrados). Estes achados não só mostraram a dificuldade em trabalhar *in vitro* com uma molécula tão complexa como a FN, visto sua instabilidade em solução, mas também foram de acordo com dados já descritos na

literatura que relatam que a FN tende a fibrilação (multimerização) independente de catalizadores externos (SALMERÓN-SÁNCHEZ et al., 2011).

Contudo, sabendo que a redFN pode ser oxidada pela mQSOX1b, nós partimos para a avaliação da hipótese de que esta oxidação da FN resultaria em modificações estruturais na molécula, de monômero a dímero ou então multímeros. Para isso, foram realizados ensaios aqui denominados de multimerização da FN, estes são descritos a seguir, e demonstram que esta agregação pode ser facilitada e acelerada na presença da enzima quiescina sulfidril oxidase.

4.2.3. Multimerização da FN

Para avaliar se as pontes dissulfetos formadas eram intra ou intercadeias, realizamos ensaios de separação eletroforética em condições desnaturantes, mas não redutoras. A ideia preliminar deste ensaio foi avaliar se essa oxidação culminaria na formação das pontes dissulfetos intercadeia, as quais estabilizariam a molécula em sua forma dimérica, ou então, na formação de dissulfetos intercadeia, já que multímeros ligados por pontes dissulfeto já foram descritos (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011).

Os resultados obtidos mostraram que a FN nativa apresentou-se como esperado, predominantemente como monômero, inclusive há a presença de agregados protéicos retidos na canaleta, que são provavelmente derivados da multimerização espontânea da molécula (Figura 15). Além disso, a redFN incubada sem ureia, independentemente da presença da enzima, também apresentou uma intensa agregação, como verificada pela presença dos agregados nas canaletas. Estes dados confirmam a capacidade intrínseca da FN em se agregar, tanto em condições desnaturante ou não. Evidências sobre estes agregados já tinham ocorrido e sido descritas em outros trabalhos anteriores sobre propriedades físico-química da FN (VARTIO; KUUSELA, 1991; VARTIO, 1989). Contudo, foram mais bem explorados por Schwarzbauer e DeSimone (2011), os quais relataram que estas formas fibrilares ocorrentes *in vitro* também acontecem *in vivo*, e são de extrema relevância e importância biológica em diversas situações fisiológicas e fisiopatológicas.

Na presença de mQSOX1b, entretanto, observa-se uma diminuição na quantidade da forma monomérica e um aumento na quantidade de agregado protéico na canaleta

principalmente na presença de uréia, o que corrobora os dados de atividade sulfidril oxidase, e interessante, observa-se também uma fraca banda na altura aproximada de 400 - 500 kDa, ou seja do dímero, o que sugere que a QSOX1b possa induzir a formação de ponte (s) dissulfeto (s) entre as duas cadeias polipeptídicas. Portanto, estes resultados evidenciaram que a multimerização da redFN é acelerada pela mQSOX1b mesmo na presença de ureia (Figura 15 ainda), sem a possibilidade de discriminação exata de quais dissulfetos foram oxidados. Os melhores achados na presença de ureia provavelmente estão relacionados com a melhor exposição dos grupamentos tióis promovidos pelo agente caotrópico.

Os multímeros gerados apresentaram na sua maioria massa molecular possivelmente superior a 800 kDa, uma vez que são maiores que laminina, cuja massa molecular aproximada é 800 kDa, e foi utilizada como padrão em alguns ensaios eletroforéticos (dados não mostrados). Estes resultados já eram especulados mesmo após a utilização do sistema SDS-PAGE padrão, com malha de acrilamida (1)/*Bis*-acrilamida (40), onde as formas multiméricas eram aprisionadas nos poços da porção empacotadora.

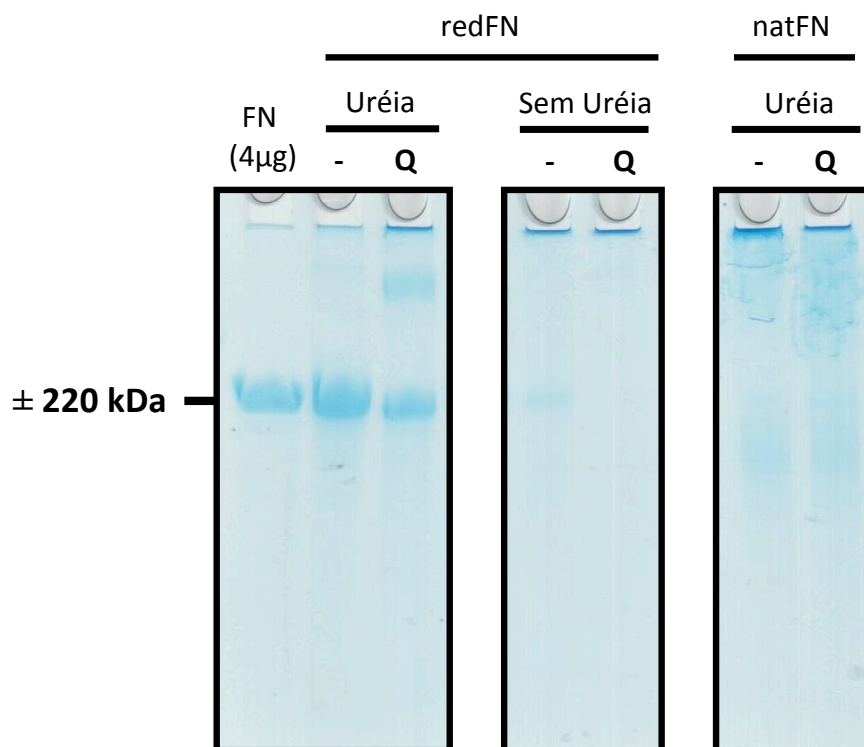


Figura 15: Perfil eletroforético dos produtos derivados dos ensaios cinéticos da FN (reduzida e nativa) (400 nM) e mQSOX1b (50 nM).

SDS-Page (acrilamida 5%, malha 1:80), corrida eletroforética por 4 hr, com corrente de 30 mA. Os ensaios cinéticos foram realizados na presença ou ausência de uréia (U) (2 M), e na presença ou ausência de mQSOX1b. Na primeira canaleta têm-se FN nativa em T.A. redutor (4 µg), utilizado como padrão de massa molecular para 220 kDa. Nas canaletas consecutivas, têm-se as frações de FN reduzida e nativa (redFN e natFN) provenientes da cinética. Ambas as FN (red e nat) foram submetidas ao mesmo protocolo de purificação e desnaturação, assim como diálise. Os géis foram corados com azul de *coomassie*.

Através destes achados, onde a presença de ureia viabilizou tanto a efetivação da cinética quanto a visualização da multimerização, nós partimos para ensaios apenas na presença do agente desnaturante, pois nessas condições a redFN comporta-se com maior solubilidade, mesmo em altas concentrações (0,4 – 0,9 mg/ml). Já na figura 16, deve-se notar que a multimerização da FN na presença tanto da mQSOX1b ativa quanto da mutada C452S é principalmente maior quando em maiores concentrações e também quando com a enzima está ativa, seno a forma monomérica ainda presente quando na presença da enzima mutada. A permanência de baixa atividade sulfidril oxidase da mQSOX1b C452S fez com que passássemos a

utilizar a mQSOX1b inativada por fervura, pois assim viabilizaria os ensaios mesmo em baixas concentrações de redFN (100 e 200 nM, por exemplo).

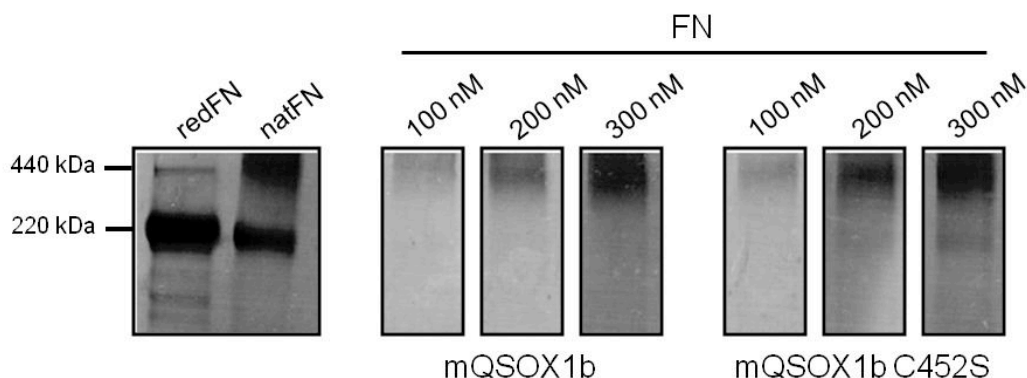


Figura 16: SDS-PAGE do produto de cinéticas enzimáticas com mQSOX1b selvagem e mQSOX1b mutada C452S (200 nM) sobre redFN.

Ensaio de cinética enzimática realizada segundo Raje et al (2002). Foram utilizadas redFN e natFN como padrões de massa molecular de 220 e 440 kDa. Notar a maior presença de FN monomérica apenas com mQSOX1b C452S. Os géis foram corados com azul de *coomassie*.

Sendo assim, buscamos avaliar se os multímeros formados eram ligados por interações dissulfeto ou ligações fracas (iônicas), para isso, frações dos ensaios cinéticos foram submetidas à separação eletroforética na ausência (Figura 17A) ou presença de agente redutor (β -mercapto) (Figura 17B) no tampão de amostra (T.A. redutor), ou detergente iônico (deoxicolato, DOC) (Figura 17C), utilizando como controle negativo da reação a enzima mQSOX1b inativada. Sendo assim, encontramos que quando na presença de T.A. redutor a forma multimérica da FN foi abolida completamente em todas as três condições cinéticas, gerando a forma monomérica, demonstrando que os multímeros são mantidos por pontes dissulfeto. Contudo, quando na presença do DOC, houve apenas uma pequena alteração no perfil de migração das amostras (forma monomérica) na malha de acrilamida e a preservação da FN multiméricas. Logo, estes dados demonstram que a forma multimérica gerada após cinética é dependente de dissulfetos (pois são sensíveis a redução e resistentes ao DOC). A utilização do detergente iônico DOC corroborou também o fato de que estes multímeros são estabilizados por dissulfetos providos pela mQSOX1b, pois a literatura relata que estas formas fibrilares de FN formadas auto cataliticamente são solubilizadas na presença DOC (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010).

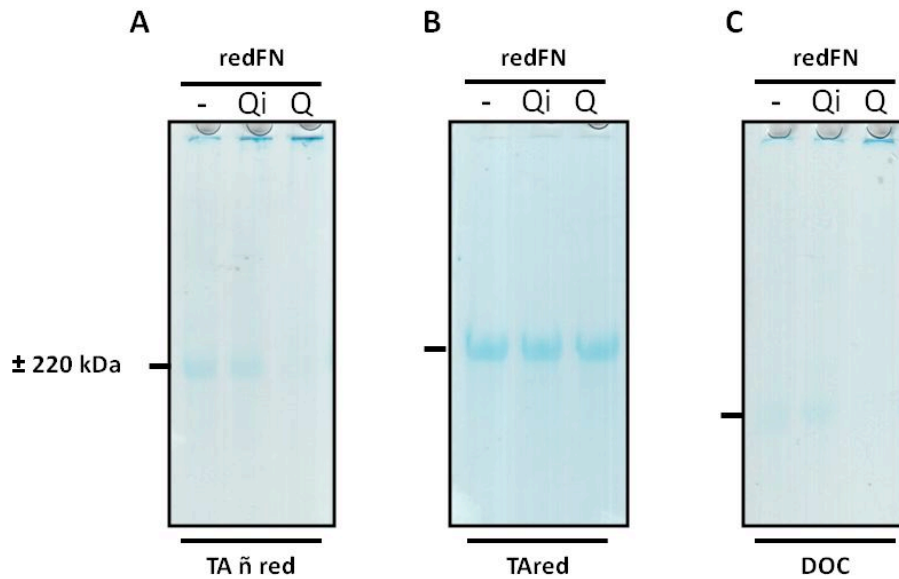


Figura 17: Solubilização dos multímeros de FN.

As frações colhidas dos ensaios cinéticos foram submetidas a separação eletroforética em SDS-Page (acrilamida 5%, malha 1:80), com corrida eletroforética com duração de três horas, com corrente de 30 mA, gel corado com azul de *coomassie*. Cada caneleta condiz com uma condição experimental diferente, sendo -, para ausência de enzima, **Qi** para enzima inativa, e **Q** para enzima ativa. O ensaio cinético é o mesmo em A, B e C, contudo as frações foram submetidas a condições eletroforéticas diferentes: em A, com tampão de amostra não redutor; em B, com T.A redutor; e em C, com DOC (0,2%). Em todas as reações com mQSOX1b foram utilizados 200 nM de enzima frente a 400 nM de substrato (redFN). A Reação aconteceu por 1 hr em temperatura ambiente. Experimento realizado com n=3.

