

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO
CELULAR INDUZIDA PELA QSOX1b

CURITIBA

2023

PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA MIGRAÇÃO
CELULAR INDUZIDA PELA QSOX1b

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, 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 S. Nakao

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Martinez Huamani, Pierina Alexandra

Caracterização dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pela QSOX1b / Pierina Alexandra Martinez Huamani. – Curitiba, 2023.
1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Pro^{fa} Dr^a Lia S. Nakao.

1. Movimento celular. 2. Endocitose. 3. Cavéolas. 4. Fibroblastos. 5. Quiescina/sulfidril oxidase. I. Nakao, Lia Sumie. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. III. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **PIERINA ALEXANDRA MARTINEZ HUAMANI** intitulada: **Caracterização dos mecanismos envolvidos na migração celular induzida pela QSOX1b**, sob orientação da Profa. Dra. LIA SUMIE NAKAO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 30 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

04/04/2023 17:24:10.0

LIA SUMIE NAKAO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/04/2023 17:14:26.0

VANESSA MORAIS FREITAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

05/04/2023 10:46:22.0

FERNANDA FOGAGNOLI SIMAS

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

04/04/2023 17:07:52.0

HELOISA SOBREIRO SELISTRE DE ARAUJO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

Assinatura Eletrônica

05/04/2023 10:42:15.0

AXEL HELMUT RULF COFRÉ

Avaliador Externo (FUNDACAO OSWALDO CRUZ)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: ppbiocel@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal [Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015](#).

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 272774

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppq.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 272774

Dedicado a Paulinita e Mathías, meus maiores exemplos de força, fé e perseverança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser a minha fonte de força, paz, sabedoria e amor.

Agradeço aos meus pais Nelly e Titto, pelo apoio, conselhos e cuidados cheios de amor. Por demonstrar-me que mesmo longe, sempre estão junto comigo.

Agradeço à minha família e amigos no Peru pelos bons desejos, pelo afeto e carinho.

Agradeço à minha família em Curitiba, pela companhia incondicional nos momentos bons, mas principalmente nos mais difíceis.

Agradeço à minha orientadora, por confiar em mim e apoiar esse projeto e todos os obstáculos que teve no caminho. Pelos ensinamentos, amizade e suporte no longo de todos esses anos.

Agradeço aos professores do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox, pela colaboração, conselhos e ensinamentos científicos.

Agradeço às minhas amigas, amigos e colegas do laboratório, aos que saíram e aos que permanecem, pela companhia, risadas, conselhos e suporte na nossa luta diária na vida acadêmica.

Agradeço a todas as instituições e órgãos de fomento que contribuíram no desenvolvimento desse projeto. À CAPES e ao PPG de Biologia Celular e Molecular pela bolsa e pela oportunidade de fazer o doutorado. Ao CTAF pela disponibilização do microscópio confocal. À Fundação Araucária pela bolsa de apoio técnico nos últimos meses do doutorado.

Agradeço aos membros da banca, por ter aceitado o convite e ter contribuído na melhora desse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira foram parte dessa etapa.

RESUMO

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoproteína predominantemente secretada (isoforma b) que contribui na montagem da matriz extracelular e regulação de proteínas como laminina, fibronectina e colágeno. Também modula a proliferação, migração e adesão de células tumorais, células musculares lisas e fibroblastos, sugerindo que pode atuar como promotor ou supressor de tumores, marcador tumoral, marcador de insuficiência cardíaca e regulador da função vascular. Nosso grupo mostrou, previamente que QSOX1b induz a proliferação e migração de células musculares lisas de aorta, através de superóxido e peróxido de hidrogênio intracelulares, respectivamente. Porém os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos continuam desconhecidos. Neste trabalho, utilizando imunofluorescência indireta e western blot foi avaliada a internalização de QSOX1b recombinante. Através da técnica de scratch foi avaliada a migração celular induzida pela QSOX1b recombinante endocitada e foram utilizados inibidores da endocitose para caracterizar esse processo. As imagens adquiridas por microscopia confocal mostraram uma rápida internalização da QSOX1b recombinante selvagem e mutada e a co-localização com EEA1 e Rab5, mas não com Rab7, indicando a presença da QSOX1b nos endossomos iniciais, mas não nos endossomos tardios. Os ensaios de scratch evidenciaram que a incubação com 500 nM de QSOX1b recombinante endocitada durante 30 minutos foi suficiente para induzir a migração celular nas próximas 24 horas. A inibição da endocitose mediada por caveola com metil- β -ciclodextrina ou com silenciamento gênico da caveolina 1, diminuiu drasticamente o efeito pró-migratório da QSOX1b selvagem. Esse efeito também foi confirmado por imunofluorescência, observando-se que QSOX1b recombinante ficou restrita à superfície celular após a inibição química ou gênica da endocitose. Como detectamos que QSOX1b colocaliza com Nox1, e de acordo com dados previamente publicados, aqui propomos que QSOX1 pode ser endocitada e internalizada com Nox1 e ativar Nox1 nos endossomos levando à produção de espécies reativas de oxigênio que possam promover a migração celular. Nossos dados não só proporcionam informação nova sobre a localização endossomal de QSOX1b, mas também apresentam um novo mecanismo regulador da migração celular.

Palavras-chave: Migração celular. Quiescina/sulfidril oxidase. Endocitose. Caveola. Nox1. Fibroblastos.

ABSTRACT

Quiescin/sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) is a predominantly secreted flavoprotein (isoform b) that contributes to the assembly of the extracellular matrix and regulation of proteins such as laminin, fibronectin and collagen. It also modulates the proliferation, migration and adhesion of tumor cells, smooth muscle cells and fibroblasts, suggesting that it may act as a tumor promoter or suppressor, tumor marker, heart failure marker and vascular function regulator. Our group previously showed that QSOX1b induces the proliferation and migration of aortic smooth muscle cells through intracellular superoxide and hydrogen peroxide, respectively. However, the molecular mechanisms involved in these processes remain unknown. In this work, using indirect immunofluorescence and western blot, the internalization of recombinant QSOX1b was evaluated. Through the scratch assay, cell migration induced by endocytosed recombinant QSOX1b was evaluated and endocytosis inhibitors were used to characterize this process. Images acquired by confocal microscopy showed rapid internalization of wild-type and mutant recombinant QSOX1b and co-localization with EEA1 and Rab5, but not Rab7, indicating the presence of QSOX1b in early endosomes but not in late endosomes. Scratch assays showed that incubation with 500 nM endocytosed recombinant QSOX1b for 30 minutes was sufficient to induce cell migration in the next 24 hours. Inhibition of caveola-mediated endocytosis with methyl- β -cyclodextrin or caveolin 1 gene knockdown, dramatically decreased the pro-migration effect of wild-type QSOX1b. This effect was also confirmed by immunofluorescence, showing that recombinant QSOX1b was restricted to the cell surface after chemical or gene inhibition of endocytosis. As we detected that QSOX1b colocalizes with Nox1, and in accordance with previously published data, here we propose that QSOX1 can be endocytosed and internalized with Nox1 and activate Nox1 in endosomes leading to the production of reactive oxygen species that can promote cell migration. Our data not only provide new information about the endosomal localization of QSOX1b, but also present a new regulatory mechanism of cell migration.

Keywords: Cell migration. Quiescin/sulfhydryl oxidase. Endocytosis. Caveola. Nox1. Fibroblasts.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS LONGA E CURTA DA QSOX1.....	18
FIGURA 2. FLUXO DE EQUIVALENTES REDUTORES NOS CENTROS REDOX EM QSOX	19
FIGURA 3. TRÁFEGO ENDOCÍTICO.....	25
FIGURA 4. ENDOCITOSE EM MACROESCALA	26
FIGURA 5. ENDOCITOSE EM MICROESCALA.....	28
FIGURA 6. MECANISMO DE SINALIZAÇÃO NOS REDOXOSSOMOS.....	30
FIGURA 7. REAÇÕES DO MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE.....	33
FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DO ENSAIO DO SCRATCH.....	38
FIGURA 9. ESQUEMA DA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS REDOX-ATIVAS ATRAVÉS DE ELETROFORESES BIDIMENSIONAL DIAGONAL	43
FIGURA 10. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TÉCNICA DE ELETROFORESES BIDIMENSIONAL DIAGONAL.....	43
FIGURA 11. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1B (SELVAGEM E MUTADA)	45
FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE H ₂ O ₂ PELA OXIDAÇÃO DE DTT PELAS ENZIMAS QSOX1B SELVAGEM E QSOX1B MUTADA.....	46
FIGURA 13. CÉLULAS MUSCULARES LISAS OBTIDAS DE AORTA DE RATO.....	47
FIGURA 14. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1B RECOMBINANTE NAS VSMC.....	49
FIGURA 15. SECREÇÃO DE QSOX1B-HA SELVAGEM E MUTADA NO MEIO DE CULTIVO	50
FIGURA 16. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1B SECRETADA.....	51
FIGURA 17. PRESENÇA DE QSOX1B RECOMBINANTE LIGADA NA MEMBRANA CELULAR CONFIRMADA POR WESTERN BLOT	52
FIGURA 18. EFEITO PROLIFERATIVO DE QSOX1B RECOMBINANTE NAS CÉLULAS L929.....	54
FIGURA 19. EFEITO MIGRATÓRIO DE QSOX1B RECOMBINANTE NAS CÉLULAS L929.....	55
FIGURA 20. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1B RECOMBINANTE NOS FIBROBLASTOS L929.....	56
FIGURA 21. DETECÇÃO DE QSOX1B RECOMBINANTE INTERNALIZADA NOS FIBROBLASTOS L929.....	57
FIGURA 22. DETECÇÃO DE QSOX1B RECOMBINANTE NA SUPERFÍCIE DOS FIBROBLASTOS L929 EM 4 °C.....	57
FIGURA 23. DETECÇÃO DE QSOX1B RECOMBINANTE EM LISADO CELULAR... 58	
FIGURA 24. LOCALIZAÇÃO DE QSOX1B SELVAGEM E MUTADA NOS ENDOSSOMOS.....	59
FIGURA 25. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1B ENDOCITADA.....	60
FIGURA 26. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1B APÓS INIBIÇÃO DE ENDOCITOSE	62

FIGURA 27. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1B APÓS INIBIÇÃO COM METIL-B-CICLODEXTRINA.....	63
FIGURA 28. INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1B NA PRESENÇA DE METIL-B-CICLODEXTRINA	64
FIGURA 29. QSOX1B CO-LOCALIZA COM CAVEOLINA 1	65
FIGURA 30. QSOX1B NÃO CO-LOCALIZA COM CLATRINA	65
FIGURA 31. INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO MEDIADA POR QSOX1B APÓS SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1.....	66
FIGURA 32. EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1 NA MIGRAÇÃO CELULAR	67
FIGURA 33. INIBIÇÃO DA ENDOCITOSE DE QSOX1B APÓS SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1	68
FIGURA 34. CO-LOCALIZAÇÃO DE QSOX1B COM NOX1	69
FIGURA 35. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS OXIDADAS PELA QSOX1B SELVAGEM	70
FIGURA 36. EXPRESSÃO DE ALFA-ACTINA DE MUSCULO LISO APÓS ESTIMULO COM QSOX1B RECOMBINANTE.....	71
FIGURA 37. MECANISMO DE INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR MEDIADA POR ENDOCITOSE DA QSOX1B	77

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
ALR	<i>Augmenter of Liver Regeneration</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAV-1	Caveolina 1
CxxC	Motivo de cisteínas
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DTT	Ditiotreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
Ero	<i>Endoplasmic reticulum oxidase</i>
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Erv	<i>Essencial for Respiration and Viability</i>
FAD	Flavina-adenina dinucleotídeo
FMT	Transição fibroblasto-miofibroblasto
HA	Hemaglutinina
His	Histidina
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRR	Região rica em hélices
HVA	<i>Homovanilic acid</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
kDa	kilo Dalton
LB	Meio Luria-Bertani
MMP	Metaloprotease
Nox1	NADPH oxidase 1
NRF2	Fator eritróide de transcrição nuclear 2
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDI	Proteína Dissulfeto Isomerase

QSOX1a	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, isoforma longa
QSOX1b	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, isoforma curta
QSOX1b wt	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, recombinante selvagem
QSOX1b mut	Quiescina/ sulfidril oxidase 1, recombinante mutada
siRNA	Pequeno RNA de interferência
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SFB	Soro fetal bovino
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
TRX	Tiorredoxina
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1	PROTEÍNA QSOX1	18
3.1.1	Estrutura	18
3.1.2	Atividade sulfidril oxidase.....	18
3.1.3	Expressão e localização	20
3.1.4	Função biológica.....	20
3.2	ENDOCITOSE	24
3.2.1	Reguladores da endocitose	24
3.2.2	Tipos de endocitose.....	25
3.2.3	Inibidores da endocitose	28
3.2.4	Sinalização endossomal	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	REAGENTES.....	31
4.2	PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
4.2.1	Expressão e purificação de QSOX1b recombinante.....	31
4.2.2	Determinação da atividade enzimática da QSOX1b	33
4.2.3	Cultivo de fibroblastos L929.....	34
4.2.4	Cultivo primário de VSMC.....	34
4.3	ENSAIOS PRELIMINARES REALIZADOS EM VSMC	35
4.3.1	Ligação de QSOX1b recombinante por imunofluorescência.....	35
4.3.2	Ligação de QSOX1b secretada por imunofluorescência	35

4.3.3	Identificação de proteínas ligantes da QSOX1b por <i>espectrometria de massa</i>	36
4.4	ENSAIOS REALIZADOS EM FIBROBLASTOS L929.....	37
4.4.1	Avaliação do efeito proliferativo da QSOX1b recombinante	37
4.4.2	Avaliação do efeito migratório da QSOX1b recombinante	37
4.4.3	Avaliação da internalização de QSOX1b por imunofluorescência	38
4.4.4	Detecção de QSOX1b endocitada através de Western blot	39
4.4.5	Detecção de QSOX1b nos endossomos através de imunofluorescência	39
4.4.6	Avaliação do efeito migratório induzido pela QSOX1b endocitada	39
4.4.7	Avaliação do efeito dos inibidores da endocitose	40
4.4.8	Avaliação da internalização da QSOX1b após inibição com metil- β -ciclodextrina	40
4.4.9	Silenciamento de caveolina 1	41
4.4.10	Avaliação do efeito do silenciamento de caveolina 1 na endocitose e migração celular	41
4.4.11	Avaliação da interação de QSOX1b com Nox1	41
4.4.12	Detecção de proteínas oxidadas pela QSOX1b através de eletroforese bidimensional diagonal.....	41
4.4.13	Padronização do ensaio de transição de fibroblastos a miofibroblastos ...	44
4.5	ANALISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS	45
5.1	OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	45
5.1.1	Expressão e purificação das proteínas recombinantes.....	45
5.1.2	Determinação da atividade enzimática da QSOX1b	46
5.1.3	Obtenção de células musculares lisas vasculares	46
5.2	RESULTADOS PRELIMINARES EM VSMC	47
5.2.1	Internalização de QSOX1b selvagem e mutada em VSMC	47
5.2.2	Identificação de proteínas ligantes da QSOX1	52

5.3	RESULTADOS EM FIBROBLASTOS L929	53
5.3.1	Efeito proliferativo de QSOX1b nos fibroblastos L929	54
5.3.2	Efeito migratório de QSOX1b nos fibroblastos L929.....	55
5.3.3	Internalização de QSOX1b recombinante nos fibroblastos L929.....	55
5.3.4	Detecção de QSOX1b recombinante nos endossomos dos fibroblastos L929	58
5.3.5	Efeito migratório da QSOX1b recombinante endocitada	59
5.3.6	Efeito migratório após inibição da endocitose.....	61
5.3.7	Inibição da endocitose de QSOX1b pela metil- β -ciclodextrina	63
5.3.8	Inibição da endocitose e migração após silenciamento de caveolina 1	66
5.3.9	Interação de QSOX1b com Nox1.....	68
5.3.10	Detecção de alvos oxidáveis da QSOX1b recombinante selvagem	69
5.3.11	Avaliação da transição de fibroblastos a miofibroblastos induzida pela QSOX1b recombinante	71
6	DISCUSSÃO	72
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
	APÊNDICE 1: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA QSOX1b RECOMBINANTE...	86
	APÊNDICE 2: REPRESENTAÇÃO DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	87
	APÊNDICE 3: INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b SECRETADA	88
	APÊNDICE 4: VISÃO ORTOGONAL DA INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE	89

1 INTRODUÇÃO

A migração celular é um processo fundamental para manter diversos fenômenos fisiológicos como a homeostase tecidual, cicatrização de feridas, desenvolvimento embrionário e resposta imune. Falhas na migração celular podem desencadear vários problemas desde feridas que não cicatrizam, deficiências imunológicas até condições patológicas mais graves como inflamação, fibrose, aterosclerose e metástase do câncer (Trepap *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2018, SenGupta *et al.*, 2021).

Um importante regulador da migração celular é a endocitose. Através do tráfego endocítico são internalizados receptores de fatores de crescimento e quimiocinas. Também são recicladas e distribuídas integrinas e caderinas moduladoras da adesão celular, e metaloproteases que reorganizam a matriz extracelular na quimiotaxia. Esses mecanismos ativam cascatas de sinalização que levam à reorganização do citoesqueleto de actina e finalmente à migração celular (Maritzen *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 2018).

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoenzima predominantemente secretada que catalisa a formação de pontes dissulfeto. Foi mostrado que QSOX1 modula a proliferação, migração e adesão de células tumorais. O aumento da expressão de QSOX1 foi confirmado em células tumorais da próstata (Ouyang *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009; Baek *et al.*, 2018), mama (Katchman *et al.*, 2013; Soloviev *et al.*, 2013; Knutsvik *et al.*, 2016), pâncreas (Antwi *et al.*, 2009; Katchman *et al.*, 2011), neuroblastoma (Araújo *et al.*, 2014) e mesotelioma pleural (Lacerenza *et al.*, 2020). Além disso, a inibição da atividade da sulfidril oxidase e a inibição gênica da QSOX1 demonstrou suprimir o fenótipo proliferativo, migratório e invasivo em linhagens celulares de câncer renal, de mama, de pulmão e de pâncreas (Hanavan *et al.*, 2015; Fifiel *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2018).

Em doenças cardiovasculares a QSOX1 também tem ganhado atenção devido a seu papel protetor frente ao dano oxidativo em placas ateroscleróticas e cardiomiócitos e a sua participação no remodelamento vascular (de Andrade *et al.*, 2011; Caillard *et al.*, 2018; Borges *et al.*, 2015). Nesse sentido, nosso grupo mostrou que QSOX1b extracelular induz a proliferação e migração de células musculares lisas de aorta de rato (VSMC), provavelmente contribuindo para a formação da neoíntima

(Borges *et al.*, 2015). A migração induzida por QSOX1b em VSMC foi dependente da atividade enzimática e do peróxido de hidrogênio derivado de Nox1 (França *et al.*, 2020).

Apesar que os efeitos da QSOX1 têm sido principalmente atribuídos à sua função sulfidril oxidase na matriz extracelular, promovendo a organização e incorporação de proteínas como laminina, fibronectina e colágeno (Ilani *et al.*, 2013; Javitt *et al.*, 2018; Feldman *et al.*, 2020). Observações prévias também sugeriram que QSOX1b exógena interage com a membrana plasmática e depois é rapidamente internalizada pelas VSMC (Martinez, 2018). Porém, todos esses dados ainda são insuficientes para entender completamente os mecanismos moleculares envolvidos na migração induzida pela QSOX1.

Uma vez que a migração celular é um passo chave na progressão e invasão tumoral e também no reparo tecidual, neste trabalho em uma etapa preliminar avaliamos a internalização de QSOX1b em VSMC de cultura primária e procuramos possíveis alvos. Na sequência, avaliamos o efeito da QSOX1b nos fibroblastos L929, como modelo alternativo às células de músculo liso, demonstrando que QSOX1b também estimula a migração nestas células. Além disso caracterizamos uma via endocítica que medeia a migração celular induzida pela QSOX1b exógena.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar os mecanismos envolvidos na migração de fibroblastos da linhagem L929 induzida pela QSOX1b recombinante

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de QSOX1b exógena nas células L929
- Avaliar a internalização de QSOX1b exógena em diferentes tempos
- Avaliar o efeito da temperatura na internalização
- Avaliar a localização de QSOX1b nos endossomos
- Avaliar o efeito da endocitose de QSOX1b na migração celular
- Avaliar o tipo de endocitose de QSOX1b através de inibidores específicos
- Silenciar uma proteína essencial na endocitose e avaliar o efeito na migração celular
- Avaliar o efeito de QSOX1b na transição de fibroblastos a miofibroblastos

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

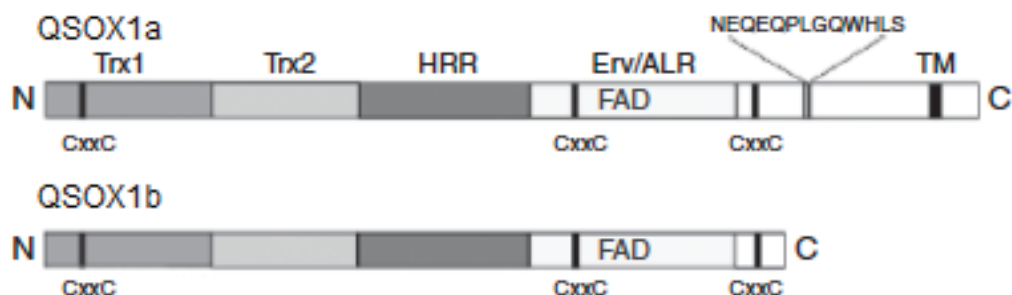
3.1 PROTEÍNA QSOX1

3.1.1 Estrutura

Quiescina/sulfidril oxidase 1 (QSOX1) é uma flavoenzima que catalisa a formação de tióis a dissulfeto com redução de oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (Coppock & Thorpe, 2006). Em humanos, é codificada pelo gene QSCN6, que produz duas isoformas mediante processamento alternativo: QSOX1a (isoforma longa, 74 kDa), que possui um domínio transmembrânico e é detectada principalmente no complexo de Golgi, retículo endoplasmático e vesículas secretoras, e QSOX1b (isoforma curta, 65 kDa) que apresenta-se no Golgi mas é predominantemente secretada (Chakravarthi *et al.*, 2007; Radom *et al.*, 2006; Kodali & Thorpe, 2010; Benayoun *et al.*, 2001; Zanata *et al.*, 2005; Israel *et al.*, 2014).

