

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KARIME CRUZ FRANÇA

EFEITOS DISTINTOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO SUPERÓXIDO NA
MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS PELA
QSOX1b

CURITIBA

2019

KARIME CRUZ FRANÇA

EFEITOS DISTINTOS DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E DO SUPERÓXIDO NA
MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS INDUZIDAS PELA
QSOX1b

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à
obtenção do título de doutora em Biologia Celular e
Molecular.

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

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

França, Karime Cruz

Efeitos distintos do peróxido de hidrogênio e do superóxido na migração e proliferação de células musculares lisas induzidas pela QSOX1b. / Karime Cruz França. – Curitiba, 2019.
87 p.: il.

Orientadora: Lia Sumie Nakao.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Vasos sanguíneos. 2. Miócitos de músculo liso. 3. Migração. 4. Proliferação de células. 5. Hiperplasia. I. Título. II. Nakao, Lia Sumie. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 612.13



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **KARIME CRUZ FRANÇA** intitulada "**Efeitos distintos do peróxido de hidrogênio e do superóxido na migração e proliferação de células musculares lisas induzidas pela QSOX1b**", sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa. A outorga do título de Doutor está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 23 de setembro de 2019.

LIA SUMIE NAKAO
Presidente da Banca examinadora (UFPR)

RICARDO AURINO DE PINHO
Avaliador Externo (PUC-PR)

PATRICIA SHIGUNOV
Avaliador Externo (ICC)

AUGUSTO SÁVIO PEIXOTO RAMOS
Avaliador Interno (ICC)

GLAUCIO VALDAMERI
Avaliador Externo (UFPR)



*Dedico este trabalho ao Peterson,
pelo apoio, compreensão e seus incentivos
mais que carinhosos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e os seus professores pelo apoio intelectual e estrutural.

À Prof. Dra. Lia Sumie Nakao, pela paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou. Obrigada pela confiança todos esses anos de trabalho que se iniciaram ainda na graduação e por não medir esforços para a realização deste trabalho.

À Dra. Alejandra San Martin, que me recebeu em estágio nos Estados Unidos. Aproveito para agradecer sua equipe: Holly, Felipe e Alejandra Valdivia.

Prof. Dr. Silvio Marques Zanata e Prof. Dra. Adriana Mercadante por compartilhar seus conhecimentos e pelos esforços em manter o laboratório ativo.

Ao prof. Dr. Silvio Sanches Veiga por disponibilizar seu laboratório para o uso do Tecan.

À Dra. Lucia Lopes da USP, por nos ceder o inibidor ML171.

Ao Peterson. Obrigada por estar perto incondicionalmente! Amo você!

Aos meus pais, pelo amor e valores a mim transmitidos, e ao meu “brodinho” Bruno pelos fraternos conselhos. Agradeço também minha cunhada Graziela pelas aulas de inglês.

Ao Fernando, João Carlos e Aparecida, a melhor torcida de todas.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Neurobiologia da UFPR e do Grupo de Pesquisa de Patologia Redox. Vocês são feras! Agradeço o companheirismo e as longas discussões que muito contribuiu com minha aprendizagem durante este tempo.

Não posso deixar de citar os amigos da Vila Internacional de Atlanta: Lurdinha, Gali, Carol, Flavinha e Joelma. Não consigo imaginar o que teria sido os 6 meses em Atlanta sem vocês! Meu coração é cheio de gratidão pelo amor que me deram!

A todos os familiares, amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Capes pelo suporte financeiro.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

A migração e a proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC) possuem importante papel na hiperplasia da camada íntima arterial em resposta a estímulos patológicos, como a restenose, que consiste na reobstrução do lúmen do vaso sanguíneo após a técnica da angioplastia por cateter balão. Estudos vêm associando a regulação de processos migratórios e proliferativos celulares com moléculas oxidantes, estabelecendo espécies reativas de oxigênio (ROS) como importantes sinalizadores nesse processo. Tíol proteínas estão cada vez mais evidentes na sinalização redox, inclusive a proteína QSOX1 (quiescina sulfidril oxidase), uma tíol oxidase dependente de FAD (flavina adenina dinucleotídeo) que catalisa a oxidação de di(tióis) à dissulfeto, com a redução concomitante do oxigênio molecular (O_2) à peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Recentemente, nosso grupo demonstrou que a QSOX1 extracelular está envolvida na proliferação e na migração de VSMC. Desta forma, o objetivo do trabalho foi melhor compreender os mecanismos pelos quais a proteína QSOX1 extracelular está envolvida nos processos de migração e proliferação em VSMC. O modelo experimental consistiu basicamente em VSMC primárias, mas em alguns ensaios foram utilizadas linhagens de células vasculares. Foram utilizadas construções da isoforma curta da proteína QSOX1: *wild type* (mQSOX) e a mutante inativa (C452SQSOX). A atividade sulfidril oxidase foi determinada pela formação de peróxido de hidrogênio. Os ensaios de migração foram realizados pelos métodos de *scratch* ou *transwell* e os ensaios de proliferação por cristal violeta, ambos na presença das proteínas recombinantes e de inibidores e/ou ativadores da produção de ROS. Ensaios de *western blotting* foram realizados para investigar a via de sinalização envolvida na migração em VSMC induzida pela QSOX1. Nossos resultados mostraram que a proteína QSOX1 recombinante extracelular estimula a migração em VSMC através de processos que envolvem aumento da produção de ROS. A presença do H_2O_2 resultante da atividade sulfidril oxidase e a presença do complexo enzimático NADPH oxidase (especificamente NOX1) mostraram-se importantes no processo migratório induzido pela QSOX1. A ausência da QSOX1 endógena inibe a motilidade de células musculares lisas. Além disso, a atividade desta enzima mostrou estar associada à regulação da via SSH1-cofilina, indicando ser a proteína QSOX1 uma reguladora redox que contribui para reorganização do citoesqueleto de actina durante o movimento celular. Foi também demonstrado que em concentrações mais altas e um tempo maior de exposição a proteína QSOX1 recombinante extracelular induz proliferação de VSMC. Este processo também foi dependente de ROS, especificamente com a formação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Em resumo, nossos dados indicam o envolvimento da QSOX1 recombinante extracelular na sinalização dos processos de migração e proliferação de VSMC mediados por NOX1.

Palavras-chave: Migração. Proliferação. QSOX1. ROS. NOX1.

ABSTRACT

Vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and proliferation plays an important role in arterial intima layer hyperplasia in pathological responses, like restenosis, which consists in reobstruction of the blood vessel lumen after the balloon catheter angioplasty technique. Studies have been associating the regulation of cell migratory and proliferative processes with oxidizing molecules, establishing reactive oxygen species (ROS) as relevant messengers in these events. Thiol proteins are increasingly evident in redox signaling, including QSOX1 protein (quiescin sulfhydryl oxidase), FAD (adenine dinucleotide flavin) - dependent thiol oxidase that catalyzes the oxidation of di (thiols) to disulfide, concomitant reduction of molecular oxygen (O_2) to hydrogen peroxide (H_2O_2). Our group recently demonstrated that extracellular QSOX1 is involved in VSMC proliferation and migration. Thus, the purpose of the study was to better understand the mechanisms by which extracellular QSOX1 protein is involved in the migration and proliferation processes in VSMC. The experimental model consisted of primary VSMC, but in some trials vascular cell line were used. Constructs of the short protein isoform QSOX1: wild type (mQSOX) and the inactive mutant (C452SQSOX) were used. Sulfhydryl oxidase activity was determined by the formation of hydrogen peroxide. Migration assays were performed by scratch or transwell methods and proliferation assays by crystal violet, both in the presence of recombinant proteins and ROS production inhibitors and/or activators. Western blotting assays were performed to investigate the signaling pathway involved in QSOX1-induced VSMC migration. Our results showed that extracellular recombinant QSOX1 protein stimulates migration in VSMC through processes involving increased ROS production. The presence of H_2O_2 resulting from sulfhydryl oxidase activity and the presence of the enzyme complex NAPH oxidase (specifically NOX1) proved to be important in the QSOX1 induced migration process. The absence of endogenous QSOX1 inhibits smooth muscle cell motility. In addition, the activity of this enzyme has been shown to be associated with regulation of the SSH1-cofillin pathway, indicating that QSOX1 protein is a redox regulator that contributes to actin cytoskeleton reorganization during cell movement. It has also been shown that at higher concentrations and longer exposure time to extracellular recombinant QSOX1 protein induces VSMC proliferation. This process was also ROS dependente, specifically through the formation of superoxide ($O_2^{\cdot-}$). In summary, our data indicate the involvement of extracellular recombinant QSOX1 in signaling NOX1-mediated VSMC proliferation migration processes.

Key-words: Migration. Proliferation. QSOX1. ROS. NOX1.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – ESTRUTURA VASCULAR ARTERIAL | 16 |
| FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS FILAMENTOS DE ACTINA E DAS PROTEÍNAS REGULADORAS NA FORMAÇÃO DO <i>LAMELLIPODIUM</i> .21 | |
| FIGURA 3 - O CICLO CELULAR E OS COMPLEXOS CDK-CICLINAS..... | 23 |
| FIGURA 4 - ORIGENS DE ROS EM VSMC | 26 |
| FIGURA 5 - ESTRUTURA GERAL DAS NADPH OXIDASES. | 27 |
| FIGURA 6 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO NADPH OXIDASE (NOX2) EM FAGÓCITOS. | 28 |
| FIGURA 7 - ISOFORMAS DA QSOX1. | 31 |
| FIGURA 8 - CULTURA PRIMÁRIA DE VSMC OBTIDAS PELO MÉTODO DE EXPLANTE. | 45 |
| FIGURA 9 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b (SELVAGEM E MUTADA). | 46 |
| FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA QSOX1b POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA | 47 |
| FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO DE DTT PELA ENZIMA wtQSOX. | 47 |
| FIGURA 12 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM VSMC PELO MÉTODO DE <i>SCRATCH</i> | 48 |
| FIGURA 13 - EFEITO DA QSOX1B RECOMBINANTE NA MIGRAÇÃO DE VSMC..... | 49 |
| FIGURA 14 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO PELO MÉTODO DE <i>TRANSWELL</i> | 50 |
| FIGURA 15 - EFEITO QUIMIOATRAENTE DA PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE EM VSMC..... | 50 |
| FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b FUSIONADA A ETIQUETA DE HISTIDINAS E TIORREDOXINA NA REGIÃO N-TERMINAL E DO PLASMÍDEO CONTENDO AS SEQUÊNCIAS PARA QSOX1b MARCADAS COM ETIQUETAS DE HA..... | 51 |
| FIGURA 17 - SUPEREXPRESSÃO PROTÉICA DE QSOX1b EM CÉLULAS HEK 293T. | 52 |
| FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HEK 293T TRANSECTADAS COM wtQSOX. | 52 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 19 - MIGRAÇÃO CELULAR DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 SECRETADA DE HEK 293T. | 53 |
| FIGURA 20 - EFEITO DA QSOX1B RECOMBINANTE NA PROLIFERAÇÃO EM VSMC. | 54 |
| FIGURA 21 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 SECRETADA DE HEK293T..... | 55 |
| FIGURA 22 - EFEITO DA MITOMICINA C NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 RECOMBINANTE. | 55 |
| FIGURA 23 - A MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE DEPENDE DE ESTÍMULO CONTÍNUO. | 56 |
| FIGURA 24 - QUANTIFICAÇÃO DE TIÓIS DE SUPERFÍCIE NA PRESENÇA DE QSOX1b RECOMBINANTE. | 57 |
| FIGURA 25 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (DEGRADAÇÃO DE H ₂ O ₂) EM VSMC INCUBADAS COM PEG-CAT OU CAT..... | 59 |
| FIGURA 26 - PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b..... | 60 |
| FIGURA 27 - QUANTIFICAÇÃO DO H ₂ O ₂ NO SOBRENADANTE DE VSMC EXPOSTAS À QSOX1B RECOMBINANTE..... | 61 |
| FIGURA 28 - DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR EM VSMC TRATADAS COM QSOX1b. | 62 |
| FIGURA 29 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM VSMC..... | 63 |
| FIGURA 30 - PEG-SOD AUMENTA AS QUANTIDADES DE PERÓXIDO DE HIDROGENIO INTRACELULAR. | 63 |
| FIGURA 31 - EFEITO DA PEG-SOD NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B RECOMBINANTE..... | 64 |
| FIGURA 32 - EFEITO DA PEG-SOD NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B RECOMBINANTE..... | 65 |
| FIGURA 33 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE WTQSOX NA PRESENÇA DE DPI..... | 66 |
| FIGURA 34 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE NOX1 NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE. | 66 |
| FIGURA 35 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE NOX1 NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE..... | 67 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 36 - PAPEL DA NOX1 NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDAS PELA QSOX1b RECOMBINANTE..... | 67 |
| FIGURA 37 - DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELLULAR EM VSMC ko/wt NOX1 TRATADAS COM QSOX1b RECOMBINANTE..... | 68 |
| FIGURA 38 - DEFOSFORILAÇÃO DA COFILINA INDUZIDA PELA wtQSOX EM VSMC. | 69 |
| FIGURA 39 - EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFATASE <i>SLINGSHOT</i> 1 NA DEFOSFORILAÇÃO DA COFILINA INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE..... | 69 |
| FIGURA 40 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE SSH1 NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE. | 70 |
| FIGURA 41 - SILENCIAMENTO GÊNICO DA QSOX1 MEDIADO POR siRNA..... | 71 |
| FIGURA 42 - A AUSÊNCIA DE QSOX1 DIMINUI MIGRAÇÃO EM HASMS..... | 71 |
| FIGURA 43 - QSOX1 DIMINUI MIGRAÇÃO EM VSMC NA PRESENÇA DA NOX1..... | 72 |
| FIGURA 44. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA VIA SLINGSHOT1-COFILINA PELA ATIVIDADE DA PROTEÍNA QSOX1b EM VSMC | 78 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| ADF | <i>Actin Depolymerizing Factors</i> |
| ALR | <i>Augmenter of Liver Regeneration</i> |
| Arp | <i>Actin-Related Proteins</i> |
| C | Aminoácido Cisteína |
| Cat | Catalase |
| DCFH-DA | 2',7'-Diclorofluoreceína Diacetato |
| DTNB | Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) |
| DTT | Ditiotreitol |
| DPI | Difenil iodônio |
| EGF | Fator de Crescimento Epidermal (<i>Epidermal Growth Factor</i>) |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| Erv | <i>Essencial for Respiration and Viability</i> |
| FAD | Flavina-adenina dinucleotídeo |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HASM | Células Musculares Lisas de Aorta Humana (<i>Human Aortic Smooth Muscle</i>) |
| HEK | <i>Human Embryonic kidney</i> |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HVA | <i>Homovanilic acid</i> |
| IPTG | Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo |
| kDa | kilo Dalton |
| Ko | <i>Knockout</i> |
| LB | Meio Luria-Bertani |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MEF | <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> |
| NAC | N-acetilcisteína |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato |
| NBT | Azul de nitrotetrazólio |
| NOX1 | NADPH oxidase 1 |

| | |
|------------------------------|--|
| O ₂ | Oxigênio Molecular |
| O ₂ ^{•-} | Ânion Superóxido |
| PBS | Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate Buffer Solution</i>) |
| PDGF | Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>) |
| PDI | Proteína Dissulfeto Isomerase |
| PEG-Cat | Polietilenoglicol catalase |
| PEG-SOD | Polietilenoglicol superóxido dismutase |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil |
| QSOX | Quiescina/ sulfidril oxidase |
| RNS | Espécies Reativas de Nitrogênio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>) |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| S | Aminoácido Serina |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| siRNA | <i>Small interference RNA</i> |
| SOD | <i>Superoxido dismutase</i> |
| SSH1 | <i>Slingshot1</i> |
| TBST | Tampão salina tamponada com Tris contendo Tween-20 |
| TRX | Tiorredoxina |
| VSMC | Células Musculares Lisas Vasculares (<i>Vascular Smooth Muscle Cells</i>) |
| wt | <i>wild type</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1 ESTRUTURA DOS VASOS..... | 16 |
| 2.2 O REMODELAMENTO VASCULAR..... | 17 |
| 2.3 MIGRAÇÃO..... | 20 |
| 2.4 PROLIFERAÇÃO..... | 22 |
| 2.5 MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO EM VSMC..... | 24 |
| 2.6 REGULAÇÃO REDOX EM MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO EM VSMC..... | 25 |
| 2.6.1 Espécies Reativas de Oxigênio..... | 25 |
| 2.6.2 NADPH oxidases (NOX)..... | 26 |
| 2.6.3 ROS na migração e proliferação de VSMC..... | 29 |
| 2.7 PROTEÍNA QSOX..... | 30 |
| 3 OBJETIVOS..... | 33 |
| 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 33 |
| 4.1 CULTIVO CELULAR..... | 33 |
| 4.1.1 Cultura primária de células musculares lisas vasculares pelo método de explante (adaptado de KIRSCHENLOHR <i>et al.</i> , 1996)..... | 33 |
| 4.1.2 Cultivo Celular de HEK 293T, MASM e MEF..... | 34 |
| 4.1.3 Cultivo Celular de HASM..... | 34 |
| 4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA..... | 34 |
| 4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTES DE CAMUNDONGO SELVAGEM E MUTADA..... | 35 |
| 4.4 SUPEREXPRESSÃO DE QSOX1b EM CÉLULAS HEK 293T..... | 36 |
| 4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SULFIDRIL OXIDASE..... | 37 |
| 4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR..... | 38 |
| 4.6.1 <i>Scratch</i> | 38 |
| 4.6.2 <i>Transwell</i> | 38 |
| 4.7 PROLIFERAÇÃO CELULAR..... | 39 |
| 4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CATALASE EM VSMC..... | 40 |
| 4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM VSMC..... | 40 |

| | | |
|------|--|----|
| 4.10 | PREPARO DE EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES | 41 |
| 4.11 | DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR EM VSMC POR 2',7'-DICLOROFLUORECEINA DIACETATO (DCFH-DA). | 41 |
| 4.12 | REAÇÃO DE WESTERN BLOTTING | 42 |
| 4.13 | QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO SOBRENADANTE DE VSMC TRATADAS COM QSOX1b | 42 |
| 4.14 | DETERMINAÇÃO DE TIÓS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR COM DTNB. | 43 |
| 4.15 | DETECÇÃO DE TIÓIS DE SUPERFÍCIE COM ALEXA MALEIMIDA-488. | 43 |
| 4.16 | siRNAs | 44 |
| 4.17 | TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS COM siRNA | 44 |
| 4.18 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 44 |
| 5 | RESULTADOS | 45 |
| 5.1 | OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES. | 45 |
| 5.2 | EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES | 45 |
| 5.3 | A ATIVIDADE DA PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE INDUZ MIGRAÇÃO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATO. | 48 |
| 5.4 | A PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE INDUZ PROLIFERAÇÃO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATO, INDEPENDENTE DE SUA ATIVIDADE. . | 54 |
| 5.5 | INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ATIVIDADE SULFIDRIL OXIDASE DA QSOX NO AMBIENTE EXTRACELULAR DE VSMC | 56 |
| 5.6 | O PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGENIO INTRACELULAR | 58 |
| 5.7 | O PAPEL DO SUPERÓXIDO E NOX1 | 62 |
| 5.8 | EFEITO DA PROTEÍNA QSOX1b NO REMODELAMENTO DO CITOESQUELETO DE ACTINA. | 68 |
| 5.9 | A AUSÊNCIA DA PROTEÍNA QSOX EM DIFERENTES TIPOS CELULARES DIMINUI MIGRAÇÃO. | 70 |
| 6 | DISCUSSÃO | 72 |
| 7 | CONCLUSÃO | 78 |
| | REFERÊNCIAS | 79 |

1 INTRODUÇÃO

O remodelamento arterial refere-se a alterações estruturais e funcionais da parede dos vasos em resposta a alguma doença, lesão ou envelhecimento (VAN VARIK, *et al.*, 2012). Este mecanismo está intimamente relacionado a vários processos fisiopatológicos que acarretam em alterações hemodinâmicas significativas, morbidade e mortalidade cardiovascular. Entre os mecanismos envolvidos nesse processo de remodelamento estão hiperplasia das camadas arteriais internas, fibrose, alterações de colágeno e elastina, disfunção endotelial e calcificação arterial (OWENS; KUMAR; WAMHOFF, 2004; RENNA; HERAS, N.; MIATELLO, R. M., 2017).

A hiperplasia da camada íntima arterial envolve eventos característicos como a migração e a proliferação de células musculares lisas vasculares (VSMC). Em resposta a estímulos patológicos e reguladores bioquímicos, essas células passam por um processo de modulação fenotípica e sua capacidade contrátil é transformada em proliferativa e migratória (SAN MARTIN; GRIENDLING, 2010).

A proliferação celular é um processo preciso e regulado por uma rede bioquímica complexa que, através de sinais específicos, comanda o ciclo celular garantindo a replicação correta do material genético e a coordenação de processos como diferenciação, senescência e morte (MINGJIAN SHI *et al.*, 2004; SUN *et al.*, 2015). Já a migração celular é manifestada a partir da formação de lamelipódios que de forma geral envolve quatro etapas: saliência da borda principal, adesão ao substrato, retração da parte traseira e aderência (POLLARD; BORISY, 2003). Estudos estruturais, bioquímicos, genéticos e teóricos da biologia de doenças cardiovasculares convergem em compreender os mecanismos moleculares de ativação dos eventos de migração e proliferação de células vasculares (SU *et al.*, 2001; SAN MARTIN; GRIENDLING, 2010; LU *et al.*, 2018).

Embora espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) sejam mais conhecidos por seus papéis no estresse oxidativo através dos quais induzem danos ao DNA e/ou oxidação de lipídios e proteínas, eles funcionam também como reguladores de sinalização celular em condições fisiológicas e vêm sendo associadas aos processos celulares proliferativos e migratórios de células vasculares (GELLERT *et al.*, 2014; HOBBS *et al.*, 2014; MOEN *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2015).

Tiol proteínas são apontadas como proteínas chaves na sinalização redox devido às suas reações de oxi-redução em resíduos de aminoácidos ou cofatores suscetíveis. Isto permite que essas proteínas sejam reguladas de diversas formas, constituindo um importante mecanismo de integração de espécies oxidantes na transdução de sinais celulares, (FOMENKO; GLADYSHEV, 2012; FASS *et al.*, 2014). Algumas proteínas tiol oxidases oxidam tiois protéicos à dissulfetos a custo da redução do oxigênio molecular (O₂) (aceptor de elétrons) e são conhecidas por sua participação no dobramento oxidativo no retículo endoplasmático como a Ero-1 (*endoplasmic reticulum oxidoreductin 1*), a Erv-2 (*essencial for respiration and viability 2*), a PDI (Proteína dissulfeto Isomerase) e a QSOX1 (Quiescina Sufredil Oxidase 1) (DEPUYDT; MESSENS; COLLET, 2011; SEVIER, 2012).

A QSOX1 é uma flavoproteína catalisadora dissulfeto adicional na via secretora do retículo endoplasmático (ILANI, T. *et al.*, 2015). Apesar de sua enzimologia já ser bastante detalhada no lúmen do RE, nas cisternas de Golgi, no meio extracelular e em fluidos secretados (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007; MAIRET-COELLO *et al.*, 2004; SEVIER, 2012), ainda não estão bem esclarecidos os processos biológicos que dependam de um catalisador da formação de dissulfeto *de novo* no Golgi ou no ambiente extracelular (ILANI, T. *et al.*, 2015).

O papel fisiológico da QSOX1 vem sendo apontado em eventos fisiológicos e patológicos, eventualmente com funções antagônicas (LIMOR-WAISBERG; BEN-DOR; FASS, 2013; SEVIER, 2012; KODALI; THORPE, 2010). Por exemplo, alguns estudos indicam que a QSOX regula negativamente a proliferação de diversas linhagens celulares (MUSARD *et al.*, 2001; HELLEBREKERS *et al.*, 2007), mas induz atividade proliferativa através de metaloproteases -2 e -9 (MMP) de matriz extracelular (MEC) (KATCHMAN *et al.*, 2011); foi identificada como biomarcador de malignidade em adenocarcinoma pancreático, possivelmente através da ativação do processo de metástase (ANTWI *et al.*, 2009), entretanto, a presença da proteína QSOX1 também foi relacionada a um bom prognóstico em câncer de mama humano por provável inibição da tumorigênese (PERNODET *et al.*, 2012); já foi demonstrado que a QSOX possui atividade pró-apoptótica, provocando ativação de morte celular em células endoteliais e macrófagos na aterosclerose (DE ANDRADE *et al.*, 2011), mas a proteína QSOX1 também já foi relacionada à proteção contra apoptose induzida por estresse oxidativo (MOREL *et al.*, 2007).

Mecanismos redox vêm sendo apontados como determinantes em processos de proliferação e migração em células vasculares (LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.;

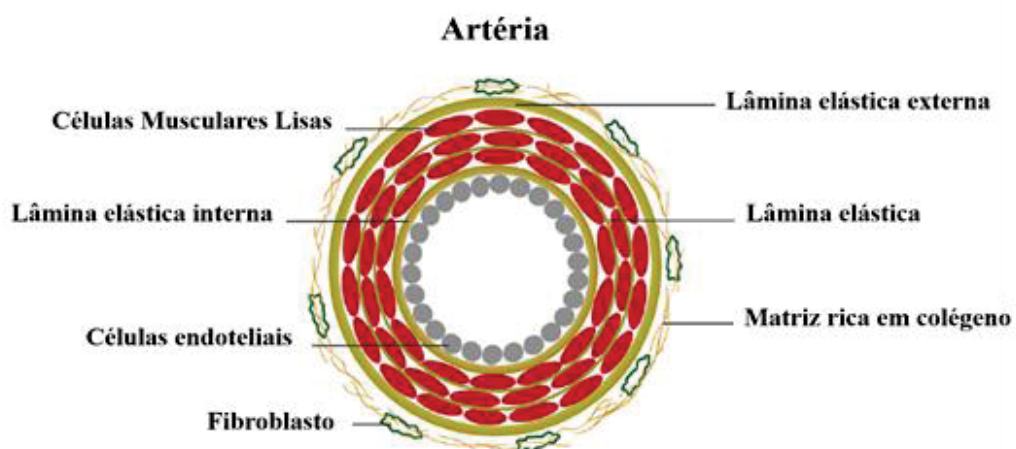
GRIENDLING, K.K.). Desta forma, baseado na atividade catalítica da proteína QSOX1 e em sua localização intra e extracelular (SIMPER *et al.*, 2010) recentemente nosso grupo demonstrou que a proliferação e a migração de células musculares lisas de aorta são dependentes de QSOX1 (BORGES *et al.*, 2015). Como possivelmente a sua atuação no dobramento e redobramento oxidativo de proteínas poderia ser a chave para induzir estes processos, neste trabalho buscamos melhor compreender os aspectos mecânicos dos processos de proliferação e migração induzidos pela QSOX1.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRUTURA DOS VASOS

Os vasos arteriais normais são formados por uma camada íntima, composta de células endoteliais alinhadas e apoiadas em uma fina membrana basal delimitada por uma lâmina elástica interna (FIGURA 1). Ocasionalmente, células musculares lisas também são encontradas nessa camada, mas a maioria delas residem na média, que fica abaixo da lâmina elástica interna, onde se organizam em várias camadas cercadas por uma MEC rica em colágeno e elastina. A camada mais externa da artéria é separada da média por uma lâmina elástica e é composta de tecido conjuntivo frouxo que contém fibroblastos, pequenos vasos e terminações nervosas autônomas (VAN VARIK *et al.*, 2012; MAZUREK *et al.*, 2017).