Para que a hipótese da possível multimerização da FN não fosse exclusivamente resultado das suas propriedades autocatalíticas, nós realizamos ensaios cinéticos com FN no seu estado molecular nativo (natFN), ou seja, sem a redução dos tióis, mas a permanência das etapas metodológicas para tal. Com isso, constatamos que a presença de mQSOX1b satisfatoriamente não alterou o perfil de separação eletroforética da natFN se comparado com as frações sem mQSOX1b, ou com a enzima inativa, em condições redutoras, não redutoras ou desnaturantes com DOC (Figura 18). Estes dados suportam a hipótese de que a FN reduzida, a qual é uma molécula de MEC com alta massa molecular, é passível de oxidação *in vitro* pela mQSOX1b, e que esta reação enzimática gera formas fibrilares (multiméricas) com massa molecular superiores a 800 kDa.

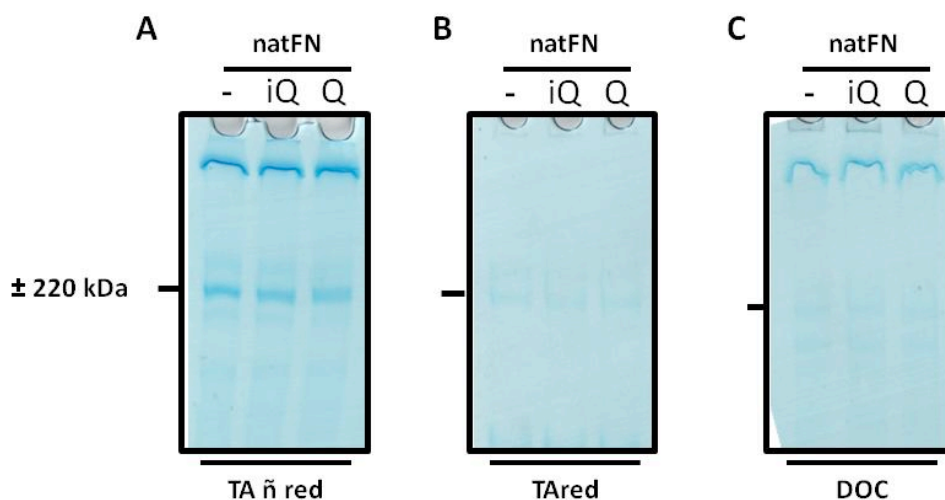


Figura 18: Ensaio de multimerização da FN nativa.

Ensaio de cinética enzimática frente à FN nativa, na ausência ou presença de mQSOX1b ativa ou inativa. SDS-Page (acrilamida 5%, malha 1:80), corrida eletroforética com duração de três horas, com corrente constante de 30 mA, gel corado com azul de *coomassie*. Cada canelita condiz com uma condição experimental diferente, sendo -, para ausência de enzima, **Qi** para enzima inativa, e **Q** para enzima ativa. O ensaio cinético é o mesmo em A, B e C, contudo as frações foram submetidas a condições eletroforéticas diferentes: em **A**, com tampão de amostra não redutor; em **B**, com T.A redutor; e em **C**, com DOC (2%). Em todas as reações com mQSOX1b foram utilizados 200 nM de enzima frente a 400 nM de substrato (natFN). A Reação aconteceu por 1 hr em temperatura ambiente. Experimento realizado com n=3.

A forma fibrilar da FN já é bem descrita e caracterizada, e está associada a diversas funções celulares, como por exemplo, motilidade, crescimento e diferenciação celular, e conseqüentemente no controle do crescimento tecidual (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011; SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999). O envolvimento da FN nestes eventos celulares, lhe permitem participação tanto em estados fisiológicos quanto patológicos, sendo que estudos já comprovam a utilização da FN como um potente alvo para terapia tumoral (KASPAR; ZARDI; NERI, 2006). Para a FN plasmática, molécula utilizada neste trabalho, não há descrito eventos de multimerização de fibrilas homogêneas de FN-FN em solução (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010). Contudo, esta forma plasmática também pode ser, e é na maioria das vezes depositada na MEC de diversos tecidos, assim como, atua sobre a agregação celular, plaquetária, e de proteínas adesivas durante eventos hemostáticos,

o que acarretam na sua posterior conformação multimérica heterogênea (MORETTI et al., 2007; MOSESSON et al., 2009).

Segundo a literatura, a conformação fibrilar da FN representa uma forma madura da molécula, e só é alcançada após duas etapas de alongamento. Sendo que na primeira etapa há a imobilização da FN dimérica pelas integrinas de superfície celular (principalmente $\alpha 5\beta 1$, entre outras) as quais viabilizam a formação fibrilar preliminar, e esta forma é solúvel em DOC (SECHLER; SCHWARZBAUER, 1997; SOTTILE; MOSHER, 1997). Após esta etapa inicial, em uma segunda etapa, há a inserção de novas moléculas de FN diméricas sobre a forma fibrilar nascente, a qual é mediada por domínios específicos e resultam na forma fibrilar final da FN, já esta forma com alta massa molecular é insolúvel ao DOC (BANEYX; BAUGH; VOGEL, 2002; SECHLER et al., 2001). Nós observamos que as formas multiméricas da FN geradas pela mQSOX1b eram de fato insolúveis na presença de DOC mesmo após 5 horas de separação eletroforética, o que nos garantiu que os multímeros detectados são estabilizadas por ligações covalentes, como dissulfetos, e provavelmente, sugere-se a participação da mQSOX1b nesta segunda fase de multimerização da FN na MEC (Figura 19).

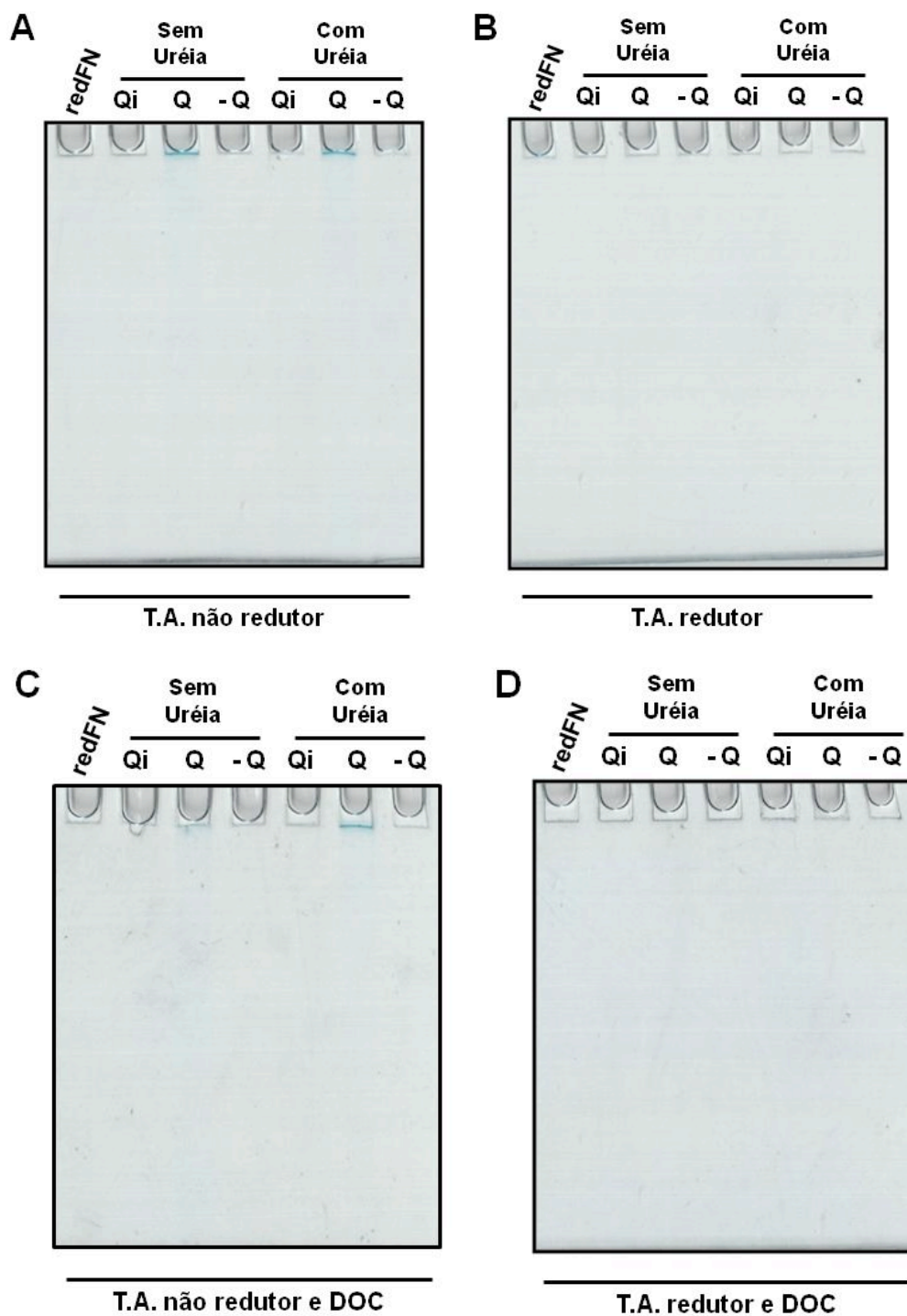


Figura 19: redFN multimerizada após separação eletroforética de cinco horas.

Foi realizada a separação eletroforética do mesmo grupo de cinética em 4 condições diferentes: **A**, Com T.A. não redutor; **B**, Com T.A. redutor; **C**, Com T.A. não redutor e DOC (2%); e **D**, Com T.A. redutor e DOC (2%). A cinética enzimática foi realizada de acordo com as anteriores acima descritas. SDS-PAGE (5% acrilamida, malha 1:80), com duração da corrida eletroforética por 5 horas em corrente constante de 30 mA. Foram adicionados 20 µg de amostra em cada canaleta. Experimento realizado com n=2. Géis corados com azul de *coomassie*

Como este processo de alongamento da forma fibrilar da FN é complexo e passa por duas etapas distintas e sequenciais, o fator tempo é limitante para a conclusão do processo de multimerização. Sabe-se que o tempo estimado para uma cultura celular de fibroblastos produzir um arcabouço de FN maduro e resistente é em média 4 dias (ANTIA et al., 2008). Sendo assim, realizamos ensaios de multimerização em dois tempos cinéticos distintos, 100 segundos e 1 hora, e neste experimento pudemos novamente confirmar que a presença de mQSOX1b ativa acelera a formação da forma multimérica da redFN (Figura 20), de modo dependente do tempo de incubação.

A literatura propõe que esta estrutura multimérica gerada pela associação de FN-FN é dada tanto por ligações covalentes, quanto não covalentes (SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010). Sendo que estas associações proteicas envolvem diversos tamanhos/fragmentos de FN (massa molecular), os quais são derivados do processamento alternativo do RNAm ou então da digestão enzimática, e ambas as formas podem ser encontradas tanto depositadas na MEC quanto solúveis no plasma sanguíneo. Sendo que para o ambiente plasmático, estes fragmentos são de extrema importância e relevância em eventos trombóticos (MOSESSON et al., 2009; SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011; SINGH; CARRAHER; SCHWARZBAUER, 2010; WHITE; BARALLE; MURO, 2008).

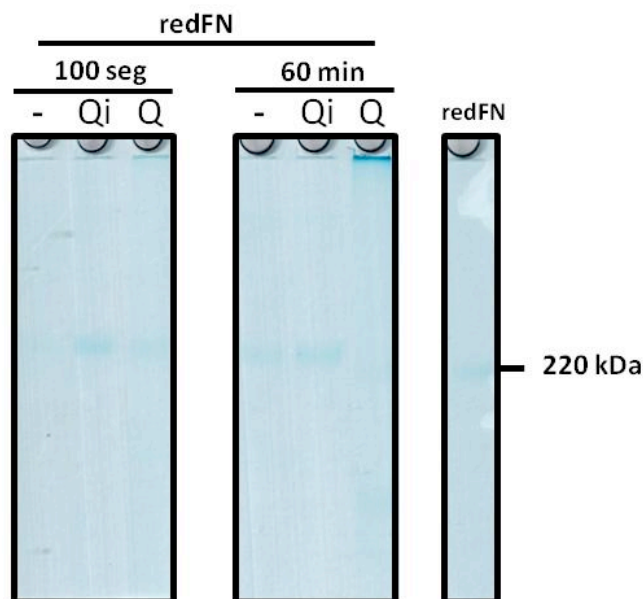


Figura 20: Ensaio de multimerização da FN reduzida (redFN) em tempos de cinética diferentes.