Estruturalmente, como visto na figura 1, as duas isoformas são resultado da fusão de duas grandes superfamílias: tiorredoxina (Trx) e *essential for respiration and vegetative growth* (ERV). A sequência primária da QSOX1 consiste em um domínio Trx1 na porção N-terminal, seguido de um domínio Trx2 e um domínio rico em hélices (HRR), que é exclusivo das QSOX (Coppock *et al.*, 1998), e um domínio ALR/ERV na porção C-terminal (Kodali & Thorpe, 2010).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DOS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS LONGA E CURTA DA QSOX1



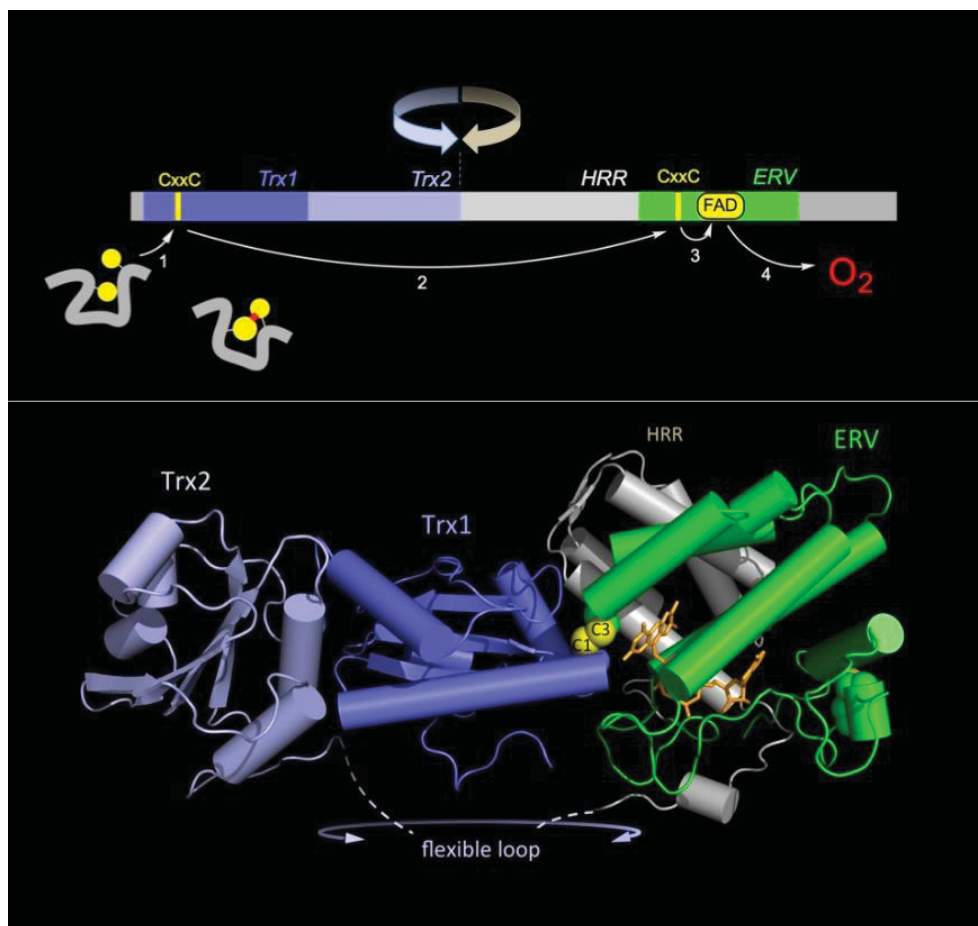
Nota: As estruturas mostram os domínios Trx1, Trx2, HRR (*helix rich domain*) e ERV/ALR. Os 3 motivos CxxC, a região de ligação do FAD e o domínio transmembrânico (TM) são também representados.
 FONTE: Figura adaptada de KODALI & THORPE (2010).

3.1.2 Atividade sulfidril oxidase

O domínio Trx1 e o domínio ALR/ERV da QSOX1 possuem um e dois motivos tiorredoxina (CxxC) respectivamente (Coppock & Thorpe, 2006), como mostrado na

Figura 1. A atividade sulfidril oxidase está diretamente relacionada à presença desses motivos CxxC, sendo o primeiro e segundo motivo ($C_{70}XXC_{73}$ e $C_{449}XXC_{452}$), essenciais para a atividade enzimática. A transferência dos dois elétrons do substrato reduzido (tióis) tem a seguinte ordem: substrato reduzido $\rightarrow C_{70}XXC_{73} \rightarrow C_{449}XXC_{452} \rightarrow FAD \rightarrow O_2$. Por estudos cristalográficos foi determinado que no estado basal, a distância entre o primeiro e o segundo motivo é de 40Å e por ser grande é impossível uma transferência eletrônica. Mas, durante a catálise, os domínios TRX1 e ALR/ERV se reorientam e aproximam, permitindo assim a reação redox entre os resíduos de cisteínas, como observado na figura 2 (Alon *et al.*, 2012).

FIGURA 2. FLUXO DE EQUIVALENTES REDUTORES NOS CENTROS REDOX EM QSOX



Nota: acima, o fluxo de equivalentes redutores de um substrato (seta 1) segue através dos dois motivos CxxC redox-ativos (seta 2), do anel de flavina (seta 3) chegando ao oxigênio molecular (seta 4). Embaixo, reorientação dos domínios TRX1 e ALR/Ver para permitir o fluxo de elétrons. FONTE: THORPE LAB (2016).

3.1.3 Expressão e localização

Com exceção de fungos e leveduras, QSOX1 está presente em vários organismos como *Arabidopsis thaliana* (Limor-Waisberg *et al.*, 2012; Sevier, 2012), *Oryza sativa* (Du *et al.*, 2020), *Caenorhabditis elegans* (Coppock *et al.*, 1998), *Trypanosoma brucei* (Thorpe & Coppock, 2002), *Plasmodium berghei* (Zheng *et al.*, 2020), insetos (Magalhães *et al.*, 2008), aves e mamíferos (Thorpe & Coppock, 2007).

Em mamíferos foi observado que se expressa em locais como trato reprodutor masculino (Ostrowski e Kestler, 1980; Benayoun *et al.*, 2001; Iskandar *et al.*, 2023), tecido uterino (Musard *et al.*, 2001), fibroblastos de pulmão (Coppock *et al.*, 1993), ilhotas de Langerhans, glândula parótida, glândulas apócrinas da pele, células no intestino que secretam peptídeos e proteínas (Coppock e Thorpe, 2006), epiderme (Matsuba *et al.*, 2002), encéfalo (Mairet-Coello *et al.*, 2004; 2005), glândula sebácea, placenta (Thorpe e Coppock, 2007) e leite bovino (Jaje *et al.*, 2007).

A nível intracelular QSOX1 foi descrita no retículo endoplasmático (embora não tenha sequência de retenção no RE), complexo de Golgi e vesículas secretoras (Kodali & Thorpe, 2010). Por ter um domínio transmembrânico, a QSOX1a localiza-se no complexo de Golgi e parece participar do dobramento oxidativo intracelular de proteínas com destino extracelular (Chakravarthi *et al.*, 2007). Já a QSOX1b apresenta-se no Golgi, mas é principalmente secretada ao meio extracelular, como demonstrado no líquido seminal de rato (Benayoun *et al.*, 2001), no soro de mamífero (Zanata *et al.*, 2005; Israel *et al.*, 2014) em plasma e recentemente em exossomos (Ganig *et al.*, 2021) de fibroblastos.

3.1.4 Função biológica

As funções da QSOX1 em condições normais e patológicas são diversas. Os primeiros estudos mostraram que QSOX1 regula negativamente o ciclo celular em fibroblastos embrionários e células epiteliais de endométrio (Coppock *et al.*, 1993; 2000; Musard *et al.*, 2001). Por outro lado, a elevada expressão de QSOX1 principalmente em tecidos derivados do mesoderma e ectoderma sugeriu um papel regulatório no desenvolvimento fetal de camundongos (Portes *et al.*, 2008). Recentemente foi mostrado que QSOX1 no Golgi ativa sialiltransferases que glicosilam mucinas formadoras do muco intestinal. Animais *knockout* para QSOX1

apresentam alteração na microbiota e colite (Ilani *et al.*, 2023). Esse papel variado em condições normais também é observado em doenças como detalhado a seguir.

3.1.4.1 QSOX1 no câncer

A expressão aumentada de QSOX1 foi confirmada em células tumorais de próstata (Ouyang *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009; Baek *et al.*, 2018), mama (Katchman *et al.*, 2013; Soloviev *et al.*, 2013; Knutsvik *et al.*, 2016), pâncreas (Antwi *et al.*, 2009; Katchman *et al.*, 2011), neuroblastoma (Araújo *et al.*, 2014) e mesotelioma pleural (Lacerenza *et al.*, 2020). Morel e colaboradores (2007) indicaram um possível papel protetor da QSOX1 frente a apoptose, pois observaram que células MCF-7 que superexpressavam QSOX1 eram mais resistentes à morte celular causada por estresse oxidativo, possivelmente devido à preservação da polarização mitocondrial. Hanavan e colaboradores (2015) mostraram que a expressão de QSOX1 favorece o crescimento tumoral de pâncreas (*in vivo*) e observaram também uma diminuição significativa da invasão de células tumorais de pâncreas e rim (*in vitro*) quando a atividade enzimática da QSOX1 foi inibida com Ebselen, um composto de organoselênio de conhecida atividade anti-inflamatória e antioxidante, ao qual se une covalentemente. Da mesma forma, foi mostrado que o composto SBI-183 inibe a atividade da QSOX1 e em consequência suprime o fenótipo proliferativo e invasivo em linhas celulares de câncer renal, mama, pulmão e pâncreas (Fifiel *et al.*, 2020). Células tumorais de pulmão também mostraram uma diminuição na migração e invasão quando QSOX1 foi silenciada (Sung *et al.*, 2018). Geng e colaboradores (2020) sugeriram que QSOX1 regula positivamente a migração e proliferação celular parcialmente através da via PI3K/Akt em células de glioblastoma. Recentemente também, através de análise bioinformática, o gene da QSOX1 foi associado a estágios clínicos de carcinoma de tireoide (Pan *et al.*, 2021).

A alta expressão da QSOX1 nesses tipos celulares e tumores indica que ela está diretamente relacionada com a progressão tumoral e baixa sobrevivência, devido à estimulação da proliferação celular, ativação de metaloproteases (Katchman *et al.*, 2011; 2013) e regulação da matriz extracelular (Lake & Faigel, 2014).

Por outro lado, foi observado que a superexpressão de QSOX1 levou a redução da proliferação celular e do potencial invasivo em células de câncer de mama (Pernodet, 2012) e ainda foi levantada a hipótese da QSOX1 inibir a autofagia e em

consequência reduzir a invasão celular e crescimento tumoral (Poilet *et al.*, 2014). Em geral, esses resultados associam a presença da QSOX1 com um melhor prognóstico para pacientes oncológicos, ideia que também foi fortalecida pelo grupo de Zhang (2019), que mostrou que QSOX1 tem um efeito inibidor do potencial invasivo e metastático em carcinoma hepatocelular, suprimindo vias de integrina/FAK e EGFR/Raf/ERK e promovendo a apoptose destas células. Na continuação, foi mostrado que QSOX1 afeta a capacidade antioxidante de células de carcinoma hepatocelular ao impedir a ativação de NRF2 (conhecido regulador da resposta antioxidante). Essa regulação negativa de NRF2 é mediada pela inibição da sinalização de EGFR após QSOX1 e esta facilita sua ubiquitinação e posterior tráfego endossomal (Sun *et al.*, 2021).

Estas evidências embora contrastantes, sugerem que o papel da QSOX1 como promotor ou supressor de tumores varia dependendo do tipo e estágio do tumor. Mesmo assim, o nível de expressão da proteína associada com a progressão da doença poderia ser utilizado como biomarcador e um possível alvo terapêutico.

3.1.4.2 QSOX1 em doenças cardiovasculares

A função da QSOX1 nas doenças cardiovasculares ainda não é compreendida completamente, mas sua participação nestas patologias tem adquirido importância. A elevada expressão de QSOX1 na placa aterosclerótica foi associada com um papel protetor contra apoptose por dano oxidativo (de Andrade *et al.*, 2011). Além disso, um estudo baseado em proteômica identificou a QSOX1 como um biomarcador de insuficiência cardíaca aguda descompensada. Nesse estudo os pacientes com esta patologia apresentaram níveis plasmáticos elevados de QSOX1 solúvel (Mebazaa *et al.*, 2012). Também foi mostrado em camundongos que a deleção de QSOX1 induziu insuficiência cardíaca caracterizada por estresse crônico do retículo endoplasmático, assim como uma resposta inflamatória por disfunção contrátil cardíaca e um severo dano oxidativo, sugerindo que QSOX1 tem um papel cardioprotetor e representa um alvo de interesse no diagnóstico e tratamento de insuficiência cardíaca aguda (Caillard *et al.*, 2018). Recentemente um estudo avaliou RNA circulares em sangue de pacientes com infarto agudo de miocárdio e identificou níveis mais altos de expressão de RNA de QSOX1 em pacientes que tinham desenvolvido disfunção ventricular após

o infarto sugerindo que QSOX1 podia ser um marcador prognóstico para esta patologia (Vanhaverbeke *et al.*, 2019).

No tecido neointimal de carótidas de rato, também foi altamente expressa após lesão por cateter balão e foi parcialmente responsável pelo espessamento da neointima (Borges *et al.*, 2015). É conhecido que as células musculares lisas constituem o único tipo celular na camada media da parede das artérias, e tem um papel importante na função vascular (Chi *et al.*, 2019). Nesse sentido, nosso grupo recentemente tem observado mediante ensaios *in vitro* que QSOX1 extracelular induz a proliferação e migração de células musculares lisas de aorta de rato (VSMC). A proliferação independe da atividade sulfidril oxidase e é mediada por superóxido intracelular cuja fonte pode ser Nox1 ou outra fonte alternativa; já a migração depende da atividade enzimática e é mediada por peróxido de hidrogênio derivado de Nox1 (França *et al.*, 2020).

3.1.4.3 Papel da QSOX1 na matriz extracelular

Por sua localização extracelular, acredita-se que a QSOX1 contribua na remodelação da matriz extracelular e montagem de proteínas extracelulares. Assim, Katchman e colaboradores (2013), sugeriram que as metaloproteases poderiam ser substratos da QSOX1, sendo ativadas através do switch de cisteínas ou pelo ambiente oxidativo. Neste estudo foi mostrado que o silenciamento de QSOX1 diminuiu a atividade funcional das MMP-9 e MMP-2. E como a expressão dos mRNA destas MMPs se manteve constante, concluíram que QSOX1 podia ativar estas MMPs de forma pós-traducional.

Além disso, foi demonstrado que QSOX1 recombinante extracelular é importante para a adesão celular e incorporação de trímeros solúveis de laminina na matriz extracelular de fibroblastos, em um processo que depende da atividade sulfidril oxidase (Ilani *et al.*, 2013). Este mesmo grupo, com o objetivo de descobrir as interações redox da QSOX1 em ambientes fisiológicos, gerou mutantes da proteína para estabilizar a interação da enzima com seus substratos e mostraram que a expressão de fibronectina na matriz extracelular, assim como a proliferação e adesão celular também foram severamente reduzidas quando os fibroblastos foram tratados com QSOX1 recombinantes com os resíduos de prolina mutados, sugerindo que a QSOX1 pode utilizar os loops de prolina para interagir com seus substratos na matriz

extracelular (Javitt *et al.*, 2018). Recentemente, um estudo genético feito em camundongos para detectar características da osteoporose identificou o gene da QSOX1 como responsável de um locus que influencia na acumulação de osso cortical e na resistência óssea. Acredita-se que esta função da QSOX1 também possa estar relacionada com a modulação da matriz extracelular (Al-Barghouthi *et al.*, 2021). O uso de anticorpos inibidores da QSOX1 também reduziu o crescimento tumoral e a metástase em modelo murino de câncer de mama e melanoma. A inibição de QSOX1 nesses casos levou à desorganização das redes de colágeno e fibronectina da matriz, criando dessa forma um microambiente desfavorável para adesão, proliferação e migração de células tumorais (Feldman *et al.*, 2020).

3.2 ENDOCITOSE

A endocitose é um mecanismo pelo qual as células internalizam solutos, macromoléculas e partículas através da membrana plasmática, junto com as proteínas e lipídeos que a constituem. Este processo permite a absorção de nutrientes, internalização e modulação de receptores, regulação da sinalização celular e outros processos essenciais para o funcionamento das células (Kumari *et al.*, 2010; Elkin *et al.*, 2016; Hinzé *et al.*, 2018; Sigismund *et al.*, 2021). Depois de internalizadas, as macromoléculas e proteínas trafegam e são classificadas dentro de uma série de compartimentos tubulovesiculares conhecidos como endossomos, através dos quais podem seguir diferentes destinos: podem ser recicladas para membrana plasmática, podem ser enviadas ao complexo de Golgi, podem ir para degradação nos lisossomos, ou em células polarizadas podem ser transportadas até o outro lado da célula num processo chamado de transcitose (Elkin *et al.*, 2016).

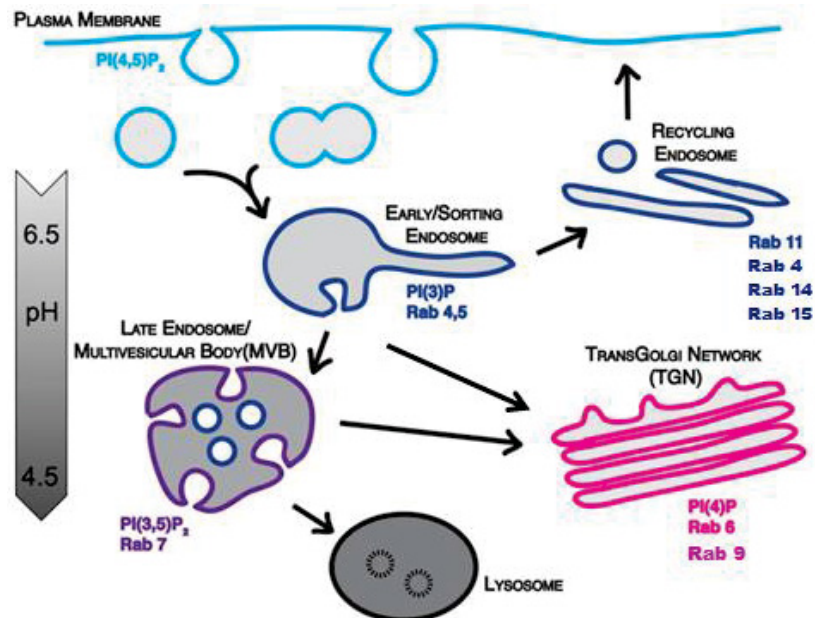
3.2.1 Reguladores da endocitose

Os compartimentos endossomais passam por um processo de amadurecimento desde endossomos iniciais até endossomos tardios, o qual leva a diminuição do pH do lúmen, alteração nos lipídeos de fosfatidilinositol e recrutamento e ativação de GTPases da família Rab (Elkin *et al.*, 2016).

As Rab são pequenas GTPases monoméricas altamente conservadas que possuem funções importantes na regulação do tráfego de membranas e compartimentação no sistema de endomembranas (Elkin *et al.*, 2016). Existem

aproximadamente 20 proteínas Rab que participam no tráfego endocítico, coordenando os processos de classificação, reciclagem e degradação da carga como observado na figura 3. A endocitose e a fusão com os endossomos iniciais está regulada principalmente por Rab5 e Rab21. Após a classificação, a reciclagem das moléculas para a membrana plasmática está regulada em rotas rápidas por Rab4, Rab14 e Rab15, e em rotas lentas por Rab11a, Rab15 e Rab22a. O transporte dos endossomos iniciais para tardios e a fusão de endossomos tardios com os lisossomos está regulado por Rab7. O retorno da carga para o complexo de Golgi desde os endossomos iniciais está regulado por Rab6; e desde os endossomos tardios, por Rab9 (Agola *et al.*, 2011; Wandinger-Ness *et al.*, 2014).