FIGURA 1 – ESTRUTURA VASCULAR ARTERIAL



FONTE: Adaptado de MAZUREK *et al.*, 2017.

As células endoteliais da camada íntima funcionam como barreiras naturais dos vasos sanguíneos e são consideradas as principais reguladoras da homeostase vascular. São responsáveis por prevenir a adesão e a invasão de plaquetas, leucócitos e moléculas no interior dos vasos arteriais. Além disso, sob condições normais, proporcionam o equilíbrio fisiológico entre a vasodilatação e a vasoconstrição, fazem regulação de processos inflamatórios através da secreção de óxido nítrico (NO), controlam processos de trombose e inibem ou estimulam os processos de migração e proliferação de células musculares (VAN VARIK *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015; MAZUREK *et al.*, 2017).

As VSMC da camada média regulam o tônus vascular através da dinâmica de contração e relaxamento, conseqüentemente são responsáveis pelo fluxo sanguíneo. A diferenciação completa ou maturação das VSMC na camada média podem expressar um repertório único de proteínas contráteis, como a cadeia pesada de miosina de músculo liso, ou α -actina de músculo liso, canais iônicos e moléculas sinalizadoras que são requeridas para sua função contrátil (MAZUREK *et al.*, 2017). Durante a formação de novos vasos, VSMC também produzem elevados níveis de moléculas extracelulares, incluindo colágeno, elastina, proteoglicanos, caderinas e integrinas que consistem a maior porção da massa dos vasos sanguíneos (BROWN *et al.*, 2007). Além disso, outros componentes do meio de fibras colágenas exercem importante papel na conexão e suporte dos vasos sanguíneos (VAN VARIK *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015; MAZUREK *et al.*, 2017).

A adventícia consiste de uma camada rica em MEC, em fibras colágenas e proteoglicanas sintetizadas pelos fibroblastos. Esta camada abriga nervos, capilares linfáticos e pequenos vasos sanguíneos que desempenham função de nutrição. São diversas as células que ocupam esta região dos vasos, incluindo macrófagos, linfócitos, mastócitos, células dendríticas, células-tronco progenitoras e fibroblastos, este último compreendendo a maior proporção de células (MAZUREK *et al.*, 2017).

2.2 O REMODELAMENTO VASCULAR

A parede vascular pode mudar sua estrutura para manter o tamanho do lúmen a fim de controlar o fluxo sanguíneo normal, processo este denominado de remodelamento vascular (VAN VARIK *et al.*, 2012). Essa capacidade das artérias de adaptar sua estrutura em resposta a

condições fisiológicas é essencial em situações como gravidez ou envelhecimento, mas também em muitas doenças arteriais como hipertensão, aterosclerose ou restenose (REDONDO *et al.*, 2016). De forma geral, o remodelamento vascular é um episódio ativo e envolve mudanças em muitos eventos celulares, incluindo crescimento celular, morte, migração, organização do citoesqueleto, bem como a síntese ou degradação da MEC. Pode ser induzido por interações dinâmicas entre fatores de crescimento local, citocinas inflamatórias, substâncias vasoativas e estímulos hemodinâmicos, sendo todos importantes mediadores no processo de adaptação vascular (VAN VARIK *et al.*, 2012; REDONDO *et al.*, 2016).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação de ateromas, que consistem de placas compostas de lipídios e células inflamatórias acumuladas nas paredes dos vasos sanguíneos. Estas placas causam o estreitamento do lúmen, processo chamado de estenose, afetando o fluxo sanguíneo e podendo provocar interrupção total do mesmo (SCHWARTZ *et al.*, 1991). Este processo pode levar a complicações como infarto do miocárdio e derrames, sendo fatal em muitos casos (NOFER; BRODDE; KEHREL, 2010).

A disfunção endotelial é o ponto primário e crucial para o desenvolvimento da aterosclerose. Os danos ao endotélio desequilibram os processos de vasoconstrição e vasodilatação, situação que pode iniciar uma série de mudanças patofisiológicas como aumento da permeabilidade vascular à lipoproteínas, adesão leucocitária, agregação de plaquetas e liberação de citocinas (RENNA; HERAS, N.; MIATELLO, R. M., 2017). Várias citocinas inflamatórias como fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e IL-6, induzem o endotélio a expressar moléculas de adesão celular (VCAM), moléculas de adesão intercelular (ICAM), proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) e outras quimiocinas, consequentemente promovendo a adesão e migração de monócitos (REDONDO *et al.*, 2016; RENNA; HERAS, N.; MIATELLO, R. M., 2017). Na íntima, os monócitos aumentam a expressão de receptores e internalizam lipoproteínas modificadas formando células espumosas, fato que é considerado como uma lesão aterosclerótica inicial (RENNA; HERAS, N.; MIATELLO, R. M., 2017).

VSMC são consideradas ponto-chave na estenose luminal depois de danos na túnica íntima e na lâmina elástica interna. Quando uma grande quantidade dessas células migra para a íntima, sua proliferação excessiva e supressão da apoptose promovem síntese de MEC e deposição lipídica, consequentemente facilitando fibrose e espessamento da parede arterial e

estenose luminal (MAZUREK *et al.*, 2017). A desobstrução do vaso pode ser realizada com a técnica da angioplastia por cateter balão, na qual um cateter é introduzido no lúmen do vaso aterosclerótico e insuflado, comprimindo o ateroma e restabelecendo o fluxo sanguíneo (GRÜNTZIG; SCHNEIDER, 1977). Entretanto, este procedimento pode levar a um novo processo patológico, a restenose, que consiste na reobstrução do vaso sanguíneo através da formação da neoíntima e um atraso na fase de remodelamento constritivo no local da desobstrução (GRÜNTZIG; SCHNEIDER, 1977; CARAMORI; YAMAMOTO; ZAGO, 1997).

A formação da neoíntima após processo de desobstrução é delicada, pois ocorre a remoção da camada endotelial que é uma importante estrutura de barreira e regulação do fluxo sanguíneo. A desnudação endotelial e a ruptura da túnica média resultam na exposição da matriz subendotelial a células sanguíneas circulantes. Esta matriz contém inúmeros fatores ativadores de plaquetas e colágeno, incluindo trombina e tromboxano. A exposição de camadas mais profundas leva à formação de trombos que contêm fatores quimiotáticos e mitogênicos, podendo funcionar como matriz para a migração e proliferação de VSMC (ZHANG *et al.*, 2015). A liberação de citocinas, fatores de crescimento e a ativação de macrófagos culminam na modulação fenotípica de células musculares lisas e subsequente migração e proliferação para produzir uma neoíntima. Além disso, outros tipos celulares são acumulados junto com a síntese excessiva de matriz, incluindo células progenitoras circulantes e miofibroblastos originários da adventícia (ASHINO *et al.*, 2013, SCHROEDER *et al.*, 2007; SAN MARTIN *et al.*, 2008; PESCATORE *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2015).

Um dos eventos mais relevantes no remodelamento vascular é a de-diferenciação de VSMC em um fenótipo que apresenta um aumento de duas a três vezes na capacidade proliferativa e migratória, quando comparadas a células das lesões ateroscleróticas primárias (FERNS; AVADES, 2000; LEITE *et al.*, 2004), em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares. Este processo é considerado bastante ativo e envolve vários eventos incluindo crescimento, morte, organização do citoesqueleto e síntese ou degradação de MEC. (MUTO *et al.*, 2007).

2.3 MIGRAÇÃO

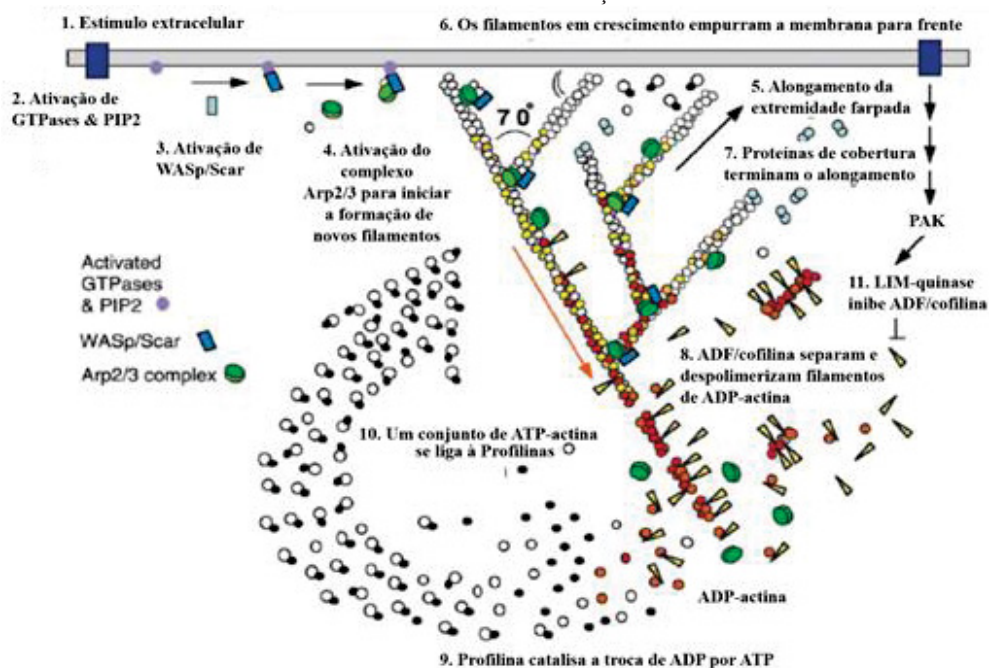
O processo de migração celular é um processo que requer sinalização especializada e domínios específicos para que a célula consiga sentir uma alteração em seu gradiente de quimiotaxia e na sua polaridade (POLLARD; BORISY, 2003). Inicialmente, receptores localizados na membrana ativam cascatas intracelulares que são estendidas na direção do movimento na forma de *lamellipodia*. Novos complexos focais são estabelecidos na porção anterior da célula sob a protusão, através da reestruturação do citoesqueleto de actina. Em seguida, o corpo celular contrai induzido pela fosforilação da miosina II e se move para frente. Subsequentemente, adesões focais da parte de trás da célula são destacadas e a borda retrai. Finalmente, receptores de adesão são reciclados por endocitose e transporte vesicular. Estes eventos individuais são direcionados por ativação de sinais específicos nos compartimentos celulares relevantes. Portanto, existem domínios sinalizadores característicos que distinguem as partes posterior e anterior da célula. Nessa perspectiva, uma migração bem-sucedida é dependente de muitas moléculas, cuja ativação e ações seguintes são cuidadosamente cronometradas em compartimentos subcelulares pertinentes. Estudos estruturais, bioquímicos, genéticos e teóricos convergem para o mecanismo molecular de protusão de lamelas e como as células podem responder a sinais externos (POLLARD; BORISY, 2003; INSALL; MACHESKY, 2009).

A actina é, em massa, o componente estrutural dominante nos *lamellipodia*, sendo a proteína mais abundante na maioria das células eucarióticas (INSALL; MACHESKY, 2009). São encontradas na forma de monômeros (actina G – globular) ou filamentos (actina F), que são polímeros helicoidais duplos compostos pelas subunidades globulares sobrepostas de maneira a formar polaridade molecular. Tal polaridade é a chave para o mecanismo de montagem de actina nas células, uma vez que o crescimento dos filamentos é orientado para a superfície (INSALL; MACHESKY, 2009; WILLIAMS *et al.*, 2012).

A organização e o comportamento dos filamentos de actina no interior das células são determinados por uma variedade de proteínas ligadoras de actina que afetam a polimerização e despolimerização dos filamentos (FIGURA 2), bem como suas propriedades físicas e interações com organelas celulares ou entre si mesmas (WILLIAMS *et al.*, 2012). Tais proteínas são divididas em categorias conforme sua “função”: (1) proteínas nucleadoras, como o complexo

Arp2/3 (*actin-related protein 2/3 complex*), que funcionam como um “molde” para a actina G iniciar a formação de um filamento; (2) proteínas sequestradoras de monômeros, as chamadas de timosinas, que se ligam aos monômeros de actina e evitam sua polimerização; (3) proteínas bloqueadoras de terminação (capas), que regulam o comprimento dos filamentos de actina ao se ligarem nas suas terminações formando uma capa. Esta regulação também pode ocorrer através da despolimerização na terminação oposta à capa, resultando na desestruturação do filamento; (4) proteínas polimerizadoras de monômeros, as profilinas, que se ligam aos monômeros actina-ATP e os adicionam na extremidade farpada durante a formação do filamento, através da remoção da capa; (5) proteínas despolimerizadoras do filamento de actina, as cofilinas e (*actin depolymerizing factors*), que ativam acentuadamente a despolimerização dos filamentos em monômeros e a reorganização do citoesqueleto de actina; (6) proteínas de ligação transversal ou empacotadoras, que através de dois ou mais ligantes de actina fazem a interconexão dos filamentos formando uma rede; (7) proteínas fragmentadoras de filamentos: ligam-se a um lado do filamento existente e o quebra em dois; (8) proteínas ligantes de membrana: proteínas periféricas que fazem o ancoramento dos filamentos de actina durante a formação de uma projeção externa ou invaginações (POLLARD; BORISY, 2003; LODISH *et al.*, 2014).

FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS FILAMENTOS DE ACTINA E DAS PROTEÍNAS REGULADORAS NA FORMAÇÃO DO *LAMELLIPODIUM*.



FONTE: Adaptado de POLLARD; BORISY, 2003.

A dinâmica da organização e do comportamento dos filamentos de actina no interior das células são determinados basicamente pela hidrólise de ATP da actina polimerizada, que provoca a quebra dos monômeros dos filamentos através da dissociação do γ -fosfato, funcionando como um temporizador interno. Reações de separação são desencadeadas através das ADF/cofilinas que, por sua vez, se ligam às subunidades de actina-ADP próximo às extremidades do filamento. Profilina catalisa a troca de ADP para ATP e retorna as subunidades para o pool de ATP-actina-profilina, deixando-as prontas para um novo ciclo de montagem (POLLARD; BORISY, 2003; CAMPELLONE; WELCH, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2012). Em adição ao seu papel na reciclagem de subunidades de actina, as ADF/cofilinas também podem ajudar a iniciar saliências, cortando os filamentos para expor a terminação farpada para alongamento (POLLARD; BORISY, 2003; CAMPELLONE; WELCH, 2010; LODISH *et al.*, 2014).

Estímulos extracelulares tais como quimioatraentes desencadeiam vias de transdução que geram moléculas restritas de sinalização associadas à membrana plasmática. Individualmente e cooperativamente, estas moléculas ativam fatores promotores de nucleação, os complexos Wasp/WAVE, que são recrutados para a membrana e ativados pela ação de Ras, família das Rho GTPases, Rac, PIP2 e CDC 42 (*cell division control protein 42*) em resposta a vários caminhos sinalizadores (CAMPELLONE; WELCH, 2010). Estas pequenas GTPases são os sinais chave integradores e mediadores que controlam e coordenam as dinâmicas do movimento celular.

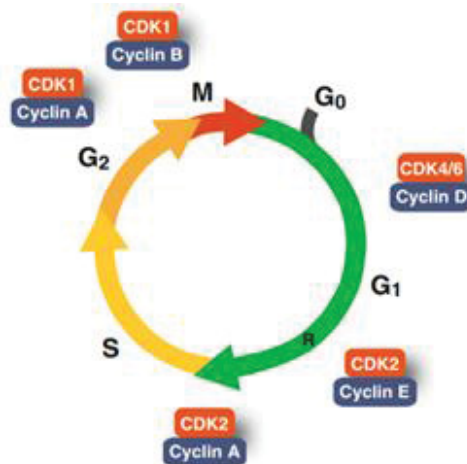
2.4 PROLIFERAÇÃO

O ciclo celular é dividido basicamente em duas etapas: a interfase e a fase mitótica (fase M), que consistem na duplicação do material genético e na divisão celular, respectivamente. Este ciclo é a maneira pela qual os organismos se reproduzem, substituem células danificadas, funcionalmente deficientes ou que são perdidas por morte celular programada. As fases do ciclo celular são bastante distintas e envolvem uma série de eventos nucleares e citoplasmáticos estreitamente coordenados: a interfase, que é dividida nas etapas G1 (quando a célula aumenta seu tamanho e ativa a replicação do DNA), a S (período de Síntese de DNA) e a G2 (período no qual a célula continua a crescer e a mitose é ativada) (FIGURA 3). Na fase M, ocorre os fenômenos consecutivos de mitose e citocinese, ou seja, a célula para de crescer e é dividida em duas células-filhas. Após a divisão celular, cada célula-filha volta para a interfase e é preparada

para duas situações: outra divisão celular ou um estado de não-proliferação (G₀). O controle dessas fases ocorre em pontos estratégicos através de proteínas ciclinas e proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdk), sem que uma fase seja acionada antes da anterior terminar (ALBERTS, 2015).

Diferentes fatores de crescimento ativam as células durante a interfase, provocando aumento da massa celular e da síntese de macromoléculas. Esta dinâmica ocorre através da ativação de vias de sinalização das MAPK (*mitogen activated protein kinase*) / Ras / Raf / ERK, que por sua vez induzem a síntese de ciclinas e outras proteínas reguladoras (Myc e Jun) (FUKAI *et al.*, 1998; GOMEZ *et al.*, 2014).

FIGURA 3 - O CICLO CELULAR E OS COMPLEXOS CDK-CICLINAS.



FONTE: POON, 2016.

A via das MAPK é considerada a mais importante via de sinalização que regula a proliferação celular, apesar de também participar da regulação da diferenciação celular e morte. A coordenação dessa via contém uma sequência de proteínas quinases que fosforilam consecutivamente resíduos de serinas e treoninas de proteínas, alterando suas funções e suas expressões gênicas. Esta cascata de sinalização envolve 3 famílias de proteínas que transmitem e respondem a diferentes sinais extracelulares: ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), JNK (c-Jun N-terminal kinases) e p38 MAPK. Cada cascata ou subfamília responde a diferentes fatores de crescimento, fatores de diferenciação, sinais extracelulares de estresse e citocinas inflamatórias, o que implica em um sistema de centenas de proteínas que regulam diferentes

funções fisiológicas celulares, agindo como fatores de transcrição ou ativando enzimas nucleares e citoplasmáticas (FUKAI *et al.*, 1998; GOMEZ *et al.*, 2014; SUN *et al.*, 2015).

2.5 MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO EM VSMC

Entre os estímulos que desencadeiam a modulação fenotípica nas VSMC estão lesão, força mecânica, estresse oxidativo, moléculas intra e extracelulares e interações célula-célula e célula-matriz (VALDIVIA *et al.*, 2016). Além disso, estão envolvidos nesse processo a diminuição da expressão de proteínas específicas do músculo liso, a variação na expressão de genes que codificam moléculas de sinalização celular, fatores de transcrição e síntese de proteínas da MEC. Durante os últimos anos, vários estudos vêm tentando explicar os mecanismos moleculares da modulação fenotípica VSMC em muitas perspectivas diferentes, os quais apontam para microRNAs, citocinas e fatores bioquímicos, receptores de membrana, canais iônicos, citoesqueleto e MEC (ZHANG *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos precisos dessa troca fenotípica não serem completamente compreendidos, vários estímulos diferentes têm sido identificados, alguns estão na TABELA 1.

TABELA 1: ESTÍMULOS DA MODULAÇÃO FENOTÍPICA EM VSMC.

| |
|--|
| Inflamação |
| Estresse Oxidativo |
| Estresse hemodinamico |
| Estresse mecânico |
| Produtos Finais de Glicação Avançada (AGEs) |
| Aumento de produtos de fosfato de calcio |
| HORMONAL SISTÊMICO |
| Angiotensina II (Ang II) |
| Aldosterona |
| ESTIMULO PARÁCRINO |
| Fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) |
| Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGF) |
| Fator de Crescimento Endotelial (EGF) |
| Fator de Crescimento derivado de Plaquetas (PDGF) |
| Metaloproteinases de Matriz (MMP) |

FONTE: Adaptado de VAN VARIK *et al.*, 2012.

2.6 REGULAÇÃO REDOX EM MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO EM VSMC

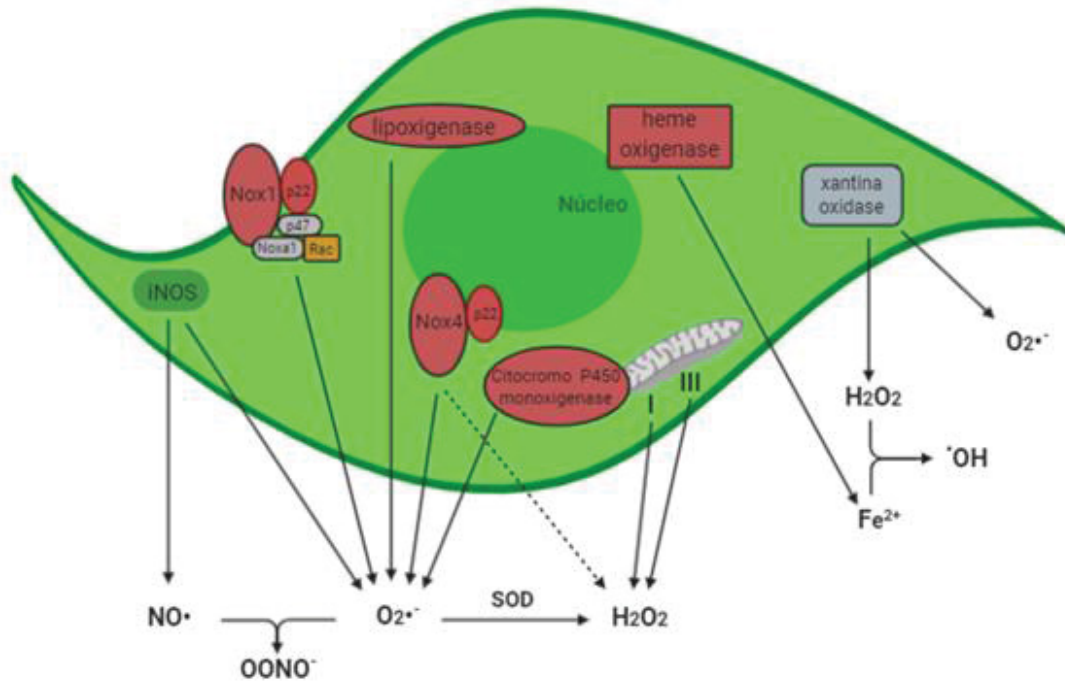
Para manter a homeostase funcional dentro das células, existe um sistema de detecção e resposta ao estado redox celular (MOEN *et al.*, 2014). Espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) são conhecidas por causarem modificações covalentes em lipídios, proteínas e no DNA. Muitas condições fisiológicas e patológicas estão associadas com o acúmulo de espécies reativas, que por sua vez envolvem um sistema elaborado de combate formado por enzimas antioxidantes e pequenas moléculas (MOEN *et al.*, 2014). Os alvos mais sensíveis e seletivos da sinalização redox são os aminoácidos que contêm enxofre (a metionina e a cisteína), fato este que direciona oxidantes celulares como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio e o peroxinitrito ($ONOO^-$) apresentarem-se envolvidos na atividade de tiol proteínas (GELLERT *et al.*, 2014; HOBBS *et al.*, 2014; MOEN *et al.*, 2014).

Estudos vêm associando a regulação de processos migratórios e proliferativos celulares com moléculas oxidantes, estabelecendo a produção de ROS como importantes mensageiros extra e intracelulares de moléculas sinalizadoras *downstream*, incluindo quinases, fosfatases, fatores de transcrição e proteínas do citoesqueleto (VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). Desta forma, a regulação redox de proteínas envolvidas em eventos de proliferação, hipertrofia e migração em VSMC está sendo evidenciada no remodelamento vascular do processo de restenose pós-angioplastia (GARCÍA-REDONDO *et al.*, 2016; TANAKA *et al.*, 2016).

2.6.1 Espécies Reativas de Oxigênio

O ânion superóxido é o membro mais clássico da classe de ROS, sendo produzido principalmente na mitocôndria pela cadeia transportadora de elétrons durante o metabolismo celular. Além disso, VSMC contêm outras origens de ROS, incluindo xantina oxidase, lipoxigenases, óxido nítrico sintases e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases (NOXs) (FIGURA 4). Em condições fisiológicas, alguns $O_2^{\bullet-}$ são convertidos para H_2O_2 espontaneamente ou catalisados por distintas superóxido dismutases (SOD), alternativamente, podem também ser convertidos para radicais hidroxilas ($\bullet OH$) (LENNICKE *et al.*, 2015), através da reação de Haber-Weiss.

FIGURA 4 - ORIGENS DE ROS EM VSMC



FONTE: Adaptado de SAN MARTIN, GRIENDLING, 2010.