Ensaio de cinética enzimática frente à redFN, na ausência ou presença de mQSOX1b ativa ou inativa. SDS-Page (acrilamida 5%, malha 1:80), corrida eletroforética com duração de três horas, com corrente de 30 mA, gel corado com azul de *coomassie*. Cada caneleira condiz com uma condição experimental diferente, sendo -, para ausência de enzima, Qi para enzima inativa, e Q para enzima ativa. O ensaio cinético teve dois tempos de duração, 100 segundos e 1 hora, conforme indicado na figura. Em todas as reações com mQSOX1b foram utilizados 200 nM de enzima frente a 400 nM de substrato (redFN). A Reação aconteceu em temperatura ambiente. Experimento realizado com n=3.

As formas mais abundantes de FN no plasma sanguíneo possuem massas moleculares de 220 e 440 kDa, sendo a de 440 kDa o dímero (duas formas de 220 kDa) ligado por duas pontes dissulfetos. Entretanto, outros tamanhos de FN estão presentes. Estas outras formas de FN são chamadas pela literatura de fragmentos de FN, e são isoformas de FN ou então, são fragmentos gerados pela clivagem proteolítica da molécula por enzimas presentes na MEC ou no plasma (por exemplo, metaloproteases, trombina, plasmina, e tripsina) em sítios específicos, resultando em fragmentos de 235, 146, 70, e 30 kDa aproximadamente (CHEN; MOSHER, 1996; MOLESSON et al., 2009). Após o processo de redução da FN purificada de plasma sanguíneo humano com DTT, pudemos visualizar a presença destes fragmentos descritos pela literatura (Figura 21), o que nos levou a investigar se a multimerização da FN pela mQSOX1b envolvia a dimerização destes fragmentos derivados de FN, e talvez visualizar quais estariam sendo ligados. Para isso, fizemos a digestão trípica

dos multímeros gerados pelas cinéticas com a enzima tripsina, e posterior análise por separação eletroforética em sistema SDS-Page. Em caso positivo, esperava-se encontrar a presença de formas multiméricas de FN quando mQSOX1b estava presente diferentes daquelas encontradas nos grupos sem a enzima, ou com enzima ativa. Contudo, neste experimento preliminar (n=2), não foi possível identificar diferença entre os fragmentos gerados nas frações correspondentes aos multímeros, entretanto, a forma multimérica foi completamente abolida (Figura 22).

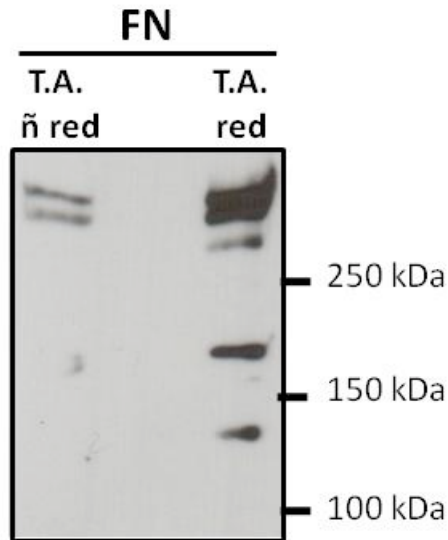


Figura 21: Padrão dos fragmentos de FN plasmática encontrados após redução com DTT.

Separação eletroforética em SDS-PAGE (6% acrilamida), seguida de transferência para membrana de nitrocelulose. Imunomarcção pela técnica de Western Blotting, com anticorpo primário α - FN (Sigma) (1:1500), e anticorpo secundário α - mouse HRP (BD) (1:5000). FN (8 μ g) purificada de plasma humano, em uréia (4 M), na presença de T.A. não redutor e T.A. redutor.

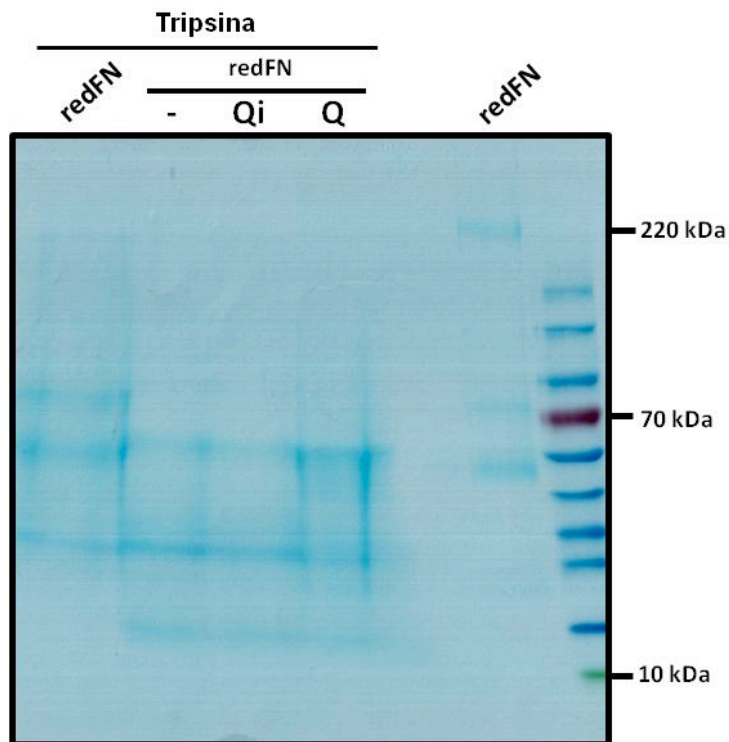


Figura 22: Perfil da digestão trípica da redFN multimerizada pela mQSOX1b.

Perfil eletroforético das frações de redFN multimerizadas e digeridas com tripsina. A reação de multimerização foi de acordo com as condições já descritas, com duração de uma hora. A reação de digestão foi realizada de acordo com o fabricante (Sigma), com duração de 30 minutos. Notar a presença dos controles de redFN sem ser multimerizada na presença e ausência de tripsina, assim como, a ausência de formas fibrilares diferentes entre as frações. SDS-Page com gradiente de concentração de acrilamida (5 – 15 %), gel corado com azul de *coomassie*. Todas as amostras foram diluídas e T.A. ñ red.

Estes fragmentos gerados por digestão com tripsina já foram bem caracterizados e descritos pela literatura (GARCIA-PARDO; PEARLSTEIN; FRANGIONE, 1985). Para os fragmentos isolados, ou para a forma fibrilar de FN são descritas diversas funções sobre a proliferação, migração e diferenciação celular (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011). Williams e colaboradores (2008) demonstraram que os níveis de expressão de FN, associada à perda da sua ultraestrutura 3D na MEC, estão diretamente relacionados com aumento da proliferação de células cancerosas de mama, e de fato a literatura relata que há um aumento significativo na expressão de FN durante o estágio invasivo destas células (KASPAR; ZARDI; NERI, 2006; YAO et al., 2007). A função proliferativa relacionada à superexpressão da FN é relacionada com a ativação de eventos de sinalização intracelular mediados pelo recrutamento de

diversas enzimas quinases e metaloproteínas que promovem o remodelamento ou fragmentação de proteínas de MEC (MAITY et al., 2011). O produto da reação de oxidação pela QSOX1b, o H_2O_2 , também é descrito como um catalisador da fragmentação da FN *in vitro* e possivelmente *in vivo* (VARTIO, 1989). Em nossos experimentos a possível degradação da FN pelo peróxido de hidrogênio foi inibida pela adição de quelantes em todas as soluções tampão, e também pela ação da peroxidase (HRP) como constituinte das reações enzimáticas (RAJE; GLYNN; THORPE, 2002). Sendo assim, com base nos achados da literatura, têm-se proposto que alterações no arranjo estrutural 3D da matriz de FN mais a sua interação a receptores de membrana, estão intimamente associados ao arrasto para a proliferação celular de diversas linhagens, e conseqüentemente promoção da progressão tumoral.

Com base nestes dados acima, buscamos elucidar se a multimerização da FN culminaria em alterações em suas propriedades adesivas. Através de um ensaio de ligação sobre a molécula gelatina, constatamos que não houve alterações na capacidade adesiva da FN quando multimerizada ou não, mas sim quando FN se encontra no estado reduzido ou nativo (Figura 23). De fato, o estado redox da molécula já foi descrita como um fator decisivo para a interação da FN com a gelatina *in vitro* (MAJORS, 2002).

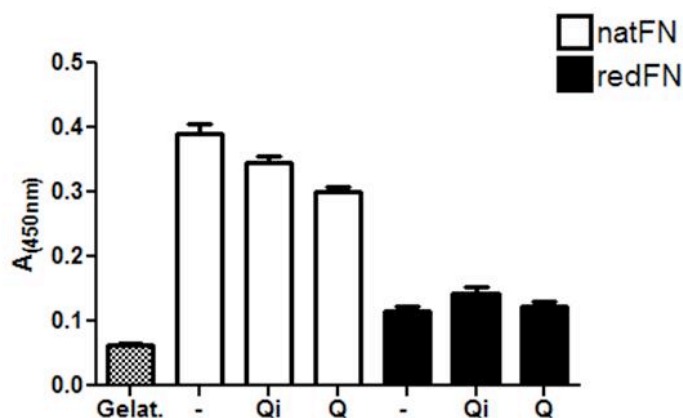


Figura 23: Ensaio de ligação da redFN e natFN sobre gelatina.

Ensaio realizado de acordo com Majors e colaboradores (2002). Frações derivadas das cinéticas (descrito anteriormente) foram incubadas sobre gelatina (200 ng) durante 1 hora, e a ligação foi determinada pelo imunoensaio de ELISA. Anticorpo primário anti-FN monoclonal (Sigma) (1:1000), e secundário anti-mouse HRP (BD) (1:2000). Os dados foram tratados pelo programa GraphPad 5 Prism. Foram realizados dois experimentos independentes.

Sendo assim, como as regiões de interação adesiva entre célula-FN são diferentes das regiões de interação de moléculas MEC-FN, a multimerização poderia não ter efeito sobre a interação específica de gelatina-FN, mas sim sobre outras moléculas da matriz, ou então sobre a interação célula-FN. Logo, foram realizados ensaios de adesão e proliferação celular frente à FN nativa, reduzida, e multimerizada, para avaliar não só se a forma fibrilar de FN gerada pela mQSOX1b era capaz de alterar as propriedades adesivas e proliferativas da molécula, mas também nortear os possíveis papéis e funções da FN multimerizada.

4.3. Perfil de culturas celulares sobre FN multimerizada

De fato, QSOX já foi descrita para diversos ambientes celulares e extracelulares, contudo, têm-se associado diferentes papéis para a enzima, sendo ela pró ou anti apoptótica, pró ou anti proliferativa, marcadora de bom ou mal prognóstico em tecidos cancerosos, ou seja, há descrito diversas funções dependendo do tecido analisado (ALON et al., 2012; LIMOR-WAISBERG; BEN-DOR; FASS, 2013; SEVIER, 2012). Por isso, buscamos trabalhar com diferentes linhagens celulares para obter indícios e talvez elucidar um dentre os muitos possíveis papéis da QSOX1.

Recentemente, e em paralelo a confecção de nossos experimentos, Ilani e colaboradores (2013), propuseram que a presença da atividade oxidase da QSOX1 é crucial para a efetiva deposição de componentes da MEC, especificamente a laminina. Estes achados vieram de acordo com nossos dados aqui demonstrados, e que há muito tempo são explorados por nosso grupo, visto que a laminina também é uma proteína de MEC de alta massa molecular, assim como a fibronectina. Neste mesmo trabalho (ILANI et al., 2013), também são considerados que eventos de invasão tumoral provavelmente dependem da presença de QSOX1 devido ao grande remodelamento da MEC durante a invasão celular. Sabe-se já, que constituintes da MEC, tanto a laminina quanto a FN, são bem caracterizadas como importantes atores no cenário canceroso de diversos tecidos (FINAK et al., 2008; KASPAR; ZARDI; NERI, 2006).