FIGURA 3. TRÁFEGO ENDOCÍTICO



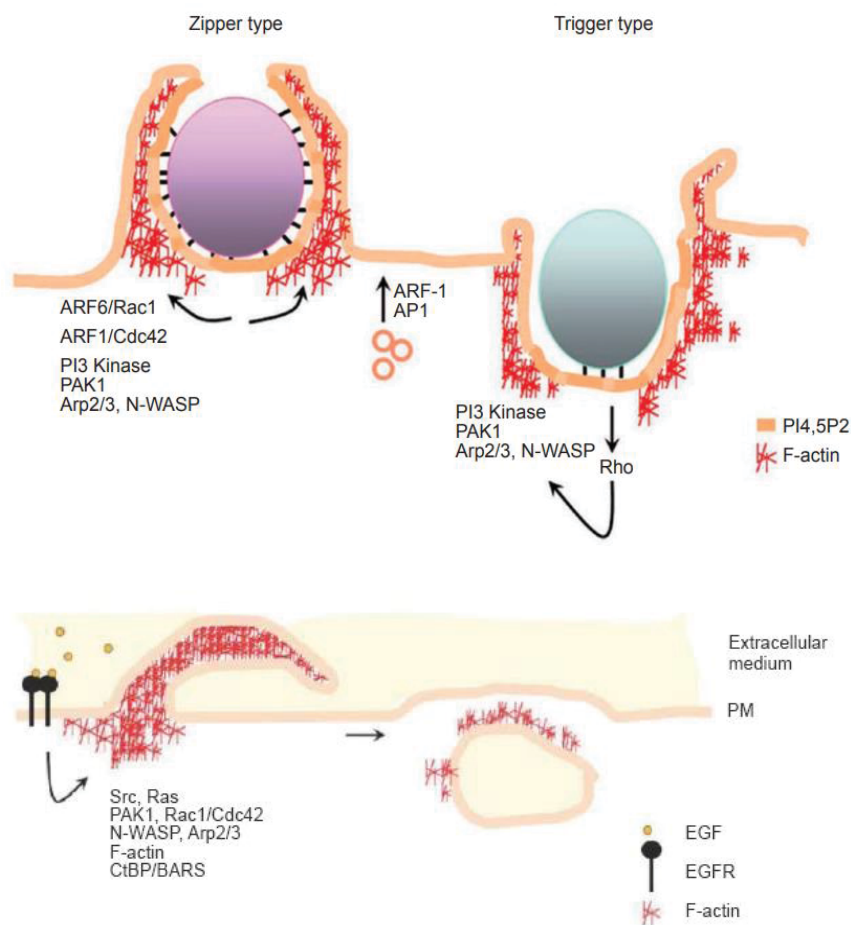
Nota: as vesículas internalizadas seguem um processo de fusão com endossomos iniciais onde a carga pode ser classificada para endossomos tardios, endossomos de reciclagem ou complexo de Golgi. FONTE: figura adaptada de ELKIN *et al.*, 2016.

3.2.2 Tipos de endocitose

As diferentes vias endocíticas classificam-se segundo a escala da invaginação inicial da membrana plasmática. A ingestão de partículas de grande tamanho, superior a 500 nm, ocorre geralmente através de fagocitose ou de macropinocitose. Esses dois processos caracterizam-se por depender da maquinaria de polimerização de actina e possuem uma cinética mais lenta (Figura 4). Na fagocitose, grandes partículas são absorvidas pelas células, levando à deformação da membrana plasmática que logo envolverá a partícula gerando assim o fagossomo, este processo é específico e está

mediado por receptores. Por outro lado, na macropinocitose as células internalizam grandes quantidades de líquido extracelular contendo solutos e membrana e inicia-se pela polimerização de actina formando extensões na membrana conhecidas como *ruffles* que logo formarão grandes vesículas chamadas de macropinosomos. Diferentemente da fagocitose, a macropinocitose não depende de receptores de superfície sendo um mecanismo menos específico (Kumari *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2020).

FIGURA 4. ENDOCITOSE EM MACROESCALA



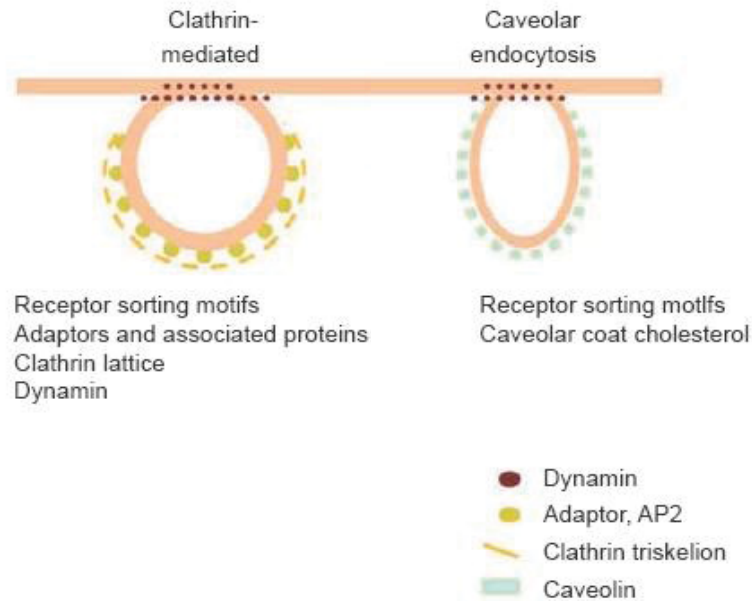
NOTA: eventos moleculares durante os processos de fagocitose (superior) e macropinocitose (inferior). Nos dois casos observa-se a deformação da membrana plasmática e polimerização de actina. FONTE: KUMARI *et al.*, 2010.

Cargas menores que 200 nm são internalizadas por processos endocíticos que se classificam segundo o tipo de revestimento da vesícula (Kumari *et al.*, 2010). Os dois tipos mais estudados são a endocitose mediada por clatrina e a endocitose mediada por caveolas (Figura 5).

A endocitose mediada por clatrina é a principal via endocítica nas células de mamíferos e é responsável pela captação de receptores de superfície unidos aos seus ligantes. A clatrina é a proteína que reveste as vesículas, sendo capaz de revestir vesículas de 100 – 200 nm de diâmetro. De forma geral, este processo envolve o reconhecimento da carga e a montagem do revestimento, seguido pela invaginação da membrana e, finalmente a fissão da membrana, catalizada pela dinamina. Depois de liberadas as vesículas, o revestimento de clatrina é desmontado pela ATPase HSC70, permitindo que a vesícula sem revestimento possa fundir-se com o endossomo inicial e entregar sua carga (Kumari *et al.*, 2010; Elkin *et al.*, 2016; Mettlen *et al.*, 2018).

A endocitose mediada por caveolas é a segunda via endocítica melhor estudada. As caveolas são invaginações da membrana plasmática em forma de frasco, com 50 – 100 nm de diâmetro e são formadas pela montagem de caveolinas, proteínas integrais da membrana que se ligam diretamente ao colesterol de membrana e cavininas, proteínas do revestimento citosólico (Kumari *et al.*, 2010; Elkin *et al.*, 2016). São encontradas em vários tipos de células, incluindo adipócitos, células endoteliais, células musculares, fibroblastos e astrócitos (Matthaeus *et al.*, 2021). Este tipo de endocitose é desencadeada pela ligação do ligante aos receptores de carga concentrados nas caveolas. O brotamento de caveolas da membrana plasmática é regulado por quinases e fosfatases, e assim como a endocitose mediada por clatrina, a dinamina é necessária para liberação destas vesículas (Khan *et al.*, 2020).

FIGURA 5. ENDOCITOSE EM MICROESCALA



Nota: processos endocíticos a microescala que são mediados por clatrina (esquerda) ou caveolae (direita). Nos dois casos, dinamina é requerida para a fissão das invaginações da membrana plasmática. FONTE: KUMARI *et al.*, 2010.

3.2.3 Inibidores da endocitose

A endocitose pode ser inibida por meios farmacológicos e genéticos. Dentre os inibidores químicos clássicos temos a citocalasina D e latrunculina, conhecidos inibidores da polimerização de actina. Podem utilizar-se para estudar os mecanismos de captação dependentes de actina como fagocitose e macropinocitose (Kuhn *et al.*, 2014). A sacarose hipertônica é outro tratamento usado para bloquear a endocitose mediada por clatrina, impedindo a interação de clatrina com seus adaptadores, porém foi reportado que causa encolhimento celular e pode levar a alterações no citoesqueleto de actina cortical. A clorpromazina é uma droga anfipática catiônica que leva ao bloqueio da endocitose mediada por clatrina pois impede a montagem de clatrina e proteínas adaptadoras nas membranas endossomais, depletando-as da membrana plasmática. As nistatinas e ciclodextrinas (como metil- β -ciclodextrina) utilizam-se para depletar o colesterol da membrana plasmática das células levando ao bloqueio da endocitose mediada por caveola e balsas lipídicas. Porém foi reportado que estes inibidores também poderiam inibir a endocitose mediada por clatrina pois a captação de clatrina requer colesterol. Esses inibidores químicos clássicos podem agir de maneira inespecífica e, portanto, é necessária cautela ao interpretar os achados.

No entanto, esses inibidores são amplamente disponíveis e seus efeitos na endocitose são rápidos pelo que podem ajudar a caracterizar a entrada de uma proteína cargo. O uso de controle adequados permite demonstrar que um inibidor afeta uma via sem interferir em outra. Outros inibidores farmacológicos como Dynasore e Pitstops são considerados mais específicos pela sua capacidade de inibir a atividade GTPase da dinamina porém ficam restritos somente a endocitose dependente de dinamina (Dutta & Donaldson, 2012; Kuhn *et al.*, 2014).

Para evitar os problemas de especificidade dos inibidores químicos, são abordados enfoques genéticos alterando a expressão de proteínas específicas das vias endocíticas, isso inclui a expressão de formas mutantes de proteínas críticas envolvidas na endocitose ou o silenciamento de estas proteínas através de siRNA ou shRNA. A desvantagem dessa abordagem é que o tempo para deletar uma proteína é maior, podendo levar vários dias nos quais as células podem se adaptar e até alterar sua expressão gênica. De forma geral, as diferentes abordagens para inibir a endocitose tem vantagens e desvantagens pelo que se recomenda que sejam utilizadas diferentes abordagens para corroborar a inibição de uma via específica (Dutta & Donaldson, 2012).

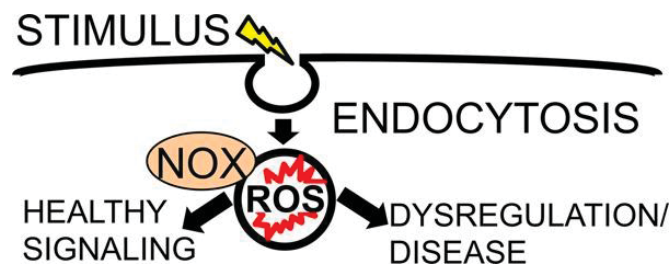
3.2.4 Sinalização endossomal

Por muito tempo a endocitose foi considerada como um mecanismo celular que desligava sinais ao invés de ativá-los. Hoje se reconhece que os sinais extracelulares que se originam na membrana plasmática podem ser estendidos e modificados por sinalização endossomal. Neste tipo de sinalização, o receptor de superfície celular após ligação com seu ligante é imediatamente endocitado antes da transmissão do sinal intracelular. Dessa forma, durante o tráfego endossomal os receptores ativados continuam cascatas de sinalização citoplasmática até terminar suas tarefas e serem degradados via lisossomal. Através da sinalização endossomal também é possível concentrar agentes de sinalização em uma região específica da célula. Por exemplo durante a migração celular esse mecanismo permite a execução da sinalização contrátil na borda posterior, onde um número crescente de endossomos de sinalização garantirá a fidelidade da sinalização compartimentada de forma rápida. Neste caso integrinas são endocitadas e levadas à borda posterior da célula para ajudar na desmontagem da adesão focal, depois são recicladas novamente para a

borda anterior (Schiefermeier *et al.*, 2011; Oakley *et al.*, 2009; Spencer *et al.*, 2014). Entre os sistemas ligantes/receptores mais estudados que utilizam endossomos para transdução de sinal estão EGF, PDGF, IL-1 β e TNF α . No caso do receptor EGF (EGFR), é bem conhecido que a endocitose do receptor ocorre após a ligação do ligante (Oakley *et al.*, 2009).

Existem também endossomos de sinalização redox, conhecidos como redoxossomos. Estes endossomos sinalizadores se formam dentro das células em resposta a estímulos extracelulares específicos. Sua formação está intimamente ligada à maquinaria endocítica e à endocitose coordenada de enzimas produtoras de EROS como as Nox, e proteínas específicas de sinal da superfície celular. Um requisito obrigatório dos redoxossomos é a produção de EROS (produzidos por Nox1 ou Nox2) no interior do endossomo levando a mudanças dependentes de processos redox na estrutura da proteína na superfície citoplasmática do redoxossomo ou perto de esta. Esses sinais dependentes de redox desencadeiam a translocação de proteínas citoplasmáticas para os complexos de receptores endossomais que são necessários para ativação e transdução de sinal (Figura 6). Um exemplo de proteínas reguladas por esta via são as proteínas da família tirosina quinase que são sensíveis ao controle redox e podem ser ativadas nos redoxossomos (Spencer *et al.*, 2014).

FIGURA 6. MECANISMO DE SINALIZAÇÃO NOS REDOXOSSOMOS



Nota: O gráfico mostra o mecanismo de sinalização nos endossomos ativos redox, conhecidos como redoxossomos. Após ativação por um estímulo extracelular, Nox1 produz espécies reativas de oxigênio dentro dos endossomos podendo ativar diferentes cascatas de sinalização. FONTE: SPENCER *et al.*, 2014.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Para cultura celular foram utilizados DMEM alta glicose, Tripsina-EDTA 0.05%, soro fetal bovino, penicilina-estreptomicina, opti-MEM todos obtidos da Gibco Life Technologies. Para migração celular foi usado PDGF-BB (Peprotech) e mitomicina C (Sigma). Os anticorpos utilizados para imunofluorescência e *western blot* foram, anti-QSOX (feito no laboratório, Portes *et al.*, 2008), anti-EEA1 (BD Biosciences, # 610457), anti-Rab5 (Cell Signaling Technology, #46449), anti-Rab7 (Cell Signaling Technology, #95746), anti-caveolina 1 (Santa Cruz, #53564), anti-Nox1 (GeneTex, #103888), anti-His (ThermoFisher Scientific, #21315), anti-actina de musculo liso (Sigma-Aldrich #5228), anti-caveolina 1 (Abcam, #2910), anti-GAPDH (Santa Cruz, #32233), anti-rabbit Alexa Fluor 488 (ThermoFisher Scientific, #21206), anti-mouse Alexa Fluor 568 (ThermoFisher Scientific, #10042), anti-mouse HRP (Sigma, #4416), anti-rabbit HRP (Sigma #A0545). Para purificar as proteínas com His-Tag foram utilizadas resinas de Níquel-NTA agarose da Qiagen. Para determinar atividade enzimática, ácido homovanílico (HVA), peroxidase de raiz forte (HRP) ditiotreitól (DTT) e peróxido de hidrogênio, todos obtidos da Sigma-Aldrich. Para eletroforese e western blot foi utilizado coquetel inibidor de protease (Roche), marcador de massa molecular pré-corado (Thermo Scientific), membrana de nitrocelulose (Cytiva), leite em pó (Bio Rad), substrato convencional (GE Healthcare) e altamente sensível (SuperSignal West Dura). Para transfecção foi usado siRNA Silencer CAV-1 (Ambion, Life Technologies) e siRNA controle negativo (Silencer Select Negative Control No. 1, Ambion, Life Technologies), reagente de transfecção DharmaFECT Duo (Dharmacon). Os inibidores da endocitose usados foram sacarose (Synth), metil- β -ciclodextrina (Sigma), citocalasina D (Cayman).

4.2 PREPARAÇÃO DO MATERIAL BIOLÓGICO

4.2.1 Expressão e purificação de QSOX1b recombinante

Bactérias quimiocompetentes da cepa AD494 foram transformadas por choque térmico com o vetor pET-32a QSOX, contendo o inserto para a forma selvagem e mutada S₄₅₂XXC₄₅₅ (Borges *et al.*, 2015). Após a transformação, as bactérias foram recuperadas em 1 mL de meio SOC sem antibiótico e incubadas por

15 min a 37°C sob agitação para recuperação. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação e plaqueadas em meio LB/ágar (5 g/L extrato de levedura, 10 g/L triptona, 10 g/L NaCl, 15 g/L ágar, pH 7.4) contendo ampicilina (30 µg/mL).

Das colônias que cresceram no meio sólido, foram selecionadas 4 colônias isoladas e inoculadas em 5 mL do meio LB com ampicilina. 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 0.4 – 0.6 em 600 nm. Após atingirem a absorvância desejada, foi separado 1 mL para controle não-induzido da expressão e no restante foi adicionado IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosídeo) na concentração final de 0.1 mM para a indução da expressão da proteína recombinante, por 4 horas a 37°C. Amostras das culturas induzidas e não induzidas foram separadas em SDS-PAGE e o gel foi corado com azul de Coomassie. Após análise dos géis, o clone com maior expressão foi selecionado e utilizado para a expressão em larga escala.

A colônia de interesse foi pré-inoculada em 20 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._{600nm} entre 0.4-0.6 a expressão da proteína recombinante foi induzida com a adição de IPTG na concentração final de 0.1 mM por 18 horas a 20 °C. Seguindo o período de indução, a cultura resultante (1 litro) da expressão foi sedimentada por centrifugação a 4000 xg por 30 minutos e o pellet lavado duas vezes por centrifugação com PBS gelado. As células foram coletadas em 4 sedimentos equivalentes a 250 mL de cultura cada. A purificação descrita a continuação refere-se a 1 sedimento. Os outros sedimentos de bactérias foram armazenados em -80° C.

O pellet bacteriano foi ressuspendido e lisado em 20 mL de tampão de lise nativo gelado (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, pH 8.0; 10 mM imidazol, 50 µM FAD, 2 mM PMSF) em prensa de French (1000 psi). Em seguida o lisado bacteriano foi submetido à centrifugação a 30000 xg, 4°C por 30 minutos para clareamento. A purificação das proteínas recombinantes foi feita por cromatografia por afinidade a metais imobilizados (IMAC) em 0.5 mL (1 mL de suspensão) de resina de Ni-NTA agarose previamente equilibrada em tampão nativo contendo 10 mM imidazol. O lisado clareado foi passado pela coluna de Ni²⁺. O *flow through* foi coletado e chamado de void. A coluna foi então lavada quatro vezes com tampão nativo contendo

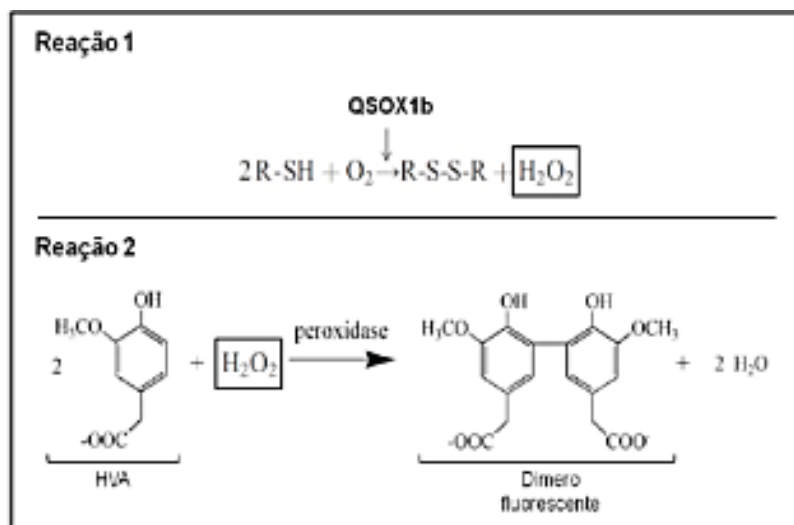
20 mM imidazol (3 mL/lavagem). Finalmente, a proteína foi eluída da resina com 3 mL tampão nativo contendo 250 mM imidazol.

As proteínas recombinantes foram dialisadas com PBS e concentradas por ultra filtração em Amicon 50 kDa (Millipore). A concentração foi determinada através da absorbância em 456 nm, utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{456\text{nm}} = 12.5$ e $11.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para as formas selvagem e mutada respectivamente (Heckler *et al.*, 2008). Alíquotas de todas as etapas da purificação foram analisadas por SDS-PAGE 10% e gel corado com azul de Comassie. As proteínas recombinantes foram aliquotadas e estocadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ em 10% de glicerol com 1mM EDTA, a cada nova preparação, ou caso as proteínas ficassem estocadas por mais de 1 mês, passaram por análise de atividade enzimática.

4.2.2 Determinação da atividade enzimática da QSOX1b

Foi utilizado um método fluorescente, já descrito para medir atividade de QSOX (Raje *et al.*, 2002) que 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 (Figura 7).

FIGURA 7. REAÇÕES DO MÉTODO INDIRETO DE QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE QUIESCINA SULFIDRIL OXIDASE



Nota: A reação 1 mostra a reação catalisada pela QSOX1 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 peroxidase (HRP) para a dimerização de dois ácidos homovanílico (HVA). FONTE: Raje (2002) e Heckler (2008).

Este ensaio foi realizado em microplacas, conforme descrito em Borges e colaboradores (2015), no qual as proteínas recombinantes de QSOX1b selvagem e mutada foram adicionadas (em concentração final de 0.2 μM) a uma mistura reacional que consistiu de 50 mM tampão fosfato, 300 μM EDTA, pH 7.4 e um mix contendo 1 mM ácido homovanílico (HVA), 1.4 μM peroxidase de raiz forte (HRP) e 150 μM DTT (substrato). A fluorescência da reação foi monitorada pelo espectrofluorímetro Tecan i-control M-200, durante 5 minutos, utilizando os seguintes parâmetros: $\lambda_{\text{em}} = 420\text{nm}$, $\lambda_{\text{exc}} = 320\text{nm}$, 27°C. Para determinar a atividade da QSOX1b recombinante selvagem foi utilizada uma curva padrão de calibração com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 μM).