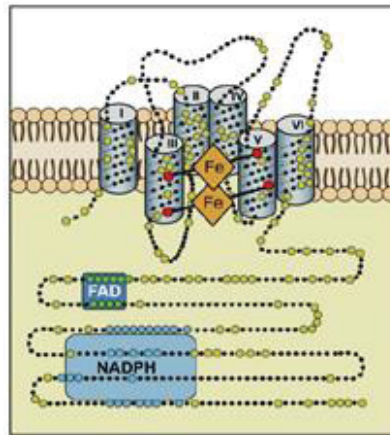
O H_2O_2 é menos reativo e está envolvido em muitos processos fisiológicos como transdução de sinal na hipóxia, diferenciação e proliferação celular, mas também exerce um importante papel na mediação de respostas imunes (CAI, 2005). Entretanto, seus efeitos dependem do contexto celular, como por exemplo, seu local de produção, sua concentração ou o tempo de exposição (CAI, 2005; CAO *et al.*, 2016). Assim, H_2O_2 não é mais considerado como um subproduto indesejado e bastante tóxico, mas um importante mediador no controle de processos celulares vitais.

2.6.2 NADPH oxidases (NOX)

As NOX são consideradas a maior origem de ROS no sistema cardiovascular. Foram inicialmente descritas como complexos enzimáticos em neutrófilos e são caracterizadas por serem proteínas transmembranas que transportam elétrons através de membranas biológicas para reduzir oxigênio molecular para superóxido (TSAI *et al.*, 2016). De acordo com sua função preservada, existem propriedades estruturais conservadas em todos os membros da família NOX.

A partir do COOH terminal, incluem: (1) um sítio de ligação a NADPH; (2) uma região ligante de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); (3) seis domínios transmembrana conservados; (4) quatro histidinas ligantes do grupo heme, altamente conservadas nos domínios transmembrana (FIGURA 5).

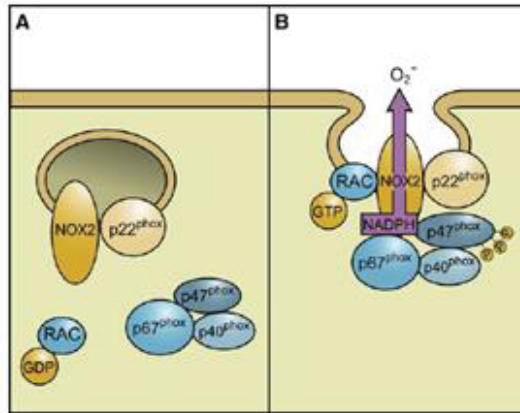
FIGURA 5 - ESTRUTURA GERAL DAS NADPH OXIDASES.



FONTE: BEDARD *et al.*, 2007. Os membros da família NOX compartilham seis domínios transmembrana altamente conservados. Os domínios transmembranares III e V contém duas histidinas cada um, abrangendo dois grupos hemes. O terminal COOH citoplasmático contém FAD e domínios de ligação NADPH.

Sete isoformas tem sido descritas que basicamente contem duas subunidades organizadoras (p47^{phox}, NOXO1), duas subunidades ativadoras (p67^{phox}, NOXA1) e dois fatores de maturação (DUOXA1 e DUOXA2) (BEDARD *et al.*, 2007). Algumas isoformas possuem subunidades moduladoras (p40^{phox}, p22^{phox}). Utilizando o exemplo de NOX2, a ativação ocorre através de uma série de interações proteína-proteína. NOX2 se associa à p22^{phox} para adquirir estabilidade, concomitantemente fatores citosólicos se translocam para o complexo NOX2/p22^{phox} na membrana. p47^{phox} é fosforilada e interage com p22^{phox}, que facilita a translocação da subunidade ativadora p67^{phox} pra junto do complexo. Finalmente, a pequena Rac GTPase interage diretamente com NOX2 e em seguida com p67^{phox} (FIGURA 6).

FIGURA 6 - FORMAÇÃO DO COMPLEXO NADPH OXIDASE (NOX2) EM FAGÓCITOS.



FONTE: BEDARD, *et al.*, 2007.

As NOX conectam o doador de elétron NADPH do lado citosólico ao receptor de elétron oxigênio do outro lado da membrana. No primeiro ponto, os elétrons são transferidos do NADPH para o FAD, processo este regulado pela ativação de p67^{phox}. Em seguida, um elétron de cada vez é transferido para os grupos heme e destes para o oxigênio (BEDARD *et al.*, 2007).

No sistema cardiovascular as isoformas das NOX são expressas em células endoteliais, musculares lisas, macrófagos, fibroblastos da adventícia, miócitos, bem como adipócitos e células tronco (VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). VSMCs de grandes artérias expressam Nox1 e Nox4 e outros vasos mais resistentes expressam NOX2. Em todas as células vasculares, essas oxidases são enzimas de baixa atividade cuja capacidade é um terço da dos neutrófilos, por isso são consideradas peças-chave em processos de sinalização. Dependendo dos compartimentos celulares em que se localizam, regulam diversas funções como proliferação, migração, diferenciação, apoptose, senescência e respostas inflamatórias (VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). *In vivo*, a expressão protéica das subunidades da NADPH oxidase são superreguladas em aortas de animais hipertensos durante a restenose e, em modelos experimentais, sugerem uma associação entre essas oxidases e eventos mediados por ROS (LASSEGUE; SAN MARTIN; GRIENGLING, 2012).

Em VSMC, o papel modulador de ROS derivados de NADPH oxidases, em vias redox sinalizadoras, tem sido verificado através de modificações provocadas na atividade de Rho GTPases e proteínas tirosina quinases como Src, Ras, JAK2, Pyk2 and PI3K, bem como MAPK, particularmente p38 MAPK, ERK1/2 e ERK5 (SAN MARTÍN; GRIENGLING, 2010).

2.6.3 ROS na migração e proliferação de VSMC

O movimento direcionado e organizado da célula é baseado em uma regulação local e temporal do citoesqueleto de actina. Espécies reativas de oxigênio podem influenciar a dinâmica da actina direta e indiretamente através de alterações provocadas durante fases específicas da migração. A actina, como a maior parte das proteínas, é suscetível a modificações pós-traducionais como acetilação, fosforilação, metilação e modificações tiol-redox (GELLERT *et al.*, 2014; HOBBS *et al.*, 2014). Além disso, ROS também podem interferir na atividade das proteínas reguladoras das fibras de f-actina durante a formação de *lamellipodium* na membrana celular (GELLERT *et al.*, 2014; HOBBS *et al.*, 2014). Por exemplo a proteína Rac, cuja ativação por receptores já foi relacionada a estimular a polimerização de actina pela produção de ROS mediada via NADPH oxidases (CAMPELLONE; WELCH, 2010). Outro exemplo é a cofilina, uma proteína despolimerizadora dos filamentos de actina, cuja regulação é influenciada pela oxidação do sítio de fosforilação da via das fosfatases (OHASHI, 2015).

A produção de ROS extracelular também pode aumentar sinais migratórios, embora os mecanismos ainda necessitem ser melhor elucidados. Sítios de adesão focal, integrinas e junções celulares podem atuar como sensores da sinalização redox, pois têm sido reportados por ativar vias de transdução de sinal sensíveis a ROS (LARAGIONE *et al.*, 2003; BAGULHO *et al.*, 2015). Além disso, tióis de superfície também são apontados para exercer um papel como sensores redox e participar na sinalização através da formação de dissulfetos no ambiente extracelular e transmitir informação para o espaço intracelular (LARAGIONE *et al.*, 2003; REZENDE *et al.*, 2012).

A sinalização envolvendo integrinas, na adesão celular, pode ser mediada por ROS que, em diferentes tipos celulares, são demonstradas ativando pequenas Rho-GTPases. As origens de ROS ativando integrinas incluem mitocôndria, lipoxigenase e NADPH oxidase (HAN *et al.*, 2009; SAN MARTÍN; GRIENGLING, 2010; VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). Já foi demonstrado também que a adesão das integrinas na MEC é aumentada na presença de H₂O₂, bem como pelo peroxinitrito (SAN MARTÍN; GRIENGLING, 2010; SIMPER *et al.*, 2010). Assim, ROS não regula somente os mecanismos de migração celular, mas também a expressão e atividade de enzimas necessárias para criar um caminho para a migração celular.

A migração de VSMC é influenciada por muitos fatores, mas *in vivo*, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é o maior estímulo pró-migratório, através do receptor β -PDGF (ASHINO *et al.*, 2013, SCHROEDER *et al.*, 2007; PESCATORE *et al.*, 2012). O PDGF também descrito em processos de proliferação durante o espessamento intimal na restenose (WEBER *et al.*, 2004).

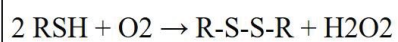
A ativação do receptor PDFGR-B ocorre através de auto-fosforilação em resposta a um agonista, facilitando a interação do receptor com múltiplas moléculas tradutoras de sinais. Este processo envolve importantes enzimas sinalizadoras, incluindo p44/42 (MAPK), ERK1/2, p38 MAPK e Akt (ASHINO *et al.*, 2013). Além disso, PDGF ativa a pequena GTPase Rac1, que é importante para a ativação da NADPH oxidase, a maior fonte de ROS em VSMC. O envolvimento de espécies reativas de oxigênio na motilidade celular induzida por fatores de crescimento, como o PDGF, vem sendo descrito em vários trabalhos (WEBER *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2007; PESCATORE *et al.*, 2012).

Têm sido demonstrado o importante papel das ROS em respostas proliferativas vasculares (LU *et al.*, 2018). Um potencial alvo de ROS pode ser a família das MAPK, que consistem de serina/treonina quinases que traduzem sinais da membrana para o núcleo em resposta a fatores de crescimento clássicos e receptores de superfície acoplados à proteína G (OWENS *et al.* 2004). Em mamíferos, são divididas em: (1) quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK 1/2, também chamadas de p42/44MAPK); (2) c-Jun N-terminal quinases (JNKs); (3) p38MAPK; e (4) a grande MAPK1 (ERK5) (SUN *et al.*, 2015).

2.7 PROTEÍNA QSOX

As QSOX são tiol oxidases dependentes de FAD que, através de uma série de reações de troca tiol-dissulfeto, catalisam a oxidação de di(tióis) à dissulfeto, com a redução concomitante de oxigênio molecular à peróxido de hidrogênio (REAÇÃO 1).

REAÇÃO 1: OXIDAÇÃO DE GRUPOS SULFIDRILA A DISSULFETOS COM A REDUÇÃO DO OXIGÊNIO MOLECULAR A PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂).

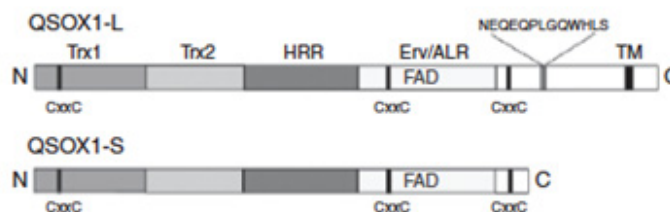


FONTE: KODALI; THORPE, 2010.

Estruturalmente, a proteína QSOX é composta por dois domínios tiorredoxina (TRX1/TRX2) na porção N-terminal, seguidos por um domínio espaçador característico de QSOX (helix-rich region - HRR) e por um domínio Erv/Alr (“Essential for respiration and vegetative growth” / “*augmenter of liver regeneration*”) na porção C-terminal, sendo este último o que contém o sítio de ligação a FAD. Além disso, a proteína QSOX possui três motivos CxxC presentes nos domínios TRX1 e Erv/Alr e estão diretamente ligados à atividade sulfidril oxidase da proteína QSOX (FIGURA 7). A transferência de elétrons ocorre do substrato reduzido para o domínio CxxC – TRX1 e deste, para o CxxC – Erv/Alr, passando em seguida para o FAD a fim de liberar o O₂ (KODALI; THORPE, 2010).

Em mamíferos são descritas duas formas para enzimas QSOX devido ao processamento alternativo do transcrito: QSOX1 com isoforma longa (QSOX1a), contendo 12 éxons e um domínio transmembrana na região C-terminal; e com isoforma curta (QSOX1b), contendo 11 éxons sem o domínio transmembrana (FIGURA 7). Ainda é descrita em neuroblastoma a proteína QSOX2 (gene *QSOXN*), a qual possui alta homologia com os membros da família QSOX1 e é predominantemente localizada próxima as membranas plasmática e nuclear (COPPOCK; THORPE, 2006; RADOM *et al.*, 2006).

FIGURA 7 - ISOFORMAS DA QSOX1.



FONTE: COPPOCK & THORPE (2006) e RADOM, *et al.*, (2006). O gene da proteína QSOX1 produz duas isoformas através de splicing alternativo: QSOX1A (isoforma longa, 74 kDa) e a QSOX1b (isoforma curta, 65kDa, sem o domínio transmembrana – TM).

Exceto em fungos e leveduras, a QSOX1 parece ser expressa em todos outros organismos, como *C. elegans* (COPPOCK *et al.*, 1998), insetos (MAGALHÃES *et al.*, 2008), mamíferos, aves, *T. brucei* (THORPE; COPPOCK, 2007) e *A. thaliana* (LIMOR-WAISBERG *et al.*, 2012; SEVIER, 2012). A expressão de QSOX1 já foi demonstrada em diversos ambientes, como trato reprodutor masculino (OSTROWSKI; KESTLER, 1980; BENAYOUN *et al.*, 2001), 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), encéfalo (MAIRET-COELLO *et al.*, 2004; 2005), epiderme (MATSUBA *et al.*, 2002), glândula sebácea, placenta (THORPE; COPPOCK, 2007) e leite bovino (JAJE *et al.*, 2007). A presença da QSOX1 foi também demonstrada em células tumorais de próstata (OUYANG *et al.*, 2005), mama (PERNODET *et al.*, 2012; KATCHMAN *et al.*, 2013; SOLOVIEV *et al.*, 2013), pâncreas (ANTWI *et al.*, 2009; KATCHMAN *et al.*, 2011) e neuroblastoma (ARAÚJO *et al.*, 2014). Nosso grupo demonstrou que a QSOX1 está presente em tecidos fetais, como soro (ZANATA *et al.*, 2005) e nos tecidos derivados dos folhetos mesodérmico e ectodérmico (PORTES *et al.*, 2008). Acredita-se que a isoforma predominante nestes ambientes seja a QSOX1b (RADOM *et al.*, 2006).

A isoforma QSOX1a, por apresentar um domínio transmembrânico, localiza-se no complexo de Golgi e aparentemente, participa do dobramento oxidativo intracelular de proteínas com destino extracelular (CHAKRAVARTHI *et al.*, 2007). Contudo, também pode sofrer um processamento proteolítico e ser secretada da célula (RUDOLF *et al.*, 2013). Por outro lado, a QSOX1b apresenta-se em Golgi, mas predominantemente no meio extracelular, como demonstrado no líquido seminal de rato (BENAYOUN *et al.*, 2001) e pela presença (ZANATA *et al.*, 2005) e atividade (ISRAEL *et al.*, 2014) em soro de mamífero. A localização extracelular da QSOX1 evidencia que a enzima atua sobre substratos da matriz propriamente dita ou de proteínas da superfície celular, que apresentam tióis suscetíveis à oxidação, agindo como regulador do estado redox das mesmas. De fato, estudos mostraram que QSOX1 extracelular é importante para estruturar os trímeros de laminina, atuando no remodelamento da MEC e no processo de adesão celular, como demonstrado em culturas de fibroblastos (ILANI *et al.*, 2013).

Considerando que a QSOX 1 já foi determinada no sobrenadante de células musculares lisas de aorta e em células progenitoras de músculo liso (SIMPER *et al.*, 2010), nosso grupo demonstrou recentemente que a proliferação e a migração de células musculares lisas de aorta são dependentes de QSOX1 (BORGES *et al.*, 2015). Assim, a importância deste estudo foi ampliar estes resultados a fim de esclarecer a importância biológica efetiva da proteína QSOX1 ao investigar as vias redox-sensíveis envolvidas nos processos de migração de proliferação celular de VSMC.

3 OBJETIVOS

Avaliar os mecanismos moleculares envolvidos na migração e proliferação de VSMC induzidos pela QSOX1 exógena recombinante, e avaliar o papel da QSOX1 na migração induzida por PDGF.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1-Confirmar que QSOX1 exógena recombinante induz migração e proliferação de VSMC;
- 2-Avaliar o envolvimento de ROS e NOX1 nos efeitos pró-migratórios e pró-proliferativos da QSOX1 exógena recombinante;
- 3-Avaliar o papel da QSOX1 endógena na migração basal de VSMC e induzida por PDGF.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

4.1.1 Cultura primária de células musculares lisas vasculares pelo método de explante (adaptado de KIRSCHENLOHR *et al.*, 1996)

VSMC foram obtidas a partir de ratos Wistar, machos com 180-220g. A aorta foi coletada e transferida para um tubo contendo Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7.4 e antibiótico gentamicina 50 µg/µL (Schering-Plough). Após a remoção da camada adventícia, a artéria foi cortada longitudinalmente e as células endoteliais removidas mecanicamente. Fragmentos de 1 mm² foram inseridos em placas de 24 poços (Corning, Ref. 353047) e cobertos com 0,05 mL de meio DMEM alta glicose (Life Technologies) contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies) e gentamicina 50 µg/µL. Após 6 horas, aproximadamente, foi acrescentado 0,2 mL de meio completo, cuja troca foi realizada a cada 3 dias até à migração das células do fragmento para a placa. Quando uma alta confluência foi atingida ao redor dos explantes (cerca de 4 dias), as células foram coletadas com tripsina (Instituto Adolfo Lutz) e colocadas em subcultura, sendo utilizadas nos ensaios até a passagem 7. Na maioria dos ensaios, culturas entre 70 – 80%

confluentes foram mantidas em meio contendo SFB 0,1% *overnight* (cerca de 16 horas) antes dos experimentos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do setor de ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, protocolo nº 882/2015.

4.1.2 Cultivo Celular de HEK 293T, MASM e MEF.

As linhagens celulares de rim embrionário humano (HEK 293T), musculares lisas de aorta de rato (MASM) NOX1 knockout (ko NOX1) e NOX1 wild type (wt NOX1) bem como fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) *SlingShot1* knockout (ko SSH1) e *SlingShot1* wild type (wt SSH1), foram cultivadas em meio DMEM de alta glicose (Cultilab) contendo SFB 10% e gentamicina 40 µg/mL. O repique era feito a cada 3 dias, com tripsina. As células foram mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂.

4.1.3 Cultivo Celular de HASM

Células musculares lisas de aorta humana (HASM) foram obtidas da Clonetics (San Diego, Calif). As células foram cultivadas em meio Cascade Biologics® (*Medium 231 - Thermo Fisher Scientific*) contendo fator de crescimento Epidermal (Invitrogen), penicilina (10 U/ml) e streptomomicina (10 µg/ml). As células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ e utilizadas entre passagem 6 e 12 para os experimentos. Culturas entre 70 – 80% confluentes foram mantidas em meio livre de soro de 24 a 48 horas antes dos experimentos.

4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A confirmação da identidade das VSMC foi realizada pela expressão de actina de músculo liso. Para isso, foram plaqueadas 1×10^4 células em lamínulas de 13 mm diâmetro (Knittel). No dia seguinte, foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min. Os grupos aldeídos foram bloqueados com glicina 0,1 M por 5 minutos e a permeabilização da membrana foi feita juntamente com o bloqueio (saponina 0,05% e albumina 1% em PBS) por 60 minutos. Após a incubação com anticorpo primário actina de músculo liso (1:250 Sigma-Aldrich A 5228) na solução de bloqueio por 1 h, as células foram lavadas 5 vezes

com PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado a um fluoróforo (anti mouse Alexa fluor 488, Molecular Probes ab150113) por 50 min na solução de bloqueio. Após 5 lavagens com PBS, os núcleos foram corados com solução de DAPI 1,5 μ M, e a lâmina foi montada com Fluormount (Life Technologies). As imagens foram obtidas no microscópio de varredura a laser confocal (NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan) utilizando objetiva 20x (com abertura numérica de 0.75). Os filtros utilizados para FITC foram com excitação de 450-490 nm e emissão com intervalo entre 515-565 nm; já para DAPI excitação de 365 nm e emissão com intervalo entre 445-450 nm.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTES DE CAMUNDONGO SELVAGEM E MUTADA

Bactérias eletrocompetentes da cepa AD494 (Novagen) (*Escherichia coli*) foram submetidas a uma diferença de potencial de 1.80 kV (eletroporador BioRad®) a partir de alíquotas de 50 μ L com o vetor pET 32a QSOX, contendo o inserto para a forma selvagem, e com o vetor pET 32a QSOX mut452 contendo o inserto para a forma inativa da proteína de camundongo (BORGES *et al.*, 2015). Após a eletroporação, as bactérias foram recuperadas em 1mL de meio SOC (extrato de levedura 0,5 g, triptona 2g, NaCl 10mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, e glicose 20 mM, pH 7,4) sem antibiótico e então incubadas por 1 hora a 37°C sob agitação. Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio LB/Agar (extrato de levedura 5 g/L, triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, Agar 15 g/L, pH 7,4) contendo canamicina 30 μ g/mL e ampicilina 30 μ g/mL. Das colônias que cresceram no meio sólido, foram selecionadas 4 colônias isoladas de cada recombinante e inoculadas em 10 mL do meio LB acrescido de canamicina 30 μ g/mL e ampicilina 30 μ g/mL. As culturas foram incubadas por 16 horas a 37°C sob agitação. A cultura saturada foi diluída 1:50 em 10 mL de meio LB e incubadas a 37°C sob agitação constante até atingirem uma densidade ótica (D.O.) de 0,5-0,6 a 550 nm. Após atingirem a absorvância desejada, foi separado 1 mL para controle não-induzido da expressão e foi adicionado no restante IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0,1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante, por 4 horas a 30°C. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram separadas em SDS-PAGE e o gel corado com azul de

Coomassie. Após análise dos géis, o clone com maior expressão foi selecionado e utilizado para a expressão em larga escala.

O clone de interesse foi pré-inoculado em 15 mL de meio LB e incubado por 16 horas a 37°C sob agitação. Dessa cultura saturada, foi realizada a inoculação em uma diluição 1:50 em meio LB novo e quando as culturas bacterianas atingiram a D.O. entre 0,5-0,6 a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG na concentração final de 0,1 mM por 16 horas a 20°C.

Seguindo o período de indução, a cultura resultante (1litro) da expressão foi sedimentada por centrifugação a 4.000 x g por 30 minutos e o *pellet* lavado duas vezes por centrifugação com água deionizada gelada. Após as lavagens, o concentrado de bactérias foi ressuscitado em tampão de lise nativo (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) e armazenado a -80° C.

As bactérias foram lisadas em tampão de lise nativo gelado (acrescido de PMSF 1 mM e FAD 50 µM) em prensa de French (1000 psi). Em seguida o lisado bacteriano foi submetido à sedimentação a 3000 g, 4°C por 50 minutos. A purificação da proteína recombinante foi feita por IMAC com resina de Ni-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada em tampão de lise. A resina foi lavada com 3 vezes em água ultrapura e equilibrada em tampão nativo com imidazol 10 mM. A proteína foi eluída da resina com tampão nativo contendo 250 mM de imidazol. Alíquotas de todas as etapas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 10% e o gel corado com azul de comassie.

As proteínas recombinantes foram dialisadas contra PBS 0,1X e sua concentração determinada através da absorbância em 456 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{456 \text{ nm}} = 12,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HECKLER *et al.*, 2008a). Alíquotas das proteínas wtQSOX e C452SQSOX foram estocadas a -80°C em 20% de glicerol e a cada nova preparação, ou caso as proteínas ficassem estocadas por mais de 1 mês, era realizada a análise de atividade enzimática.

4.4 SUPEREXPRESSAO DE QSOX1b EM CÉLULAS HEK 293T

Células HEK 293T foram transfectadas utilizando *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. As células foram semeadas em placas de 100 mm (Nest) entre 60-70% de confluência (1×10^6) e utilizado 8 ug dos vetores pEGFP-C1

(Clontec), pcDNA 3.1 mQSOX1 ou pcDNA 3.1 mQSOX1C455S. As células foram incubadas *overnight* com a mistura DNA/Lipofectamina em meio OptiMEM® (Invitrogen) (sem SFB e antibiótico) e mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de 5h de incubação, o meio foi trocado por 4 mL de DMEM contendo antibiótico (sem SFB) e mantido por 48 horas, quando foram coletados o sobrenadante e o extrato celular.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SULFIDRIL OXIDASE

Foi utilizado um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX1 (RAJE *et al.*, 2002). Este método se baseia na oxidação do ácido homovanílico a um dímero fluorescente, pela peroxidase de raiz forte (HRP) na presença de peróxido de hidrogênio. Como a atividade sulfidril oxidase gera peróxido de hidrogênio, a taxa de formação do dímero fluorescente se relaciona com a taxa de formação do peróxido. Sendo assim, conforme descrito em BORGES e colaboradores (2015), em microplaca preta com fundo claro (Corning) a proteína recombinante QSOX1b 0,2 µM (na forma selvagem ou mutada) foi adicionada à uma mistura reacional que consistiu de tampão fosfato 50 mM, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,3 mM, pH 7,4 e um mix contendo ácido homovanílico (HVA) 1 mM, peroxidase de raiz forte (HRP) 1,4 µM e o substrato ditioneitol (DTT) 0,15 mM. A fluorescência da reação foi monitorada por 5 minutos pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M200, utilizando os seguintes parâmetros: $\lambda_{em} = 320$ nm, $\lambda_{exc} = 420$ nm. A partir de uma curva padrão de calibração feita com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 µM), a atividade da proteína recombinante selvagem foi determinada através da relação da fluorescência pelo tempo de reação. Foi também realizado o acompanhamento da atividade de wtQSOX no sobrenadante de células HEK 293T transfectadas com pcDNA 3.1 mQSOX1 (neste trabalho denominado de wtQSOX-SN HEK293T), pcDNA 3.1 mQSOX1C455S (C455SQSOX-SN HEK293T), pEGFP-C1 (GFP-SN HEK 293T) ou na presença de difenilenoiodônio (DPI) 20, 40 e 60 µM (Sigma-Aldrich).