O crescimento e a expansão de células cancerosas são característicos de tumores metastáticos, sendo este característico por providenciar a sobrevivência destas células e aumentar o poder de invasão sobre outros tecidos circundantes. O processo de metástase ocorre através da junção de vários sinais intra e extracelulares que desencadeiam a desadesão das células da MEC, e promovem a proliferação e migração das mesmas, independente da ancoragem sobre os componentes da matriz (WEBER, 2008). As proteínas de MEC são responsáveis por formar um microambiente determinante para o desenvolvimento e crescimento de diversas células normais e cancerosas, sendo que para o perfil canceroso, a estrutura tridimensional dos componentes da matriz regula eventos de proliferação, invasão, e disseminação das células, principalmente através do remodelamento das proteínas já depositadas (WONG; RUSTGI, 2013). Neste contexto extracelular, têm-se ressaltado várias evidências de que QSOX1 possa ser um, dentre os muitos participantes de processos proliferativos através da sua atuação sobre proteínas depositadas na MEC. Neste trabalho, a FN foi a molécula alvo de investigação, e partimos avaliar se a multimerização da FN gerada pela QSOX1 altera de fato as propriedades adesivas e proliferativas em diferentes linhagens.

4.3.1. Adesão celular

Nestes ensaios, FN reduzida ou nativa, oxidada ou não pela mQSOX1b (nas mesmas condições cinéticas previamente descritas aqui) foram utilizadas como matriz adsorvida para a adesão celular. Os resultados com células 3T3, Rasm ou HeLa mostraram que a adesão destas células não foram afetadas pela forma fibrilar da FN gerada pela mQSOX1b. Interessantemente, nem o fato da FN estar em seu estado nativo, não reduzido, ou reduzido interferiu na adesão (Figura 24). Estes resultados sugerem que a multimerização da redFN *in vitro* não altera a exposição dos domínios de adesão célula-FN da molécula, assim como, também não promove a adesão por outros mecanismos que não este. Vale ressaltar que estes resultados indiferentes para adesão podem estar relacionados ao fato de que estrutura fibrilar da FN aqui, foi confeccionada em ensaios *in vitro*, sem a presença de integrinas cruciais para orquestrar tal processo. E esta organização sincronizada para a formação e estabelecimento da forma fibrilar da molécula é crucial para a finalização do arranjo estrutural da matriz, possivelmente com efeitos significativos sobre a exposição dos

respectivos domínios relacionados com a interação célula-FN (ENGLER et al., 2009; SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011).

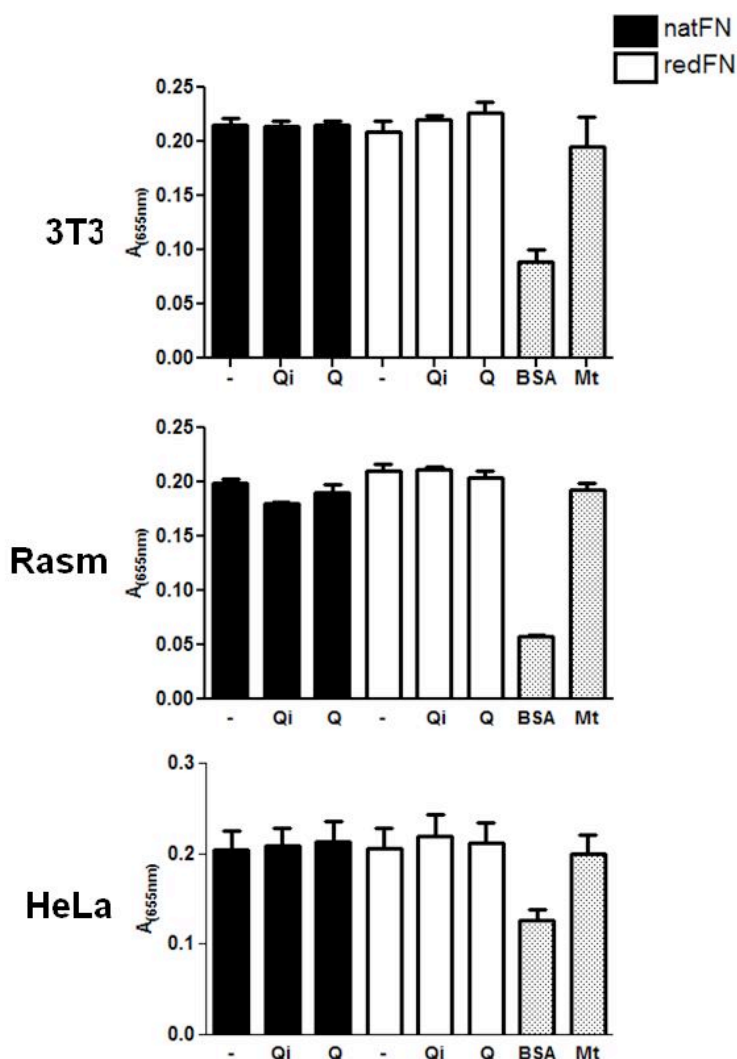


Figura 24: Análise de adesão celular das linhagens Rasm e HeLa, sobre natFN e redFN multimerizada.

As frações provenientes das cinéticas foram previamente adsorvidas por 16 hrs, á 4°C, e após isto as células foram plaqueadas sobre natFN e redFN (sem mQSOX1b, com mQSOX1b inativa e ativa), assim como os controles mQSOX1b ativa e inativa, e matrigel (MT). Após 2 horas de cultura, as células foram fixadas e coradas para observação colorimétrica. Análise estatística *test t* pelo programa GraphPad Prism 5.

4.3.2. Proliferação celular

A influência da multimerização da FN sobre a proliferação celular também foi testada, utilizando as mesmas condições de matriz adsorvida, como descrito no item anterior. Os resultados com Rasm e HeLa demonstraram que a FN reduzida multimerizada não afetou as propriedades proliferativas das linhagens. Já a matriz de FN nativa proporcionou um aumento no número de células (Rasm e HeLa) quando na presença de ambas as mQSOX1b, ativa ou inativa, principalmente após 48 horas de proliferação (Figura 25), contudo, a atividade da enzima proporcionou proliferação mais significativamente diferente em relação ao controle. A ação isolada das proteínas recombinantes foi excluída, pois a adsorção das proteínas recombinantes isoladamente não afetaram a proliferação. Como a FN nativa não é substrato da enzima, ainda não entendemos como houve diferença nestas condições. Uma hipótese seria que QSOX1, possa atuar como fator de crescimento, interagindo possivelmente com alguma proteína de superfície celular, e que esta interação culmine no disparo da proliferação celular. Contudo, talvez a presença da enzima também proporcione melhores condições para este evento de proliferação que ainda não foram descritas. De fato, esta função proliferativa para QSOX1 foi recentemente relatada por Ilani e colaboradores (2013), os quais demonstraram que culturas de fibroblastos com baixa expressão de QSOX1 retornavam ao estado proliferativo apenas quando o meio de cultura era suplementado com a enzima recombinante ativa (50 nM), mas aqui o mecanismo de ação também não foi explorado.

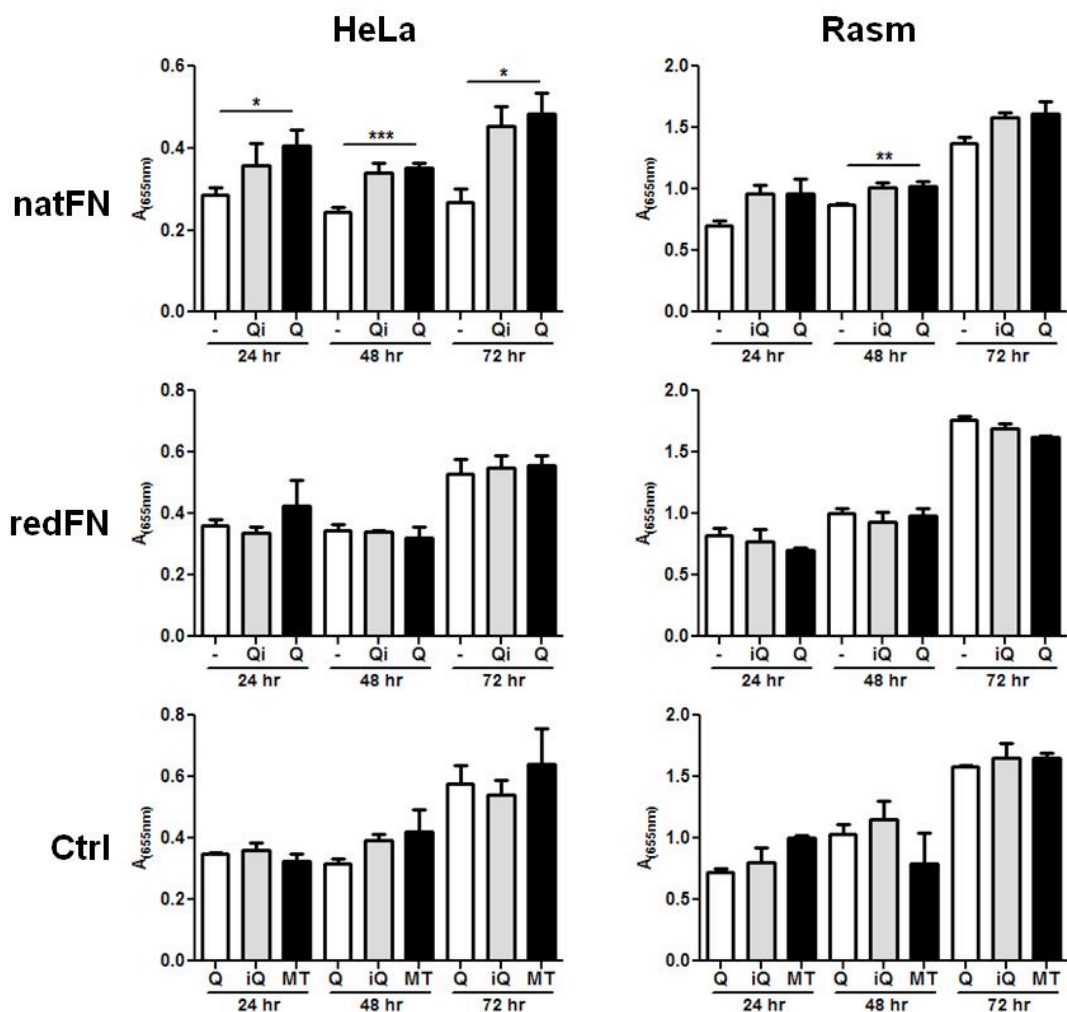


Figura 25: Análise de proliferação celular das linhagens Rasm e HeLa, sobre natFN e redFN multimerizada.

As frações provenientes das cinéticas foram previamente adsorvidas por 16 hrs, á 4°C, e após isto as células foram plaqueadas sobre natFN e redFN (sem mQSOX1b, com mQSOX1b inativa e ativa), assim como os controles mQSOX1b ativa e inativa, e matrigel (MT). Após 24, 48 e 72 horas de cultura, as células foram fixadas e coradas para observação colorimétrica. Análise estatística *test t* pelo programa GraphPad Prism 5.0. * indica $p < 0,01$, ** indica $p < 0,002$, e *** indica $p < 0,001$.

Nossos dados, embora focados na ação da QSOX1 no meio extracelular, indicam que a proliferação sobre matriz de FN nativa independe da atividade sulfidril oxidase. Assim, a hipótese de que a multimerização da FN por si só levaria a proliferação significativa das células testadas não pode ser confirmada. Contudo, esta ideia ainda não pode ser rejeitada, pois o modelo utilizado por nós é relacionado a

produtos protéicos derivados de cinéticas enzimáticas, e não da depleção ou superexpressão da QSOX1 nas respectivas linhagens. Para entender mais sobre estes mecanismos de interação da FN e QSOX1, foram realizadas tentativas para superexpressar a enzima, e analisar o perfil do microambiente secretado por estas células.

4.3.3. Superexpressão da QSOX

Para elucidar o possível papel biológico da QSOX1 frente a proteínas de MEC, foram realizadas tentativas de superexpressão de QSOX1 em diferentes tipos de linhagens celulares (Hek293t e HeLa). Ao alcançar tal objetivo, partir-se-ia então para análise da sua possível participação em comportamentos celulares como adesão, proliferação, migração e morte celular, com o envolvimento direto de proteínas da MEC, especificamente FN. Os resultados preliminares mostraram bom rendimento de transfecção, para GFP, mas para mQSOX1b o rendimento ficou próximo aos 30% de transfecção. A fusão de GFP a mQSOX1b possibilitou a identificação das regiões celulares com maior expressão da proteína, a qual apresentou-se expressa de forma difusa no citoplasma em ambas as linhagens (Figura 26). Contudo, uma taxa aumentada de desadesão celular das células superexpressando mQSOX1b dificultaram a utilização de destas linhagens em outras metodologias.