4.2.3 Cultivo de fibroblastos L929

Células de fibroblastos murinos L929 (doadas pela Profa. Dra. Heloisa Salistre de Araújo, UFSCar) foram cultivadas em meio DMEM alta glicose contendo 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina 10000 U/mL, mantidos em ambiente úmido a 37 °C com 5% de dióxido de carbono. DMEM contendo 0.1% de soro fetal bovino foi usado para carenciamento durante a noite antes de todos os experimentos e como veículo durante os tratamentos das células.

4.2.4 Cultivo primário de VSMC

Células musculares lisas de aorta de rato (VSMC) foram obtidas pelo método de explante (adaptado de Kirschenlohr *et al.*, 1996), utilizando ratos Wistar machos com 200 g (cerca de 2 meses de idade). A aorta foi coletada e transferida para um tubo contendo PBS e antibiótico gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Depois da remoção da camada adventícia, a artéria foi cortada longitudinalmente e as células endoteliais removidas mecanicamente. Em seguida, foi cortada em fragmentos de 1 mm^2 , e cerca de 3-5 explantes foram plaqueados em placas de 24 poços (com inibidor de fibroblastos, Falcon 3847) e cobertos com gotas de meio DMEM alta glicose contendo 20% de soro fetal bovino (SFB) e antibiótico. Após um período de 6 horas, foi acrescentado 0.3 mL de meio completo. A cada 3 dias, aproximadamente 0.15 mL do meio foi removido e repostado com meio fresco até à migração das VSMC para a placa, o que levou de 3 a 5 dias. Quando uma alta confluência foi atingida ao redor dos explantes (cerca de 7 dias), as células foram coletadas com tripsina e replaqueadas em placas de 60 ou 100 mm de diâmetro. A partir daqui o cultivo seguiu como de

rotina, usando DMEM com 10% SFB e gentamicina. As células foram utilizadas nos ensaios até a passagem 7. A prorrogação do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná com o protocolo N° 1053/2017.

A identidade das VSMC foi confirmada por imunofluorescência para detecção da expressão de actina de músculo liso utilizando o anticorpo anti-SM actin (1:250).

4.3 ENSAIOS PRELIMINARES REALIZADOS EM VSMC

4.3.1 Ligação de QSOX1b recombinante por imunofluorescência

As VSMC foram plaqueadas (3×10^4 células/ poço) em lamínulas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços a carenciadas de soro fetal bovino (0.1%) *overnight*. No dia seguinte foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 1 μ M de QSOX1 recombinante selvagem e mutada em PBS por diferentes tempos em 37 °C ou 4 °C. Após 2 lavagens com PBS, foram fixadas com 2% formaldeído por 20 min e os grupos aldeídos bloqueados com 125 mM glicina por 10 min. O bloqueio e permeabilização foi feito com 1% BSA e 0.1% Triton X100, respectivamente, ambos em PBS, por 1 h. Após a incubação *overnight* com anticorpo primário anti-QSOX1 (descrito em Portes *et al.*, 2008) 1:300 na solução de bloqueio, as células foram lavadas 3 vezes com 0.1% Triton X100 em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, acoplado a um fluoróforo (1:500), por 50 min na solução de bloqueio. Finalmente se realizaram 3 lavagens com PBS e a lamínula foi mergulhada em água milli Q e montada com solução de DAPI – glicerol (1:1000 – 50% glicerol). As imagens foram adquiridas no microscópio a laser confocal Nikon A1R MP, utilizando objetiva de 60x. As imagens foram analisadas usando o software Image J.

4.3.2 Ligação de QSOX1b secretada por imunofluorescência

Para avaliar a ligação de QSOX1 produzida por célula eucariota, células HEK293T foram transfectadas, através da precipitação com fosfato de cálcio, com o plasmídeo pcDNA 3.1 contendo a sequência que codifica a QSOX1 de camundongo (mQSOX1-HA selvagem e mQSOX1-C452S), em placas de 100 mm de diâmetro. Após 6 horas, o meio de transfeção foi trocado por meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e no dia seguinte, o meio foi trocado por 4 mL de DMEM alta glicose suplementado com 0.1% de soro fetal bovino. As células também foram

transfectadas apenas com o plasmídeo pCI-neo vazio, como controle negativo. Depois de 48 horas de expressão, o meio condicionado foi coletado e as proteínas secretadas foram concentradas 4 vezes por ultra filtração em Amicon 30 kDa (Millipore). Esse meio foi incubado com as VSMC (previamente aderidas em lamínulas) por diferentes tempos e a reação de imunomarcção foi realizada como explicado no item anterior. A proteína QSOX1b foi detectada através da etiqueta de Hemaglutinina (HA) com anticorpo primário anti-HA (1:500).

Para estimar a concentração de QSOX1 secretada, os meios coletados (5 μ L) foram analisados por Western blot através de uma curva padrão de QSOX1 recombinante, utilizando anticorpo primário anti-QSOX1 (1:1000) e secundário anti-coelho conjugado com HRP (1:4000).

4.3.3 Identificação de proteínas ligantes da QSOX1b por *espectrometria de massa*

As VSMC (5 x 10⁶ células/ condição) em suspensão foram incubadas com 1 μ M de QSOX1b recombinante selvagem ou mutada em PBS (ou com uma proteína irrelevante como AIF) e após 5 minutos, a ligação foi estabilizada adicionando 1% de formaldeído (agente *cross*-ligante) por 10 minutos. Após o bloqueio com 125 mM glicina, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e lisadas por sonicação (5 ciclos de 30 segundos cada), em tampão de lise não desnaturante (50 mM Tris, 0.1 mM EDTA 0.1 mM EGTA, coquetel inibidor de proteases). O lisado foi centrifugado por 15 min a 18000 xg em 4°C e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 xg por 1 hora em 4°C. O pellet obtido, correspondente à fração de membrana, foi ressuspendido em 2% Igepal-630 em PBS (com inibidor de proteases). Após a dosagem proteica, as proteínas com His-tag foram enriquecidas incubando 50 μ g de proteína total em 50 μ L de resina de Ni-NTA agarose, por 1h a 4 °C em tampão desnaturante contendo 1% Igepal-630, 6 M ureia, 10 mM imidazol, inibidor de proteases). Após 5 lavagens com 1% de Igepal-630 e 10 mM de imidazol em PBS, as proteínas foram eluídas incubando as resinas com 0.5 M imidazol no mesmo tampão por 15 min a 4°C. As amostras foram submetidas a eletroforese curta e a corrida foi até 25% do gel, em seguida este foi corado com nitrato de prata. As canaletas foram cortadas do gel e digeridas com tripsina. A análise por espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS) foi realizada em colaboração com o Dr. Nilson Zanchin, do Instituto Carlos Chagas. Os resultados foram analisados no software MaxQuant.

As amostras de fração de membrana enriquecida em resinas de Ni-NTA agarose foram analisadas por Western Blot para detectar se QSOX1b recombinante estava ligada à fração de membrana. Os anticorpos utilizados foram, primário: anti-QSOX1 (1:500) e secundário: anti-coelho conjugado com HRP (1:4000).

4.4 ENSAIOS REALIZADOS EM FIBROBLASTOS L929

4.4.1 Avaliação do efeito proliferativo da QSOX1b recombinante

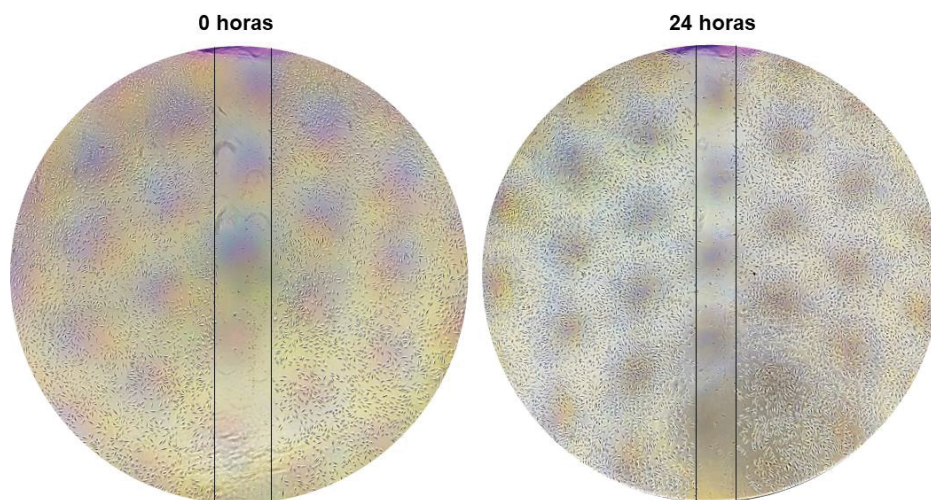
O efeito proliferativo da QSOX1b recombinante nas células da linhagem L929 foi avaliado tratando as células com 100 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 48 horas seguindo o ensaio de cristal violeta já padronizado pelo nosso grupo (França *et al.*, 2020). Os controles positivo e negativo foram DMEM alta glicose suplementado com 10% e 0.1% de soro fetal bovino respectivamente; esse último foi também o veículo das proteínas recombinantes. Assim, um dia antes do experimento, 10^4 células foram plaqueadas em placa de 96 poços e carenciadas de soro fetal bovino *overnight*. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado pelos tratamentos e depois de 48 horas avaliou-se a viabilidade celular através do ensaio com cristal violeta. Para isso, as células foram fixadas com 4% formaldeído por 10 minutos, seguido pela permeabilização com 2% metanol por 10 minutos e a tingção com 0.5% cristal violeta (em 20% metanol) por 10 minutos. O excesso de corante foi removido mediante várias lavagens com água e os cristais foram dissolvidos com 100 uL da solução de 0.1 M citrato de sódio pH 4.2 (em 50% de metanol). Finalmente se mediram as absorbâncias a 570 nm e os valores obtidos foram comparados com os valores do controle negativo (100% de viabilidade).

4.4.2 Avaliação do efeito migratório da QSOX1b recombinante

A migração celular foi avaliada através do ensaio do *scratch* (França *et al.*, 2020), incubando as células com 50 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada, 20 ng/mL PDGF-BB humano como controle positivo e DMEM alta glicose 0.1% soro fetal bovino como veículo. Para isso, 7.5×10^4 células/poço foram incubadas em placa de 24 poços. Após a adesão e carenciamento de soro fetal bovino *overnight*, as células foram pré-tratadas por 30 minutos com 0.4 µg/ml mitomicina C, um inibidor da proliferação celular. Depois disso, com ajuda de uma ponteira de 200 µL foi realizado um risco na metade do poço, as células desaderidas foram removidas lavando duas

vezes com PBS e os tratamentos foram aplicados. O risco foi fotografado no tempo 0 e 24 horas depois do tratamento. No começo de cada risco foi realizada uma marca para garantir que a fotografia seja realizada na mesma localização no dia seguinte. Como mostrado na figura 8, a distância da migração foi calculada através da diferença entre as bordas do risco medido nos tempos 0 e 24 horas, realizando pelo menos cinco medições ao longo do risco, no software ImageJ. A distância percorrida pelas células incubadas com o veículo, foi considerada como 100%. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA com *post-hoc* Dunnett, no software GraphPad Prism 8.0.

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO DO ENSAIO DO SCRATCH



Nota: Com ajuda de uma ponteira de 200 μ L foi realizado um risco em linha reta na monocamada de células L929. Em seguida, as células desaderidas foram removidas lavando com PBS e em logo foi aplicado o tratamento. O risco foi fotografado no tempo 0 e 24 horas depois.

4.4.3 Avaliação da internalização de QSOX1b por imunofluorescência

As células foram plaqueadas (5×10^4 células/ poço) em lamínulas de 13 mm de diâmetro em placa de 24 poços e após adesão foram carenciadas de soro, *overnight*. No dia seguinte foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada por diferentes tempos em 37° C ou 4°C em DMEM. Após três lavagens com PBS, foram fixadas com 2% formaldeído por 20 min e os grupos aldeídos bloqueados com 125 mM glicina por 10 min. O bloqueio e permeabilização foi feito com 1% BSA e 0.01% saponina, respectivamente, ambos em PBS, por 20 min. Após a incubação *overnight* com anticorpo primário anti-QSOX1 (1:300) ou anti-His (1:100) na solução de bloqueio, as células foram lavadas 3 vezes

com 0.01% saponina em PBS e incubadas com o anticorpo secundário anti-rabbit e anti-mouse Alexa Flúor 488 ou 568 (1:500), por 50 min na solução de bloqueio. Finalmente se realizaram 3 lavagens com PBS e a lamínula foi mergulhada em água milli Q e montada com solução de DAPI – glicerol (1:1000 – 50% glicerol), para marcação do núcleo. As imagens foram adquiridas no microscópio a laser confocal Nikon A1R MP, utilizando objetiva de 60x e posteriormente foram analisadas usando o software Image J.

4.4.4 Detecção de QSOX1b endocitada através de Western blot

Foram plaqueadas 10^6 células em placas de 60 mm e carenciadas de soro após adesão. No dia seguinte as células foram incubadas com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem, mutada ou veículo por 30 minutos. Após esse tempo, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e desaderiram-se da placa usando Tripsina-EDTA. As suspensões celulares foram lavadas 3 vezes com PBS, por centrifugação (900 xg, 3 min) e o pellet foi lisado com tampão RIPA. Finalmente as amostras analisaram-se por SDS-Page e Western blot. Os anticorpos utilizados foram, primários, anti-QSOX1 (1:2000) e anti-GAPDH (1:2000); secundários, anti-rabbit e anti-mouse conjugados com HRP (1:10000). Para revelar foram utilizados os substratos ECL convencional e altamente sensível.

4.4.5 Detecção de QSOX1b nos endossomos através de imunofluorescência

O ensaio de imunofluorescência foi realizado como descrito no item anterior e foram utilizados os anticorpos primários, anti-QSOX1 (1:300), anti-EEA1 (1:200), anti-Rab5 (1:200), anti-Rab7 (1:200), anti-caveolina 1 (1:50), anti-clatrina (1:100); e secundários, anti-rabbit e anti-mouse Alexa Flúor 488 ou 568 (1:500).

4.4.6 Avaliação do efeito migratório induzido pela QSOX1b endocitada

A migração celular induzida por QSOX1b recombinante endocitada foi avaliada através do ensaio do *scratch* descrito anteriormente. O estímulo com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem ou mutada foi por 30 minutos, tempo suficiente para que as recombinantes sejam endocitadas. Depois disso retiraram-se os tratamentos e as células foram lavadas cinco vezes com PBS para garantir a remoção total de estes; na terceira lavagem, com ajuda de uma ponteira de 200 μ L foi realizado um risco na metade do poço e as células desaderidas foram removidas com duas

lavagens seguintes. Finalmente a solução veículo foi colocada em cada poço e deixada por 24 horas. O risco foi fotografado no tempo 0 e 24 horas depois. Como controle positivo do experimento, também se realizaram tratamentos de 24 horas com 50 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada e 20 ng/mL de PDGF-BB humano. As imagens foram analisadas como descrito no item acima.

4.4.7 Avaliação do efeito dos inibidores da endocitose

Utilizaram-se três inibidores da endocitose, 0.45 M sacarose para inibir a endocitose mediada por clatrina (Guo *et al.*, 2015), 1 mM metil- β -ciclodextrina (Vercauteren *et al.*, 2010) para inibir a endocitose mediada por caveola e 4 μ M citocalasina D para inibir macropinocitose e fagocitose (Mäger *et al.*, 2012), que foram aplicados antes de realizar o ensaio de *scratch*. Assim, após o tratamento com mitomicina C e duas lavagens com PBS, as células foram pré-tratadas com os inibidores, diluídos na solução veículo, durante 30 minutos. Na sequência, as células foram tratadas por 30 minutos com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem, mutada ou veículo na presença ou não de cada inibidor. Depois do tratamento e respectivas lavagens, foi realizado o risco como descrito anteriormente.

Para avaliar se o efeito de Metil- β -ciclodextrina não foi a consequência de uma possível toxicidade deste inibidor, um grupo também foi tratado com QSOX1b recombinante por 2 horas na presença ou não deste inibidor, utilizando como controle positivo da migração DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino. As imagens foram analisadas como descrito no item acima.

4.4.8 Avaliação da internalização da QSOX1b após inibição com metil- β -ciclodextrina

Através de imunofluorescência foi avaliado se QSOX1b recombinante é endocitada após o pré-tratamento com o inibidor Metil- β -ciclodextrina. Para isso, as células previamente aderidas em lamínulas, foram pré-tratadas com 1 mM de Metil- β -ciclodextrina por 30 minutos em DMEM alta glicose. Na sequência, foram incubadas com QSOX1b recombinante selvagem ou mutada durante 30 minutos na presença ou não do inibidor. Depois de 3 lavagens com PBS, as células foram fixadas e o experimento de imunodeteção continuou como descrito anteriormente. O anticorpo primário utilizado foi anti-QSOX1 (1:300) e o secundário anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:500).

4.4.9 Silenciamento de caveolina 1

O silenciamento da expressão de Cav-1 foi realizado utilizando um pequeno RNA de interferência (siRNA) pré-desenhado (Ambion, Life Technologies). As células foram cultivadas até 50-60% de confluência e transfectadas por 18 horas com 50nM siRNA usando o reagente de transfeção DharmaFECT Duo (Dharmacon), de acordo com o protocolo do fabricante. Um siRNA sem direcionamento (Silencer Select Negative Control N°1, Ambion, Life Technologies) foi usado como controle negativo. As sequências dos siRNAs Cav-1 foram: sense 5'-GCAAGUGUAUGACGCGCACtt-3' e antisense 5'-GUGCGCGUCAUACACUUGCtt-3'. A expressão de Cav-1 foi avaliada por análise de western blot após 72 horas.

4.4.10 Avaliação do efeito do silenciamento de caveolina 1 na endocitose e migração celular

Por imunofluorescência, seguindo o protocolo descrito anteriormente, utilizando anticorpo anti-QSOX1 avaliou-se o efeito do silenciamento de caveolina 1 na internalização de QSOX1b após estímulo com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 minutos. Além disso, para avaliar o efeito do silenciamento na migração induzida por QSOX1b, foi realizado o ensaio de *scratch* após 48 horas do silenciamento. Foi testado o estímulo de 500 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 min além de um pulso de 2 horas com as recombinantes e com 10% de soro fetal bovino como controle positivo de migração, nesse último caso para testar se o silenciamento de caveolina 1 afeta a migração celular de forma geral.

4.4.11 Avaliação da interação de QSOX1b com Nox1

Seguindo o protocolo de imunofluorescência descrito anteriormente foi avaliada a interação de QSOX1b com Nox1 endógena após estímulo com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram anti-His (1:100) e anti-Nox1 (1:100) e os secundários anti-mouse e anti-rabbit Alexa Fluóor 568 e 647 (1:500), respectivamente.

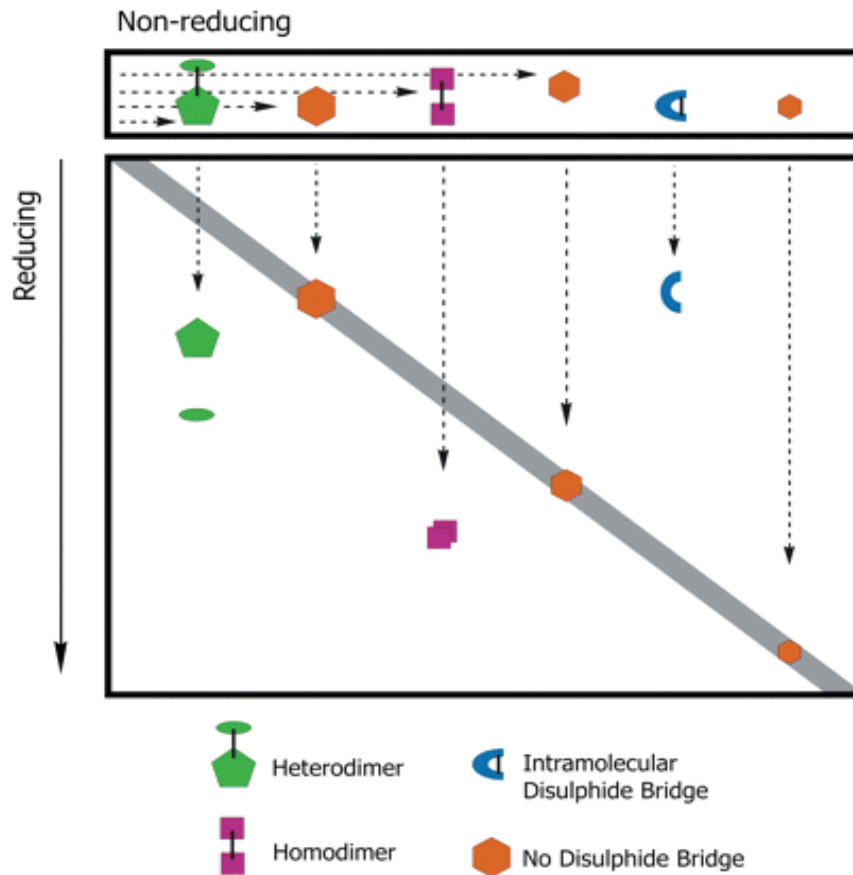
4.4.12 Detecção de proteínas oxidadas pela QSOX1b através de eletroforese bidimensional diagonal

Para identificar proteínas que são oxidadas direta ou indiretamente pela QSOX1b, formando pontes dissulfeto intra ou intermoleculares foi utilizada a técnica

de eletroforese bidimensional diagonal. Através desta técnica, as proteínas que nativamente tem pontes dissulfeto, migram numa primeira dimensão não redutora mantendo estes. Na segunda dimensão redutora, todas as proteínas que não possuem pontes dissulfeto migrarão de forma equidistante à primeira dimensão formando uma diagonal. Por outro lado, as proteínas que possuem pontes dissulfeto intermoleculares, sendo estes desfeitos, migrarão fora e abaixo da diagonal, entanto que as proteínas com pontes dissulfeto intramoleculares, depois de ser reduzidos, migrarão acima da diagonal (Figura 9).