4.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

4.6.1 *Scratch*

O ensaio de migração celular foi adaptado a partir do método de *scratch*, previamente descrito em LIANG *et al.* (2007). Em placas de 24 poços, foram semeadas 20.000 células/poço (70-80% de confluência). Após adesão, as células foram lavadas duas vezes com PBS, para a retirada dos detritos, carenciadas por 16 horas (*overnight*) com meio DMEM contendo 0,1% de soro fetal bovino e antibiótico. Depois desse período, com auxílio de uma micropipeta p200 foi feita uma raspagem na monocamada de células, em linha reta, para criar uma “ferida” e em seguida realizada uma lavagem para remover debris. O risco foi fotografado neste tempo, que corresponde ao tempo zero. Em seguida, foi realizado o tratamento que consistiu na incubação das células com a proteína wtQSOX 50 nM e C452SQSOX 50 nM. Após 24 horas, as células foram suavemente lavadas com PBS e fotografadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS100) em aumento de 10 vezes. A distância de migração foi determinada pelo *software* ImageJ através da diferença da distância entre as bordas da “ferida” nos tempos 0 e 24 horas. Como controle positivo de migração foi utilizado o estímulo por PDGF-BB 20 ng /mL (Sigma-Aldrich). Este ensaio também foi realizado com sobrenadante de células HEK 293T transfectadas (wtQSOX-SN HEK293T, C455SQSOX-SN HEK293T ou GFP-SN HEK 293T) ou não transfectadas (controle).

Em alguns casos, 30 minutos antes do tratamento com as proteínas recombinantes, as células foram incubadas com Mitomicina C 0,4 µg/ml (Roche), PEG-CAT (polietileno glicol catalase) 200 U/mL (Sigma-Aldrich), CAT (catalase) 200 U/mL (Sigma-Aldrich), PEG-SOD (polietileno glicol superóxido dismutase) 25 U/ml (Sigma-Aldrich), DPI 20 µM e ML171 150 nM (2-acetylphenothiazine) (cedido pela Dra. Lucia Lopes, USP).

4.6.2 *Transwell*

Foi utilizado o sistema *transwell* contendo membrana de policarbonato, com poros de 8-µm (Cod.140620, Nunc). Primeiramente, foi feito um *coating* na face inferior do filtro de policarbonato (inserto *transwell*) com colágeno tipo I 10 µg/ml (Gibco) por 30 minutos. As

células carenciadas com 0,1% de SFB por 16 horas (*overnight*) foram coletadas (em meio DMEM contendo albumina de soro bovino (BSA) 0,5%, lavadas para a retirada do BSA e semeadas na câmara superior (50.000 células). Na parte inferior do sistema foi adicionado DMEM contendo SFB 0,1%, wtQSOX1 50 nM, C452SQSOX1 50 nM ou PDGF-BB 20 ng /mL (Sigma-Aldrich). Após 4 horas, as células que não migraram foram gentilmente removidas da face superior da membrana com um *swab* e as que permaneceram na porção inferior foram lavadas em PBS, permeabilizadas com metanol gelado (5 minutos) e coradas com DAPI (1 ug/ml) por 5 minutos. As imagens de 4 campos de cada membrana foram adquiridas no microscópio de fluorescência invertido (Olympus Life Science) aumento de 4 vezes para contagem das células que migraram através da membrana.

Em outros ensaios, a parte inferior do sistema foi preenchido com sobrenadante de células HEK 293T transfectadas (wtQSOX-SN HEK293T, C455SQSOX-SN HEK293T ou GFP-SN HEK 293T) ou não transfectadas (controle).

4.7 PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em placas de 96 poços, foram semeadas 8×10^3 células/poço (aproximadamente 60% de confluência). Depois desse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS e carenciadas por 16 horas (*overnight*) com meio DMEM contendo SFB 0,1% e antibiótico. Após esse período, foi realizado o tratamento que consistiu na incubação das células com wtQSOX 100 nM e C452SQSOX 100 nM (exceto para o primeiro ensaio que também foram utilizadas as concentrações de 50 e 75 nM). Como controle positivo foi utilizado SFB 10%. Após 48 horas, as células foram lavadas gentilmente com PBS, fixadas em paraformaldeído 4% (10 minutos), permeabilizadas com metanol 2% (10 minutos) e coradas com cristal violeta 0,5% (dissolvido em metanol 20%) por 10 minutos. Em seguida, foi retirado o corante em lavagens sequentes com água e, após retirar o excesso, foi realizada a eluição do corante em 100 μ L de solução citrato de sódio 0,1M em metanol 50%, pH 4,2. A absorbância foi determinada em 570 nm em leitor de microplaca (Bio-rad modelo 680). Para este teste, também foi utilizado o sobrenadante de células HEK 293T transfectadas (wtQSOX-SN HEK293T, C455SQSOX-SN HEK293T ou GFP-SN HEK 293T) ou não transfectadas (controle).

Em alguns ensaios, 30 minutos antes do tratamento com as proteínas recombinantes, as células foram incubadas com Mitomicina C 0,4µg/ml, PEG-CAT 200 U/mL, CAT 200 U/mL, PEG-SOD 25 U/ml, DPI 20 µM e ML171 150 nM.

4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CATALASE EM VSMC

VSMCs (5×10^5 células) foram semeadas em placas de 60 mm. Após adesão, foram tratadas com Peg-CAT 200 U/mL ou CAT 200 U/mL por 30 minutos (em meio completo). Passado o período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS, destacadas da placa com “*scraper*”, transferidas para microtubos em 60 µL de PBS adicionado de inibidor de protease (Roche) e congeladas. Para a realização do ensaio de atividade da catalase, as amostras foram lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento em -80°C , centrifugadas ($9.000 \times g$, 20 min a 4°C) e o sobrenadante separado. Em seguida, na cubeta de quartzo, foram adicionados 495 µl de tampão Tris-base 50mM, EDTA dissódico 0,25 mM, pH 8, H_2O_2 10 mM e 5 µl da amostra. Como controle positivo de reação, foi utilizada 5 µl de uma solução contendo Peg-CAT 1 U/mL ou CAT 1 U/mL. O monitoramento da reação de decomposição do peróxido foi realizado em espectrofotômetro (HITACHI, U-2900) pelo decréscimo gradual na absorbância ($\lambda = 240 \text{ nm}$) devido ao consumo do H_2O_2 (AEBI, 1984). As leituras foram realizadas em intervalos de 1 min e a normalização dos dados obtidos foi realizada através da quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford.

4.9 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM VSMC

O método baseia-se na capacidade da SOD em inibir a redução do azul de nitrotetrazólio NBT para azul *formazan* pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, sendo que a redução do NBT é medida fotometricamente. VSMC (5×10^5 células) foram semeadas em placas de 60 mm. Após adesão, foram tratadas com PEG-SOD 25 U/mL (em meio completo) por 30 minutos e, em seguida, lavadas 3 vezes com PBS, destacadas da placa com “*scraper*”, transferidas para microtubos em 60 µL de PBS adicionado de inibidor de protease e congeladas. Para a realização do ensaio, as amostras foram lisadas por 3 ciclos de congelamento e descongelamento em -80°C , centrifugadas ($9.000 \times g$, por 20 min a 4°C) e o sobrenadante

separado. Após a dosagem e a normalização de proteínas totais, 100 µg em 30 µL de amostra foram incubadas em 70 µL de solução contendo NBT 0.1 mM e EDTA 0.05 mM. Em seguida, a reação foi realizada através da adição de 100 µL de hidroxilamina 37 mM em tampão carbonato 182 mM, pH 10.2. A absorbância foi mensurada em 560 nm nos tempos de 0, 30 e 60 min, em temperatura ambiente.

4.10 PREPARO DE EXTRATOS PROTÉICOS CELULARES

Os extratos protéicos foram obtidos a partir das culturas das células, as quais foram lavadas com PBS gelado, coletadas em tampão de amostra 1X LDS (Nupage®) (Tris-HCl 50 mM pH 6,8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 2%; glicerol 10%; DTT 100 mM; azul de bromofenol 0,1%) (aproximadamente 100 µL/ 10⁶ células). Os homogenatos foram fervidos em banho seco a 95°C por 10 minutos, sonicados (2 ciclos de 30 segundos, 70W) e centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi ressuscitado em tampão de amostra redutor (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,2% e β-mercaptoetanol 200 mM) e fervido por 10 minutos a 95°C.

4.11 DETECÇÃO DE ROS INTRACELULAR EM VSMC POR 2',7'-DICLOROFLUORECEINA DIACETATO (DCFH-DA).

As células foram semeadas (5x10³) em placas escuras de fundo óptico de 96 poços e carenciadas com SFB 0,1% (*overnight*). Em seguida, foram incubadas com DCFH-DA 20 µM por 30 min e tratadas com PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou não de PEG-CAT 200 U/mL. Durante o tratamento a fluorescência foi monitorada e capturada nos tempos de 15 e 30 minutos em leitor de placa (Rchisto, Infinite M200) com excitação de 488 nm e emissão em 525 nm. O H₂O₂ foi estimado através da fração inibida pela PEG-CAT (Δ fluorescência), em cada tratamento, que corresponde a diferença entre a fluorescência de DCF na presença ou ausência de PEG-CAT. Foi realizado um ensaio adicional em VSMC incubadas com PEG-SOD 25 U/ml.

4.12 REAÇÃO DE WESTERN BLOTTING

Para a extração de proteínas totais, a monocamada de células foi lavada com tampão PBS, removida da placa de cultura mecanicamente em tampão RIPA (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4; NaCl 150 mM; Triton X-100 0,1%; SDS 0,1%; deoxicolato de sódio 0,1%) contendo EDTA 50mM e coquetel de inibidores de proteases (Sigma). Os homogenatos foram submetidos à sonicação, à dosagem de proteínas pelo método de Bradford e fervidos em banho seco a 95°C por 10 minutos.

Os extratos protéicos de interesse foram separados por SDS-PAGE e submetidos à reação de *western blotting*. As amostras foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose durante 40 minutos sob corrente constante 15V em tampão de transferência gelado (glicina 39 mM, Tris-base 48 mM, SDS 0,037% e metanol 20%) em um aparato Trans-Blot Semi-Dry (Bio-Rad). As membranas foram então bloqueadas (durante 1 hora à temperatura ambiente) com tampão de bloqueio TBS-T (NaCl 120 mM, Tris-base 20 mM e Tween 20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado liofilizado (Molico, Nestlé). Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários de interesse (diluídos em tampão de bloqueio) a 4°C por 16 horas (*overnight*) sob agitação. Após a reação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas com TBST 3 vezes por 15 minutos e incubadas com anticorpo secundário adequado conjugado com peroxidase, diluído em tampão de bloqueio, por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, nova sequência de lavagens foi realizada e para verificação da banda de interesse as membranas foram incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência (Pierce) e expostas a filme radiográfico (Kodak) ou captadas por um scanner de alta resolução do tipo Image Scanner (GE Healthcare).

4.13 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NO SOBRENADANTE DE VSMC TRATADAS COM QSOX1b

A fim de verificar a quantidade de peróxido de hidrogênio extracelular nas células tratadas com a QSOX1b, foi realizado um ensaio colorimétrico com o reagente Ampliflu™ Red (*10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine* - Invitrogen) que, combinado com HRP, reage com H₂O₂ em uma estequiometria 1:1 para gerar o produto de oxidação vermelho fluorescente resofurina. Para isso, VSMC (5x10⁴) foram semeadas em placas de 96 poços e, após adesão, carenciadas

com meio DMEM contendo SFB 0,1% por 16 horas (*overnight*). Após este tempo, as células foram tratadas com as recombinantes wtQSOX e C452SQSOX 50 nM em meio contendo 0,1% de soro, bem como com as mesmas inativadas (fervidas a 95°C por 10 minutos) e PDGF-BB 20 ng /mL. Nos tempos de 30 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 horas e 24 horas os sobrenadantes das células foram coletados protegidos de luz e imediatamente congelados a -80°C. Ao sobrenadante das células (90 µL) foi adicionado 10 µL de uma mistura reacional contendo Ampliflu™ Red 50 µM e HRP 0,1 U/ml em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7.4. Após 30 minutos, foi feita a leitura da fluorescência pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: $\lambda_{exc} = 535 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 587 \text{ nm}$. As fluorescências emitidas foram normalizadas por quantidade de células viáveis detectadas por ensaio de cristal violeta. A eficiência de cada ensaio foi verificada através de uma curva padrão de calibração com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

4.14 DETERMINAÇÃO DE TIÓIS PROTEÍNAS DE SUPERFÍCIE CELULAR COM DTNB

As células foram semeadas (1×10^6) em placas de 100 mm e carenciadas com SFB 0,1% por 16 horas (*overnight*). Depois desse período, foram tratadas com wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas, em meio DMEM contendo SFB 0,1% por 24 horas. O controle consistiu em células cultivadas na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) 2 mM durante 4 horas em meio contendo 0,1% soro. Após os tratamentos, Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) 200 µM (em PBS) foi adicionado nas células e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e os resultados determinados por absorvância de 412 nm, utilizando o coeficiente $\epsilon_{456 \text{ nm}} = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.15 DETECÇÃO DE TIÓIS DE SUPERFÍCIE COM ALEXA MALEIMIDA-488.

VSMC foram semeadas (8×10^3) em placas escuras de fundo óptico de 96 poços e carenciadas com SFB 0,1% (*overnight*). Em seguida, as células foram tratadas por 2,5, 5, 15 e 30 minutos com wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM em meio DMEM contendo SFB 0,1%. Como controle de reação foram utilizadas células tratadas ou não (controle) com NAC 2mM por 4 horas. As células foram lavadas com PBS, incubadas com Alexa Maleimida-488 (ALM)

(Invitrogen) 10 μ M por 15 minutos (em gelo e protegidas de luz), novamente lavadas e mantidas em 100 μ L de PBS. A fluorescência foi capturada em espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, utilizando os seguintes parâmetros: λ_{exc} =488 nm e λ_{em} =530 nm.

4.16 siRNAS

Os siRNAs escolhidos para silenciar a expressão da QSOX em células humanas foram obtidos da *Sample & Assay Technologies* (Qiagen). Foram testados 5 siRNAs: um controle negativo com uma sequência nucleotídica aleatória (*scrambled-scr*) e sem especificidade a algum mRNA (sem capacidade de silenciamento); e as sequências dupla-fita para hQSOX1: Hs_QSCN6_1; Hs_QSCN6_2; Hs_QSCN6_4 e Hs_QSCN6_5 (Flexi Tube siRNA - Qiagen).

4.17 TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS COM siRNA

A transfecção das células com os siRNAs foi realizada com o agente de transfecção lipídico Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. As células foram semeadas em placas de 100 mm e 6 poços entre 60-70% de confluência (1×10^6 e 1×10^5 , respectivamente). As células foram incubadas *overnight* com a mistura de 30 pmol de siRNA/Lipofectamina em meio OptiMEM® (Invitrogen) (sem SFB e antibiótico) e mantidas em atmosfera úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o meio foi trocado por meio completo e mantido por 48 horas, quando células foram submetidas à ensaios de migração pelo método de *Transwell*.

4.18 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

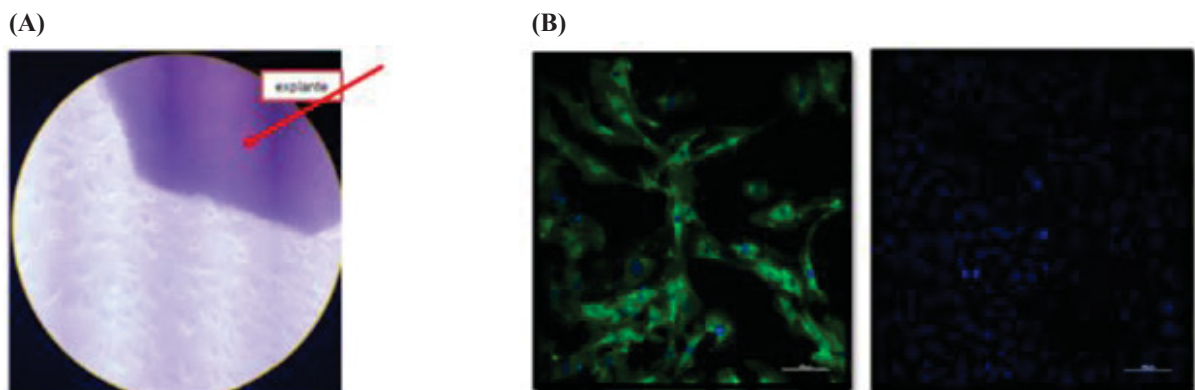
Os resultados foram apresentados como média (\pm) e desvio padrão (DP) de pelo menos três experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *One-way* ANOVA com o pós-teste de Tukey. O efeito do peróxido de hidrogênio na oxidação de DCFH-DA e a comparação de células wt vs ko NOX1 foram analisadas com teste t não pareado. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.

O modelo experimental principal utilizado neste trabalho consistiu em cultura primária de células de aorta de rato, obtidas pelo método de explante (FIGURA 8A). A possibilidade de contaminação cruzada com outros tipos celulares, como fibroblastos, foi descartada através de imunofluorescência indireta para marcação da proteína contrátil alfa-actina de músculo liso. Na FIGURA 8B é possível verificar a imunomarcação, em verde, das fibras de alfa actina de músculo liso e a homogeneidade celular encontrada nas culturas primárias utilizadas, mostrando o enriquecimento de células expressando esse marcador.

FIGURA 8 - CULTURA PRIMÁRIA DE VSMC OBTIDAS PELO MÉTODO DE EXPLANTE.



(A) Imagem do microscópio óptico, na objetiva de 10x, mostrando o sétimo dia após a retirada e semeadura dos fragmentos aórticos na placa de cultura. Seta: explante do tecido muscular da aorta de rato; (B) Confirmação da identidade das células por imunofluorescência indireta. As células (10^4) foram fixadas em laminulas e incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti alfa-actina de músculo liso (1:250) e com o anticorpo secundário anti-IgG Alexa 488 de camundongo (1:500). A imagem foi captada no microscópio de varredura a laser confocal, com objetiva de 20x.

5.2 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

A expressão das proteínas recombinantes QSOX1b (selvagem e mutada) foi realizada como descrito em material e métodos. As bactérias eletrocompetentes da cepa *E. coli* AD494 foram transformadas com o vetor pET 32a QSOX, contendo o inserto para a forma selvagem, e

com o vetor pET 32a QSOX mut452 contendo o inserto para a forma inativa da proteína de camundongo. O clone com melhor taxa de expressão, avaliada a partir da expressão em pequena escala (dado não mostrado) foi utilizado para expressar a proteína recombinante em larga escala (1L).

A proteína foi expressa em sua forma solúvel e, após a lise em prensa francesa, foi feita a purificação por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Amostras das diversas etapas do processo de purificação das proteínas wtQSOX e C452SQSOX foram separadas em gel SDS-PAGE 10% e coradas com azul de *Coomassie* (FIGURA 9). É possível verificar que as proteínas recombinantes expressas foram devidamente purificadas. Aliquotas purificadas foram estocadas e levadas à verificação da atividade enzimática da proteína, periodicamente.

FIGURA 9 - EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b (SELVAGEM E MUTADA).

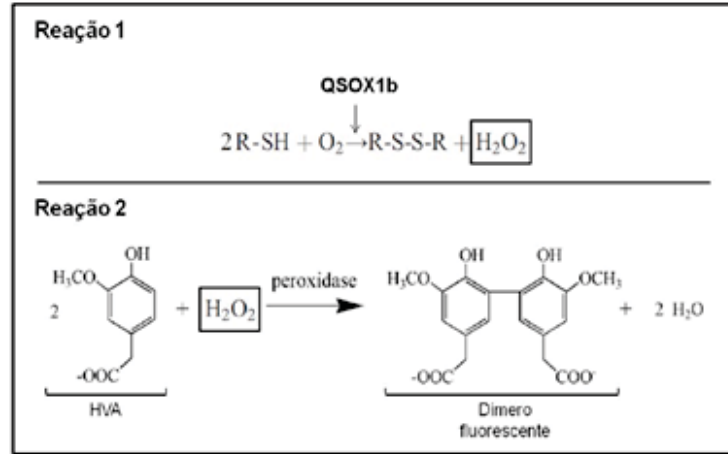


Bactérias eletrocompetentes AD494 foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante QSOX1b (mutada e selvagem). Em seguida foram lisadas e purificadas por cromatografia de afinidade em resina Ni-NTA agarose. Os eluatos das duas isoformas foram submetidos a SDS-PAGE 10% e corados com azul de Comassie.

5.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE wtQSOX.

Para a validação e confirmação da atividade sulfidril oxidase de nossa proteína recombinante selvagem, foi realizado o método indireto utilizando DTT, substrato artificial da QSOX1b, que através da atividade da sulfidril oxidase contribui com a formação de peróxido de hidrogênio. Este, por sua vez, reage com o ácido homovanílico e através da peroxidase de raiz forte é oxidado à um dímero fluorescente (FIGURA 10).

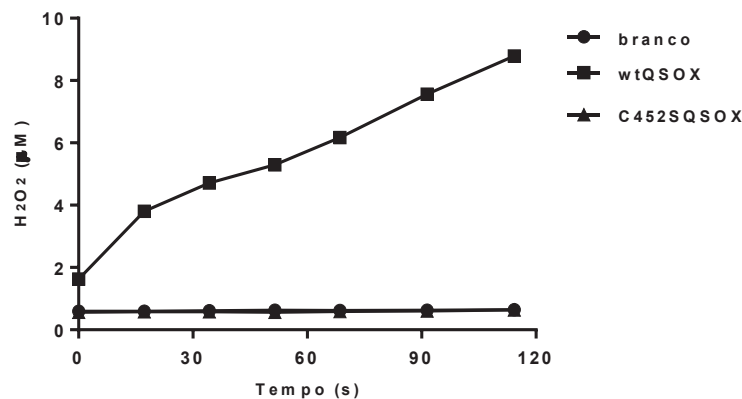
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DA QSOX1b POR EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA



FONTE: adaptado de RAJE (2002) e HECKLER (2008b). A reação 1 mostra a atividade sulfidril oxidase produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na reação 2, o H_2O_2 gerado pela reação 1 é utilizado como substrato pela HRP para a dimerização de dois HVA.

Inicialmente, foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H_2O_2 (0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 μM). A partir disso, foi realizado o monitoramento da formação do dímero fluorescente que é produzido devido à atividade da enzima. Com o passar do tempo, foi observado que a presença do tipo selvagem da proteína recombinante QSOX1 evidenciou um aumento na formação do peróxido de hidrogênio, com uma atividade média produzida de 203 $nmol H_2O_2 / min / mg$ de proteína. Já a proteína mutante mostrou-se completamente inativa (FIGURA 11).

FIGURA 11 - PRODUÇÃO DE H_2O_2 ATRAVÉS DA OXIDAÇÃO DE DTT PELA ENZIMA wtQSOX.

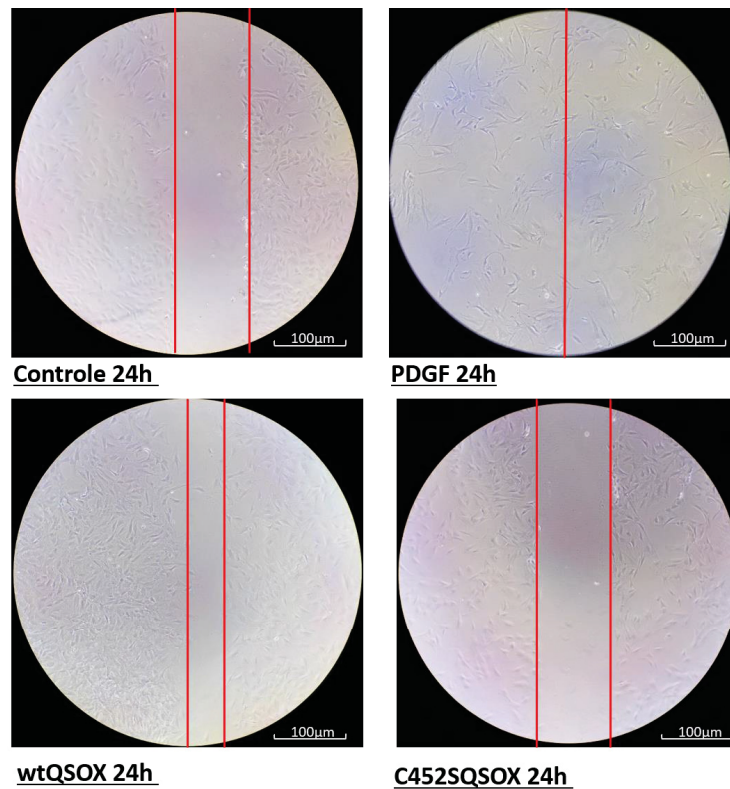


Concentração de peróxido de hidrogênio gerado a partir da oxidação de DTT pelas enzimas selvagem e mutada (0,2 μM) em relação ao tempo (segundos). O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (RAJE *et al.*, 2002). O branco da reação corresponde a mistura reacional na ausência da QSOX.

5.3 A ATIVIDADE DA PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE INDUZ MIGRAÇÃO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATOS.

Os primeiros ensaios deste trabalho foram realizados com a finalidade de confirmar alguns dados do nosso laboratório quanto ao papel pró-migratório da QSOX1b extracelular. Para isso, foram feitos ensaios de migração de VSMC incubadas com QSOX1b recombinantes (ativa e inativa). Como controle positivo de reação, foi utilizado o PDGF-BB, uma molécula bem conhecida como indutora da migração de VSMC (SUNDARESAN *et al.*, 1995; PESCATORE *et al.*, 2012). A migração foi analisada com o método de *scratch* (FIGURA 12).

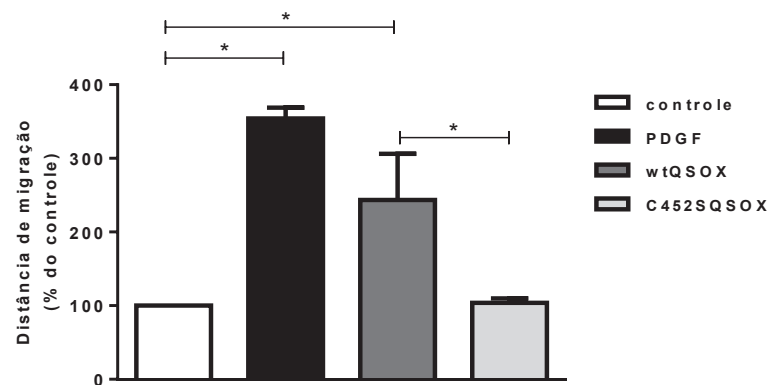
FIGURA 12 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO EM VSMC PELO MÉTODO DE *SCRATCH*



Imagens representativas de culturas de VSMC após 24 horas em ensaio de *Scratch*. A migração foi determinada pela diferença entre as distâncias das bordas da “ferida” dos tempos 0 e 24 horas.