Este perfil granulado e difuso analisado por microscopia confocal, pode estar relacionado à localização já predita para QSOX1b, que é nas cisternas de Golgi e consequentemente nas vesículas provenientes, e talvez endereçadas para a organela (CHAKRAVARTHI et al., 2007; THORPE; COPPOCK, 2007). Esta localização intracelular na rota secretória, assim como os achados de QSOX1 extracelular, leva a acreditar que esta enzima além de atuar sobre o dobramento de proteínas nascentes, pode também atuar sobre proteínas na MEC, consequentemente como reguladora do estado redox de algumas proteínas da própria matriz e também em proteínas de superfície celular (ALON et al., 2012; HECKLER et al., 2008; SEVIER, 2012).

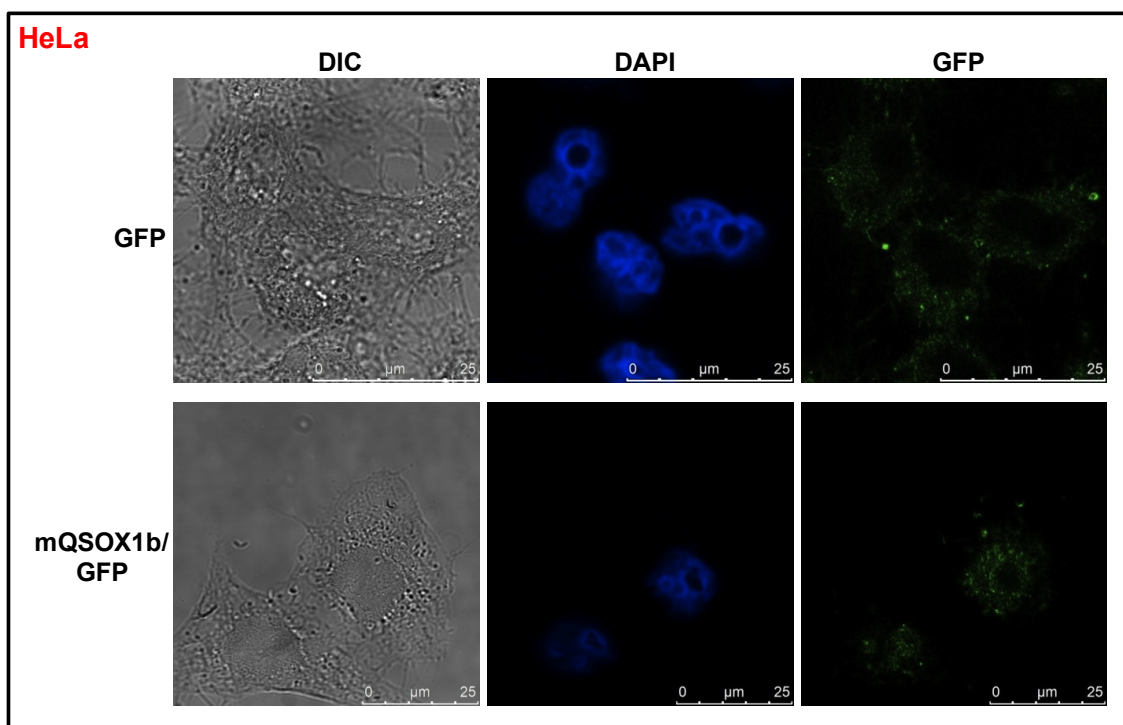
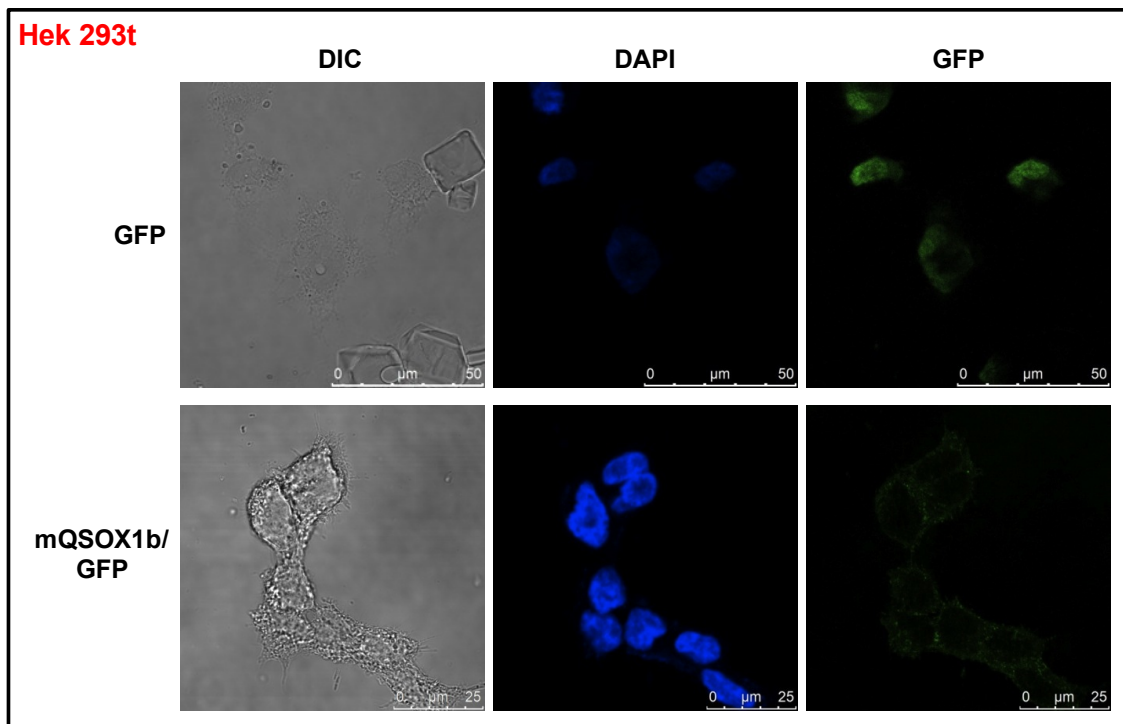


Figura 26: Análise por microscopia confocal da expressão de GFP e mQSX1b/GFP em Hek 293t e HeLa.

As células foram transfectadas conforme descrito anteriormente e cultivadas por 48 horas em seus respectivos meios e condições de cultura. O perfil morfológico visualizado por microscopia confocal Leica (SP5 laser-scanning confocal microscope).

A variação do estado redox extracelular (mais oxidativo ou redutor) acompanha o estado fisiológico do tecido em questão, e desencadeia diversos mecanismos de sinalização celular que culminam na ativação de vários eventos como diferenciação, proliferação, e morte celular (GO; JONES, 2011), os quais também já foram associados a presença ou ausência de QSOX1 (ILANI et al., 2013; PERNODET et al., 2012; SEVIER, 2012), sendo assim, realizamos a mensuração dos tióis de superfície celular e de MEC quando QSOX1b esta superexpressa.

4.3.4. Tióis de superfície celular

Utilizamos a reação de Ellman para determinar o conteúdo de tióis extracelulares, os quais compreendem os de superfície celular e matriz extracelular (LARAGIONE et al., 2006). De fato, a viabilidade do método é comprovada através do aumento significativo nos níveis de tióis extracelulares então quando as células foram incubadas com NAC por 2 ou 24h (Figura 27). Analisamos para o perfil de tióis de superfície, também células Hek293t (Figura 28) e HeLa (Figura 29) transfectadas com os vetores mQSOX1b-GFP ou apenas GFP. A superexpressão de mQSOX1b-GFP induz uma diminuição pequena, mas significativa de tióis extracelulares em relação a condição de superexpressão de apenas GFP, após 48h da transfecção, em ambas as linhagens. Este dado confirma que a QSOX1b leva a um estado mais oxidativo no meio extracelular. Este efeito pode ser consequência do papel oxidativo da enzima sobre as proteínas extracelulares, incluindo a FN. Contudo, um efeito intracelular da QSOX1b, transmitido para o meio extracelular também não pode ser descartado.

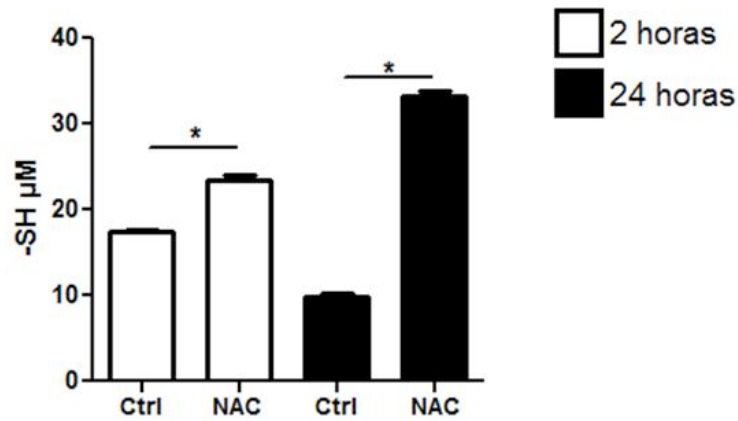


Figura 27: Detecção de tios de superfície (celular e matriz extracelular) de células Hek 293t pelo método de TNB.

Foram plaqueadas 3.10^6 cél./placa (p35), crescidas com 5% de SFB. As células foram tratadas com NAC por 2 e 24 horas. Após tratamento as células foram lavadas 10 vezes com PBS, e então Incubadas com DTNB [200 μM] por 20 minutos, e feita leitura em espectrofotômetro na faixa de 415 nm. as concentrações de tios foram calculadas usando $\epsilon_{415nm} = 14140 \text{ M. cm}^{-1}$. Análise estatística básica pelo GraphPad 5 Prism, *test t* pareado, $p < 0,005$.

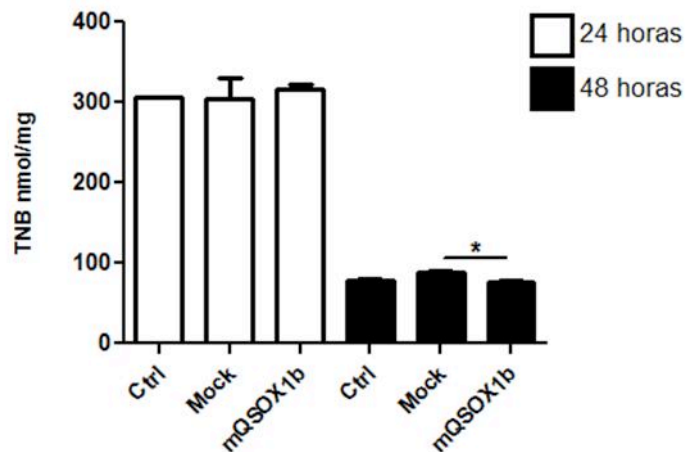


Figura 28: Detecção de tios de superfície celular de Hek 293t pelo método de TNB.

Ctrl, célula não transfectada; Mock, célula transfectada com vetor vazio; mQSOX1b, transfectada com vetor para superexpressão de mQSOX1b. Para este ensaio as células foram cultivadas (por 24 e 48 horas) e analisadas conforme descrito anteriormente para detecção de tios. Análise estatística básica pelo GraphPad 5 Prism, *test t* pareado, $p < 0,02$.

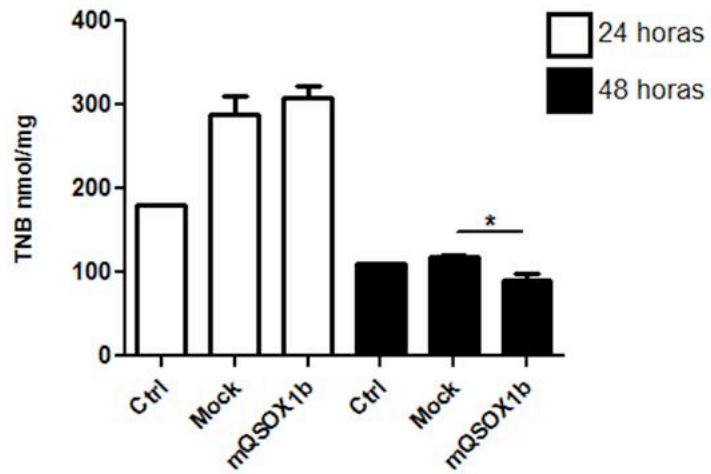


Figura 29: Detecção de tióis de superfície celular de HeLa pelo método de TNB.