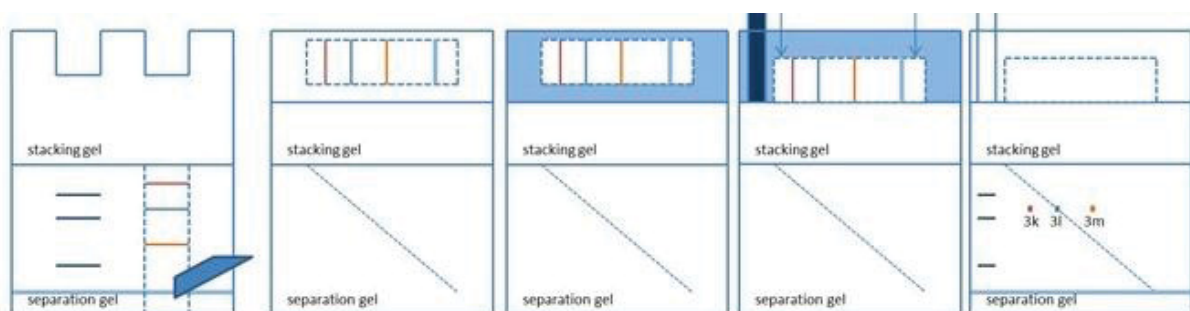
Para essa detecção, os fibroblastos L929 foram incubados com 250 nM QSOX1b recombinante selvagem (30 min), 100 μ M H₂O₂ (5 min) ou veículo em placa de 60 mm de diâmetro. Após esse tempo, as células foram lavadas uma vez com PBS e os tióis livres foram bloqueados com 20 mM N-etilmaleimida em PBS por 5 minutos no escuro seguido por uma lavagem com a mesma solução. As células foram lisadas com tampão RIPA por 1 hora a 4 °C. Depois da dosagem proteica, 50 μ g de proteínas de cada condição foram ressuspensas em tampão de amostra não redutor e fervidas por 10 min a 95 °C. As proteínas foram separadas por SDS-Page (primeira dimensão) e depois da corrida, cada *lane* foi cortada e incubada com 0.1 M de DTT em tampão de corrida por 20 min a temperatura ambiente para reduzir as proteínas. Após uma lavagem com tampão de corrida, os tióis foram bloqueados com 0.1 M de N-etilmaleimida por 15 minutos no escuro. Finalmente cada lane foi posicionada horizontalmente sobre o empilhamento do segundo gel (segunda dimensão) e o espaço vazio foi preenchido com uma solução de 0.5% agarose e traços de azul de bromofenol. Um pequeno fragmento de papel filtro contendo o marcador de massa molecular foi inserido em um lado do gel antes deste solidificar (figura 10). Os géis foram corados com nitrato de prata. Para melhor separação das proteínas, o gel de resolução utilizado foi de 8% de poliacrilamida.

FIGURA 9. ESQUEMA DA SEPARAÇÃO DE PROTEÍNAS REDOX-ATIVAS ATRAVÉS DE ELETROFORESES BIDIMENSIONAL DIAGONAL



Nota: As proteínas que migram formando uma diagonal são as que não possuem pontes dissulfetos. Por outro lado, as proteínas com pontes dissulfeto intermoleculares (homo ou heterodímeros) migram embaixo da diagonal, enquanto que proteínas com pontes dissulfeto intramoleculares correm acima desta. Fonte: RINALDUCCI, 2018.

FIGURA 10. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TÉCNICA DE ELETROFORESES BIDIMENSIONAL DIAGONAL



Nota: As proteínas são separadas num primeiro gel em condições não redutoras, logo cada *lane* é cortada e as proteínas são reduzidas e alquiladas. Finalmente cada *lane* é posicionada horizontalmente acima do segundo gel. Fonte: bio-protocol.org

4.4.13 Padronização do ensaio de transição de fibroblastos a miofibroblastos

Para determinar se QSOX1b recombinante induz a transição de fibroblastos a miofibroblastos, foi avaliada a expressão de alfa-actina de musculo liso após 72 horas do estímulo. Para isso, foram plaqueadas 10^6 células em placas de 60 mm (\approx 70% de confluência). No dia seguinte as células foram incubadas com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem, 10% de soro fetal bovino ou veículo, por 30 minutos. Logo as células foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas com veículo ou com DMEM completo (nas células tratadas com 10% de soro fetal bovino) por 72 horas. Após esse tempo, foram feitas 3 lavagens com PBS e as células foram lisadas com Laemmli buffer e dois ciclos de congelamento/descongelamento. Finalmente as amostras foram fervidas durante 10 minutos e foram analisadas por SDS-Page e Western blot, aplicando volumes iguais em cada poço. Os anticorpos primários utilizados foram anti-SM actin (1:1000) e anti-GAPDH (1:2000) e o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com HRP (1:10000). Para revelar foram utilizados os substratos ECL convencional e altamente sensível.

Também foi testado o tratamento contínuo durante as 72 horas do ensaio, utilizando 10 ng/mL de TGF- β 1 (conhecido indutor da transição fibroblasto-miofibroblasto), 50 nM QSOX1b recombinante selvagem (concentração mínima que induz migração celular), 50 nM QSOX1b recombinante mutada e veículo.

4.5 ANALISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram mostrados como média \pm SD de pelo menos 3 experimentos independentes. Os dados foram analisados pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e teste ANOVA com post-hoc de Tukey ou Dunnett, em GraphPad Prism 8.0.1. O valor de $P \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

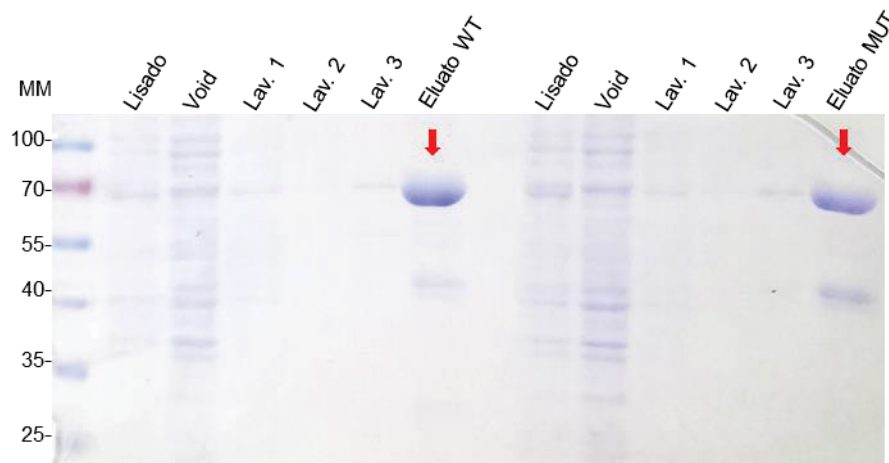
5 RESULTADOS

5.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

As bactérias quimiocompetentes da cepa AD494 foram transformadas com o vetor pET-32a QSOX1, contendo o inserto para a forma selvagem, e com o vetor pET-32a QSOX1 mut452 (SxxC) contendo o inserto para a forma inativa da proteína de camundongo. Após a expressão em grande escala as bactérias foram lisadas em prensa de French, e a purificação foi feita por cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC). Amostras das diversas etapas do processo de purificação das proteínas recombinantes QSOX1b selvagem e QSOX1b mutada foram coletadas e separadas em gel SDS-PAGE 10%, os quais foram corados com azul de Coomassie (Figura 11). É possível verificar que os eluatos apresentam as bandas com as massas moleculares esperadas para as proteínas recombinantes (70 kDa). As concentrações médias determinadas por espectrofotometria foram entre 10 e 20 μ M.

FIGURA 11. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE QSOX1b (SELVAGEM E MUTADA)



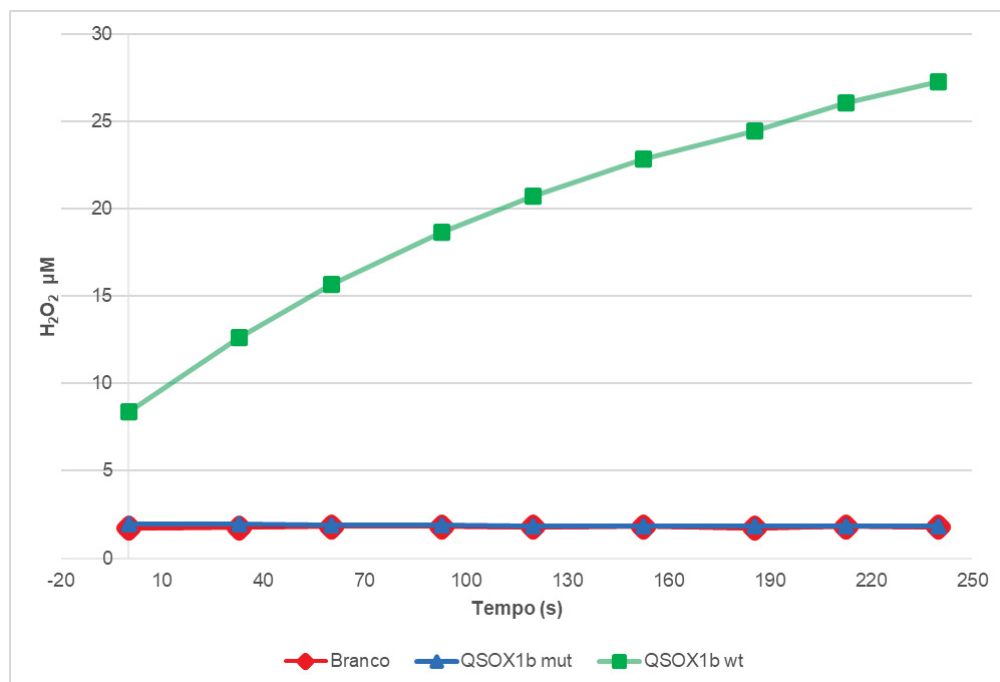
Nota: Bactérias eletrocompetentes AD494 foram transformadas com o vetor para a expressão da proteína recombinante QSOX1b (selvagem e mutada SxxC) e induzidas a expressar a proteína com 0.1mM de IPTG por 18 horas a 20°C. As bactérias foram lisadas em prensa de French com tampão de lise nativo e a purificação proteica foi realizada por cromatografia de afinidade a resina Ni-NTA agarose. O lisado, void, lavagens e eluato das duas proteínas foram submetidos a SDS-PAGE 10% e corados com azul de Coomassie. FONTE: A autora.

5.1.2 Determinação da atividade enzimática da QSOX1b

Para determinar a atividade enzimática da proteína recombinante selvagem, foi realizado o método indireto utilizando DTT, conhecido substrato artificial da QSOX1. A atividade DTT oxidase forma peróxido de hidrogênio, que juntamente com a peroxidase de raiz forte, oxida o ácido homovanílico a um dímero fluorescente.

Inicialmente, foi feita uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H_2O_2 (0; 0.2; 0.4; 0.8; 1.6 μM). Então, foi realizado o monitoramento da fluorescência das recombinantes (selvagem e mutada) que evidenciou um aumento na formação do peróxido de hidrogênio em relação ao tempo nas reações com QSOX1b selvagem, com uma atividade média produzida de 300 nmol H_2O_2 / min / mg de proteína. Já a proteína mutante mostrou-se completamente inativa (Figura 12).

FIGURA 12. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE H_2O_2 PELA OXIDAÇÃO DE DTT PELAS ENZIMAS QSOX1b SELVAGEM E QSOX1b MUTADA



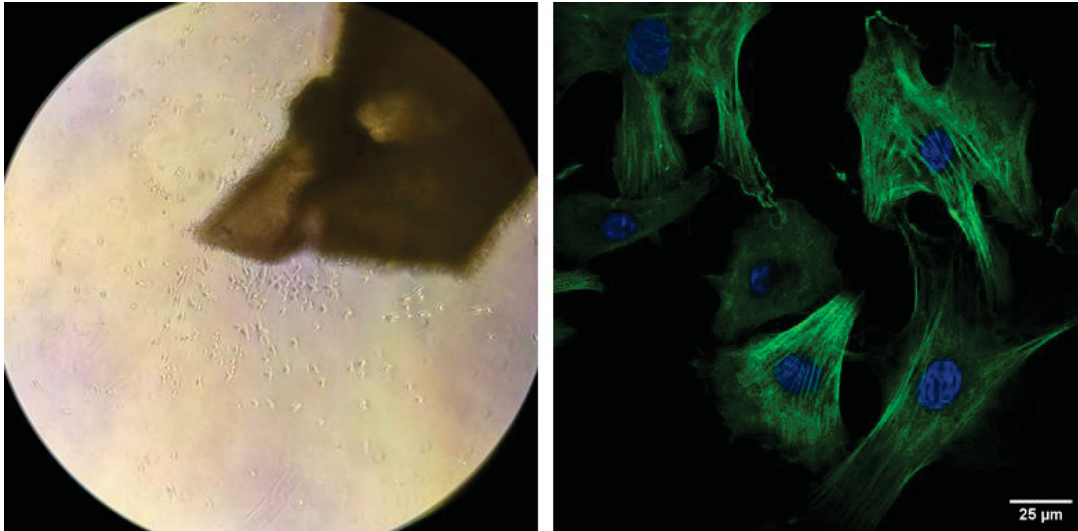
Nota: Observa-se que a QSOX1b selvagem (wt) produz H_2O_2 ao longo do tempo, devido a sua atividade enzimática, mas a QSOX1b mutada não gera H_2O_2 . O branco corresponde ao meio reacional sem QSOX1b. FONTE: A autora.

5.1.3 Obtenção de células musculares lisas vasculares

As células musculares lisas da artéria aorta foram obtidas de ratos Wistar. Após 3 – 5 dias após o plaqueamento dos explantes, as células migraram para a placa, como observado na figura. A identidade das células musculares lisas de aorta de rato

foi confirmada por de imunofluorescência indireta detectando a proteína contrátil alfa-actina de músculo liso, como observado na figura 13.

FIGURA 13. CÉLULAS MUSCULARES LISAS OBTIDAS DE AORTA DE RATO



Nota: As células musculares lisas de aorta de rato (VSMC) foram obtidas pelo método de explante (esquerda) e a identidade foi confirmada por imunofluorescência indireta pela detecção de alfa actina de músculo (direita). Os anticorpos utilizados foram: primário: anti-SM actin (1:250) e secundário: anti-mouse Alexa flúor 488 (1:500). As imagens foram captadas no microscópio a laser confocal com objetiva de 60x.

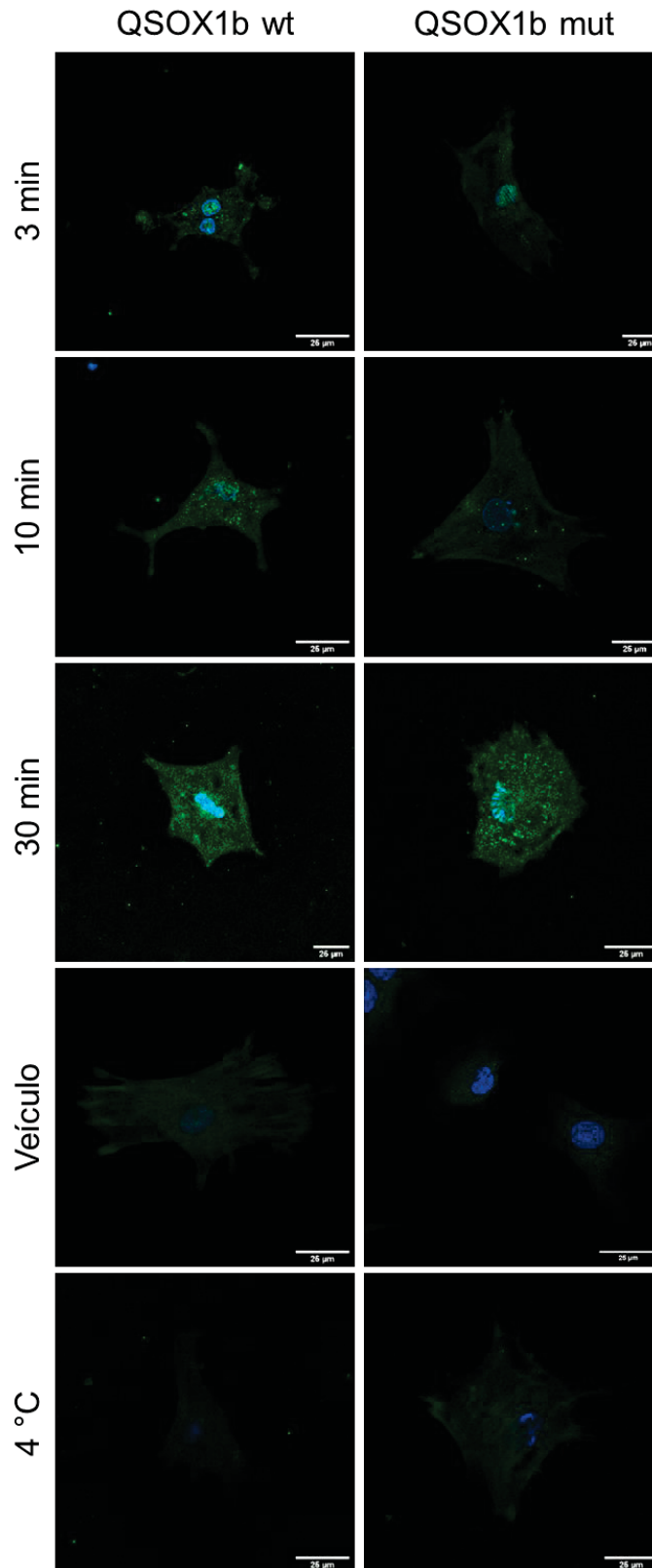
5.2 RESULTADOS PRELIMINARES EM VSMC

5.2.1 Internalização de QSOX1b selvagem e mutada em VSMC

Em dados prévios (Martínez, 2018) foi mostrado por imunofluorescência indireta a ligação de QSOX1b recombinante na membrana das VSMC após 5 minutos de incubação com 1 μ M desta; nesse tempo também foi observada uma marcação intracelular de QSOX1 mais intensa quando comparada com as células que não foram expostas às recombinantes (veículo), indicando uma internalização rápida da proteína. Para caracterizar esse fenômeno, foram avaliados tempos menores e maiores de incubação com as recombinantes, tanto em 37 °C como em 4 °C para confirmar se a internalização é dependente da temperatura e de transporte ativo. Os resultados mostraram que em 37 °C já é possível detectar a imunomarcação intracelular de QSOX1 nas VSMC incubadas com QSOX1b recombinante selvagem e mutada por apenas 3 minutos, quando comparado com a marcação fraca da condição controle (veículo). Esta imunomarcação é intensificada até 30 min em 37 °C. Em 4 °C, a intensidade da imunomarcação manteve-se próxima ao nível do veículo (Figura 14).

Estes dados indicam que ambas as QSOX1b selvagem e mutada são internalizadas rapidamente pelas VSMC. O padrão da marcação apresentou-se granular no citosol. Este padrão de marcação, e o fato de que a marcação não ocorre a 4 °C, indicam que se deve tratar de um transporte ativo, possivelmente endocitose.

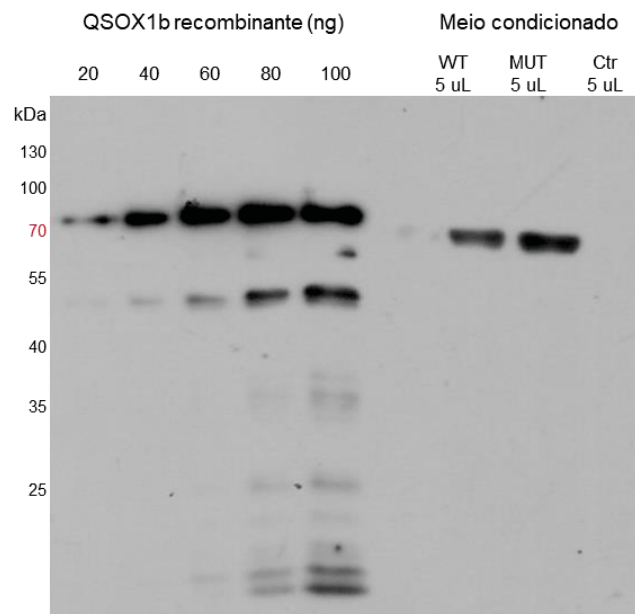
FIGURA 14. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE NAS VSMC



Nota: Imagem de microscopia confocal de VSMC, na ausência (veículo) ou presença de 1 μ M de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 3 – 30 min a 37 °C e por 30 min a 4 °C. A marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. Imagem representativa de 3 experimentos independentes. As imagens foram obtidas com objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x.