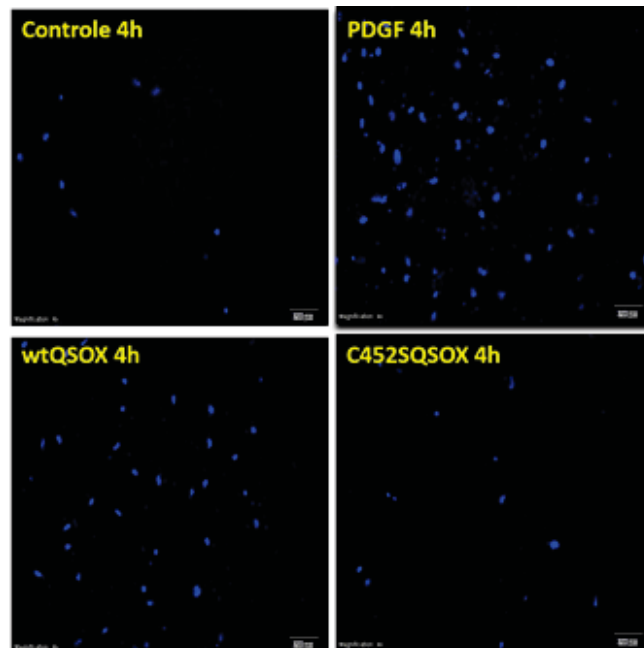
VSMCs estimuladas com a proteína recombinante selvagem (wtQSOX) 50 nM exibiram um aumento da taxa de migração quando comparadas àquelas expostas à mutante inativa (C452QSOX) 50 nM em 24 horas (FIGURA 13). A atividade de migração em 48 horas foi semelhante a que foi observada em 24 horas (dados não mostrados), mas devido ao comportamento ter sido semelhante nos dois tempos, optamos por realizar a investigação do processo de migração no período de 24 horas.

FIGURA 13 - EFEITO DA QSOX1B RECOMBINANTE NA MIGRAÇÃO DE VSMC.



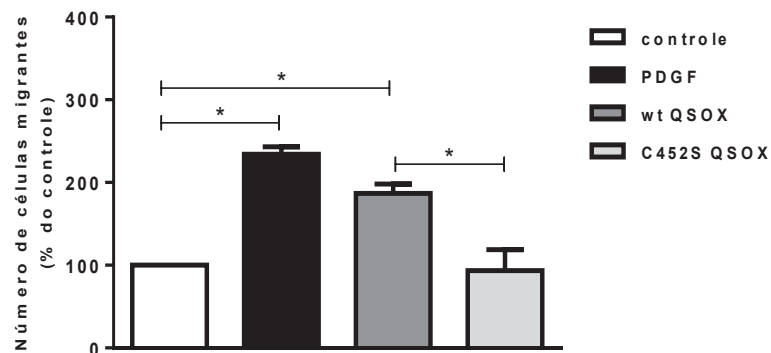
VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%. A distância de migração foi mensurada após 24 horas de exposição. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p<0.05$) estão indicadas.

Para melhor avaliação do processo de migração foram realizados ensaios em sistema *transwell* (FIGURA 14), cuja aplicação serve para medir migração celular direcionada. Confirmando os resultados já obtidos com o método de *scratch*, foi possível notar que as células expostas à proteína wtQSOX mostraram um comportamento migratório mais evidente quando comparadas às células expostas à recombinante inativa (FIGURA 15). Este dado aponta para um efeito quimiotático da enzima no processo migratório de VSMC.

FIGURA 14 - ENSAIO DE MIGRAÇÃO PELO MÉTODO DE *TRANSWELL*.

Imagens microscópicas representativas de VSMC que invadiram o *transwell* no ensaio de invasão após 4 horas. A capacidade de invasão foi determinada pela contagem das células marcadas com DAPI em imagens obtidas através de microscopia de fluorescência invertida.

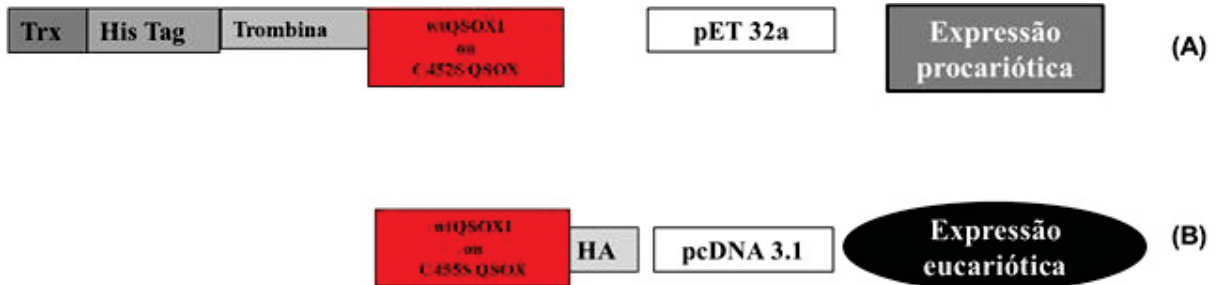
FIGURA 15 - EFEITO QUIMIOATRAENTE DA PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE EM VSMC.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Transwell* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX1 50 nM, recombinante inativa C452SQSOX 50 nM ou não tratadas, em meio DMEM contendo SFB 0,1%. Após 4 horas, imagens de 4 campos diferentes em magnitude de 4x foram capturadas e quantificadas por contagem de número de células (Image J). Os dados correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

O gene da proteína recombinante wtQSOX utilizada neste trabalho é fusionado a etiqueta de histidinas e tiorredoxina na região N-terminal (para criar afinidade com o Níquel no processo de purificação) (FIGURA 16).

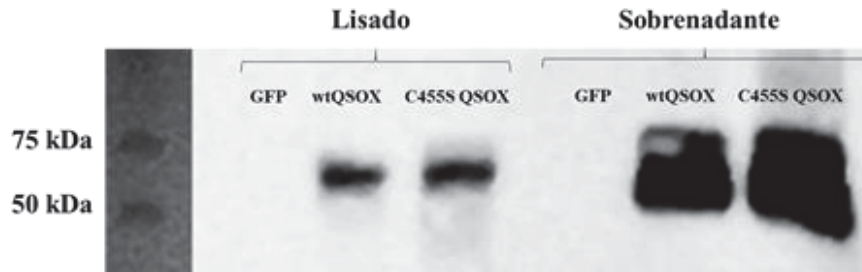
FIGURA 16 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b FUSIONADA A ETIQUETA DE HISTIDINAS E TIORREDOXINA NA REGIÃO N-TERMINAL E DO PLASMÍDEO CONTENDO AS SEQUÊNCIAS PARA QSOX1b MARCADAS COM ETIQUETAS DE HA.



FONTE: O autor (2019).

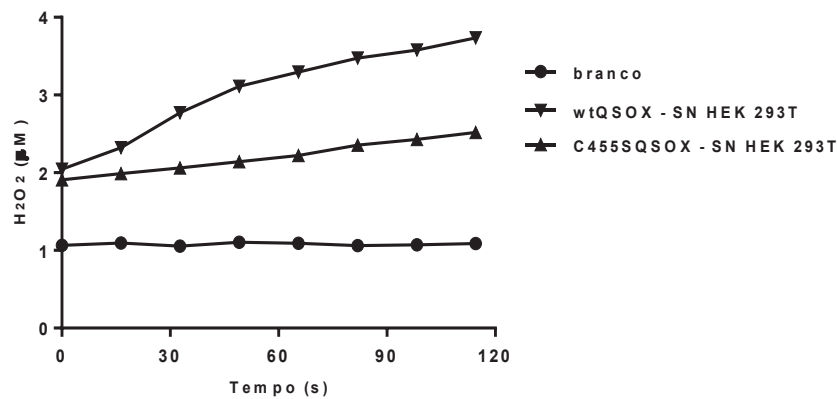
Foi pensado que esta *tag* TRX1 poderia influenciar a ação pró migratória da nossa recombinante, pois parte da atividade da proteína QSOX1 envolve a transferência de elétrons do substrato reduzido para o domínio CxxC – TRX1 e deste para o CxxC – Erv/Alr. Além disso, esta recombinante foi produzida em organismo procarioto, o que poderia ter ocasionado modificações pós traducionais na mesma e, conseqüentemente, interferido na ação migratória observada em VSMC. A estratégia utilizada para excluir essas possibilidades foi avaliar a migração celular em VSMC tratadas com sobrenadante de culturas celulares eucarióticas após serem transfectadas com o vetor da isoforma curta da QSOX1b, ou seja, contendo a forma proteoliticamente processada e secretada da proteína (RUDOLF; PRINGLE; BULLEID, 2013). Desta forma, células HEK 293T foram transfectadas com plasmídeos contendo sequências para wtQSOX ou C455SQSOX1 marcadas com etiqueta de HA. O sobrenadante de células transfectadas com o vetor pEGFP foi utilizado como controle negativo. Após 48 horas de transfecção, foram coletadas as células e o sobrenadante das culturas de HEK 293T para verificar a presença de QSOX1b. A cada transfecção foi realizada a confirmação da expressão e secreção da proteína por ensaio de *western blot*, nos quais foi possível verificar a presença da proteína na sua forma selvagem e mutada (FIGURA 17).

FIGURA 17 - SUPEREXPRESSÃO PROTÉICA DE QSOX1b EM CÉLULAS HEK 293T.



As amostras de sobrenadante e de extratos proteicos de HEK 293T transfectadas com plasmídeos contendo seqüências para wtQSOX ou C455S QSOX1 foram separados por SDS-PAGE e submetidos à reação de *western blotting*. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-HA 1:2000 (Proteintech) e com anticorpo anti-*mouse* 1:5000 (Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase. As membranas foram incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência (Millipore) e as imagens captadas por um scanner de alta resolução.

Para validar e confirmar a atividade sulfidril oxidase da proteína no sobrenadante, foi realizado o mesmo ensaio utilizado para medir a atividade da proteína recombinante. Foi confirmado um aumento na produção de peróxido de hidrogênio no sobrenadante das células transfectadas com a isoforma ativa da QSOX1b quando comparada às células transfectadas com a seqüência inativa ou GFP (FIGURA 18).

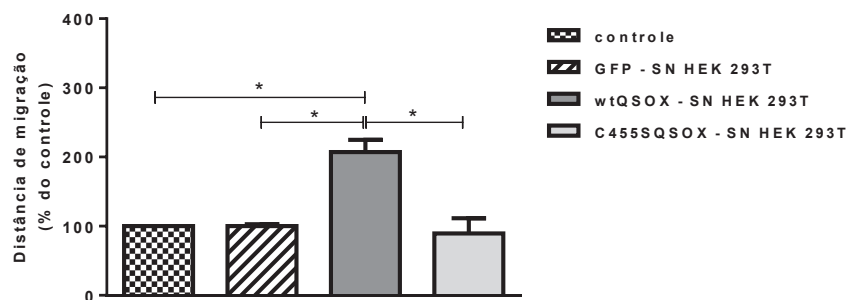
FIGURA 18 - PRODUÇÃO DE H₂O₂ NO SOBRENADANTE DE CÉLULAS HEK 293T TRANSFECTADAS COM wtQSOX.

Concentração de peróxido de hidrogênio gerado da oxidação de DTT no sobrenadante de células HEK 293T transfectadas com plasmídeos contendo seqüências para wtQSOX ou C455S QSOX em relação ao tempo (segundos). O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (RAJE et al., 2002). O branco da reação corresponde a mistura reacional na ausência da QSOX.

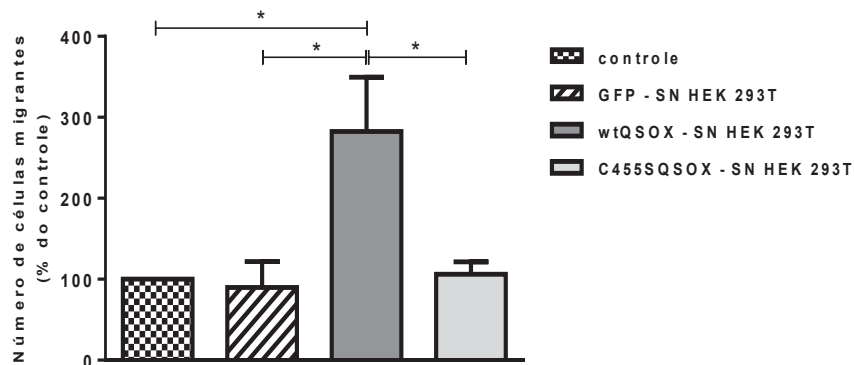
Realizada a comprovação da secreção e da atividade da wtQSOX pelas HEK 293T, foram realizados ensaios de migração (*scratch e transwell*) com o sobrenadante dessas células. Desta forma, foi possível confirmar que a atividade da QSOX1b está relacionada ao processo migratório em VSMC (FIGURA 19A), bem como a ação quimioatratante desta enzima (FIGURA 18B).

FIGURA 19 - MIGRAÇÃO CELULAR DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 SECRETADA DE HEK 293T.

(A)



(B)

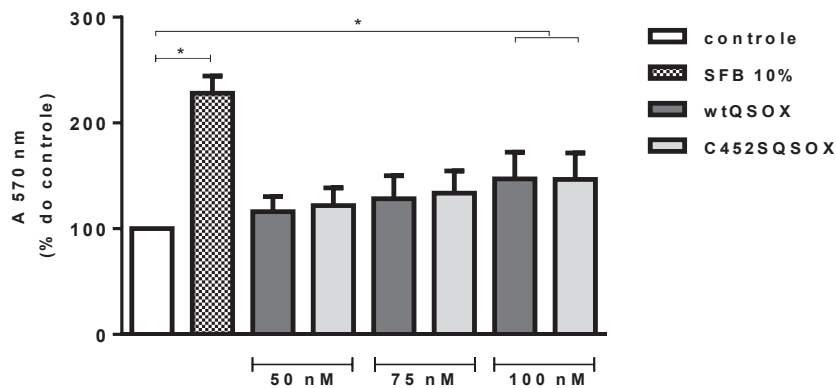


Ensaio de migração em VSMC incubadas com sobrenadante de células HEK 293T não transfectadas, transfectadas com os vetores pEGFP, wtQSOX ou C455SQSOX em meio DMEM contendo SFB 0,1%. (A) *Scratch*: Distância de migração após 24h de tratamento. Os dados correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significativas (* $p < 0.05$) são indicadas; (B) *Transwell*. Após 4 horas, imagens de 4 campos diferentes em magnitude de 4x foram capturadas e quantificadas por contagem de número de células (ImageJ). Os dados correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

5.4 A PROTEÍNA QSOX1b RECOMBINANTE INDUZ PROLIFERAÇÃO EM CÉLULAS MUSCULARES LISAS DE AORTA DE RATO, INDEPENDENTE DE SUA ATIVIDADE.

O papel proliferativo da proteína QSOX1b, independente da sua atividade, também já foi demonstrado anteriormente pelo nosso grupo (BORGES et al., 2015). Estes dados foram confirmados ao expor VSMC à proteína recombinante nas formas ativa e inativa (FIGURA 20), que induziram o processo de proliferação de forma dose-dependente, mas significativamente após 48 horas na concentração de 100nm.

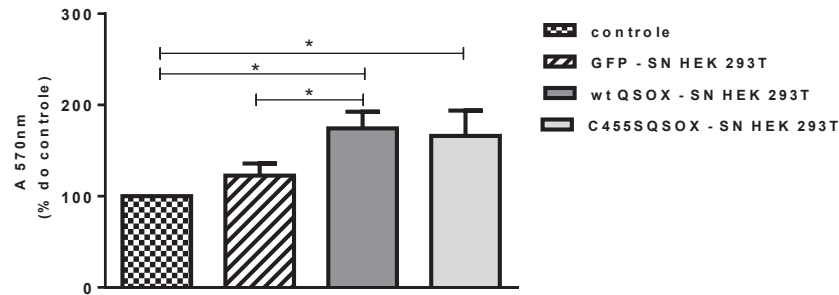
FIGURA 20 - EFEITO DA QSOX1B RECOMBINANTE NA PROLIFERAÇÃO EM VSMC.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram incubadas com SFB 10%, wtQSOX (50, 75 ou 100 nM), C452SQSOX (50, 75 ou 100 nM) ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%. Após 48 horas, as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico com Cristal Violeta. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Da mesma forma que os ensaios de migração, foram realizados ensaios de proliferação em VSMC com meio condicionado de HEK 293T transfectado ou não com wt, ou C452S QSOX, ou GFP. De maneira semelhante à proteína recombinante, foi observado que a atividade mitogênica induzida pela QSOX1b não depende de sua atividade sulfidril oxidase, pois tanto as enzimas ativa como inativa tiveram o mesmo efeito na proliferação (FIGURA 21).

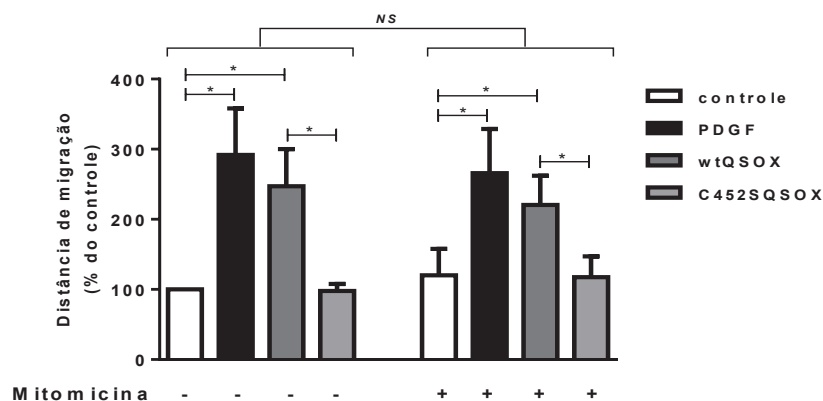
FIGURA 21 - PROLIFERAÇÃO CELULAR DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 SECRETADA DE HEK293T.



Ensaio de cristal violeta em VSMC incubadas por 48 horas com sobrenadante de células HEK 293T não transfectadas, transfectadas com os vetores pEGFP, wtQSOX ou C455SQSOX em meio DMEM contendo SFB 0,1%. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Para excluir a possibilidade de o aumento da proliferação ser responsável pela migração verificada anteriormente, foi feito um experimento adicional de migração na presença de um inibidor da síntese de DNA, a mitomicina (KUMAR; ALI, RAMACHANDRAN, 2015) (FIGURA 22). A presença da mitomicina não afetou os resultados obtidos pela incubação com PDGF ou com as recombinantes. Portanto, foi possível confirmar que em 24 horas a migração induzida por PDGF e pela atividade da QSOX1b não houve um efeito proliferativo, reforçando ainda mais a função da atividade da enzima na migração celular.

FIGURA 22 - EFEITO DA MITOMICINA C NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1 RECOMBINANTE.

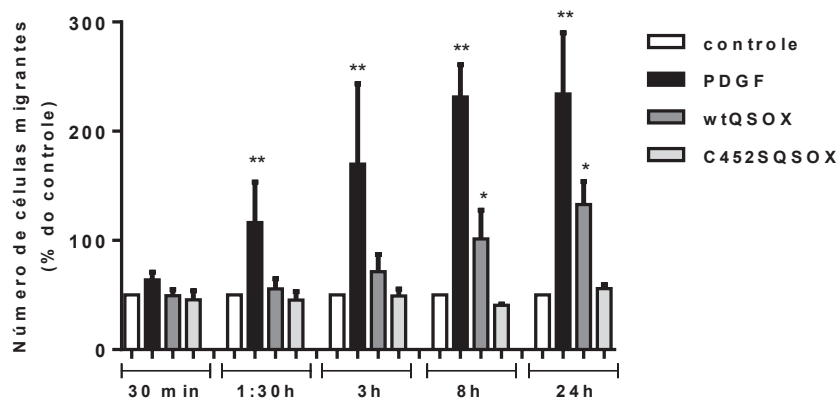


VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência de Mitomicina C 0,4 μ g/ml. A distância de migração foi mensurada após 24 horas de exposição. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 4 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas. (NS – não significativo).

5.5 INVESTIGAÇÃO DO PAPEL DA ATIVIDADE SULFIDRIL OXIDASE DA QSOX NO AMBIENTE EXTRACELULAR DE VSMC

Sendo o PDGF um conhecido indutor de receptores de superfície tirosino-quinases e o comportamento migratório de VSMC estimulada pela QSOX1 semelhante ao desse fator de crescimento, resolvemos investigar comparativamente o desencadeamento de ambos os estímulos nas vias de migração. Foi verificado que as células expostas ao PDGF pelo período de 1 hora e meia apresentaram um aumento na motilidade comparado ao controle, caracterizando um estímulo inicial e permanente nessas células. Entretanto, a wtQSOX mostrou que seu estímulo para desencadear a migração deve ser contínuo, pois as células só responderam significativamente após 8 horas de exposição à recombinante (FIGURA 23).

FIGURA 23 - A MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE DEPENDE DE ESTÍMULO CONTÍNUO.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%. Nos tempos marcados (30 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 horas, 8 horas e 24 horas) o meio de tratamento foi substituído por DMEM contendo SFB 0,1%. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($p < 0.05$) estão indicadas.

Nesse aspecto, foi pensando que a atividade da QSOX1 através da introdução de pontes dissulfeto em substratos extracelulares, como proteínas da MEC ou proteínas com tiol exofacial, poderia desencadear alguma via de sinalização que levasse ao movimento celular. Inicialmente, foi feita uma marcação por DTNB, segundo Laragione (2003). Os resultados não mostraram alteração significativa na superfície das células expostas às proteínas recombinantes selvagem e

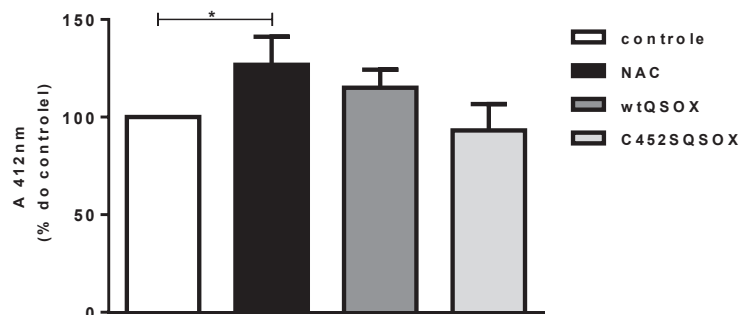
mutada, quando comparadas às células não tratadas (FIGURA 24A). Na tentativa de melhor identificar uma possível interação da proteína QSOX1b com a superfície celular, foi utilizada a sonda Alexa Maleimida 488, específica para modificações tiol (SAHAF, 2005; SKALSKA; BERNSTEIN; BROOKES, 2010; LINDAHL, 2011). Além disso, tempos mais curtos foram determinados para verificar o início de uma possível cascata sinalizadora.

Foi observado que com 4 horas de tratamento a NAC provocou um aumento na marcação com maleimida, indicando um aumento nos níveis de tióis na superfície das células (FIGURA 24B). Já em maior concentração ou em tempo de exposição mais longo ocorreu queda da fluorescência detectada (dados não mostrados), o que está de acordo com o papel metabólico da n-acetilcisteína, que é facilmente transportada para o interior das células, aonde aumenta a concentração de tióis, primeiramente de glutathiona reduzida (GSH) através da sua desacetilação com consequente liberação de cisteína (SKALSKA; BERNSTEIN; BROOKES, 2010).

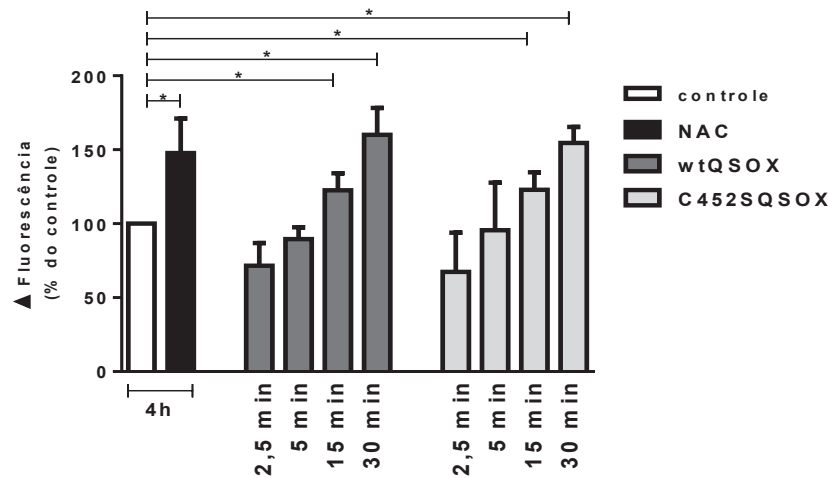
Os resultados não demonstraram diferença significativa nos primeiros minutos de exposição com as recombinantes, mas observou-se uma tendência de oxidação na superfície das células tratadas com ambas as recombinantes, o que aponta para uma possível interação da QSOX1b com a superfície celular ser independente de sua atividade. Interessantemente, foi verificado que ao passar um teor elevado de tióis com o passar do tempo na superfície das células tratadas com as proteínas selvagem e mutada, sendo significativo com 15 e 30 minutos, quando comparadas às células não tratadas (FIGURA 24B), demonstrando este ser um ambiente mais reduzido. Estes dados precisam ser confirmados.

FIGURA 24 - QUANTIFICAÇÃO DE TIÓIS DE SUPERFÍCIE NA PRESENÇA DE QSOX1b RECOMBINANTE.