Ctrl, célula não transfectada; Mock, célula transfectada com vetor vazio; mQSOX1b, transfectada com vetor para superexpressão de mQSOX1b. Para este ensaio as células foram cultivadas (por 24 e 48 horas) e analisadas conforme descrito anteriormente para detecção de tióis. Análise estatística básica pelo GraphPad 5 Prism, *test t* pareado, $p < 0,02$.

4.4. Discussão geral: Função biológica da QSOX1

Até o presente momento a QSOX1 já foi predita participar de diversos eventos celulares, e em muitos deles com funções antagonistas, como a ativação ou inibição da proliferação (KATCHMAN et al., 2011; PERNODET et al., 2012) e ação pró e anti-apoptótica (DE ANDRADE et al., 2011; MOREL et al., 2007). No cenário de células em processos patológicos, a expressão de QSOX1 varia conforme o tecido analisado. Sendo que em alguns processos cancerosos ela é expressa abaixo dos níveis normais (MOGGS et al., 2005; MUSARD et al., 2001), e em outros acima dos níveis normais (ANTWI et al., 2009; KATCHMAN et al., 2011; MOREL et al., 2007). Contudo, vale ressaltar, que a maioria dos tecidos analisados para expressão da enzima é de perfil altamente secretório, como mama, próstata, pâncreas e fibroblastos, e para estes ambientes acredita-se que a enzima tenha importante papel sobre o dobramento de proteínas nascentes, ou no remodelamento de constituintes da MEC, muitas vezes promovendo processos de invasão celular.

Nosso grupo vem trabalhando com QSOX1 no contexto da MEC há muito tempo (PORTES et al., 2008; ZANATA et al., 2005; Steclan et al., manuscrito em preparação), contudo, recentemente, outro grupo de pesquisa mostrou que a depleção de expressão da enzima em fibroblastos acarreta em defeitos na deposição da laminina na MEC secretada por estas células, porém, a deposição de outros constituintes como colágeno e fibronectina não foram alteradas (ILANI et al., 2013). Neste trabalho ainda, os autores avaliaram apenas a relação da presença da enzima ativa com a deposição de laminina, diferentemente de nosso trabalho, onde mostramos que QSOX1 é capaz de oxidar a fibronectina *in vitro*, providenciando formas multiméricas da molécula, as quais são amplamente descritas com importantes papéis biológicos *in vivo* (ROZARIO et al., 2009; SALMERÓN-SÁNCHEZ et al., 2011). Estes dados então corroboram com os achados e funções preditas pela literatura, de que a enzima QSOX1 provavelmente atue sobre os microambientes da MEC, talvez sobre o remodelamento de proteínas passíveis de oxidação.

Sabendo da localização da QSOX1, e da sua possível atuação na MEC sobre os constituintes proteicos, outras evidências reforçam a atuação da enzima neste ambiente. Especula-se, por exemplo, que outros fatores oxidativos estão presentes na MEC de diversos tecidos, e são responsáveis pela oligomerização de moléculas. Um exemplo é para a finalização do colágeno na MEC, que depende da participação

conjunta da enzima peroxidase, H_2O_2 e halogenetos (com Cl^- e Br^-) na formação de ligações sulfilimina (S=N, ligação entre o enxofre de um resíduo de aminoácido metionina, e nitrogênio de um resíduo de aminoácido hidroxilisina) (WEISS, 2012).

O processo de deposição destas, e de outras proteínas na MEC é minuciosamente regulado conforme a situação fisiológica das células secretoras, resultando em microambientes extracelulares diretamente ligados e responsáveis pelo controle da invasão e motilidade das células (SCHEDIN; KEELY, 2011; WEBER, 2008). E conhece-se, que a promoção destes eventos celulares é dada através do remodelamento dos componentes da matriz para abertura de nichos que facilitam a migração pelas redes de filamentos proteicos, e com concomitante liberação de citocinas armazenadas (WONG; RUSTGI, 2013). A mudança estrutural de diversas proteínas da MEC é principalmente resultado da oxi/redução de tióis, os quais por sua vez também atuam sobre os eventos celulares pela sinalização mecânica para as células, as quais traduzem estes estímulos físicos para bioquímicos, e deflagram a regulação de diversos processos celulares, incluindo adesão, proliferação, diferenciação e apoptose, direta ou indiretamente (VOGEL, 2006). Aqui, demonstramos também que a superexpressão de mQSOX1b levou o perfil mais oxidativo dos tióis de matriz e superfície celular nas linhagens analisadas. De fato, muitas proteínas de MEC e superfície são descritas como detentoras de resíduos de aminoácidos reversivelmente sensíveis a oxi/redução intra e/ou extracelular, e que a presença destes são caracterizados como elementos-chaves em processos de sinalização celular (CLAVREUL et al., 2006; GO; JONES, 2011). O perfil oxidado para estes ambientes pode também estar relacionado com a promoção ou inibição da proteção celular contra danos oxidativos, e sobre isto, Magalhães e colaboradores (MAGALHAES et al., 2008), mostraram de fato que a depleção da expressão de QSOX1 em mosquitos *Anopheles* acarreta em danos oxidativos gerados pelo metal obtido através da ingestão de sangue.

Neste contexto então, temos evidenciado reforços positivos para a atuação de QSOX1 sobre o conteúdo secretado por células para a MEC, possivelmente através da oxidação direta de tióis reativos presentes na matriz, especificamente a FN, ou então, ainda no mesmo contexto, sobre tióis de superfície celular. Quanto à oxidação da FN, é importante ressaltar que a forma multimérica da molécula (fibrilar), aqui gerada na presença da QSOX1b, assim como outras formas oligomerizadas da molécula, já foram bem caracterizadas, e vinculadas a diversos eventos celulares *in vivo* (SCHWARZBAUER; DESIMONE, 2011). Inclusive, sabe-se que a presença de

formas fibrilares da FN são essenciais e suportam o dobramento de outras proteínas de matriz, por exemplo, a fibrilina (SABATIER et al., 2009). Sendo que também a formação destes multímeros, por sua vez, depende não só de integrinas de superfície celular, mas também de outros processos enzimáticos na MEC, que ainda são descritos como desconhecidos (ENGLER et al., 2009; SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999), e que aqui, em nosso trabalho, temos evidências para sugerir a participação de QSOX1 para este cenário, visto que a forma multimérica de FN gerada é dependente de dissulfetos, e insolúvel a DOC.

5. Conclusão

Aqui, utilizando-se mQSOX1b, pode-se elucidar que a atividade sulfidril oxidase foi de acordo com o descrito pela literatura, para os substratos já conhecidos DTT, GSH, e lisozima.

A FN reduzida também foi caracterizada como substrato passível de oxidação de pela mQSOX1b *in vitro*, sendo que esta oxidação resulta na formação da forma fibrilar (multimérica) da molécula, com massa molecular superior a 800 kDa. Estes achados confirmam as especulações levantadas pela literatura de que QSOX1 possa atuar sobre o modelamento e remodelamento de constituintes da MEC ricos em cisteína (colágenos, fibrilina, elastina, fibronectina, e etc).

Apresentamos evidências de que a FN multimerizada pela sulfidril oxidase não altera o perfil de adesão celular em linhagens de 3t3, Rasm, e HeLa. Entretanto, quando analisada a FN no seu estado nativo junto a mQSOX1b, houve a promoção significativa da capacidade proliferativa das linhagens HeLa e Rasm.

Quando analisado linhagens Hek293t e HeLa superexpressando QSOX1b, constatou-se que a presença da enzima alterou o estado redox das proteínas da matriz e de superfície celular, o que *in vivo* possivelmente culminaria na alteração do arranjo estrutural de proteínas e estado redox na MEC.

Sendo assim, concluímos que QSOX1 possa atuar sobre FN, e possivelmente sobre outras moléculas de MEC, através da formação de dissulfetos, os quais provavelmente estejam relacionados com o dobramento e/ou remodelamento dos constituintes da MEC, assim como, sobre a oxidação de tióis de superfície celular e da matriz.

6. Referências Bibliográficas

ALON, A.; GROSSMAN, I.; GAT, Y.; KODALI, V. K.; DIMAIO, F.; MEHLMAN, T.; HARAN, G.; BAKER, D.; THORPE, C.; FASS, D. The dynamic disulphide relay of quiescin sulphydryl oxidase. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 414–8, 16 ago. 2012.

ALON, A.; HECKLER, E. J.; THORPE, C.; FASS, D. QSOX contains a pseudo-dimer of functional and degenerate sulfhydryl oxidase domains. **FEBS letters**, v. 584, n. 8, p. 1521–5, 16 abr. 2010.

ANTIA, M.; BANEYX, G.; KUBOW, K. E.; VOGEL, V. Fibronectin in aging extracellular matrix fibrils is progressively unfolded by cells and elicits an enhanced rigidity response. **Faraday discussions**, v. 139, p. 229–49; discussion 309–25, 419–20, jan. 2008.

ANTWI, K.; HOSTETTER, G.; DEMEURE, M. J.; KATCHMAN, B. A.; DECKER, G. A.; RUIZ, Y.; SIELAFF, T. D.; KOEP, L. J.; LAKE, D. F. Analysis of the plasma peptidome from pancreas cancer patients connects a peptide in plasma to overexpression of the parent protein in tumors. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 10, p. 4722–31, out. 2009.

ARAKI, K.; INABA, K. Structure, mechanism, and evolution of Ero1 family enzymes. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 8, p. 790–9, 15 abr. 2012.

BANERJEE, R. Redox outside the box: linking extracellular redox remodeling with intracellular redox metabolism. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 7, p. 4397–402, 10 fev. 2012.

BANEYX, G.; BAUGH, L.; VOGEL, V. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. v. 2002, 2002.

BENAYOUN, B.; ESNARD-FÈVE, A.; CASTELLA, S.; COURTY, Y.; ESNARD, F. Rat seminal vesicle FAD-dependent sulfhydryl oxidase. Biochemical characterization and molecular cloning of a member of the new sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13830–7, 27 abr. 2001.

BENHAM, A. M. Protein secretion and the endoplasmic reticulum. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 8, p. a012872, ago. 2012.

BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; HESS, D. T.; STAMLER, J. S. NIH Public Access. v. 320, n. 5879, p. 1050–1054, 2009.

BROILLET, M. C. S-nitrosylation of proteins. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 55, n. 8-9, p. 1036–42, jul. 1999.

BULLEID, N. J.; ELLGAARD, L. Multiple ways to make disulfides. **Trends in biochemical sciences**, v. 36, n. 9, p. 485–92, set. 2011.

CASTELLETTI, F.; DONADELLI, R.; BANTERLA, F.; HILDEBRANDT, F.; ZIPFEL, P. F.; BRESIN, E.; OTTO, E.; SKERKA, C.; RENIERI, A.; TODESCHINI, M.; CAPRIOLI, J.; CARUSO, R. M.; ARTUSO, R.; REMUZZI, G.; NORIS, M. Mutations in FN1 cause

glomerulopathy with fibronectin deposits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 7, p. 2538–43, 19 fev. 2008.

CHAKRAVARTHI, S.; JESSOP, C. E.; WILLER, M.; STIRLING, C. J.; BULLEID, N. J. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. **The Biochemical journal**, v. 404, n. 3, p. 403–11, 15 jun. 2007.

CHANG, T. S.; MORTON, B. Epididymal sulfhydryl oxidase: a sperm-protective enzyme from the male reproductive tract. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 66, n. 1, p. 309–15, 2 set. 1975.

CHEN, H.; MOSHER, D. F. Formation of sodium dodecyl sulfate-stable fibronectin multimers. Failure to detect products of thiol-disulfide exchange in cyanogen bromide or limited acid digests of stabilized matrix fibronectin. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 15, p. 9084–9, 12 abr. 1996.

CHEN, V. M.; HOGG, P. J. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 4, n. 12, p. 2533–41, dez. 2006.

CHIARUGI, P.; GIANNONI, E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 11, p. 1352–64, 1 dez. 2008.

CLAVREUL, N.; ADACHI, T.; PIMENTAL, D. R.; IDO, Y.; SCHÖNEICH, C.; COHEN, R. A. S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells. v. 25, p. 1–25, 2006.

CODDING, J. J. A.; ISRAEL, B. A. B.; THORPE, C. Protein Substrate Discrimination in the Quiescin Sulfhydryl Oxidase (QSOX) Family. **Biochemistry**, 2012.

COLLET, J.; MESSENS, J. Structure, Function, and Mechanism of Thioredoxin Proteins. v. 13, n. 8, 2010.

COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 4, n. 6, p. 483–93, jun. 1993.

COPPOCK, D. L.; THORPE, C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 300–11, 2006.