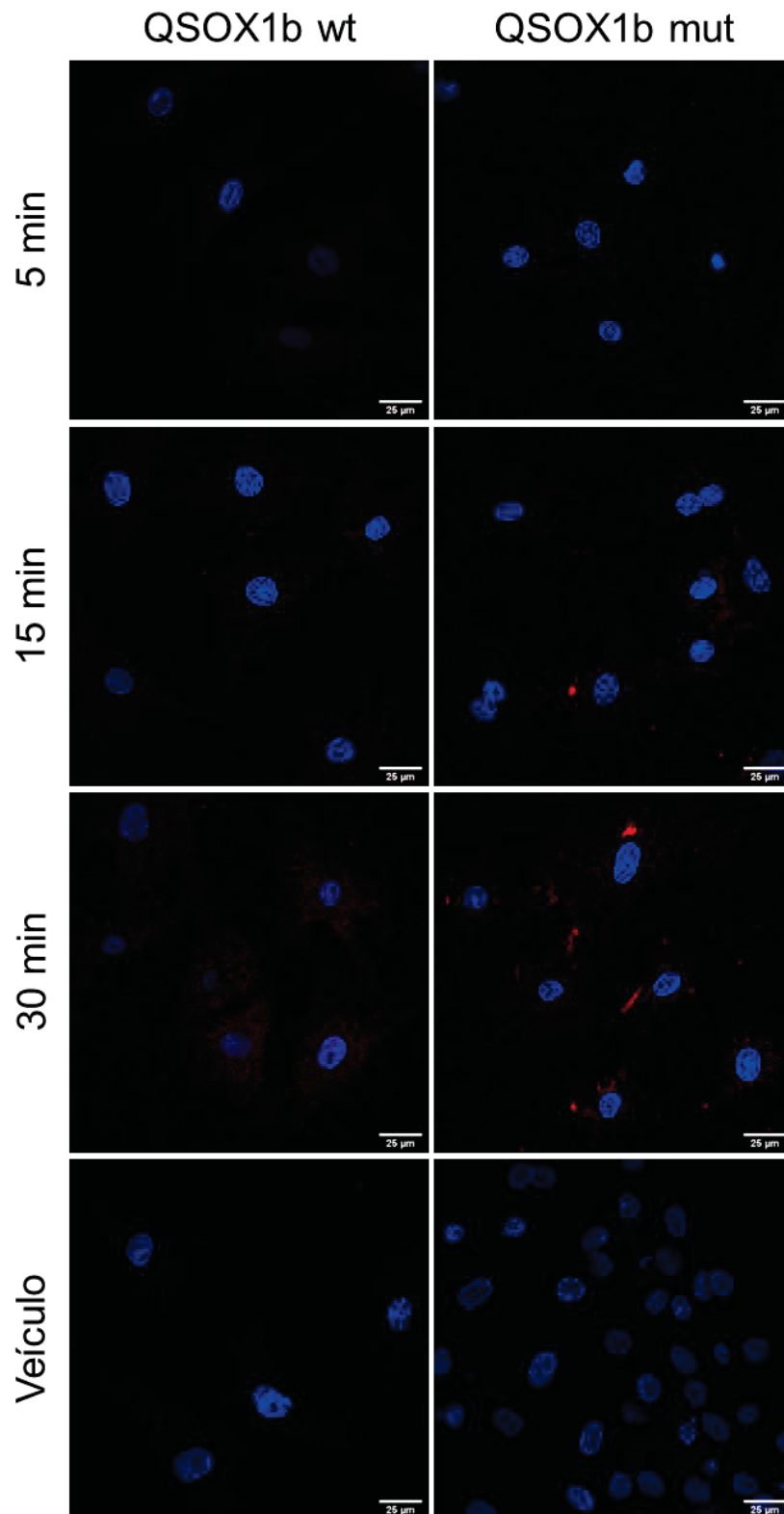
Os ensaios também foram avaliados com QSOX1b secretada por células HEK293T superexpressando QSOX1b selvagem e mutada (CXXS). Esses vetores contêm as sequências que codificam a QSOX1b selvagem e mutada de camundongo com uma etiqueta de hemaglutinina (HA). A concentração das QSOX1b secretadas nos sobrenadantes concentrados foi determinada por western blot e mostrou ser de aproximadamente entre 200 – 300 nM (Figura 15). Como observado na figura 16, em 5 minutos de incubação há uma pequena quantidade de QSOX1b selvagem e mutada internalizando, sendo logo incrementada nos tempos de 15 e 30 minutos. Esses dados confirmam que QSOX1b exógena, tanto selvagem como mutada são internalizadas rapidamente por VSMC.

FIGURA 15. SECREÇÃO DE QSOX1b-HA SELVAGEM E MUTADA NO MEIO DE CULTIVO



Nota: As células HEK293T foram transfectadas com construções para expressar QSOX1-HA selvagem ou QSOX1-HA mutada (C455S). O controle (Ctrl) representa células transfectadas apenas com o plasmídeo pCI-neo vazio. Quarenta e oito horas após a transfeção, o meio condicionado foi coletado e analisado por western blotting com anti-QSOX1. Uma curva de calibração foi realizada nas mesmas condições com diferentes quantidades de QSOX1b recombinante. Massa molecular da QSOX1b recombinante: 74 kDa e da QSOX-HA: 67 kDa.

FIGURA 16. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b SECRETADA



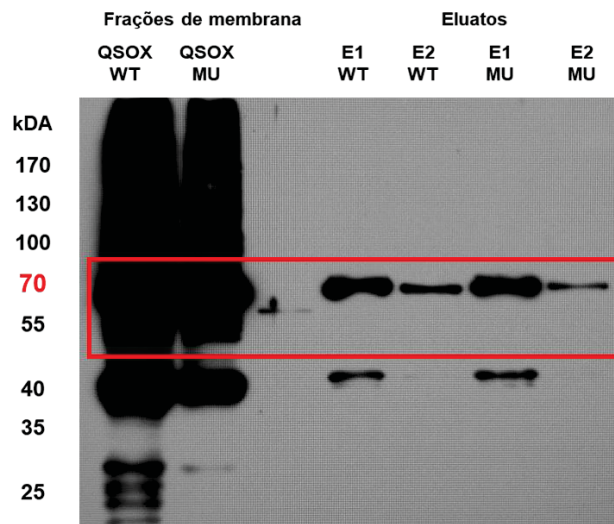
Nota: Imagem de microscopia confocal de VSMC, na ausência (veículo) ou presença de ~ 200 – 300 nM de QSOX1b secretada selvagem e mutada (CXXS) por 5 – 30 min a 37 °C. A marcação vermelha detecta QSOX1-HA após reação com anti-HA e anti-rabbit Alexa Fluor 647, em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas com objetiva de 60x.

5.2.2 Identificação de proteínas ligantes da QSOX1

Através do ensaio de *cross-linking* com formaldeído se estabilizou a ligação da QSOX1b recombinante selvagem com proteínas da membrana das VSMC. Na análise por *western blot* foi confirmada a presença abundante de QSOX1b recombinante nas frações de membrana. Estas frações foram incubadas com resina de Ni-NTA e a QSOX1b crossligada e enriquecida foi analisada. Os resultados mostraram a presença da QSOX1 nestas amostras (eluatoss), inclusive numa segunda etapa de eluição (Figura 17).

Este processo foi realizado 3 vezes. Os eluatos de três experimentos independentes foram analisados por espectrometria de massas. Apenas a primeira replicata (Tabela 1) permitiu, dentro das mais de 300 proteínas identificadas, detectar maior quantidade de proteínas com mais peptídeos únicos nas amostras teste (QSOX1b selvagem e mutada) comparado com o controle negativo (AIF). Também foram detectados 5 e 3 peptídeos únicos de QSOX1b recombinante selvagem e mutada respectivamente.

FIGURA 17. PRESENÇA DE QSOX1b RECOMBINANTE LIGADA NA MEMBRANA CELULAR CONFIRMADA POR WESTERN BLOT



Nota: Detecção da QSOX1b selvagem e mutada ligadas nas frações de membrana enriquecidas em resinas de Ni-NTA-Agarose (Eluatos). Os anticorpos utilizados foram anti-QSOX1 (1:500) e anti-rabbit conjugado com HRP (1:4000).

TABELA 1. PROTEÍNAS DA FRAÇÃO DE MEMBRANA IDENTIFICADAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Protein names	Unique peptides AIF	Unique peptides QSOXmut	Unique peptides QSOXwt
Filamin A	17	12	29
AHNAK nucleoprotein OS=Rattus norvegicus	9	3	22
Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	9	9	18
Vinculin	11	2	16
Collagen alpha-1(I) chain	5	4	13
Fibronectin	2	3	9
Collagen alpha-1(III) chain	3	0	8
Unconventional myosin-Ic	4	3	8
Myoferlin	1	0	7
Collagen, type I, alpha 2	0	0	6
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	1	1	6
Receptor of activated protein C kinase 1 (Rack1)	1	1	6
Calnexin	0	0	5
Moesin	1	0	5
Protein disulfide-isomerase A4	1	2	5
Caveolae-associated protein 1 (Cavin1)	2	2	5
Septin 6 (Predicted), isoform CRA_b	0	0	2
Actin-related protein 2/3	0	1	2
RAB14, member RAS oncogene family	0	0	2
LDL receptor-related protein 1 (LRP1)	0	0	2
Qsox1	0	3	5
AIF	4	0	0

Nota: A tabela mostra as proteínas com peptídeos únicos mais abundantes identificados nas frações de membrana de células incubadas com QSOX1b recombinante selvagem e mutada em relação ao controle negativo (AIF). Do total de proteínas detectadas, somente foram selecionadas aquelas que possuíam dois ou mais peptídeos únicos de diferença em relação ao controle negativo (AIF), após essa primeira filtragem foram descartadas proteínas inespecíficas comuns ou irrelevantes (ex. ribossomais, mitocondriais, nucleares).

5.3 RESULTADOS EM FIBROBLASTOS L929

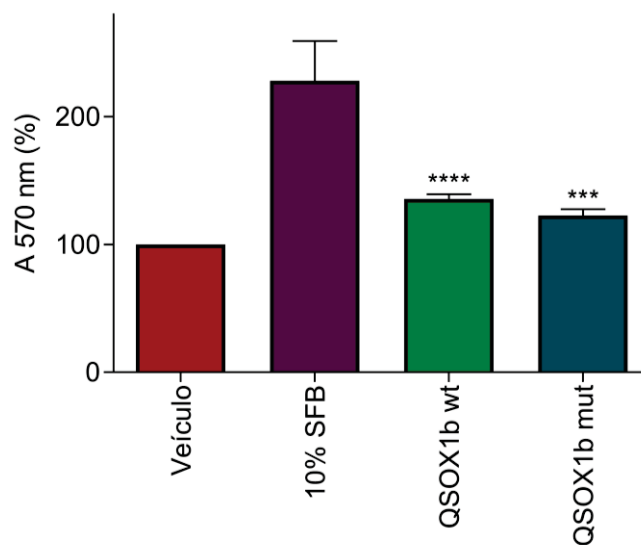
Nosso grupo demonstrou anteriormente que QSOX1b induz a proliferação e migração de células musculares lisas de aorta (França *et al.*, 2020), além disso os resultados prévios mostraram que QSOX1b é rápida internalizada nestas células. Embora culturas primárias sejam fisiologicamente mais parecidas com as células no tecido, seu uso implica restrição no número de passagens antes de entrarem em senescência, no uso de animais experimentais e em alto custo para se obter um

número grande de células. Portanto, para estudar de maneira mais detalhada e controlada o mecanismo de internalização e seu posterior tráfego intracelular, utilizamos como modelo experimental a linhagem de fibroblasto murino L929 (ATCC® CCL-1™), derivada originalmente de tecido areolar e adiposo subcutâneo normal de um camundongo macho com 100 dias de idade. Como observado na sequência, estas células respondem igual às VSMC quanto a proliferação e migração induzidas pelas QSOX1b recombinantes. Com esta validação, caracterizamos os mecanismos envolvidos na migração celular induzida pela QSOX1b na linhagem L929.

5.3.1 Efeito proliferativo de QSOX1b nos fibroblastos L929

Através do ensaio com cristal violeta foi mostrado que 100 nM de QSOX1b selvagem e mutada induzem a proliferação das células L929 depois de 48 horas de tratamento. Os resultados observados na figura 18 representam a média de 3 ensaios independentes com 5 replicatas técnicas cada, e expressam a porcentagem de proliferação celular em relação ao controle (veículo). Como estímulo mitogênico foi utilizado 10% de soro fetal bovino que aumentou em 2 vezes o número de células em relação ao controle. As proteínas QSOX1b selvagem e mutada aumentaram significativamente ($p \leq 0.001$) o número de células em aproximadamente 1.4 e 1.2 vezes respectivamente.

FIGURA 18. EFEITO PROLIFERATIVO DE QSOX1b RECOMBINANTE NAS CÉLULAS L929

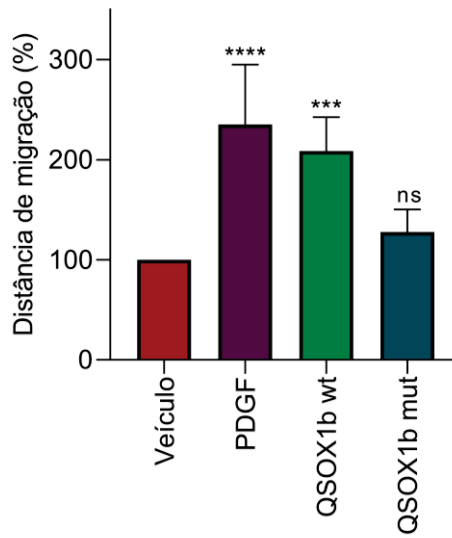


Nota: O gráfico mostra as porcentagens de proliferação celular em relação ao controle negativo (veículo) após tratamento por 48 horas com 100 nM de QSOX1b selvagem e mutada ou 10% SFB (controle positivo). Teste ANOVA de um fator e post hoc Dunnet, **** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.01$, $n=3$.

5.3.2 Efeito migratório de QSOX1b nos fibroblastos L929

O ensaio de migração através da técnica do *scratch* mostrou que o tratamento por 24 horas com 50 nM QSOX1b selvagem aumenta a migração celular significativamente ($p \leq 0.001$) em 2 vezes comparado ao controle (veículo), enquanto que a QSOX1b mutada teve um aumento não significativo em 1.2 vezes (Figura 19).

FIGURA 19. EFEITO MIGRATÓRIO DE QSOX1b RECOMBINANTE NAS CÉLULAS L929



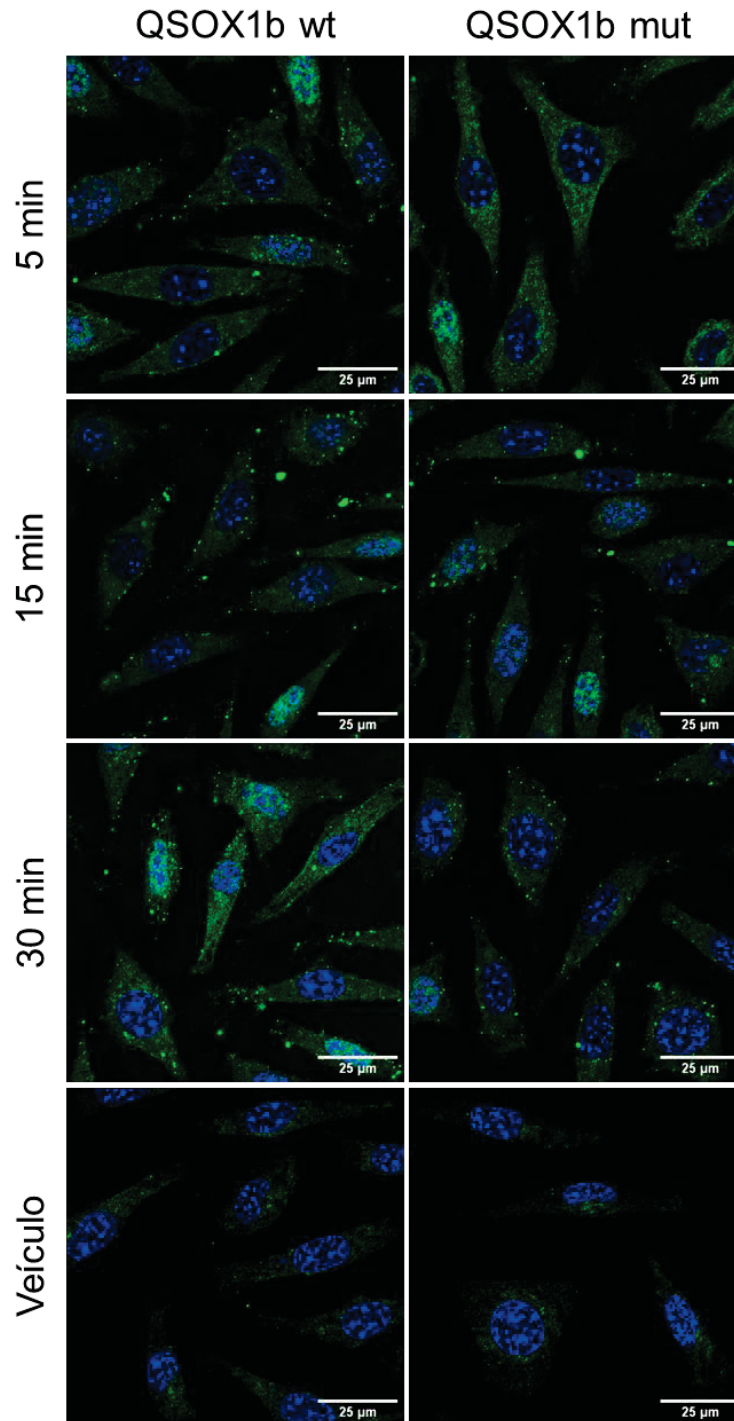
Nota: O gráfico mostra a porcentagem da distância de migração em relação ao controle negativo (veículo) após tratamento por 24 horas com 50 nM QSOX1b selvagem e mutada ou 20 ng/mL de PDGF (controle positivo). Teste ANOVA de um fator e post hoc Dunnett, **** $p \leq 0.0001$, *** $p \leq 0.001$, ns: não significativo, $n=5$.

5.3.3 Internalização de QSOX1b recombinante nos fibroblastos L929

A localização de QSOX1b exógena foi avaliada por imunofluorescência, utilizando anticorpo anti-QSOX1. Após 5 min de incubação com 500 nM QSOX1b recombinante selvagem e mutada ambas foram detectadas na superfície celular e também no compartimento intracelular como observou-se previamente nas VSMC. Com o tempo, a imunomarcagem de QSOX1b torna-se intracelular, em um padrão pontuado distribuído no citosol (Figura 20). Esses resultados indicam uma rápida interação da QSOX1b recombinante com a membrana plasmática seguida de sua internalização, presente em grânulos ou vesículas. Utilizando anticorpo anti-His, também foi detectada a internalização da QSOX1b recombinante e apesar que a marcação é menos intensa, o padrão é semelhante (Figura 21). As células também foram incubadas com QSOX1b recombinante em 4 °C e observou-se que tanto a proteína selvagem quanto a mutada estavam restritas à superfície celular (Figura 22), indicando que a internalização é mediada por um transporte dependente de energia.

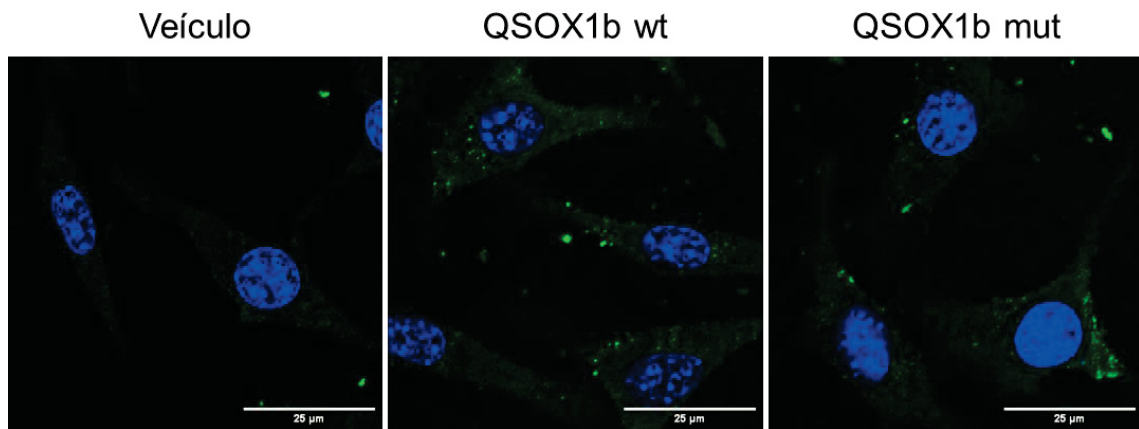
Como em VSMC, também foi observado que QSOX1b secretada por células HEK293T (superexpressando QSOX1b selvagem e mutada) internaliza nos fibroblastos (Apêndice 3).