(A)



(B)



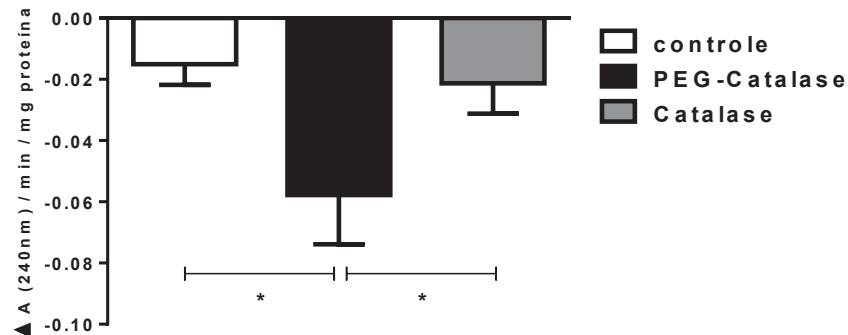
Determinação de tióis de superfície em VSMC (A) por DTNB (LARAGIONE *et al.*, 2003). VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram incubadas com wtQSOX1 50 nM, C452SQSOX 50 nM, por 24 horas. O controle consistiu em células cultivadas na presença ou ausência de NAC 2mM, durante 4 horas. Os resultados foram determinados utilizando o coeficiente $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. (B) por Alexa maleimida-488. VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram incubadas com wtQSOX1 50 nM, C452SQSOX 50 nM por 2,5, 5, 15 e 30 minutos ou não tratadas (controle), em meio DMEM SFB 0,1%. Como controle de reação foram utilizadas células tratadas com NAC 2mM por 4 horas. As células foram incubadas com Alexa Maleimida-488 (ALM) (Invitrogen) e a fluorescência capturada em leitor de placa com excitação de 488 nm e emissão de 530 nm. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 2 experimentos independentes realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

5.6 O PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGENIO INTRACELULAR

Uma vez que ROS, particularmente peróxido de hidrogênio e superóxido, vêm sendo relacionados aos processos de migração e proliferação induzidos por fatores de crescimento, como o PDGF, passamos a investigar a possível participação do peróxido de hidrogênio (produto da atividade catalítica da QSOX1b) nestes eventos. Para isso, foram realizados ensaios de migração de VSMC na presença de catalase, uma enzima que decompõe o H_2O_2 , conjugada a polietileno-glicol para facilitar seu acesso ao meio intracelular (BECKMAN *et al.*, 1988).

Inicialmente, para confirmar que a PEG-CAT estava sendo incorporada às células, foi realizado um ensaio para determinar a atividade da catalase intracelular em células incubadas ou não com PEG-CAT e CAT. De fato, foi observado um aumento na atividade catalase (degradação de H_2O_2) em lisados de VSMC incubados com PEG-CAT, mas não no lisado de células incubadas com CAT (FIGURA 25).

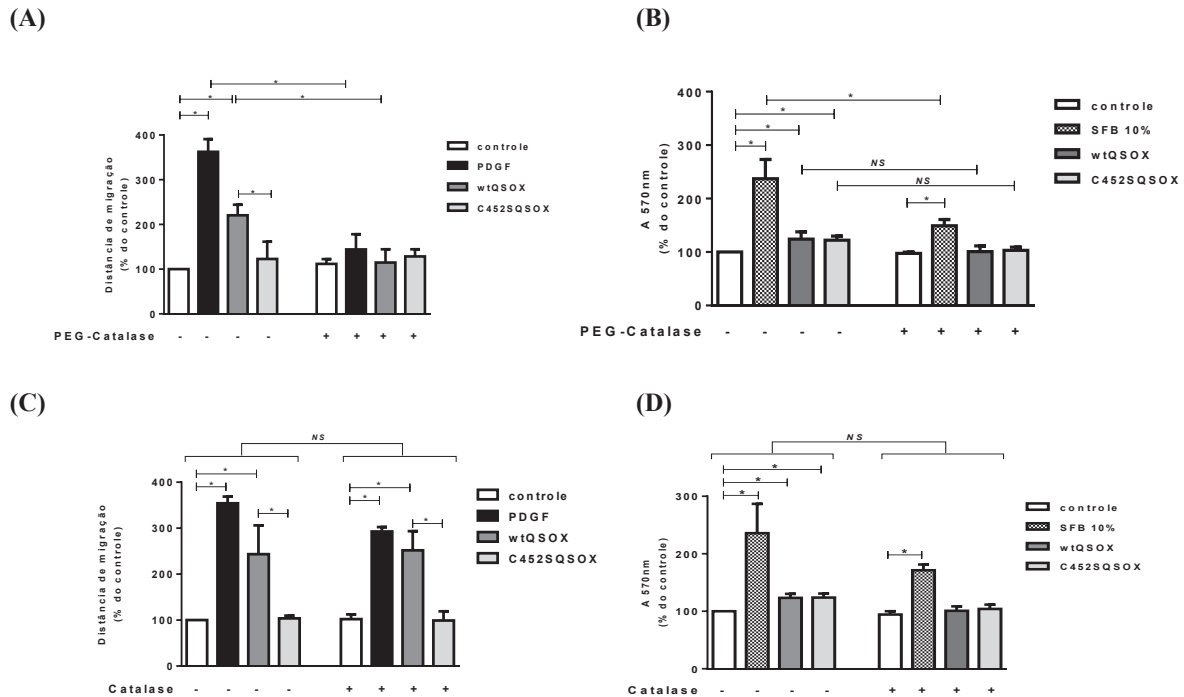
FIGURA 25 - ATIVIDADE DA ENZIMA CATALASE (DEGRADAÇÃO DE H₂O₂) EM VSMC INCUBADAS COM PEG-CAT OU CAT.



VSMC foram expostas ou não (controle) à PEG-catalase 200 U/mL ou Catalase 200 U/mL por 30 minutos. Em seguida, os lisados celulares foram incubados com H₂O₂ 10mM e a absorvância foi monitorada em 240 nm por 5 minutos. Os dados mostrados são correspondentes a média ± DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes (**p*<0.05) estão indicadas.

Demonstrada a incorporação da PEG-CAT pelas VSMC, avaliamos o papel da catalase intracelular e extracelular na migração celular. Foi verificado que a PEG-CAT inibiu significativamente a migração de VSMC estimulada por PDGF e pela recombinante ativa (FIGURA 26A). Além disso, observou-se que a catalase intracelular inibiu a proliferação induzida por SFB 10%, mas não teve efeito frente às recombinantes selvagem ou mutada (FIGURA 26B). Já a catalase extracelular não teve efeito na migração (induzida por PDGF ou QSOX1b) nem na proliferação (induzida por SFB 10% ou QSOX1b), indicando que o peróxido extracelular não está envolvido (FIGURA 26C e D). A atividade oxidase da QSOX1b extracelular poderia ser a fonte desse peróxido, que poderia se difundir para a célula. Entretanto, a ausência de efeito da catalase extracelular enfraquece essa hipótese. A proliferação, em contraste, não foi afetada pelo peróxido de hidrogênio intracelular ou extracelular. Estes dados confirmam que o peróxido de hidrogênio intracelular tem um papel importante na migração induzida pela QSOX1b.

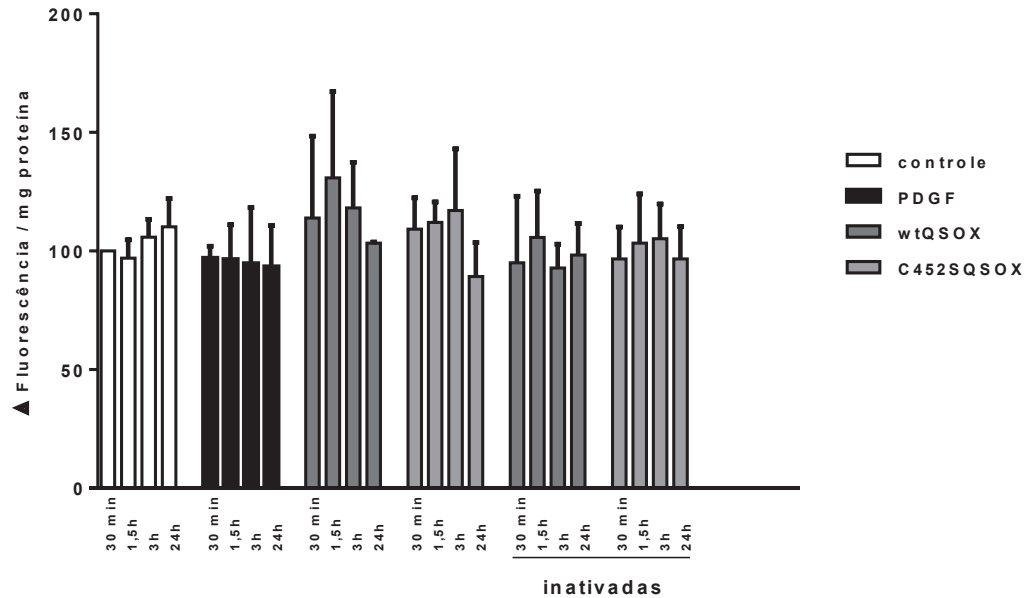
FIGURA 26 - PAPEL DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b.



Efeito da PEG-catalase (PEG-CAT) (A) na migração e (B) na proliferação de VSMC. Efeito da Catalase (CAT) (C) na migração e (D) na proliferação de VSMC. As células foram incubadas com PDGF, wtQSOX, C452SQSOX ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência PEG-CAT (200 U/mL) ou CAT (200 U/mL). A migração foi determinada pelo ensaio de *scratch* e a proliferação por cristal violeta, após 24 ou 48 horas, respectivamente. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas. (NS – não significativo)

Outra forma utilizada para avaliar um possível efeito extracelular do peróxido de hidrogênio derivado da atividade enzimática da proteína QSOX1b recombinante, foram realizados alguns ensaios com a sonda Amplex Red, na tentativa de quantificar este H_2O_2 produto no meio extracelular de VSMC. Para isso, foram analisadas amostras de sobrenadantes tratados com as recombinantes selvagem, mutada ou com PDGF, em diferentes tempos. Nossos resultados não foram conclusivos, pois não foi possível observar alterações significativas entre os tratamentos. Entretanto, o sobrenadante das células tratadas com a recombinante na forma ativa mostra uma tendência em aumentar o H_2O_2 em 1 hora e 30 minutos de tratamento, aparentando retornar ao estado basal no tempo de 24 horas (FIGURA 27). Este comportamento parece diferenciar do PDGF, que já nos tempos iniciais mostra a aparente entrada do H_2O_2 na célula.

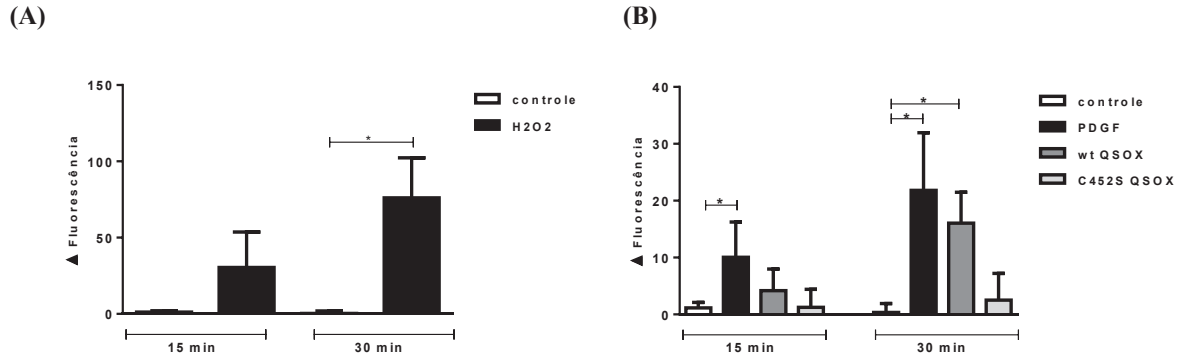
FIGURA 27 - QUANTIFICAÇÃO DO H₂O₂ NO SOBRENADANTE DE VSMC EXPOSTAS À QSOX1B RECOMBINANTE.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram tratadas com PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%. As células também foram incubadas com as recombinantes inativadas (aquecidas a 95°C por 10 minutos). Nos tempos marcados (30 minutos, 1 hora e 30 minutos, 3 horas e 24 horas) os sobrenadantes coletados e incubados com Ampliflu™ Red (conforme o protocolo do fabricante). A fluorescência foi determinada com os comprimentos de emissão de 535nm e excitação de 587nm. As fluorescências emitidas foram normalizadas por quantidade de células viáveis detectadas por ensaio de cristal violeta. A eficiência de cada ensaio foi verificada por uma curva padrão de calibração com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio. Os dados mostrados são correspondentes a média ± DP de 4 experimentos independentes, realizados em quadruplicatas.

Sendo assim, foi utilizada a sonda DCFH-DA para avaliar os níveis de peróxido de hidrogênio intracelular em VSMC. Embora esta sonda não seja específica para este oxidante, foi utilizada a fração fluorescente inibida pela PEG-CAT como uma estimativa das quantidades de peróxido de hidrogênio intracelular. Como controle de reação, as células foram incubadas com H₂O₂ 0,5 mM e, após 30 minutos, foi observado um aumento significativo do sinal da DCF quando comparado com células não tratadas (FIGURA 28). Os níveis de H₂O₂ foram significativamente aumentados em VSMC incubadas com PDGF, mas não com wt ou C452SQSOX, após 15 minutos, quando comparados ao controle. Entretanto, após 30 minutos, as células incubadas com PDGF e wtQSOX mostraram um significativo aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio quando comparados ao controle (FIGURA 28B), confirmando a produção deste oxidante durante os primeiros 30 minutos. Estes resultados indicam que wtQSOX induz um acúmulo de H₂O₂, possivelmente produzido intracelularmente, e não no meio extracelular.

FIGURA 28 - DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR EM VSMC TRATADAS COM QSOX1b.

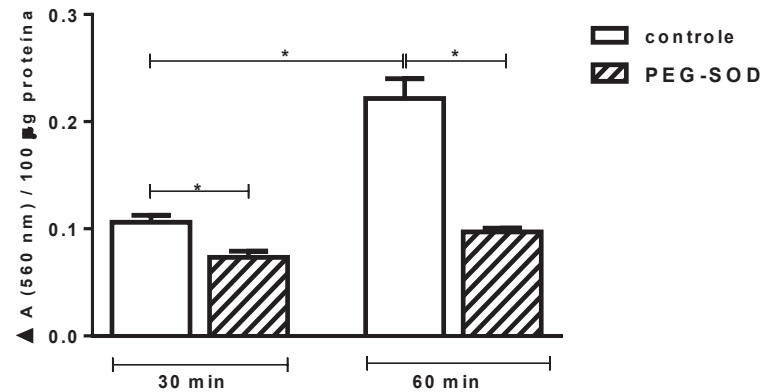


O H₂O₂ foi estimado através da fração inibida pela PEG-CAT (Δ fluorescência), que corresponde a diferença entre a fluorescência de DCF na presença ou ausência de PEG-CAT. Os níveis intracelulares de H₂O₂ foram medidos em VSMC incubadas por 15 e 30 minutos com (A) H₂O₂ 0,5 mM ou não tratadas (controle); (B) PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX ou não tratadas (controle). Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

5.7 O PAPEL DO SUPERÓXIDO E NOX1

O peróxido de hidrogênio possui várias origens, tais como enzimas produtoras de superóxido, que em seguida pode ser dismutado por SODs. Desta forma, para verificar o papel do superóxido intracelular na migração e na proliferação de VSMC, foram realizados ensaios na presença de polietileno-glicol superóxido dismutase. Desta forma, como realizado com a PEG-CAT, foi confirmada a eficiência de incorporação da PEG-SOD através da determinação da sua atividade (FIGURA 29).

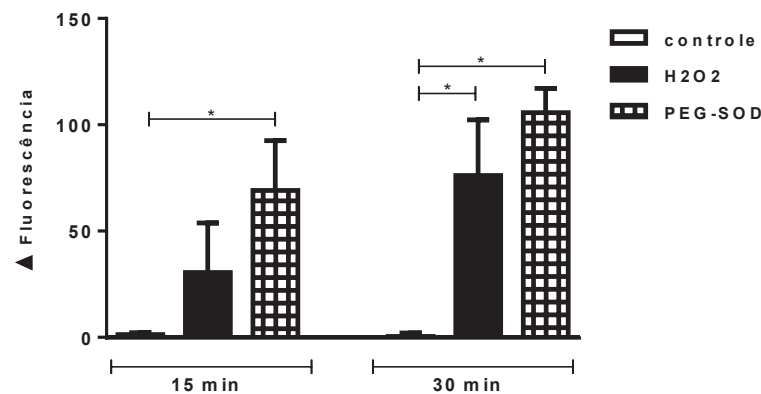
FIGURA 29 - ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM VSMC.



VSMC foram incubadas ou não (controle) com PEG-SOD 25 U/mL por 30 minutos. Após esse período foi verificada a capacidade da SOD inibir a redução do NBT para formazan pelo $O_2^{\cdot-}$ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. A absorbância foi mensurada em 560 nm nos tempos de 0, 30 e 60 min, em temperatura ambiente. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Alem disso, em uma replicata técnica com a sonda DCFH-DA realizado em células tratadas com PEG-SOD, observamos um aumento evidente da fração inibida pela PEG-CAT da fluorescência da DCF (FIGURA 30), demonstrando que mesmo em condições basais o superóxido é gerado, e que PEG-SOD aumenta a produção de peróxido de hidrogênio.

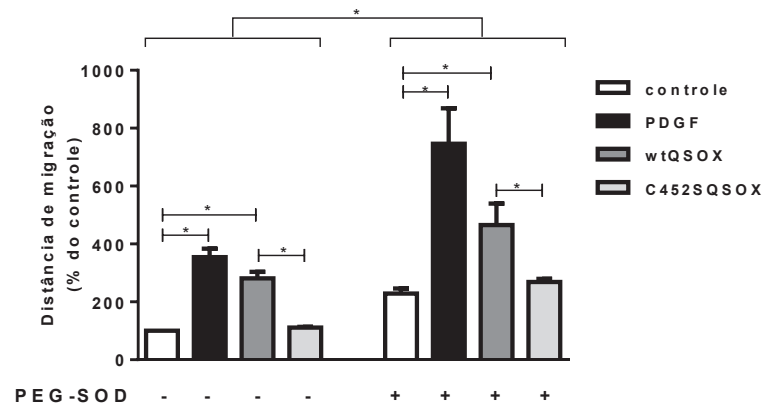
FIGURA 30 - PEG-SOD AUMENTA AS QUANTIDADES DE PERÓXIDO DE HIDROGENIO INTRACELULAR.



VSMC foram incubadas ou não com PEG-SOD 25 U/mL por 30 minutos. Como controle positivo, as células foram tratadas com H_2O_2 0,5 μ M. as quantidades de H_2O_2 intracelular foram estimadas com DCFH-DA, como a fração inibida pela PEG-CAT. Estes dados correspondem a uma replicata técnica.

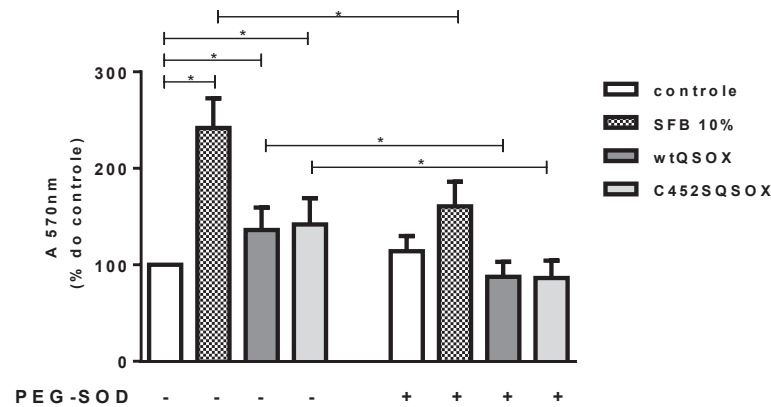
Feito isso, foi observado que ao expor as células à PEG-SOD, a migração em VSMC mostrou-se potencializada em todas as condições (FIGURA 31), incluindo a condição basal, mas mantendo em evidência a ação da recombinante ativa na indução do processo migratório. De maneira semelhante, a migração induzida pelo PDGF-BB também foi evidente pela incubação com PEG-SOD. Este resultado está de acordo com a interpretação que o peróxido de hidrogênio intracelular, resultante da dismutação do superóxido, promove migração. Entretanto, PEG-SOD inibiu a proliferação induzida por SFB10%, wtQSOX e C452SQSOX (FIGURA 32), apontando para um envolvimento do ânion superóxido na proliferação de VSMC.

FIGURA 31 - EFEITO DA PEG-SOD NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B RECOMBINANTE.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência de PEG-SOD 25 U/mL. A distância de migração foi mensurada após 24 horas de exposição. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

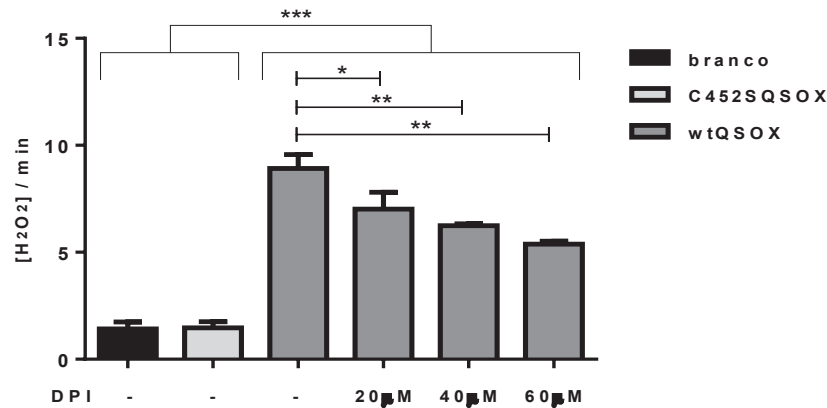
FIGURA 32 - EFEITO DA PEG-SOD NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1B RECOMBINANTE.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de SFB 10%, wtQSOX 100 nM, C452SQSOX 100 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência de PEG-SOD 25 U/mL. Após 48 horas, as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico com Cristal Violeta. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Em VSMC de vasos aórticos, as proteínas NOX são a principal origem de ânion superóxido, particularmente a isoforma NOX1. Desta forma, foi verificado o papel das proteínas NOX usando os inibidores DPI e o ML171, este específico para NOX1. É importante ressaltar que o DPI é um inibidor da produção de ROS mediado por flavoenzimas. Assim, resolveu-se avaliar se DPI poderia inibir a atividade da QSOX recombinante. Para isso, usamos o mesmo método do ácido homovanílico, por fluorescência contínua (metodologia já descrita), a para averiguar se a inibição da migração celular poderia estar relacionada à inibição da atividade de wtQSOX. Na FIGURA 33 é possível verificar que wtQSOX na presença de DPI 20 μ M, concentração utilizada nos ensaios de migração e proliferação, mostrou-se discretamente inibida, mas ainda ativa.

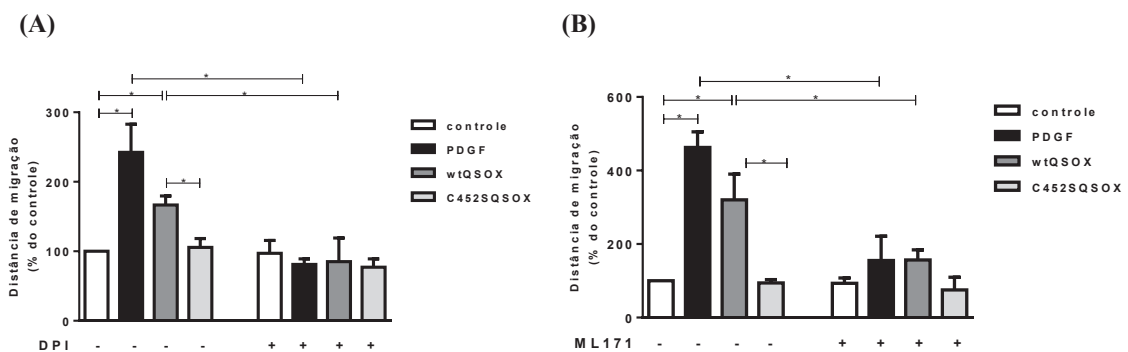
FIGURA 33 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE WTQSOX NA PRESENÇA DE DPI.



Concentração de peróxido de hidrogênio gerado a partir da oxidação de DTT pelas enzimas selvagem e mutada (0,2 µM) em relação ao tempo (segundos), na presença de DPI 20, 40 e 60 µM. O ensaio de atividade sulfidril oxidase foi determinado pelo método de fluorescência contínua (RAJE *et al.*, 2002). O branco da reação corresponde a mistura reacional na ausência da QSOX.

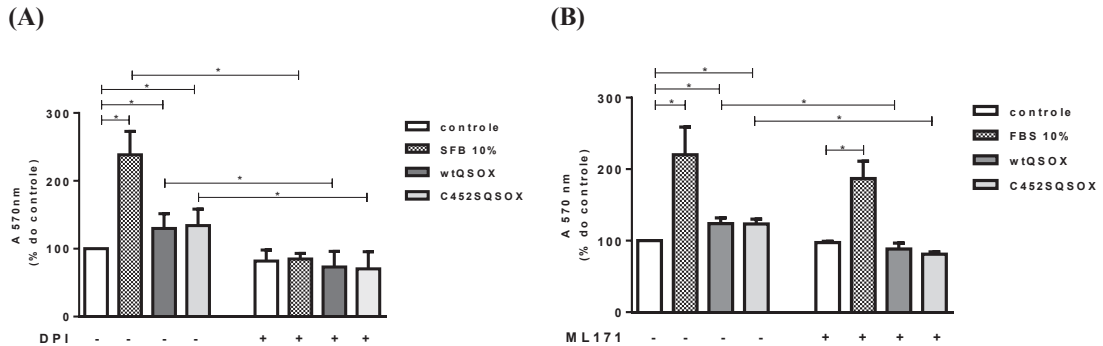
A migração induzida por PDGF e pela wtQSOX foi diminuída por ambos os inibidores (FIGURA 34A e B). De forma semelhante, a proliferação induzida tanto pela wt ou C452SQSOX também foi inibida pelos dois compostos (FIGURA 35A e B). Entretanto, enquanto o DPI inibiu a proliferação induzida por SFB, o ML171 não inibiu, indicando que o SFB possui agente mitogênicos que não atuam exclusivamente via NOX1. De forma geral, estes dados sugerem que proteínas NOX, particularmente NOX1, são mediadores importantes dos processos de migração e proliferação de VSMC induzidas por QSOX1b, através da produção de superóxido

FIGURA 34 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE NOX1 NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência de (A) DPI 20 µM e (B) ML171 150 nM. A distância de migração foi mensurada após 24 horas de exposição. Os dados mostrados são correspondentes a média ± DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes (* $p < 0.05$) estão indicadas.