DE ANDRADE, C. R.; STOLF, B. S.; DEBBAS, V.; ROSA, D. S.; KALIL, J.; COELHO, V.; LAURINDO, F. R. M. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 47, n. 10, p. 716–27, dez. 2011.

DEPUYDT, M.; MESSENS, J.; COLLET, J.-F. How proteins form disulfide bonds. **Antioxidants & redox signaling**, v. 15, n. 1, p. 49–66, 1 jul. 2011.

ENGLER, A. J.; CHAN, M.; BOETTIGER, D.; SCHWARZBAUER, J. E. A novel mode of cell detachment from fibrillar fibronectin matrix under shear. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 10, p. 1647–53, 15 maio 2009.

FINAK, G.; BERTOS, N.; PEPIN, F.; SADEKOVA, S.; SOULEIMANOVA, M.; ZHAO, H.; CHEN, H.; OMEROGU, G.; METERISSIAN, S.; OMEROGU, A.; HALLETT, M.; PARK, M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. **Nature medicine**, v. 14, n. 5, p. 518–27, maio 2008.

GARCIA-PARDO, A.; PEARLSTEIN, E.; FRANGIONE, B. Primary structure of human plasma fibronectin. Characterization of a 31,000-dalton fragment from the COOH-terminal region containing a free sulfhydryl group and a fibrin-binding site. **The Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 18, p. 10320–5, 25 ago. 1985.

GELDERMAN, K. A.; HULTQVIST, M.; HOLMBERG, J.; OLOFSSON, P.; HOLMDAHL, R. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 34, p. 12831–6, 22 ago. 2006.

GHEZZI, P. Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. v. 33, p. 1378–1381, 2005.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Cysteine/cystine redox signaling in cardiovascular disease. **Free radical biology & medicine**, v. 50, n. 4, p. 495–509, 15 fev. 2011.

HECKLER, E. J.; ALON, A.; FASS, D.; THORPE, C. Human Quiescin-Sulfhydryl Oxidase, QSOX1: Probing Internal Redox Steps. p. 4955–4963, 2008.

HECKLER, E. J.; ALON, A.; FASS, D.; THORPE, C. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 47, n. 17, p. 4955–63, 29 abr. 2008.

HECKLER, E. J.; RANCY, P. C.; KODALI, V. K.; THORPE, C. Generating disulfides with the Quiescin-sulfhydryl oxidases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 4, p. 567–77, abr. 2008.

HOGG, P. J. Disulfide bonds as switches for protein function. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 4, p. 210–4, abr. 2003.

HOOBER, K. L.; JONEJA, B.; WHITE, H. B.; THORPE, C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 48, p. 30510–6, 29 nov. 1996.

HOOBER, K. L.; SHEASLEY, S. L.; GILBERT, H. F.; THORPE, C. Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 32, p. 22147–50, 6 ago. 1999.

HOOBER, K. L.; THORPE, C. Egg white sulfhydryl oxidase: kinetic mechanism of the catalysis of disulfide bond formation. **Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 3211–7, 9 mar. 1999.

ILANI, T.; ALON, A.; GROSSMAN, I.; HOROWITZ, B.; KARTVELISHVILY, E.; COHEN, S. R.; FASS, D. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. **Science (New York, N.Y.)**, v. 341, n. 6141, p. 74–6, 5 jul. 2013.

INABA, K. Structural basis of protein disulfide bond generation in the cell. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 15, n. 9, p. 935–43, 1 set. 2010.

JAJE, J.; WOLCOTT, H. N.; FADUGBA, O.; CRIPPS, D.; YANG, A. J.; MATHER, I. H.; THORPE, C. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 13031–40, 13 nov. 2007.

JIANG, X.; FITZGERALD, M.; GRANT, C. M.; HOGG, P. J. Redox Control of Exofacial Protein Thiols / Disulfides by Protein Disulfide Isomerase *. v. 274, n. 4, p. 2416–2423, 1999.

JORDAN, P. A.; GIBBINS, J. M. Extracellular disulfide exchange and the regulation of cellular function. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 3-4, p. 312–24, 2006.

KASPAR, M.; ZARDI, L.; NERI, D. Fibronectin as target for tumor therapy. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 118, n. 6, p. 1331–9, 15 mar. 2006.

KATCHMAN, B. A.; ANTWI, K.; HOSTETTER, G.; DEMEURE, M. J.; WATANABE, A.; DECKER, G. A.; MILLER, L. J.; VON HOFF, D. D.; LAKE, D. F. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. **Molecular cancer research : MCR**, v. 9, n. 12, p. 1621–31, dez. 2011.

KODALI, V. K.; THORPE, C. Quiescin sulfhydryl oxidase from *Trypanosoma brucei*: catalytic activity and mechanism of a QSOX family member with a single thioredoxin domain. **Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 2075–85, 9 mar. 2010.

LAHAV, J.; JURK, K.; HESS, O.; BARNES, M. J.; FARNDAL, R. W.; LUBOSHITZ, J.; KEHREL, B. E. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. **Blood**, v. 100, n. 7, p. 2472–8, 1 out. 2002.

LANGENBACH, K. J.; SOTTILE, J. Identification of protein-disulfide isomerase activity in fibronectin. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 11, p. 7032–8, 12 mar. 1999.

LARAGIONE, T.; BONETTO, V.; CASONI, F.; MASSIGNAN, T.; BIANCHI, G.; GIANAZZA, E.; GHEZZI, P. Redox regulation of surface protein thiols: identification of integrin alpha-4 as a molecular target by using redox proteomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 14737–41, 9 dez. 2003.

LARAGIONE, T.; GIANAZZA, E.; TONELLI, R.; BIGINI, P.; MENNINI, T.; CASONI, F.; MASSIGNAN, T.; BONETTO, V.; GHEZZI, P. Regulation of redox-sensitive exofacial protein thiols in CHO cells. **Biological chemistry**, v. 387, n. 10-11, p. 1371–6, 2006.

LIMOR-WAISBERG, K.; BEN-DOR, S.; FASS, D. Diversification of quiescin sulfhydryl oxidase in a preserved framework for redox relay. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 70, jan. 2013.

LING, M. M.; ROBINSON, B. H. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. **Analytical biochemistry**, v. 254, n. 2, p. 157–78, 15 dez. 1997.

LUKASHEV, M. E.; WERB, Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. v. 8924, n. 98, p. 437–441, 1998.

MAGALHAES, T.; BRACKNEY, D. E.; BEIER, J. C.; FOY, B. D. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 68, n. 3, p. 134–43, jul. 2008.

MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLD, P.; GRIFFOND, B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. **The Journal of comparative neurology**, v. 473, n. 3, p. 334–63, 31 maio 2004.

MAITY, G.; CHOUDHURY, P. R.; SEN, T.; GANGULY, K. K.; SIL, H.; CHATTERJEE, A. Culture of human breast cancer cell line (MDA-MB-231) on fibronectin-coated surface induces pro-matrix metalloproteinase-9 expression and activity. **Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 32, n. 1, p. 129–38, fev. 2011.

MAJORS, A. K. Homocysteine Binds to Human Plasma Fibronectin and Inhibits Its Interaction With Fibrin. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 22, n. 8, p. 1354–1359, 30 maio 2002.

MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI, E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **Journal of dermatological science**, v. 30, n. 1, p. 50–62, out. 2002.

MIKI, H.; FUNATO, Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. **Journal of biochemistry**, v. 151, n. 3, p. 255–61, mar. 2012.

MOGGS, J. G.; MURPHY, T. C.; LIM, F. L.; MOORE, D. J.; STUCKEY, R.; ANTROBUS, K.; KIMBER, I.; ORPHANIDES, G. Anti-proliferative effect of estrogen in breast cancer cells that re-express ER α is mediated by aberrant regulation of cell cycle genes. **Journal of molecular endocrinology**, v. 34, n. 2, p. 535–51, abr. 2005.

MOREL, C.; ADAMI, P.; MUSARD, J.-F.; DUVAL, D.; RADOM, J.; JOUVENOT, M. Involvement of sulfhydryl oxidase QSOX1 in the protection of cells against oxidative stress-induced apoptosis. **Experimental cell research**, v. 313, n. 19, p. 3971–82, 15 nov. 2007.

MORETTI, F. A.; CHAUHAN, A. K.; IACONCIG, A.; PORRO, F.; BARALLE, F. E.; MURO, A. F. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 38, p. 28057–62, 21 set. 2007.

MOSESSON, M. W.; COOLEY, B. C.; HERNANDEZ, I.; DIORIO, J. P.; WEILER, H. Thrombosis risk modification in transgenic mice containing the human fibrinogen thrombin-binding gamma' chain sequence. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**, v. 7, n. 1, p. 102–10, jan. 2009.

MUSARD, J. F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAÏCHARD, A.; ORDENER, C.; REMY-MARTIN, J. P.; JOUVENOT, M.; ADAMI, P. Identification and expression of a new sulfhydryl oxidase SOx-3 during the cell cycle and the estrus cycle in uterine cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 287, n. 1, p. 83–91, 14 set. 2001.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, M. K.; KISTLER, W. S. Purification and cell-free synthesis of a major protein from rat seminal vesicle secretion. A potential marker for androgen action. **The Journal of biological chemistry**, v. 254, n. 2, p. 383–90, 25 jan. 1979.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, W. S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2639–45, 10 jun. 1980.

OSTROWSKI, M. C.; KISTLER, W. S.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G. A flavoprotein responsible for the intense sulfhydryl oxidase activity of rat seminal vesicle secretion. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 87, n. 1, p. 171–6, 15 mar. 1979.

PERNODET, N.; HERMETET, F.; ADAMI, P.; VEJUX, A.; DESCOTES, F.; BORG, C.; ADAMS, M.; PALLANDRE, J.-R.; VIENNET, G.; ESNARD, F.; JOUVENOT, M.; DESPOUY, G. High expression of QSOX1 reduces tumorigenesis, and is associated with a better outcome for breast cancer patients. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 5, p. R136, 25 out. 2012.

PORTES, K. F.; IKEGAMI, C. M.; GETZ, J.; MARTINS, A. P.; DE NORONHA, L.; ZISCHLER, L. F.; KLASSEN, G.; CAMARGO, A. A.; ZANATA, S. M.; BEVILACQUA, E.; NAKAO, L. S. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **Journal of molecular histology**, v. 39, n. 2, p. 217–25, abr. 2008.

POULOUIN, L.; GALLET, O.; ROUAHI, M.; IMHOFF, J. M. Plasma fibronectin: three steps to purification and stability. **Protein expression and purification**, v. 17, n. 1, p. 146–52, out. 1999.

PÜSCHEL, A. W.; ADAMS, R. H.; BETZ, H. Murine semaphorin D/collapsin is a member of a diverse gene family and creates domains inhibitory for axonal extension. **Neuron**, v. 14, n. 5, p. 941–8, maio 1995.

RAJE, S.; GLYNN, N. M.; THORPE, C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. **Analytical biochemistry**, v. 307, n. 2, p. 266–72, 15 ago. 2002.

RAJE, S.; THORPE, C. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidase family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. **Biochemistry**, v. 42, n. 15, p. 4560–8, 22 abr. 2003.

RANCY, P. C.; THORPE, C. Oxidative protein folding in vitro: a study of the cooperation between quiescin-sulfhydryl oxidase and protein disulfide isomerase. **Biochemistry**, v. 47, n. 46, p. 12047–56, 18 nov. 2008.

ROMBERGER, D. J. Fibronectin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 29, n. 7, p. 939–43, jul. 1997.

ROZARIO, T.; DZAMBA, B.; WEBER, G. F.; DAVIDSON, L. A; DESIMONE, D. W. The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements in vivo. **Developmental biology**, v. 327, n. 2, p. 386–98, 15 mar. 2009.

SAARANEN, M. J.; RUDDOCK, L. W. Disulfide bond formation in the cytoplasm. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 1, p. 46–53, 1 jul. 2013.

SABATIER, L.; CHEN, D.; FAGOTTO-KAUFMANN, C.; HUBMACHER, D.; MCKEE, M. D.; ANNIS, D. S.; MOSHER, D. F.; REINHARDT, D. P. Fibrillin assembly requires fibronectin. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 3, p. 846–58, fev. 2009.

SAHAF, B.; HEYDARI, K.; HERZENBERG, L. A; HERZENBERG, L. A. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 434, n. 1, p. 26–32, 1 fev. 2005.

SALMERÓN-SÁNCHEZ, M.; RICO, P.; MORATAL, D.; LEE, T. T.; SCHWARZBAUER, J. E.; GARCÍA, A. J. Role of material-driven fibronectin fibrillogenesis in cell differentiation. **Biomaterials**, v. 32, n. 8, p. 2099–105, mar. 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, 2001

SATO, Y.; INABA, K. Disulfide bond formation network in the three biological kingdoms, bacteria, fungi and mammals. **The FEBS journal**, v. 279, n. 13, p. 2262–71, jul. 2012.