FIGURA 20. INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE NOS FIBROBLASTOS L929



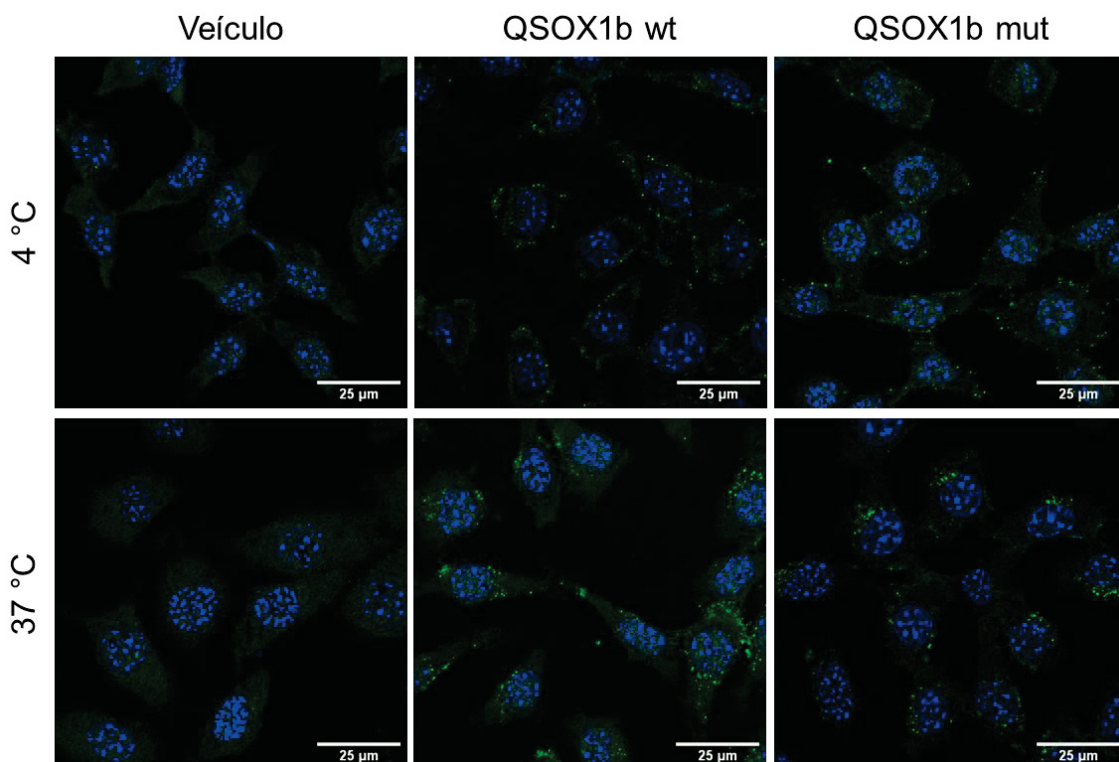
Nota: Imagem de microscopia confocal de fibroblastos L929, na ausência (veículo) ou presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada, por 5 – 30 min a 37°C. A marcação verde detecta QSOX1 após reação com anti-QSOX1 e anti-rabbit Alexa Flúor 488. Imagens obtidas com objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x.

FIGURA 21. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE INTERNALIZADA NOS FIBROBLASTOS L929



Nota: Imagem de microscopia confocal de fibroblastos L929, na ausência (veículo) ou presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada, por 30 min a 37 °C. A marcação verde detecta QSOX1b recombinante após reação com anti-His tag e anti-mouse Alexa Flúor 488. Imagens obtidas com objetiva de 60x e zoom digital de 3x.

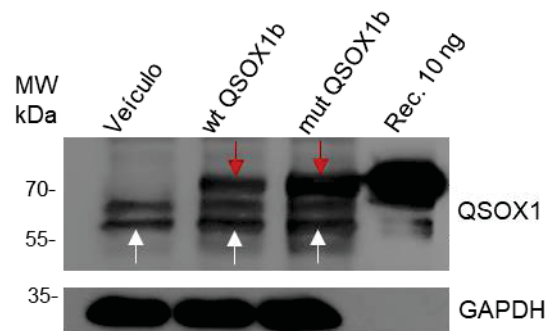
FIGURA 22. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE NA SUPERFÍCIE DOS FIBROBLASTOS L929 EM 4 °C



Nota: Imagem de microscopia confocal de fibroblastos L929, na ausência (veículo) ou presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada, por 30 min a 37 °C e 4 °C. A marcação verde detecta QSOX1b recombinante após reação com anti-QSOX1 e anti-rabbit Alexa Flúor 488. Imagens obtidas com objetiva de 60x e zoom digital de 2x.

Para fortalecer os resultados observados por imunofluorescência, também foi detectada a QSOX1b recombinante endocitada nas células L929, através de *Western blot*. Foram analisados os lisados totais das células incubadas com QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 minutos, além de um controle de células incubadas somente com o veículo. Após revelar as membranas foi possível detectar tanto a QSOX1 endógena (Figura 23, setas brancas) nos três lisados quanto a QSOX1b recombinante nos lisados das células incubadas com esta proteína (Figura 23, setas vermelhas) indicando a presença desta dentro das células e possivelmente nos endossomos.

FIGURA 23. DETECÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE EM LISADO CELULAR

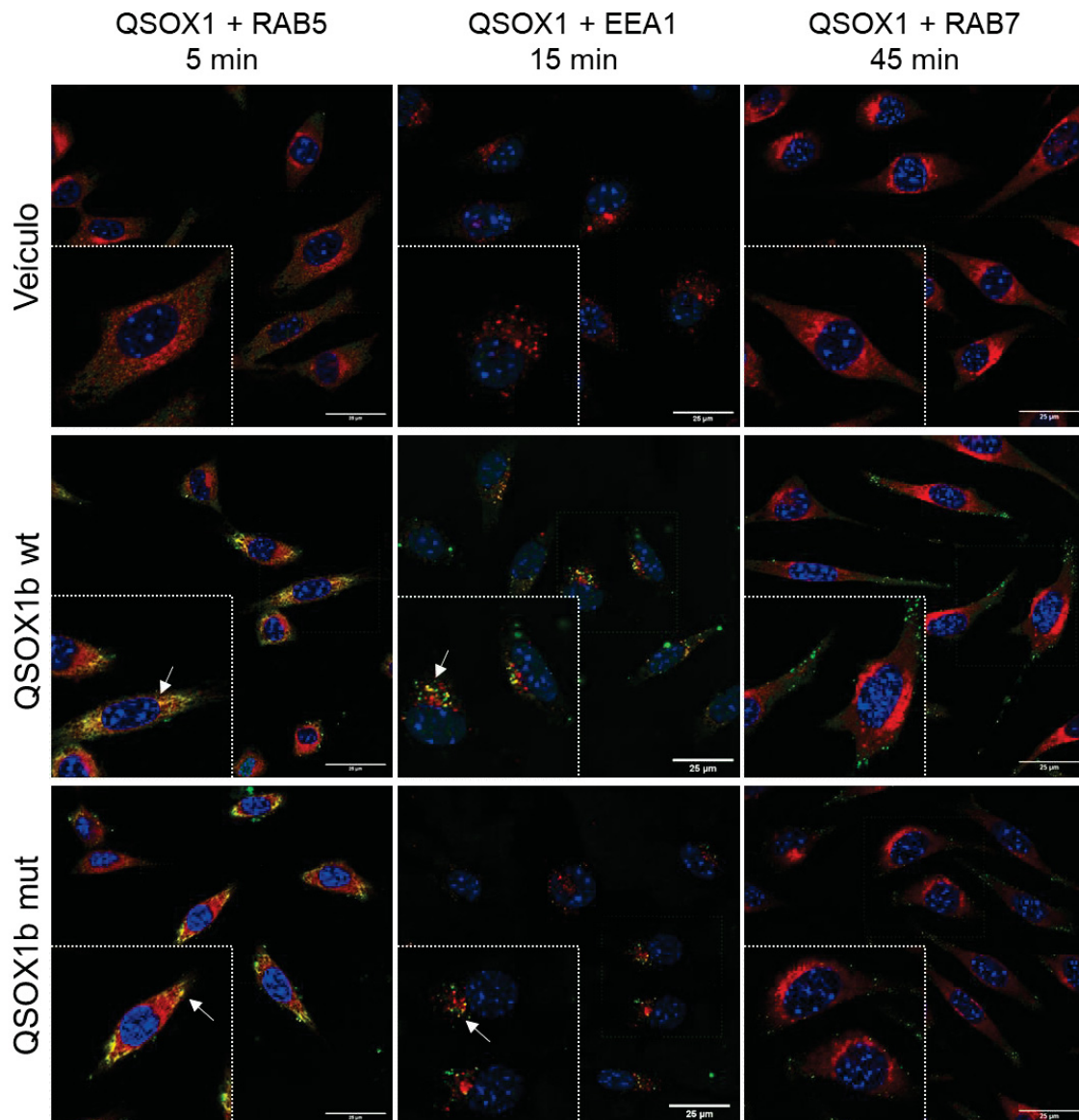


Nota: Os fibroblastos L929 foram incubados com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 min a 37 °C. Após lisar, as amostras foram analisadas por *western blotting* com anti-QSOX1. As setas brancas indicam QSOX1b endógena (≈ 66 kDa), as setas vermelhas mostram QSOX1b recombinante (≈ 74 kDa).

5.3.4 Detecção de QSOX1b recombinante nos endossomos dos fibroblastos L929

Para estudar a via clássica da endocitose através dos endossomos, analisamos se QSOX1b recombinante co-localiza com os marcadores de endossomos iniciais EEA1 e Rab5 após a incubação com as L929 por 5 e 15 minutos. Na figura 24 observa-se que houve co-localização tanto da QSOX1b selvagem quanto da mutada desde os 5 minutos e se manteve após 15 minutos. Para avaliar se QSOX1b recombinante transita para os endossomos tardios, estes foram marcados com Rab7. Até os 45 minutos avaliados, tanto a QSOX1b recombinante selvagem quanto a mutada não foram detectadas nos endossomos tardios. Esses resultados indicam que QSOX1b é endocitada independentemente da sua atividade sulfidril oxidase e não é direcionada para os lisossomos.

FIGURA 24. LOCALIZAÇÃO DE QSOX1b SELVAGEM E MUTADA NOS ENDOSSOMOS



Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 na presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 5, 15 e 45 min a 37 °C. A marcação vermelha detecta EEA1, Rab5 (endossomos iniciais) ou Rab7 (endossomos tardios), a marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x. As setas brancas indicam pontos de co-localização. A região ressaltada mostra a magnificação de 2x.

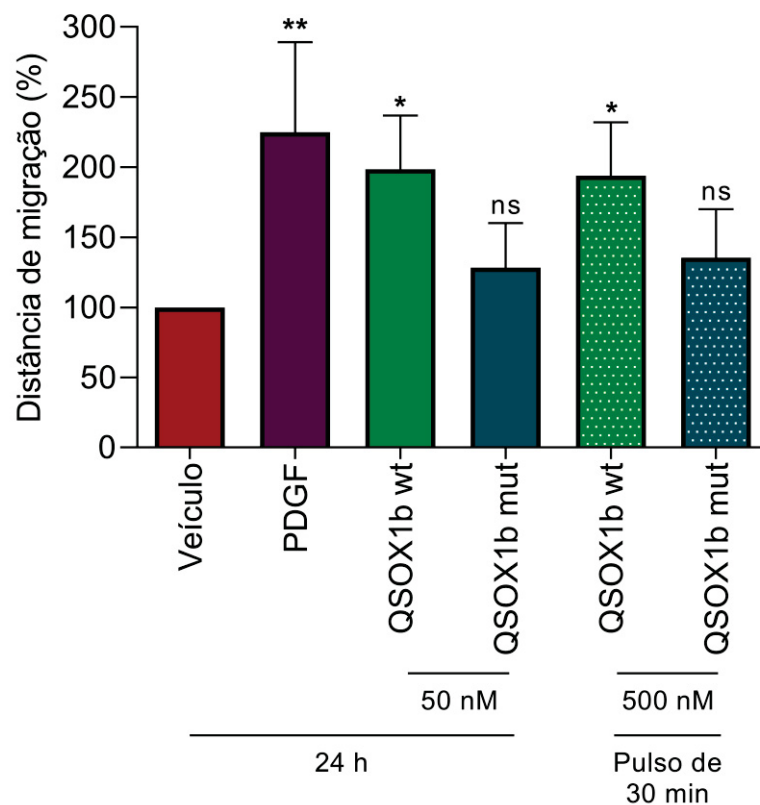
5.3.5 Efeito migratório da QSOX1b recombinante endocitada

Através da técnica do *scratch*, anteriormente foi mostrado que o tratamento de 24 horas com 50 nM de QSOX1b recombinante selvagem aumenta significativamente em 2 vezes a migração das células L929 comparado ao controle (veículo), enquanto que a QSOX1b mutada tem um aumento não significativo. Para avaliar se a QSOX1b recombinante endocitada tem o efeito migratório previamente observado, as células foram tratadas com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada apenas

por 30 minutos, tempo suficiente para internalizar. Após esse tempo as células foram lavadas 5 vezes e deixadas na solução veículo por 24 horas. Como observado na figura 25, este estímulo com recombinante selvagem também aumentou a migração em 1.9 vezes. A análise pelo teste de ANOVA com *post-hoc* Dunnett mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0.05$) na migração induzida pela QSOX1b recombinante selvagem comparada ao controle (veículo), já no caso da mutada, essa diferença não foi significativa.

Os tratamentos por 24 horas com 20 ng/mL de PDGF-BB, 50 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada também foram testados, como controle positivo do experimento, reproduzindo-se os resultados mostrados anteriormente.

FIGURA 25. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1b ENDOCITADA



Nota: O gráfico mostra a porcentagem da distância de migração em relação ao controle negativo (veículo) após tratamento por 24 horas com 50 nM de QSOX1b selvagem e mutada ou 20 ng/mL de PDGF (controle positivo) e por 30 minutos com 500 nM de QSOX1b selvagem e mutada. Teste ANOVA de um fator e post hoc Tukey, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$, ns: não significativo, $n=3$.

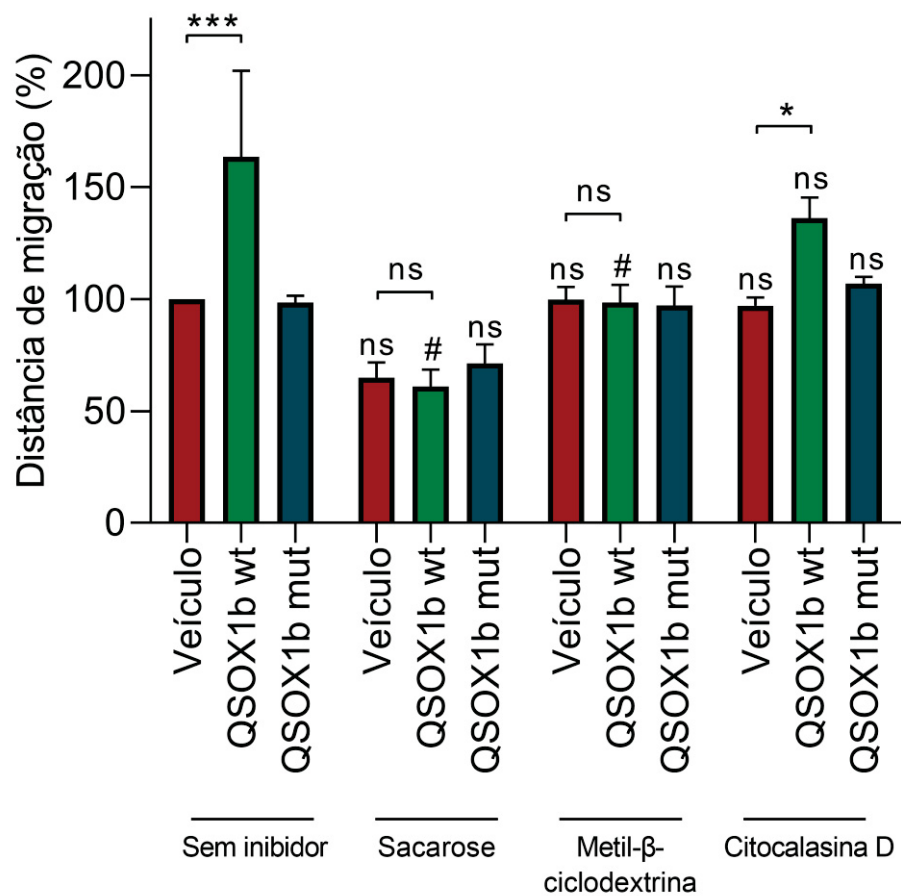
5.3.6 Efeito migratório após inibição da endocitose

Para avaliar se a migração celular induzida pela QSOX1b depende de sua endocitose, testamos inibidores de endocitose para determinar indiretamente, através da inibição ou diminuição da migração, o mecanismo endocítico. Os inibidores utilizados foram 0.45 M de sacarose, para inibir a endocitose mediada por clatrina (Guo *et al.*, 2015); 1 mM de Metil- β -ciclodextrina (Vercauteren *et al.*, 2010), para inibir a endocitose mediada por caveola e 4 μ M de citocalasina D, para inibir macropinocitose e fagocitose (Mäger *et al.*, 2012). As células foram incubadas com estes reagentes, antes e durante o tratamento com as recombinantes. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA com *post-hoc* Tukey, comparando a migração de cada tratamento com a migração do controle negativo (migração de células com veículo) e com migração do seu respectivo tratamento na condição sem inibidor.

Os resultados observados na figura 26 mostram que a sacarose reduziu significativamente a migração celular nas células tratadas com QSOX1b selvagem porem foi visualizado que esse inibidor alterou a morfologia celular e promoveu que as células soltem da placa. Esse efeito também foi observado nas células tratadas com QSOX1b mutada e veículo, sugerindo que a sacarose foi citotóxica.

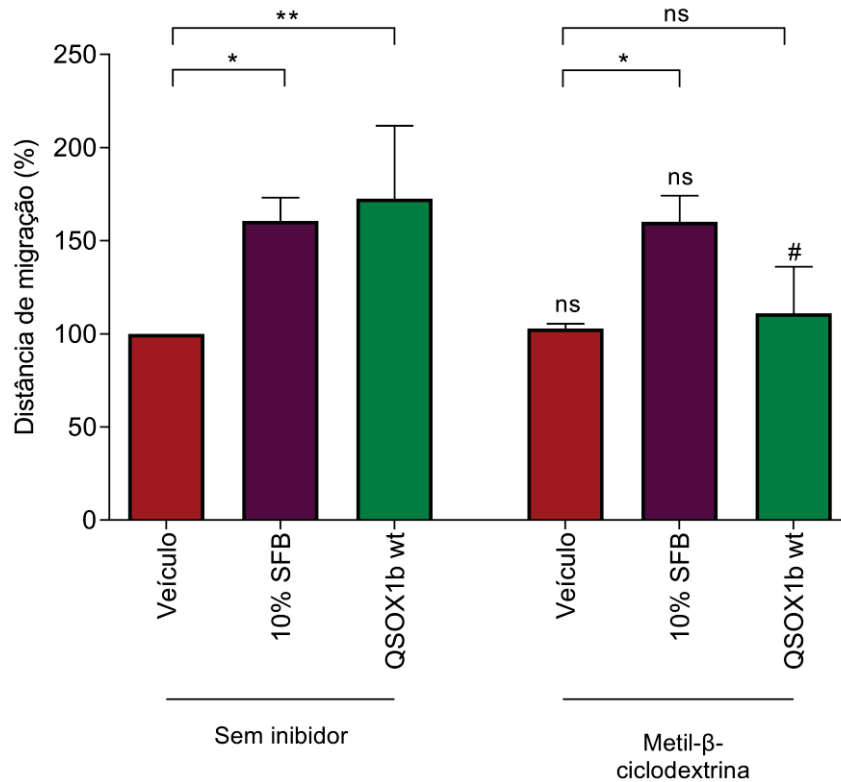
Por outro lado, a inibição com metil- β -ciclodextrina, diminuiu significativamente a migração das células tratadas com QSOX1b selvagem até o nível do veículo, sugerindo que a endocitose de QSOX1b pode ser mediada por caveola. No caso da citocalasina D, também houve uma redução na migração das células tratadas com QSOX1b selvagem, porém esta não foi estatisticamente significativa.

FIGURA 26. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1b APÓS INIBIÇÃO DE ENDOCITOSE



Nota: O gráfico mostra a porcentagem da distância de migração em relação ao controle negativo (veículo) após tratamento por 30 minutos com 500 nM de QSOX1b selvagem e mutada na presença de inibidores da endocitose. Teste ANOVA de um fator e post hoc Tukey, *** $p \leq 0.001$ e * $p \leq 0.05$ comparado ao respectivo veículo, # $p \leq 0.0001$ comparado ao respectivo tratamento na condição sem inibidor, ns: não significativo, $n=3$.

Para descartar que o efeito inibitório da Metil-β-ciclodextrina seja consequência de uma possível toxicidade deste inibidor, um grupo também foi tratado por 2 horas, na presença ou ausência do inibidor, com QSOX1b recombinante selvagem e com DMEM alta glicose suplementado com 10% de soro fetal bovino como um controle positivo. Foi observado então, que a incubação por 2 horas com Metil-β-ciclodextrina não influencia no efeito pro-migratório do soro fetal bovino e sim reduz significativamente o efeito pro-migratório da QSOX1b recombinante selvagem (Figura 27).