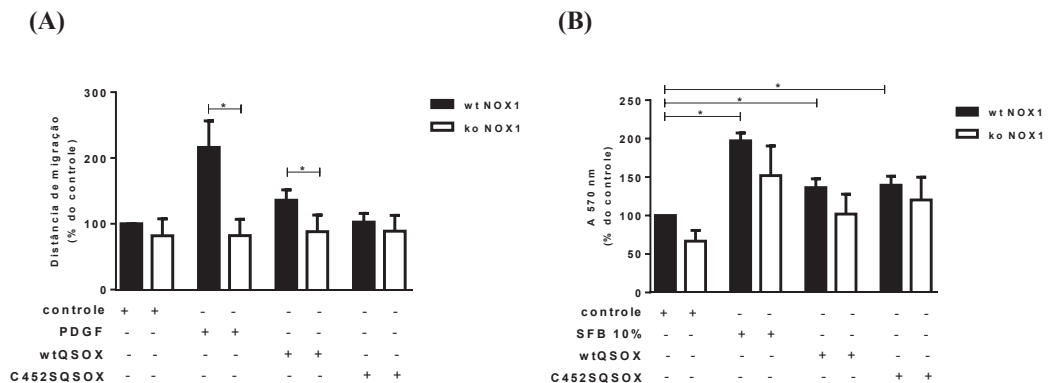
FIGURA 35 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE NOX1 NA PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE.



VSMC carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de SFB 10%, wtQSOX 100 nM, C452SQSOX 100 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%, na presença ou ausência de (A) DPI 20 μ M e (B) ML171 150 nM. Após 48 horas, as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico com Cristal Violeta. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Para melhor investigar esses dados, foram utilizadas VSMC *knockout* NOX1 para avaliar o papel deste complexo na migração e proliferação. Os resultados mostraram que a ausência de NOX1 inibiu significativamente a migração induzida por PDGF e pela wtQSOX (FIGURA 36A). Em contrapartida, a proliferação não foi significativamente afetada pela ausência da NOX1, embora as células ko NOX1 tendenciam a proliferar menos que as células wt NOX1 em todas as condições (FIGURA 36B). De maneira geral, estes resultados indicam que a NOX1 está, de fato, envolvida no sinal de QSOX1 que leva à migração em VSMC.

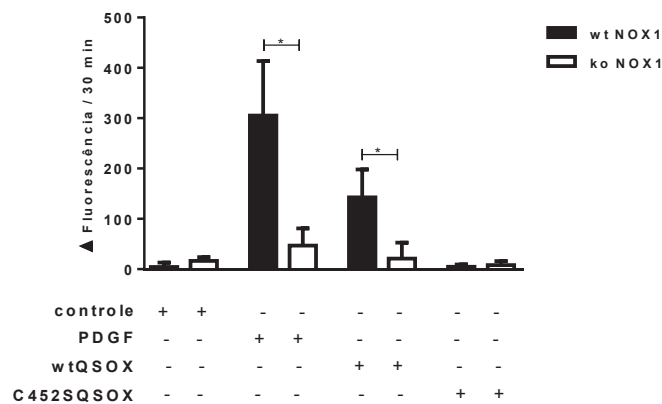
FIGURA 36 - PAPEL DA NOX1 NA MIGRAÇÃO E PROLIFERAÇÃO DE VSMC INDUZIDAS PELA QSOX1b RECOMBINANTE.



(A) VSMC ko e wt NOX1 foram tratadas ou não (controle) com PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM ou C452SQSOX 50 nM por 24 horas e submetidas ao ensaio de migração pelo método de *scratch*. (B) As mesmas linhagens foram tratadas ou não com FBS 10%, wtQSOX 100 nM or C452SQSOX 100 nM por 48 horas, e a proliferação analisada por Cristal Violeta. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

Pelo fato da migração ser dependente de peróxido de hidrogênio, foi realizada a determinação dos níveis de H_2O_2 em VSMC wt e ko NOX1 (FIGURA 37). Os resultados obtidos com as células wt foram os mesmos obtidos com as VSMC, ou seja, PDGF e wtQSOX aumentaram a quantidade de H_2O_2 em relação ao controle. A ausência de NOX1 diminuiu notavelmente as quantidades de peróxido de hidrogênio após o estímulo com PDGF e wtQSOX, indicando que NOX1 pode ser a isoforma preferida tanto para a sinalização de PDGF e QSOX1b.

FIGURA 37 - DETERMINAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO INTRACELULAR EM VSMC ko/wt NOX1 TRATADAS COM QSOX1b RECOMBINANTE.



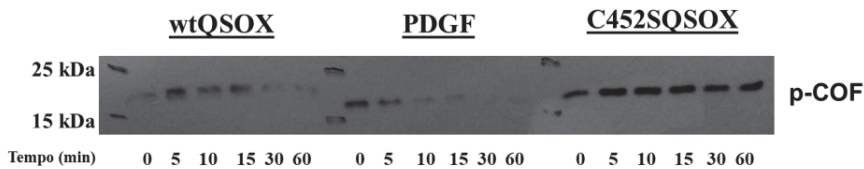
O H_2O_2 foi estimado através da fração inibida pela PEG-CAT (Δ fluorescência), que corresponde a diferença entre a fluorescência de DCF na presença ou ausência de PEG-CAT. Os níveis intracelulares de H_2O_2 foram medidos em células incubadas por 30 minutos with PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle). Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes ($*p < 0.05$) estão indicadas.

5.8 EFEITO DA PROTEÍNA QSOX1b NO REMODELAMENTO DO CITOESQUELETO DE ACTINA.

A dinâmica e a reorganização do citoesqueleto de actina são essenciais para a mudança no formato, na formação da polaridade, citocinese e migração celular. A cofilina é uma proteína-chave que liga estímulos extracelulares ao citoesqueleto de actina através da sua fosfo-regulação (POLLARD *et al.*, 2003; MIZUNO, 2013; LODISH *et al.*, 2014). Sabe-se que é um PDGF um indutor característico da de-fosforilação de cofilina (SAN MARTIN *et al.*, 2008), e isto foi observado já com 10 minutos em VSMC, quando foi verificada uma diminuição na expressão da proteína fosforilada. Interessantemente, foi observada a defosforilação da cofilina de maneira semelhante, mais evidente nas células tratadas com a proteína recombinante ativa em torno de 30 minutos. Este fato não foi observado nas células expostas à proteína mutada (FIGURA 38),

sugerindo que a atividade da QSOX influencia o remodelamento do citoesqueleto através da cofilina.

FIGURA 38 - DEFOSFORILAÇÃO DA COFILINA INDUZIDA PELA wtQSOX EM VSMC.

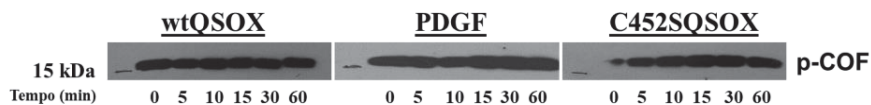


Extratos de VSMC foram separados por SDS-PAGE e submetidos à reação de *western blotting*. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-fosfo cofilina 1:500 (Santa Cruz) e com anticorpo anti-coelho 1:5000 (Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase. As membranas foram incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência e expostas a filme radiográfico.

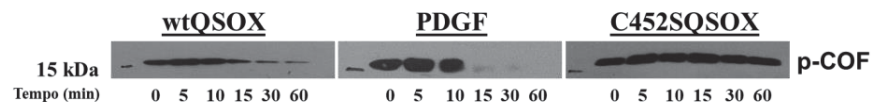
A cofilina vem sendo descrita como alvo da família fosfatase das Slingshots e em VSMCs, a isoforma SSH1 é apontada na via de ativação de cofilina pelo PDGF (MAHESWARANATHAN *et al.*, 2011). Desta forma, foi investigado se a QSOX1b estaria envolvida no processo de defosforilação da cofilina via fosfatase SSH1. Em ensaios realizados em células ko/wt SSH1, foi verificado que a ausência da proteína fosfatase não alterou a fosforilação da cofilina, ao contrário das células wild type (FIGURA 39).

FIGURA 39 - EFEITO DA INIBIÇÃO DA FOSFATASE *SLINGSHOT* 1 NA DEFOSFORILAÇÃO DA COFILINA INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE.

(A) ko SSH1



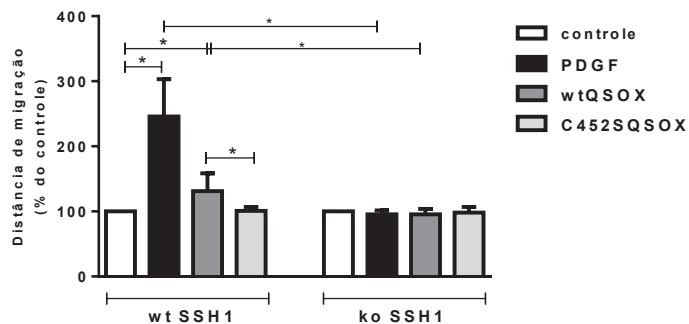
(B) wt SSH1



Extratos de MEF ko e wt SSH1 foram separados por SDS-PAGE e submetidos à reação de *western blotting*. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-fosfo cofilina 1:500 (Santa Cruz) e com anticorpo anti-coelho 1:5000 (Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase. As membranas foram incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência e expostas a filme radiográfico.

Esses dados ainda não são conclusivos devido à dificuldade de normalização através da expressão da proteína cofilina total. Mas, através de ensaios de migração com células ko e wt para SSH1, foi possível verificar o impacto da ausência da SSH1 na habilidade de VSMC se movimentar. Como mostrado na FIGURA 40, a ausência da fosfatase induziu uma significativa redução na migração em resposta ao PDGF e à wtQSOX. Este resultado confirma o papel da SSH1 na migração induzida pela atividade da proteína QSOX1b, possivelmente pela defosforilação da cofilina.

FIGURA 40 - EFEITO DA INIBIÇÃO DE SSH1 NA MIGRAÇÃO DE VSMC INDUZIDA PELA QSOX1b RECOMBINANTE.

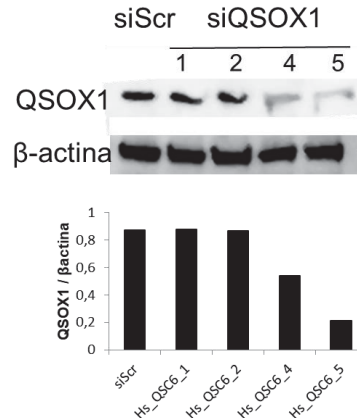


MEF ko e wt SSH1 carenciadas (SFB 0,1% *overnight*) foram submetidas ao ensaio de *Scratch* na presença de PDGF-BB 20 ng/mL, wtQSOX 50 nM, C452SQSOX 50 nM ou não tratadas (controle), em meio DMEM contendo SFB 0,1%. A distância de migração foi mensurada após 4 horas de exposição. Os dados mostrados são correspondentes a média \pm DP de 3 experimentos independentes, realizados em triplicatas. Diferenças estatísticas significantes (* $p < 0.05$) estão indicadas.

5.9 A AUSÊNCIA DA PROTEÍNA QSOX EM DIFERENTES TIPOS CELULARES DIMINUI MIGRAÇÃO.

Ensaio de silenciamento da expressão da proteína QSOX1 foram realizados para determinar se a ausência dessa proteína poderia afetar o processo de migração em células musculares lisas. Para isso foram testadas 4 sequências de siRNA QSOX1, cujas proteínas totais foram extraídas 48 horas após a transfecção dos siRNAs e separadas por SDS-PAGE. Foi observado que houve diminuição da expressão da proteína QSOX1 com as sequências 4 (em 30%) e 5 (em 76%) (FIGURA 41). A partir desse resultado, optamos por utilizar a sequência 5 nos nossos ensaios.

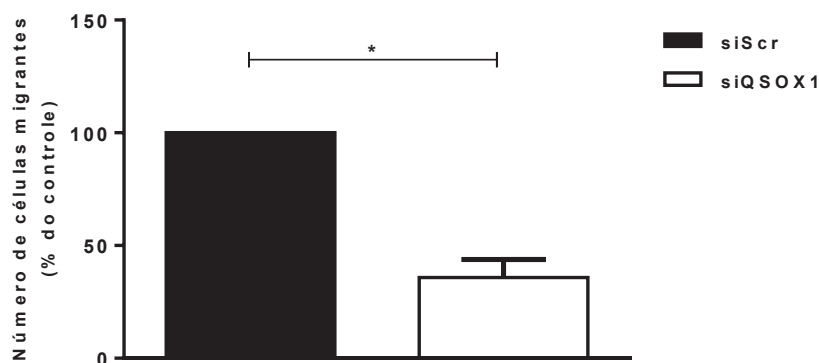
FIGURA 41 - SILENCIAMENTO GÊNICO DA QSOX1 MEDIADO POR siRNA.



Extratos proteicos celulares transfectados com siRNA *Scramble* ou siQSOX1 (de quatro seqüências iniciadoras diferentes) foram separados por SDS-PAGE e submetidos à reação de *western blotting*. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-QSOX 1:2000 (Sigma-Aldrich) e anti-coelho 1:5000 (Sigma-Aldrich) conjugado com peroxidase. Os resultados foram normalizados através da marcação de β -actina 1:5000 (Sigma-Aldrich) e anti-mouse 1:5000 (Sigma-Aldrich). As membranas foram incubadas com substrato adequado para reação de quimioluminescência (Millipore) e as imagens captadas por um scanner de alta resolução.

Nossos resultados demonstraram que a diminuição da expressão da proteína QSOX1 usando siRNA reduziu a migração em células musculares em aproximadamente 50% a migração de células musculares lisas humanas (HASMs) (FIGURA 42), demonstrando que a ausência da QSOX1 inibe migração basal.

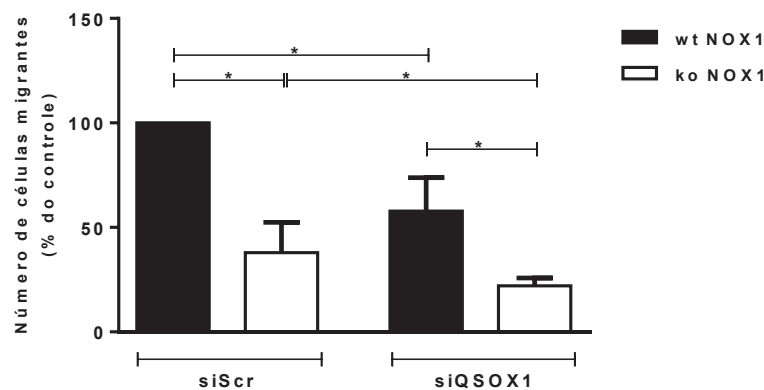
FIGURA 42 - A AUSÊNCIA DE QSOX1 DIMINUI MIGRAÇÃO EM HASMS.



As células foram transfectadas com siRNA *Scramble* ou siQSOX1. Após 48 horas, foram submetidas ao ensaio de *Transwell* por 4 horas. Imagens de 4 campos diferentes em magnitude de 4x foram capturadas e quantificadas por contagem de número de células (ImageJ). Os dados correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

Foi demonstrado anteriormente que a ausência da NOX1 prejudicou o processo de migração nas células expostas ao PDFG e à wtQSOX. O ensaio de migração quimiotático (*Transwell*) demonstrou uma significativa queda na migração das células ko NOX1, quando comparadas com as *wild type* (FIGURA 43). O silenciamento da QSOX1 nessas células inibiu parcialmente a migração em condições basais, indicando mais uma vez que essa proteína é requerida como suporte em processos de migração induzidos pela NOX1.

FIGURA 43 - QSOX1 DIMINUI MIGRAÇÃO EM VSMC NA PRESENÇA DA NOX1.



VSMC ko e wt NOX1 foram transfectadas com siRNA *Scramble* ou siQSOX1. Após 48 horas, foram submetidas ao ensaio de *Transwell* por 4 horas. Imagens de 4 campos diferentes em magnitude de 4x foram capturadas e quantificadas por contagem de número de células (ImageJ). Os dados correspondem a média \pm DP de 3 experimentos independentes realizados em triplicatas.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmaram que a QSOX1b produzida por *E. coli* induz migração e proliferação de VSMC por mecanismos dependentes e independentes de sua atividade sulfidril oxidase, respectivamente. O efeito pró-migratório dessa enzima registrado em nosso estudo foi verificado em 24 horas em VSMC expostas à recombinante selvagem, quando exibiram um aumento na taxa de migração. Já a enzima mutante inativa apresentou menor efeito migratório. A possibilidade de ser uma resposta proliferativa neste tempo foi excluída por ensaios de migração com o agente inibidor da síntese de DNA, a mitomicina. Entretanto, ao expor VSMC à proteína QSOX1b em maiores doses e por tempo prolongado (48 horas), foi possível observar que independente da atividade enzimática ambas as recombinantes induziram atividade mitogênica.

Os mesmos efeitos na migração e na proliferação ocorreram em ensaios realizados com QSOX1b superexpressa em células de mamíferos. Além disso, essa condição permitiu descartar a influência de possíveis artefatos do processo da transformação e expressão procariótica da QSOX1b recombinante como dobras indevidas, perda de glicosilação, a presença da etiqueta de Trx ou mesmo a ação de compostos bacterianos co-purificados. O fato de a atividade sulfidril oxidase ser necessária para a migração celular, mas não para a proliferação celular, indica que a sinalização QSOX1b ativa alvos celulares distintos assim como observado por BORGES *et al.*, 2015.

A ação catalítica da QSOX1 de troca tiol-dissulfeto para induzir migração e proliferação poderia resultar tanto da formação de H₂O₂ ou de dissulfetos celulares. Na superfície das membranas exofaciais existem proteínas funcionalmente importantes que contêm resíduos de cisteína com grupos sulfidrilas (-SH) livres, que são alvos para regulação redox (LARAGIONE *et al.*, 2003; SAN MARTÍN; GRIENGLING, 2010). Nossos dados não foram conclusivos quanto à capacidade da QSOX1b recombinante alterar o teor de tióis na superfície das VSMC. Entretanto, foi possível observar que nos tempos iniciais de exposição à proteína recombinante, tanto ativa ou inativa, houve uma tendência de oxidação na superfície das células seguido de aumento nos níveis de tióis, o que não está de acordo com o esperado devido à atividade sulfidril oxidase da QSOX1. Portanto, sugerimos que mais testes são necessários para confirmar esse resultado, entretanto, ressaltamos que esta alteração pode ocorrer pelo fato de as reações de oxi-redução em tióis protéicos serem facilmente reversíveis e catalisadas por proteínas dissulfeto oxidoreduases (LARAGIONE, 2003; SAHAF, 2005; SKALSKA; BERNSTEIN; BROOKES, 2010; LINDAHL, 2011).

Considerando que a proteína QSOX1b recombinante extracelular estimula a migração em VSMC de maneira semelhante ao PDFG, um indutor clássico do remodelamento vascular através do receptor tirosina-quinases β -PDGF (ASHINO *et al.*, 2013), o estímulo da QSOX1b para desencadear o processo poderia ser semelhante. Contudo, ao contrário do observado com PDFG, com o qual já foi possível verificar uma indução do processo migratório em meia hora, para a wtQSOX foi necessária uma exposição mais prolongada, ou seja, o estímulo precisa ser contínuo. Desta forma, o produto reacional da atividade catalítica da QSOX1, o peróxido de hidrogênio, passou a ser apontado como mensageiro secundário para mediar cascatas internas de

proteínas tirosino-quinases, conforme já descrito na via induzida por PDGF (VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016).

O peróxido de hidrogênio vem sendo fortemente apontado como mediador das vias de sinalização de células vasculares (CAI, 2005), pois sua meia vida é longa e sua reatividade é mais baixa do que outros ROS. O H₂O₂ pode induzir oxidação proteica, como modificações tiol, que alteram a ativação do estado das proteínas (GELLERT *et al.*, 2014; VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016; RENDONDO *et al.*, 2016). O equilíbrio entre a produção e o consumo do H₂O₂ são essenciais para ativação, manutenção e desfecho da sinalização redox. A superfície da membrana e sua permeabilidade são responsáveis pela quantidade de H₂O₂ que chegam ao espaço intracelular, onde é degradado por sistemas antioxidantes ou direcionado para realizar oxidação de proteínas alvo (SAN MARTÍN; GRIENDLING, 2010). Desta forma, os efeitos oxidantes do H₂O₂ podem estar relacionados com a sua localização intra ou extracelular (VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). Nossos dados preliminares indicam que o peróxido proveniente da reação da QSOX1b no meio extracelular pode ser gerado nesse ambiente e atravesse a membrana sendo recrutado internamente em cascatas sinalizadoras (SAN MARTIN *et al.*, 2010).

A modulação da sinalização induzida pela proteína recombinante QSOX1 extracelular passou a ser associada à ROS ao verificar um aumento da concentração intracelular de H₂O₂ em VSMC a partir de 30 minutos de exposição à esta enzima. Inibidores farmacológicos comprovaram que o H₂O₂ intracelular realmente é um importante mediador de migração em VSMC induzida pela QSOX1, assim como descrito para o PDGF, trombina e bFGF (SUNDARESAN *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2004; SCHROEDER *et al.*, 2007; PESCATORE *et al.*, 2012). A presença da enzima catalase conjugada a polietileno-glicol, associada à diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio intracelular, inibiu migração de PDGF e de wtQSOX, fato que não foi observado com a catalase não conjugada a PEG. A contribuição do H₂O₂ para a migração de VSMC também foi demonstrada com o aumento dos níveis do mesmo através da pré-incubação das células com PEG-SOD. Neste caso, a migração em VSMC mostrou-se potencializada em todos os tratamentos, mas mantendo em evidência a ação da recombinante ativa na indução do processo migratório.

Em relação ao ocorrido com a migração, nossos resultados divergiram quanto à proliferação de VSMC induzida por QSOX1b. A presença da catalase não afetou a atividade mitogênica de VSMC, mas quando as células foram tratadas com SOD foi observada uma

inibição nesse evento, colocando o ânion superóxido em evidência nesse processo. Foi demonstrado que a catalase inibe a proliferação induzida por PDGF, trombina e EGF (SUNDARESAN *et al.*, 1995; PATERSON *et al.*, 1999; SHI *et al.*, 2004). A produção de superóxido também foi associada a uma condição mitogênica, dados os efeitos inibitórios do Cu / Zn-SOD na proliferação de VSMC estimulada por xantina/xantina oxidase (Li *et al.*, 1997) e pelo EGF (Shi *et al.*, 2004). Já foi sugerido que a administração ou a superexpressão da SOD pode desequilibrar a capacidade celular de degradar H₂O₂ (como catalase e glutathione peroxidase), levando ao acúmulo dessa espécie reativa na célula. Desta forma, o efeito da SOD na proliferação seria dependente da dose (ou seja, pequenas doses de SOD inibem proliferação pela redução de O₂), enquanto que grandes doses podem não afetar ou até aumentar a proliferação celular (MITRA *et al.*, 2001).

ROS derivadas de NADPH oxidases têm sido mostradas como importantes moduladoras de vias de sinalização intracelulares (PESCATORE *et al.*, 2012; KUZMIN *et al.*, 2016; VALDIVIA; DURAN; SAN MARTIN, 2016). Nossos resultados demonstraram o envolvimento de NOX nas vias sinalizadoras de QSOX1, pois o uso de DPI inibiu os processos de migração e de proliferação induzidos por esta recombinante. Entretanto, a especificidade desse inibidor é ilimitada. Particularmente, DPI inibe uma variedade de flavoproteínas, incluindo oxido nítrico sintase endotelial, xantina oxidases e proteínas da cadeia transportadora de elétrons, além de NOX (Li *et al.*, 1997). O uso de um inibidor específico para NOX1 indicou este complexo sendo um importante requisito para a ação da QSOX1, assim como para o PDGF em VSMC. As isoformas NOX1 e NOX4 são as isoformas predominantes em células musculares lisas, bem como importantes origens de ROS envolvidas em processos sinalizadores patológicos (SAN MARTIN; GRIENGLING, 2010; PESCATORE *et al.*, 2012). É descrito que a ativação da NOX1 está envolvida na migração e na proliferação fisiopatológicas de VSMC estimuladas por fatores de crescimento, citocinas e agonistas vasoativos (GIMENEZ *et al.*, 2016; SCHRÖDER *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; ZIMMERMAN *et al.*, 2011), produzindo ânions superóxido, que dismutam ainda mais o peróxido de hidrogênio (DIKALOV *et al.*, 2008). De acordo com esses dados, a ausência de NOX1 afetou negativamente a migração de VSMC induzida pela enzima wtQSOX, bem como a produção de H₂O₂ nessas células.

A NOX1 é considerada uma das principais fontes do superóxido que medeia a sinalização provocada pelo PDGF e Ang II (LASSÈGUE *et al.*, 2001). A ausência de NOX1 em

células ou camundongos exibiram uma resposta proliferativa prejudicada em lesão arterial (LEE *et al.*, 2009). Além disso, estudos já demonstraram uma relação positiva entre a taxa proliferativa de VSMC com a expressão de NOX1 e com o nível de superóxido (DIKALOV *et al.*, 2008). No entanto, nossos dados mostraram que a proliferação de células com deficiência de NOX1 foi menor, mas não significativamente diferente da célula de controle wt NOX1, indicando que NOX1 pode não ser a fonte exclusiva de superóxido para transduzir sinais mitogênicos. De maneira semelhante, a proliferação de VSMC de aorta de animais ko NOX1 estimulada por Ang II não foi significativamente diminuída (GAVAZZI *et al.*, 2006), sugerindo que NOX1 não é essencial para a proliferação nesses animais. A incapacidade do C452SQSOX em aumentar os níveis de peróxido de hidrogênio nas células wt NOX1, com a capacidade concomitante de induzir a proliferação, está de acordo com ideia de que o superóxido pode ser produzido por fontes alternativas (LASSÈGUE *et al.*, 2001). Neste caso, é proposto que as células ko NOX1 possam ter utilizado essa fonte alternativa de superóxido ao proliferar de forma semelhante às células wt NOX1. Uma fonte alternativa é o superóxido gerado por mitocôndrias, pois já foi demonstrado que a inibição da atividade de Mn-SOD aumentou a proliferação de fibroblastos (SARSOUR *et al.*, 2008; LÓPEZ-ACOSTA *et al.*, 2018). Nesse contexto, a resposta celular causada pela ativação de NOX1 é determinada pela natureza química de cada estímulo, na localização subcelular de NOX1 e nos alvos das ROS produzidos (GIMENEZ *et al.*, 2016).