SCHEDIN, P.; KEELY, P. J. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a003228, jan. 2011.

SCHWARZBAUER, J. E.; DESIMONE, D. W. Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 7, jul. 2011.

SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Current opinion in cell biology**, v. 11, n. 5, p. 622–7, out. 1999.

SECHLER, J. L.; RAO, H.; CUMISKEY, A M.; VEGA-COLÓN, I.; SMITH, M. S.; MURATA, T.; SCHWARZBAUER, J. E. A novel fibronectin binding site required for fibronectin fibril growth during matrix assembly. **The Journal of cell biology**, v. 154, n. 5, p. 1081–8, 3 set. 2001.

SECHLER, J. L.; SCHWARZBAUER, J. E. Coordinated regulation of fibronectin fibril assembly and actin stress fiber formation. **Cell adhesion and communication**, v. 4, n. 6, p. 413–24, mar. 1997.

SEVIER, C. S. New insights into oxidative folding. **The Journal of cell biology**, v. 188, n. 6, p. 757–8, 22 mar. 2010.

SEVIER, C. S. Erv2 and quiescin sulfhydryl oxidases: Erv-domain enzymes associated with the secretory pathway. **Antioxidants & redox signaling**, v. 16, n. 8, p. 800–8, 15 abr. 2012.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 3, n. 11, p. 836–47, nov. 2002.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Conservation and diversity of the cellular disulfide bond formation pathways. **Antioxidants & redox signaling**, v. 8, n. 5-6, p. 797–811, 2006.

SEVIER, C. S.; KAISER, C. A. Ero1 and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1783, n. 4, p. 549–56, abr. 2008.

SEVIER, C. S.; QU, H.; HELDMAN, N.; GROSS, E.; FASS, D.; KAISER, C. A. Modulation of cellular disulfide-bond formation and the ER redox environment by feedback regulation of Ero1. **Cell**, v. 129, n. 2, p. 333–44, 20 abr. 2007.

SILVA, G. M.; NETTO, L. E. S.; DISCOLA, K. F.; PIASSA-FILHO, G. M.; PIMENTA, D. C.; BÁRCENA, J. A.; DEMASI, M. Role of glutaredoxin 2 and cytosolic thioredoxins in cysteinyl-based redox modification of the 20S proteasome. **The FEBS journal**, v. 275, n. 11, p. 2942–55, jun. 2008.

SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 26, p. 397–419, jan. 2010.

SOTTILE, J.; MOSHER, D. F. N-terminal type I modules required for fibronectin binding to fibroblasts and to fibronectin's III1 module. **The Biochemical journal**, v. 323 (Pt 1, p. 51–60, 1 abr. 1997.

TANZER, M. L. Current concepts of extracellular matrix. **Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association**, v. 11, n. 3, p. 326–31, maio 2006.

THORPE, C.; COPPOCK, D. L. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. **The Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 19, p. 13929–33, 11 maio 2007.

THORPE, C.; HOOBER, K. L.; RAJE, S.; GLYNN, N. M.; BURNSIDE, J.; TURI, G. K.; COPPOCK, D. L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 405, n. 1, p. 1–12, 1 set. 2002.

TIEN, A.-C.; RAJAN, A.; SCHULZE, K. L.; RYOO, H. D.; ACAR, M.; STELLER, H.; BELLEN, H. J. Ero1L, a thiol oxidase, is required for Notch signaling through cysteine

bridge formation of the Lin12-Notch repeats in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of cell biology**, v. 182, n. 6, p. 1113–25, 22 set. 2008.

TZINIA, A. K.; KITSIOU, P. V.; TALAMAGAS, A. A.; GEORGOPOULOS, A.; TSILIBARY, E. C. Effects of collagen IV on neuroblastoma cell matrix-related functions. **Experimental cell research**, v. 274, n. 2, p. 169–77, 1 abr. 2002.

UEHARA, T.; NAKAMURA, T.; YAO, D.; SHI, Z.-Q.; GU, Z.; MA, Y.; MASLIAH, E.; NOMURA, Y.; LIPTON, S. A. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 513–7, 25 maio 2006.

VAKONAKIS, I.; CAMPBELL, I. D. Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 5, p. 578–83, out. 2007.

VAN DER WIJK, T.; OVERVOORDE, J.; DEN HERTOOG, J. H₂O₂-induced intermolecular disulfide bond formation between receptor protein-tyrosine phosphatases. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44355–61, 22 out. 2004.

VARTIO, T. Regular fragmentation of hydrogen peroxide-treated fibronectin. **The Journal of biological chemistry**, v. 264, n. 8, p. 4471–5, 15 mar. 1989.

VARTIO, T.; KUUSELA, P. Disulfide-bonded dimerization of fibronectin in vitro. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 202, n. 2, p. 597–604, 5 dez. 1991.

VOGEL, V. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 35, p. 459–88, jan. 2006.

WEBER, G. F. Molecular mechanisms of metastasis. **Cancer letters**, v. 270, n. 2, p. 181–90, 8 nov. 2008.

WEDEMEYER, W. J.; WELKER, E.; NARAYAN, M.; SCHERAGA, H. A. Disulfide Bonds and Protein Folding †. **Biochemistry**, v. 39, n. 15, p. 4207–4216, abr. 2000.

WEISS, S. J. Peroxidase: tying the collagen-sulfhydryl knot. **Nature chemical biology**, v. 8, n. 9, p. 740–1, set. 2012.

WHITE, E. S.; BARALLE, F. E.; MURO, A. F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **The Journal of pathology**, v. 216, n. 1, p. 1–14, set. 2008.

WHITE, E. S.; MURO, A. F. Fibronectin splice variants: understanding their multiple roles in health and disease using engineered mouse models. **IUBMB life**, v. 63, n. 7, p. 538–46, jul. 2011.

WILLIAMS, E.; JANMEY, P. Fibronectin. Effect of disulfide bond reduction on its physical and functional properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 9, p. 5911–5914, 1983.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 5, p. 549–61, 1 set. 2008.

WITTKÉ, I.; WIEDEMEYER, R.; PILLMANN, A.; SAVELYEVA, L.; WESTERMANN, F.; SCHWAB, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 63, n. 22, p. 7742–52, 15 nov. 2003.

WONG, G. S.; RUSTGI, A. K. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. **British journal of cancer**, v. 108, n. 4, p. 755–61, 5 mar. 2013.

WOUTERS, M. A.; FAN, S. W.; HAWORTH, N. L. Disulfides as redox switches: from molecular mechanisms to functional significance. **Antioxidants & redox signaling**, v. 12, n. 1, p. 53–91, jan. 2010.

WU, C.; DAILEY, T. A.; DAILEY, H. A.; WANG, B.; ROSE, J. P. The crystal structure of augments of liver regeneration: A mammalian FAD-dependent sulfhydryl oxidase. p. 1109–1118, 2003.

YAO, E. S.; ZHANG, H.; CHEN, Y.-Y.; LEE, B.; CHEW, K.; MOORE, D.; PARK, C. Increased beta1 integrin is associated with decreased survival in invasive breast cancer. **Cancer research**, v. 67, n. 2, p. 659–64, 15 jan. 2007.

ZANATA, S. M.; LUVIZON, A. C.; BATISTA, D. F.; IKEGAMI, C. M.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; CHAVES, D. F. S.; CARON, L. F.; PELIZZARI, J. V.; LAURINDO, F. R. M.; NAKAO, L. S. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox report: communications in free radical research**, v. 10, n. 6, p. 319–23, jan. 2005.

ZHANG, Y.; HOGG, N. S-Nitrosothiols: cellular formation and transport. **Free radical biology & medicine**, v. 38, n. 7, p. 831–8, 1 abr. 2005.

ZHENG, W.; CHU, Y.; YIN, Q.; XU, L.; YANG, C.; ZHANG, W.; TANG, Y.; YANG, Y. Crucial effect of the first CXXC motif of human QSOX 1b on the activity to different substrates. **Journal of biochemistry**, v. 149, n. 3, p. 293–300, mar. 2011.

ZITO, E.; CHIN, K.-T.; BLAIS, J.; HARDING, H. P.; RON, D. ERO1-beta, a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis. **The Journal of cell biology**, v. 188, n. 6, p. 821–32, 22 mar. 2010.

7. Anexos

7.1. Termo de consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Dinâmica da multimerização da fibronectina "in vitro".

Pesquisador Responsável : Dra. Marcia Helena Appel

Pesquisador participante: Chelin Auswaldt Steclan

Local da Pesquisa: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Endereço e telefone: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, 4748. UEPG – Campus Uvaranas - (42) 3220-3108.

Convidamos você a participar de uma pesquisa, coordenada por uma professora da Universidade Estadual de Ponta Grossa. **Para poder participar, é necessário que você leia este documento com atenção.** Ele pode conter palavras que você não entenda. Por favor, peça aos responsáveis pelo estudo para explicar qualquer palavra ou procedimento que você tenha dúvida.

Este documento, chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), serve para dar a você as informações sobre a pesquisa e só deve assiná-lo se concordar em participar da pesquisa. Você só deve participar do estudo se você quiser. Você pode se recusar a participar ou se retirar deste estudo a qualquer momento.

Convidamos a participar desta pesquisa pessoas maiores de 18 anos que estão imunizadas para hepatite B, que gozam de boa saúde e não tenham restrições a coleta de sangue em quantidade igual à coletada para exames de sangue de rotina (20ml). Utilizaremos a veia do braço para retirada do sangue.

Esta pesquisa utilizará uma molécula presente naturalmente no sangue de todas as pessoas. O estudo desta molécula pode aumentar nossa compreensão de como as células do nosso corpo se multiplicam e sobrevivem diante dos desafios como doenças e lesões. Para tanto necessitamos coletar 20ml de sangue de voluntários saudáveis. Depois, retiraremos esta proteína do sangue e a estudaremos purificada, ou seja, livre de outras moléculas do sangue. Você deverá estar alimentado no dia da doação. Serão utilizados apenas materiais estéreis durante a coleta. O procedimento pode causar os mesmos desconfortos de qualquer outra coleta de sangue que eventualmente tenha feito, nada mais. As suas informações serão mantidas de forma sigilosa só podendo ter acesso a elas os pesquisadores e você.

É muito importante sua participação. Você estará ajudando entender como nossas células funcionam e controlam as relações entre elas o meio que as envolve.

Sua decisão em participar deste estudo é voluntária. Você pode decidir não participar. Uma vez que você decidiu participar da pesquisa, você pode retirar seu consentimento e

participação a qualquer momento. Se você decidir não continuar no estudo e retirar sua participação, você não será punido, nem perderá qualquer benefício ao qual você tem direito.

Não haverá nenhum custo a você relacionado aos procedimentos realizados no estudo. E você também não receberá qualquer ajuda financeira por participar da pesquisa.

CONTATO PARA PERGUNTAS

No decorrer da pesquisa você pode tirar dúvidas e buscar esclarecimentos com o Pesquisador responsável: Prof. Dra. Marcia Helena Appel na Universidade Estadual de Ponta Grossa, Campus Uvaranas Bloco M sala 102 ou pelo telefone (42) 9944-7874 ou com o Pesquisador Participante Chelin Auswaldt Steclan pelo telefone (41) 9925-2315. **Você pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (COEP) da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo telefone: 3220-3108.** A COEP é uma comissão responsável pela análise dos projetos, determinando se estão cumprindo todas as determinações da lei e que assim proporciona aos participantes voluntários de pesquisas cumprimento de seus direitos e segurança quando participarem de uma pesquisa.

Eu li e entendi os termos deste documento e recebi detalhes com o investigador responsável por este estudo. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar, e que eu posso interromper minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o objetivo descrito acima. Recebi a informação de que posso fazer qualquer questionamento sobre o documento TCLE e sobre a pesquisa e que todas as dúvidas deverão ser sanadas antes da assinatura.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento.

NOME DO PARTICIPANTE VOLUNTÁRIO:

Endereço:

Idade: R.G.:

ASSINATURA:

DATA:

NOME DO INVESTIGADOR:

(Pessoa que aplicou o TCLE)

ASSINATURA:

DATA:

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Av.: Gen. Carlos Cavalcanti, 4748 CEP: 84030-900 Bloco M, Sala 12

Campus Uvaranas Ponta Grossa Fone: (42) 3220.3108 e-mail: seccoep@uegp.br

7.2. Currículo Lattes