O PDGF é um dos principais estimulantes de migração em VSMC (LO *et al.*, 2012) relacionado à regulação de cascatas sinalizadoras por ROS. O peróxido de hidrogênio pode oxidar várias proteínas, resultando em maior mobilidade (SAN MARTIN; GRIENDLING, 2010). De fato, nossos resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que ao utilizar CAT, SOD e DPI foi observado um efeito inibidor de migração estimulada por esse fator de crescimento. É descrito também que o PDFG está envolvido na via de remodelamento do citoesqueleto de actina através da SSH1-cofilina (WILLIAMS *et al.*, 2012). Nossos dados preliminares demonstraram que a atividade da proteína QSOX1 pareceu estar envolvida nesta via, pois mostrou uma diminuição da expressão da proteína cofilina fosforilada (inativa) em VSMC. Além disso, células SSH1 KO apresentaram inibição do processo de migração. Neste caso, nossos dados sugerem que, conforme PDFG, a atividade oxidante da QSOX1 pode estar envolvida na oxidação de sítios reguladores de proteínas fosfatases que levam à ativação da cofilina.

Em VSMC, tem sido demonstrado que o efeito predominante do PDGF é na atividade da SSH1, cuja ativação já foi associada à oxidação da proteína 14-3-3 pelo peróxido de hidrogênio exógeno ou derivado de NOX1, interrompendo sua associação com a fosfatase SSH1 (KIM *et al.*, 2009). A SSH1L é ativada por auto-desfosforilação (MAHESWARANATHAN *et al.*, 2011), que aciona a de-fosforilação e ativação da cofilina e, finalmente, a migração celular. A cofilina também pode ser oxidada pelo peróxido de hidrogênio nos resíduos de cisteína, levando a uma atividade modificada (CAMERON *et al.*, 2015). Além disso, o peróxido de hidrogênio derivado de NOX1 estimula a fosforilação e ativação de JNK durante a migração de VSMC induzida por bFGF (SCHRÖDER *et al.*, 2007) e ativa p38 durante a migração de VSMC induzida por trombina (WANG *et al.*, 2004). Como alternativa, um estudo proteômico recente mostrou que o peróxido de hidrogênio pode regular positivamente os níveis de expressão de proteínas envolvidas na migração, como a subunidade 2 do complexo Arp2/3 da proteína relacionada à actina, por uma via dependente de NOX1 (AL GHOLEH *et al.*, 2013).

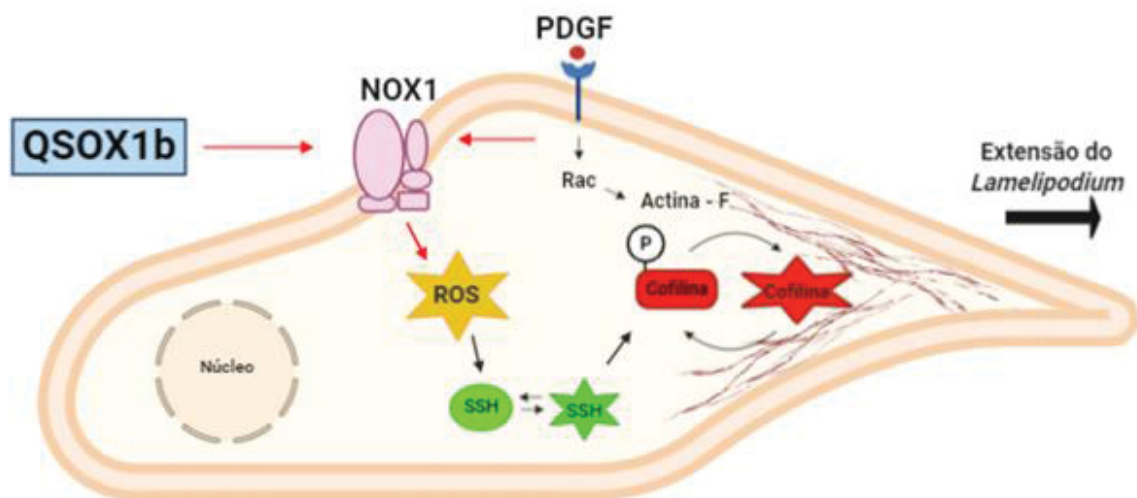
7. CONCLUSÃO

Com esse trabalho verificamos que a proteína QSOX1 recombinante extracelular está envolvida na sinalização redox dos processos de migração e proliferação de VSMC, entretanto, sua participação se dá por caminhos distintos.

A via migratória é desencadeada pela atividade da QSOX1b e depende do peróxido de hidrogênio derivado do superóxido de NOX1 (semelhante à via do PDGF), o qual pode estar oxidando proteínas reguladoras da fosfatase *Slingshot1*, que por sua vez ativa a proteína Cofilina (FIGURA 44).

A via mitogênica não depende da atividade da oxidase QSOX1b, nem do peróxido de hidrogênio, mas do superóxido, cuja fonte não é exclusivamente NOX1.

FIGURA 44. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA POSSÍVEL ATIVAÇÃO DA VIA SLINGSHOT1-COFILINA PELA ATIVIDADE DA PROTEÍNA QSOX1b EM VSMC



FONTE: O autor (2019).

REFERÊNCIAS

- AEBI H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, n.105, p.121-6.1984.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 6th ed. New York: Garland Science, 2015.
- AL GHOULEH, I.; RODRÍGUEZ, A.; PAGANO, P.J.; CSÁNYI, G. Proteomic analysis identifies an NADPH oxidase 1 (Nox1)-mediated role for actin-related protein 2/3 complex subunit 2 (ARPC2) in promoting smooth muscle cell migration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p.20220-35. out. 2013.
- 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.
- ARAÚJO, D. G.; NAKAO, L.; GOZZO, P.; SOUZA, C. D.; BALDERRAMA, V.; GUGELMIN, E. S.; KUCZYNSKI, A. P.; OLANDOSKI, M.; DE NORONHA, L. Expression level of quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. **European Journal Histochemistry**, v. 58, n. 1, p. 2228, 6 mar. 2014.
- ASHINO, T.; YAMAMOTO, M.; YOSHIDA, T.; NUMAZAWA, S. Redox-Sensitive Transcription Factor Nrf2 Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Neointimal Hyperplasia. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 33, p. 760-768, abr. 2013.
- BAGULHO, A.; VILAS-BOAS, F.; PENA, A.; PENEDA, C.; SANTOS, F.C.; JERÓNIMO, A.; DE ALMEIDA, R.F.; REAL, C. The extracellular matrix modulates H₂O₂ degradation and redox signaling in endothelial cells. **Redox Biology**, v. 6, p. 454-768, set. 2015.
- BECKMAN, J.S.; MINOR JR, R.L.; WHITE, C.W.; REPINE, J.E.; ROSEN, G.M.; FREEMAN, B.A. Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6884-92, 15 Mai. 1988.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, n.1, p.245-313, jan.2007.
- 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.
- BORGES, B.E.; APPEL, M.H.; COFRÉ, A.R.; PRADO, M.L.; STECLAN, C.A.; ESNARD, F.; ZANATA, S.M.; LAURINDO, F.R.; NAKAO, L.S. The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 7, p. 1334-46, jul. 2015. 44

- BROWN, R.A.; SHANTSILA, E.; VARMA, C.; LIP, G.Y. Current Understanding of Atherogenesis. **The American journal of medicine**, v.130, n.3, p.268-282, mar.2017.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n.1, p. 26-36, out. 2005.
- CAMERON, J. M.; GABRIELSEN, M.; CHIM, Y.H.; MUNRO, J.; MCGHEE, E.J.; SUMPTON, D.; EATON, P.; ANDERSON, K.I.; YIN, H.; OLSON, M.F. Polarized cell motility induces hydrogen peroxide to inhibit cofilin via cysteine oxidation. **Current Biology**, v.25, n.11, p.1520-5, jun. 2015.
- CAMPELLONE, K.G.; WELCH, M.D. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. **Nature Reviews: Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 237-251, 11 Abr. 2010.
- CAO, L.; LIU, J.; ZHANG, L.; XIAO, X.; LI, W. Curcumin inhibits H₂O₂-induced invasion and migration of human pancreatic cancer via suppression of the ERK/NF- κ B pathway. **Oncology Reports**, v.4 p. 2245-2251, out. 2016.
- CARAMORI, P. R.; YAMAMOTO, G. I.; ZAGO, A. J. Postangioplasty restenosis. Physiopathogeny. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 69, n. 2, p. 141–50, ago. 1997.
- 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.
- COPPOCK, D. L.; CINA-POPPE, D.; GILLERAN, S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**, v. 54, n. 3, p. 460–8, 15 dez. 1998.
- COPPOCK, D. L.; KOPMAN, C.; SCANDALIS, S.; GILLERAN, S. Preferential Gene Expression in Quiescent Human Lung Fibroblast. **Cell Growth & Differentiation**, v. 4, n. June, p. 483–493, 1993.
- COPPOCK, D. L.; THORPE, C.; LIEBERT, M. A. 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. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. In vitro **Cellular & Developmental Biology**, 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.
- DIKALOV, S.I.; DIKALOVA, A.E.; BIKINEYEVA, A.T.; SCHMIDT, H.H.; HARRISON, D.G.; GRIENGLING, K.K. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-

stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, n.9, p.1340-51, nov.2008.

DE REZENDE, F.F.; MARTINS, A. L.; NILAND, S.; WITTIG, I.; HEIDE, H.; SCHRÖDER, K.; EBLE, J.A. Integrin $\alpha7\beta1$ is a redox-regulated target of hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cell adhesion. **Free radical biology & medicine**, v. 53, n.3, p.521-31, ago. 2012.

FERNS, G. A; AVADES, T. Y. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 81, n. 2, p. 63–88, abr. 2000.

FOMENKO, D. E.; GLADYSHEV, V. N. Comparative genomics of thiol oxidoreductases reveals widespread and essential functions of thiol-based redox control of cellular processes. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 3, p. 193–201, 1 fev. 2012.

FUKAI, M.U.; ALEXANDER, R.W.; AKERS, M.; GRIENDLING, K.K. p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, n.24, p.15022-9, jun. 1998.

GARCÍA-REDONDO, A.B.; AGUADO, A.; BRIONES, A.M.; SALAICES, M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**, v. 114, p. 110-120, out. 2016.

GAT, Y.; VARDI-KILSHAIN, A.; GROSSMAN, I.; MAJOR, D.T.; FASS, D. Enzyme structure captures four cysteines aligned for disulfide relay. **Protein Science**, n.8, p.1102-12, ago,2014.

GAVAZZI, G.; BANFI, B.; DEFFERT, C.; FIETTE, L.; SCHAPPI, M.; HERRMANN, F.; KRAUSE, K.H. Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. **FEBS Letters**. v.580, n.2, p.497-504m jan. 2006.

GEHRMANN, W.; ELSNER, M. A specific fluorescence probe for hydrogen peroxide detection in peroxisomes. **Free Radical Research**, v. 45, n. 5, p. 501-506, mai. 2011.

GELLERT, M.; HANSCHMANN, E. M.; LEPKA, K.; BERNDT, C.; LILLIG, C. H. Redox regulation of cytoskeletal dynamics during differentiation and de-differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.030>

GIMENEZ, M.; SCHICKLING, B.M.; LOPES, L.R.; MILLER, F.J. JR. Nox1 in cardiovascular diseases: regulation and pathophysiology. **Clinical Science (Lond)**, v.130, n.3, p.151-65, fev. 2016.

GÓMEZ, V.M.; CASTILLO, P.M.; CASTILLO, V.E. Cell signaling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism. **Cirurgia y cirurjanos**, v.83, n.2, p.165-74, mar. 2015.

GRÜNTZIG, A.; SCHNEIDER, H. J. The percutaneous dilatation of chronic coronary stenoses--experiments and morphology. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 107, n. 44, p. 1588, 5 nov. 1977.

HAN, Z.; VARADHARAJ, S.; GIEDT, R.J.; ZWEIER, J.L.; SZETO, H.H.; ALEVRIADOU, B.R. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate heme oxygenase-1 expression in sheared endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.329, n.1, p.94-101, 2009.

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. 2008a.

HELLEBREKERS, D. M.; MELOTTE, V.; VIRÉ, E.; LANGENKAMP, E.; MOLEMA, G.; FUKS, F.; HERMAN, J. G.; VAN CRIEKINGE, W.; GRIFFIOEN, A. W. VAN ENGELAND, M. Identification of epigenetically silenced genes in tumor endothelial cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4138–48, 1 maio 2007.

HOBBS, A. G.; MITCHELL, L. E.; ARRINGTON, M. E.; GUNAWARDENA, H. P.; DE CRISTO, M. J.; LOESER, R. F.; CHEN, X.; COX, A. D.; CAMPBELL, S. L. Redox regulation of Rac1 by thiol oxidation. **Free Radical Biology and Medicine** (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.09.027i>

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**, v. 341, n. 6141, p. 74–6, 5 jul. 2013.

INSALL, R. H.; MACHESKY, L. M. Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. **Developmental Cell**, v. 17, n. 3, p. 310-322, set. 2009.

ISRAEL, B. A.; JIANG, L.; GANNON, S. A.; THORPE, C. Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 69, p. 129-135, abr. 2014.

JAJE, J.; ALON, A.; GROSSMAN, I.; HOROWITZ, B.; KARTVELISHVILY, E.; COHEN, S. R.; FASS, D. A Flavin-dependent Sulfhydryl Oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, v. 46, n. 45, p. 13031–13040, 2007.

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**, v. 9, n. 12, p. 1621–31, dez. 2011.

KATCHMAN, B. A.; OCAL, I. T.; CUNLIFFE, H. E.; CHANG, Y. H.; HOSTETTER, G.; WATANABE, A.; LOBELLO, J.; LAKE, D. F. Expression of quiescin sulfhydryl oxidase 1 is associated with a highly invasive phenotype and correlates with a poor prognosis in Luminal B breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. R28, 28 mar. 2013.

- KIM, J.S.; HUANG, T.Y.; BOKOCH, G.M. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. **Molecular Biology of the Cell**, v.20, n.11, p. 2650-60, jun. 2009.
- KIRSCHENLOHR, H.L.; METCALFE, J.C.; GRAINGER, D.J. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. **Methods in Molecular Medicine**, v. 2, p. 319-34, 1996.
- KODALI, V. K.; THORPE, C. Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 8, p. 1217–30, out. 2010.
- KUMAR, V.; ALI, M.J.; RAMACHANDRAN, C. Effect of mitomycin-C on contraction and migration of human nasal mucosa fibroblasts: implications in dacryocystorhinostomy. **The British Journal of Ophthalmology**, v. 99, n.9, p. 1295-1300, set. 2015.
- LASSÈGUE, B.; SORESCU, D.; SZÖCS, K.; YIN, Q.; AKERS, M.; ZHANG, Y.; GRANT, S.L.; LAMBETH, J.D.; GRIENGLING, K.K. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. **Circulation Research**, v.88, n.9, p.888-94, mai.2001.
- 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 Sciences of U S A**, v. 100, n. 25, p. 14737-14741, dez. 2003
- LASSÈGUE, B.; SAN MARTÍN, A.; GRIENGLING, K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. **Circulation Research**, v.110, n.10, p. 1364-90, mai. 2012.
- LEE, M.Y.; SAN MARTIN, A.; MEHTA, P.K.; DIKALOVA, A.E.; GARRIDO, A.M.; DATLA, S.R.; LYONS, E.; KRAUSE, K.H.; BANFI, B.; LAMBETH, J.D.; LASSÈGUE, B.; GRIENGLING, K.K. Mechanisms of vascular smooth muscle NADPH oxidase 1 (Nox1) contribution to injury-induced neointimal formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.29, n.4, p.480-7, abr.2009.
- LEITE, P. F.; LIBERMAN, M.; DE BRITO, F. S.; LAURINDO, F. R. Redox processes underlying the vascular repair reaction. **World Journal of Surgery**, v. 28, n. 3, p. 331–6, mar. 2004.
- LENNICKE, C.; RAHN, J.; LICHTENFELS, R.; WESSJOHANN, L.A.; SELIGER, B. Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. **Cell Communication and Signaling**, v13, n. 39, p. 23-36. Set. 2015.
- LI, P.F.; DIETZ, R.; VON HARSDORF, R. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. **Circulation**. 1997 Nov 18;96(10):3602-9.

- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-33, 1 mar. 2007.
- LINDAHL, M.; MATA-CABANA, A.; KIESELBACH, T. The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 12, p. 2581-2642, 31 mar. 2011.
- LIMOR-WAISBERG, K.; BEN-DOR, S.; FASS, D. Diversification of quiescin sulphydryl oxidase in a preserved framework for redox relay. **BMC evolutionary biology**, v. 13, n. 1, p. 70, jan. 2013.
- LO, H.M.; TSAI, Y.J.; DU, W.Y.; TSOU, C.J.; WU, W.B. A naturally occurring carotenoid, lutein, reduces PDGF and H₂O₂ signaling and compromised migration in cultured vascular smooth muscle cells. **Journal of Biomedical Science**, v.19, n.18, doi: 10.1186/1423-0127-19-18, fev. 2012.
- LODISH, H.; BERK, A.; KAISER, C. A. *Biologia celular e molecular*, p. 778-793, 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- LÓPEZ-ACOSTA. O.; DE LOS ANGELES, M. F. B.; BARRIOS-MAYA, M.A.; RAMÍREZ, A.R.; AGUILAR, F.J.A.; EL-HAFIDI, M. Reactive Oxygen Species from NADPH Oxidase and Mitochondria Participate in the Proliferation of Aortic Smooth Muscle Cells from a Model of Metabolic Syndrome. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, dez. 2018:5835072.
- LU, Q.B.; WAN, M.Y.; WANG, P.Y.; ZHANG, C.X.; XU, D.Y.; LIAO, X.; SUN, H.J. Chicoric acid prevents PDGF-BB-induced VSMC dedifferentiation, proliferation and migration by suppressing ROS/NFκB/mTOR/P70S6K signaling cascade. **Redox Biology**. n.14, p.656–668, abr, 2018.
- MAGALHAES, T.; BRACKNEY, D. E.; BEIER, J. C.; FOY, B. D. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulphydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. **Archives of Insect Biochemistry Physiology**, v. 68, n. 3, p. 134-143, jul. 2008.
- MAIRET-COELLO, G.; TURY, A.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; RISOLD, P. Y.; GRIFFOND, B. FAD-linked sulphydryl 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 mai. 2004.
- MATSUBA, S.; SUGA, Y.; ISHIDOH, K.; HASHIMOTO, Y.; TAKAMORI, K.; KOMINAMI E.; WILHELM, B.; SEITZ, J.; OGAWA, H. Sulphydryl 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.
- MIZUNO, K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. **Cellular Signalling**, v. 25, p. 457–469, 2013.

MOEN, R. J.; CORNEA, S.; OSEID, D. E.; BINDER, B. P.; KLEIN, J. C.; THOMAS, D. D. Redox-sensitive residue in the actin-binding interface of myosin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 3, p. 345–349, 24 out. 2014.

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, nov. 2007.

MUSARD, J. F.; SALLOT, M.; DULIEU, P.; FRAÎCHARD, 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.

MUTO, A.; FITZGERALD, T.N.; PIMIENTO, J.M.; MALONEY, S.P.; TESO, D.; PASZKOWIAK, J.J.; WESTVIK, T.S.; KUDO, F.A.; NISHIBE, T.; DARDIK, A. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. **Journal of Vascular Surgery**, v. 45, p. 15-24A, jun. 2007.

NOFER, J.-R.; BRODDE, M. F.; KEHREL, B. E. High-density lipoproteins, platelets and the pathogenesis of atherosclerosis. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 37, n. 7, p. 726–35, jul. 2010.

OHASHI, K. Roles of cofilin in development and its mechanisms of regulation. **Development, Growth and Differentiation**. v. 57, p.275–290, 2015.

OWENS, G.K.; KUMAR, M.S.; WAMHOFF, B.R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. **Physiological Review**, v. 84, n.3, p.767-801. Jul. 2004.

SUN, Y.; LIU, W.Z.; LIU, T.; FENG, X.; YANG, N.; ZHOU, H.F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v.35, n.6, p.600-4. 2015.

MAHESWARANATHAN, M.; GOLE, H.K.; FERNANDEZ, I.; LASSÈGUE, B.; GRIENDLING, K.K.; SAN MARTÍN, A. Platelet-derived growth factor (PDGF) regulates Slingshot phosphatase activity via Nox1-dependent auto-dephosphorylation of serine 834 in vascular smooth muscle cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, n.41, p.35430-7, out.2014.

MAZUREK, R.; DAVE, J.M.; CHANDRAN, R.R.; MISRA, A.; SHEIKH, A.Q.; GREIF, D.M. Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. **Advances in Pharmacology**, n. 78, p.323-350. 2017.

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, jun. 1980.

- OUYANG, X.; DEWEESE, T. L.; NELSON, W. G.; ABATE-SHEN, C. Loss-of-Function of Nkx3 . 1 Promotes Increased Oxidative Damage in Prostate Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 65, n. 15, p. 6773–6779, 2005.
- PATTERSON, C.; RUEF, J.; MADAMANCHI, N.R.; BARRY-LANE, P.; HU, Z.; HORAIST, C.; BALLINGER, C.A.; BRASIER, A.R.; BODE, C.; RUNGE, M.S. Stimulation of a vascular smooth muscle cell NAD(P)H oxidase by thrombin. Evidence that p47(phox) may participate in forming this oxidase in vitro and in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.28, p.19814-22, jul.1999.
- 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**, v.14, n.5, p.136, 25 out. 2012.
- PESCATORE, L. A.; BONATTO, D.; FORTI, F. L.; SADOK, A.; KOVACIC, H.; LAURINDO, F. R. Protein Disulfide Isomerase Is Required for Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration, Nox1 NADPH Oxidase Expression, and RhoGTPase Activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, n35, p. 29290-29300, 24 ago. 2012.
- POLLARD, T. D.; BORISY, G. G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell**, v. 112, p. 453–465, 21 fev. 2003.
- POON, R.Y. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. **Methods in Molecular Biology**, n.1342, p.3-19, 2016.
- 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.
- RADOM, J.; COLIN, D.; THIEBAULT, F.; DOGNIN-BERGERET, M.; MAIRET-COELLO, G.; ESNARD-FEVE, A.; FELLMANN, D.; JOUVENOT, M. Identification and expression of a new splicing variant of FAD-sulfhydryl oxidase in adult rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1759, n. 5, p. 225–33, maio 2006.
- 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.
- RENNA, N.F.; DE LAS HERAS, N.; MIATELLO, R.M. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. **International Journal of Hypertension**. v.2013, jul.2013.
- RUDOLF, J.; PRINGLE, M. A; BULLEID, N. J. Proteolytic processing of QSOX1A ensures efficient secretion of a potent disulfide catalyst. **The Biochemical Journal**, v. 454, n. 2, p. 181–90, 1 set. 2013.

SAN MARTIN, A.; LEE, M.Y.; WILLIAMS, H.C.; MIZUNO, K.; LASSÈGUE, B.; GRIENGLING, K.K. Dual regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot-1L phosphatase controls platelet-derived growth factor-induced migration of human aortic smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 102, n.4, p. 432-438, 29 fev. 2008.

SAN MARTÍN, A.; GRIENGLING, K.K. Redox control of vascular smooth muscle migration. **Antioxidants Redox Signaling**, v. 12, n.5, p.625-640, mar. 2010.

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 Biophysics**, v. 434, n. 1, p. 26-32, 1 Fev. 2005.

SARSOUR, E.H.; VENKATARAMAN, S.; KALEN, A.L.; OBERLEY, L.W.; GOSWAMI, P.C. Manganese superoxide dismutase activity regulates transitions between quiescent and proliferative growth. **Aging Cell**, v.7, n.3, p.405-17, jun.2008.

SCHROEDER, K.; HELMCKE, I.; PALFI, K.; KRAUSE, K.H.; BUSSE, R.; BRANDES, R.P. Nox1 Mediates Basic Fibroblast Growth Factor-Induced Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 27, p. 1736-1743, 2007.

SCHWARTZ, C.J.; VALENTE, A.J.; SPRAGUE, E.A.; KELLEY, J.L.; NEREM, R.M. The pathogenesis of atherosclerosis: an overview. **Clinical Cardiology**, v. 14, n. 2 Suppl 1, p. 11-16, fev. 1991.

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

SHI, M.; YANG, H.; MOTLEY, E.D.; GUO, Z. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase and/or catalase in mice inhibits aorta smooth muscle cell proliferation. **American Journal of Hypertension**, v.17, n.5 Pt 1, p.450-6, mai, 2004.

SIMPER, D.; MAYR, U.; URBICH, C.; ZAMPETAKI, A.; PROKOPI, M.; DIDANGELOS, A.; SAJE, A.; MUELLER, M.; BENBOW, U.; NEWBY, A. C.; APWEILER, R.; RAHMAN, S.; DIMMELER, S.; XU, Q.; MAYR, M. Comparative proteomics profiling reveals role of smooth muscle progenitors in extracellular matrix production. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 7, p. 1325-32, jul. 2010.

SKALSKA, J.; BERNSTEIN, S.; BROOKES, P. Measurement of extracellular (exofacial) versus intracellular protein thiols. **Methods in Enzymology**, v. 474, p. 149-164, jun. 2010.

VAN VARIK, B.J.; RENNENBERG, R.J.M.W.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KROON, A.A.; DE LEEUW, P.W.; SCHURGERS, L.J. Mechanisms of arterial remodeling: lessons from genetic diseases. **Frontiers in Genetics**, v.3, p.290, dez. 2012.