FIGURA 27. EFEITO MIGRATÓRIO DA QSOX1b APÓS INIBIÇÃO COM METIL- β -CICLODEXTRINA

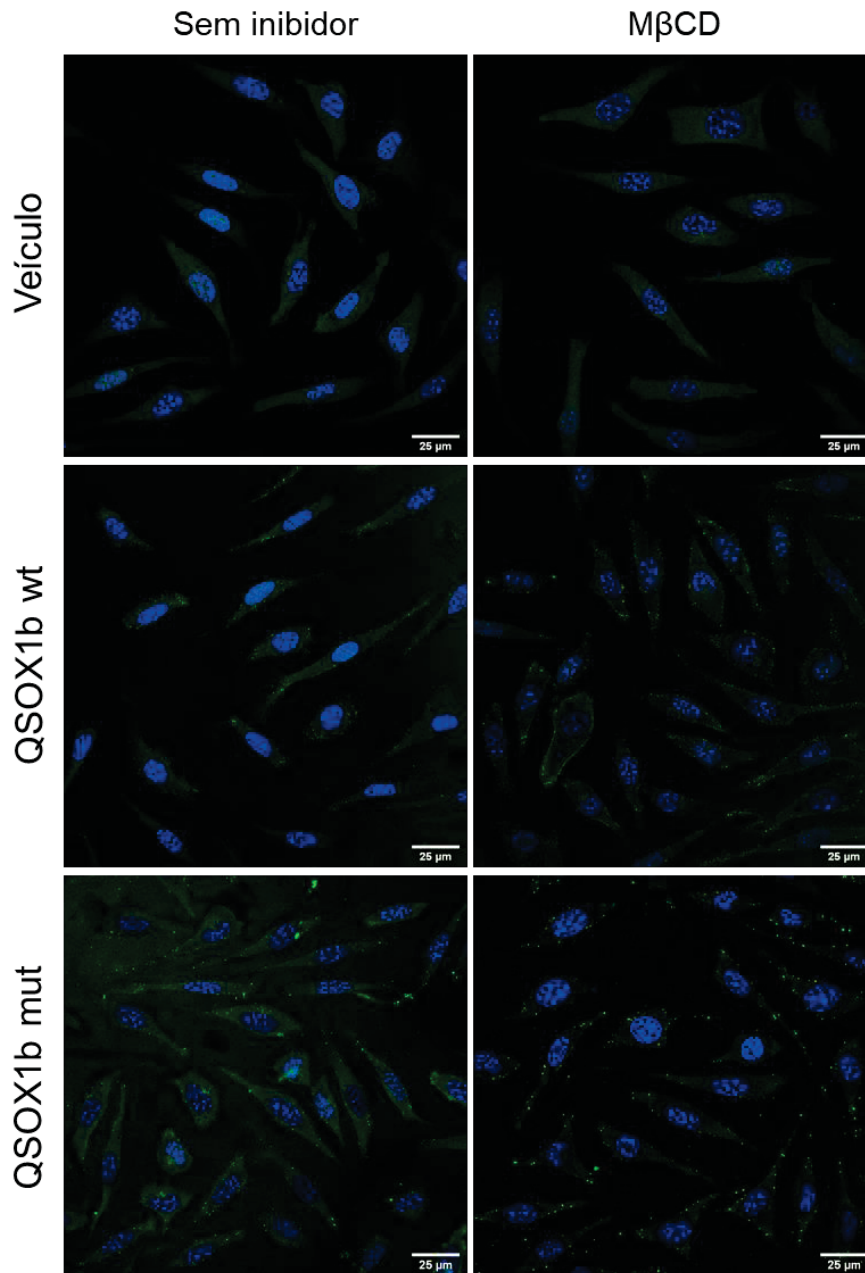
Nota: O gráfico mostra a porcentagem da distância de migração em relação ao controle negativo (veículo) após tratamento por 2 horas com 10% de soro fetal bovino ou 500 nM de QSOX1b selvagem, na presença ou não de 1 mM metil- β -ciclodextrina. Teste ANOVA de um fator e post hoc Tukey, ** $p \leq 0.01$ e * $p \leq 0.05$ comparado ao respectivo veículo, # $p \leq 0.05$ comparado ao respectivo tratamento na condição sem inibidor, ns: não significativo, $n=3$.

5.3.7 Inibição da endocitose de QSOX1b pela metil- β -ciclodextrina

Para confirmar o efeito da inibição da endocitose mediada por caveola, foi avaliado através de imunofluorescência a localização de QSOX1b recombinante na presença ou ausência de metil- β -ciclodextrina. Como se observa na figura 28, na presença de metil- β -ciclodextrina ambas QSOX1b recombinante selvagem e mutada foram detectadas preferencialmente na superfície das células.

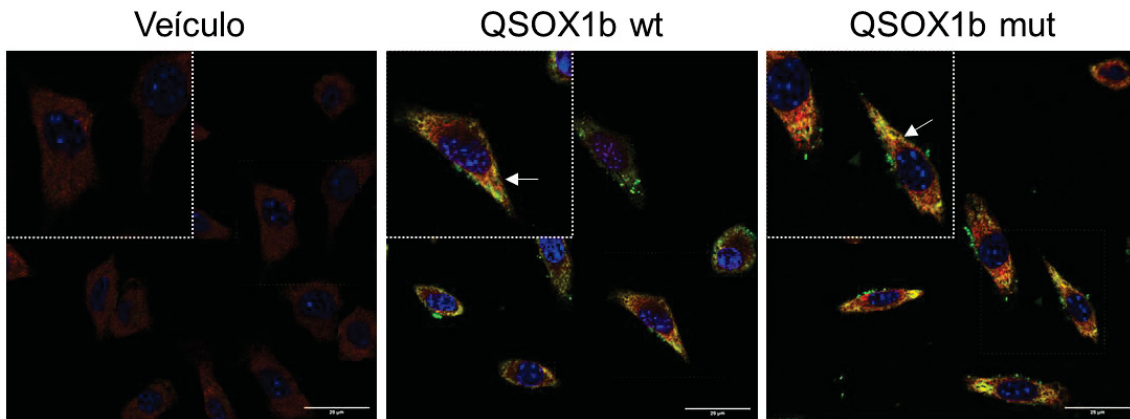
Além disso, observamos que tanto QSOX1b selvagem quanto mutada co-localizam com caveolina 1, um componente importante das caveolas, após 5 minutos de incubação (Figura 29). Esses resultados junto com os de migração indicam que a inibição da endocitose dependente de caveola prejudica gravemente a internalização de QSOX1b e a migração induzida pela QSOX1b selvagem.

FIGURA 28. INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b NA PRESENÇA DE METIL- β -CICLODEXTRINA



Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 incubados com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 min a 37 °C, na presença ou não de metil- β -ciclodextrina. A marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x.

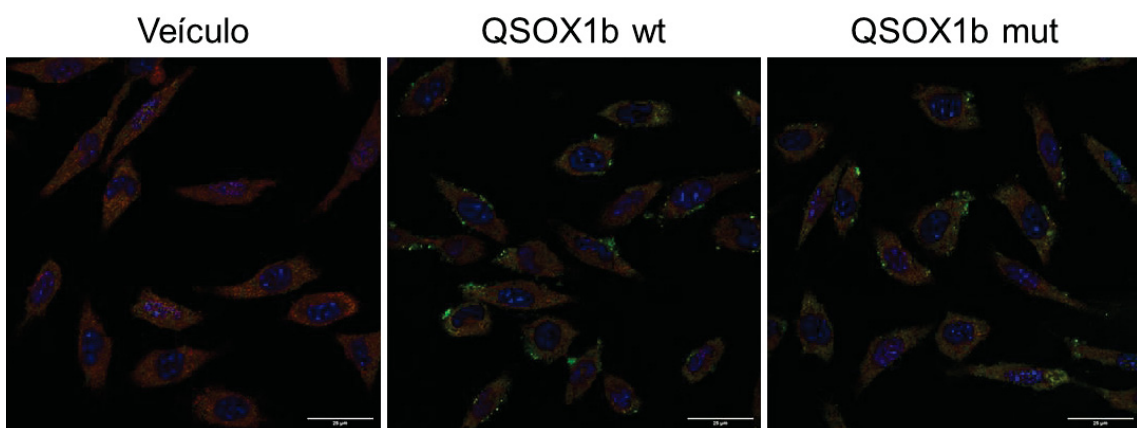
FIGURA 29. QSOX1b CO-LOCALIZA COM CAVEOLINA 1



Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 na presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 5 min a 37 °C. A marcação vermelha detecta caveolina 1, a marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x. As setas brancas indicam pontos de co-localização. A região ressaltada mostra a magnificação de 2x.

Devido a que o inibidor da endocitose mediada por clatrina mostrou-se citotóxico e impediu descartar a participação dessa via na internalização de QSOX1b, avaliamos por imunofluorescência se clatrina co-localiza com QSOX1b recombinante. Como mostrado na figura 30, após 5 minutos de incubação com as recombinantes (mesmo tempo utilizado para detectar caveolina 1) não se observou co-localização, sugerindo que essa via não é importante para a internalização da QSOX1b.

FIGURA 30. QSOX1b NÃO CO-LOCALIZA COM CLATRINA

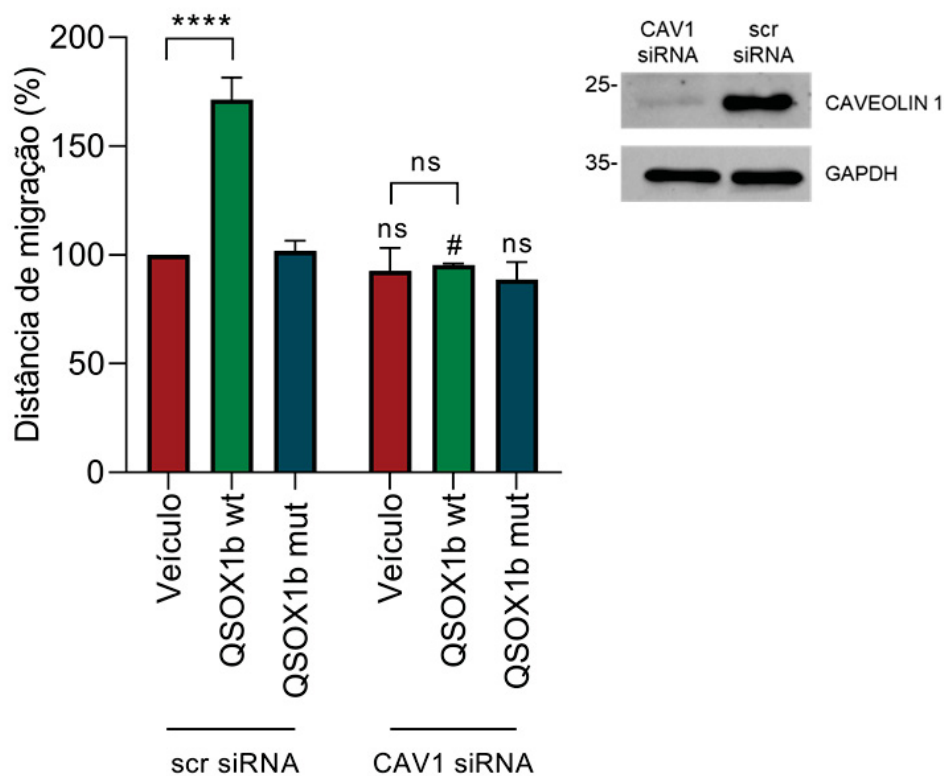


Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 na presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 5 min a 37 °C. A marcação vermelha detecta clatrina, a marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x.

5.3.8 Inibição da endocitose e migração após silenciamento de caveolina 1

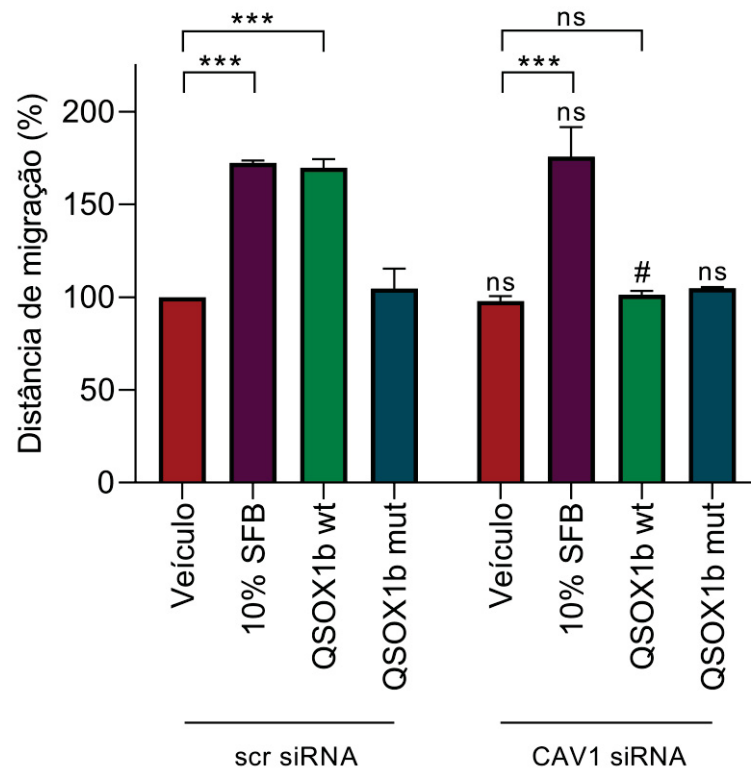
A migração celular foi avaliada nas células transfectadas com 50 nM de Cav1-siRNA nas quais a expressão de caveolina 1 foi silenciada. Como observado na figura 31, o silenciamento de caveolina 1 inibiu completamente a migração induzida por QSOX1b selvagem, em comparação com células transfectadas com o siRNA controle negativo. Para garantir que o silenciamento não interrompeu a migração celular em geral, também testamos o efeito migratório induzido por um pulso de 2 h com 10% de soro fetal bovino. O soro fetal induziu a migração celular em células transfectadas com siRNA controle negativo e também naquelas transfectadas com Cav1-siRNA (Figura 32), mostrando que a maquinaria de migração é funcional na ausência de caveolina 1.

FIGURA 31. INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO MEDIADA POR QSOX1b APÓS SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1



Nota: O gráfico da esquerda mostra a porcentagem da distância de migração das células silenciadas de caveolina 1 (Cav1-siRNA) em relação às células transfectadas com o controle negativo (scr siRNA) após tratamento por 30 min com 500 nM de QSOX1b selvagem e mutada. Teste ANOVA de um fator e post hoc Tukey, **** $p \leq 0.0001$ comparado ao respectivo veículo, # $p \leq 0.0001$ comparado ao respectivo tratamento na condição controle negativo, ns: não significativo, $n=3$. Na direita, figura representativa de western blot que mostra o silenciamento de caveolina 1 após transfecção com 50 nM Cav1-siRNA.

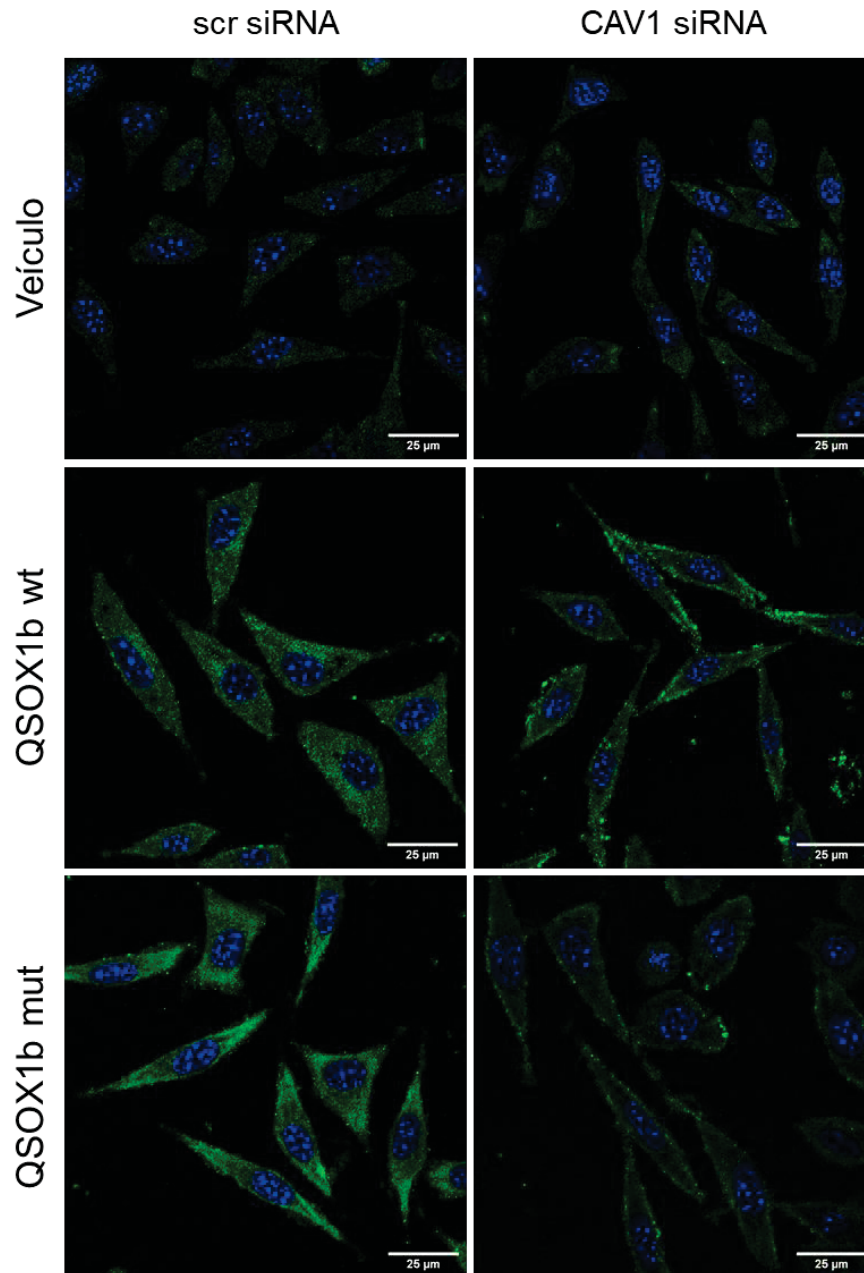
FIGURA 32. EFEITO DO SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1 NA MIGRAÇÃO CELULAR



Nota: O gráfico mostra a porcentagem da distância de migração das células silenciadas de caveolina 1 (Cav1-siRNA) em relação às células transfectadas com o controle negativo (scr siRNA) após tratamento por 2 horas com 500 nM de QSOX1b selvagem e mutada ou 10% SFB como controle positivo. Teste ANOVA de um fator e post hoc Tukey, *** $p \leq 0.001$ comparado ao respectivo veículo, # $p \leq 0.001$ comparado ao respectivo tratamento na condição controle negativo, ns: não significativo, n=2.

Por imunofluorescência, também observamos que o silenciamento de caveolina 1 impediu a internalização de QSOX1b selvagem e mutada, que foram detectadas predominantemente na superfície celular (Figura 33). Estas descobertas confirmam que a endocitose de QSOX1b selvagem é mediada por caveola e que a caveolina 1 é necessária para a migração celular induzida por QSOX1b.

FIGURA 33. INIBIÇÃO DA ENDOCITOSE DE QSOX1b APÓS SILENCIAMENTO DE CAVEOLINA 1



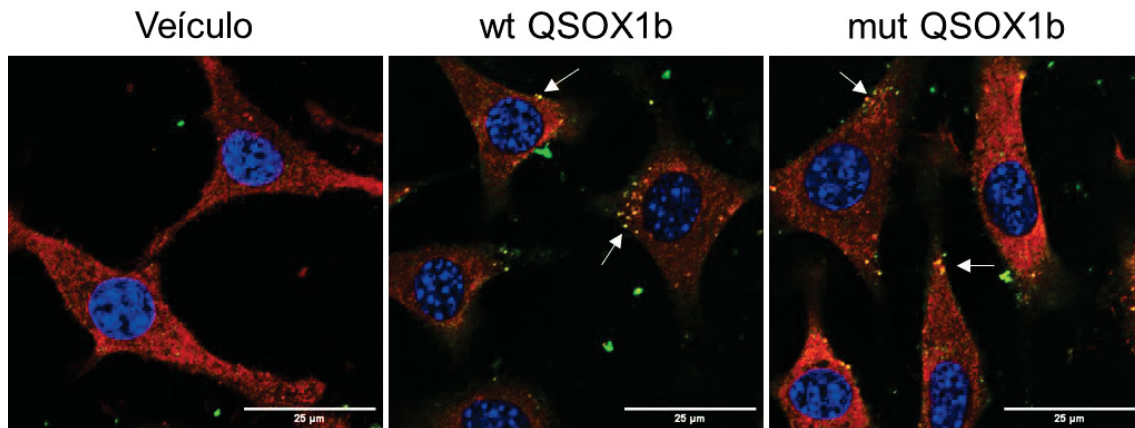
Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 silenciados de caveolina 1 (Cav1-siRNA) ou controle negativo (scr siRNA), incubados com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 min a 37 °C. A marcação verde detecta QSOX1 e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x e zoom digital de 1.5x.

5.3.9 Interação de QSOX1b com Nox1

Nosso grupo mostrou anteriormente que a migração induzida por QSOX1b dependia do peróxido de hidrogênio produzido por Nox1 (França *et al.*, 2019). Portanto, foi avaliado por imunofluorescência se QSOX1b internalizada interage com

Nox1. Os resultados na figura 34 mostram que após 30 min de incubação tanto QSOX1b selvagem quanto mutada co-localizam com Nox1 endógena.

FIGURA 34. CO-LOCALIZAÇÃO DE QSOX1b COM NOX1



Nota: Imagem de microscopia confocal dos fibroblastos L929 na presença de 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem e mutada por 30 min a 37 °C. A marcação vermelha detecta Nox1, a marcação verde detecta QSOX1b recombinante mediante anti-His tag e em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas como objetiva de 60x e zoom digital de 3x. As setas brancas indicam pontos de co-localização.

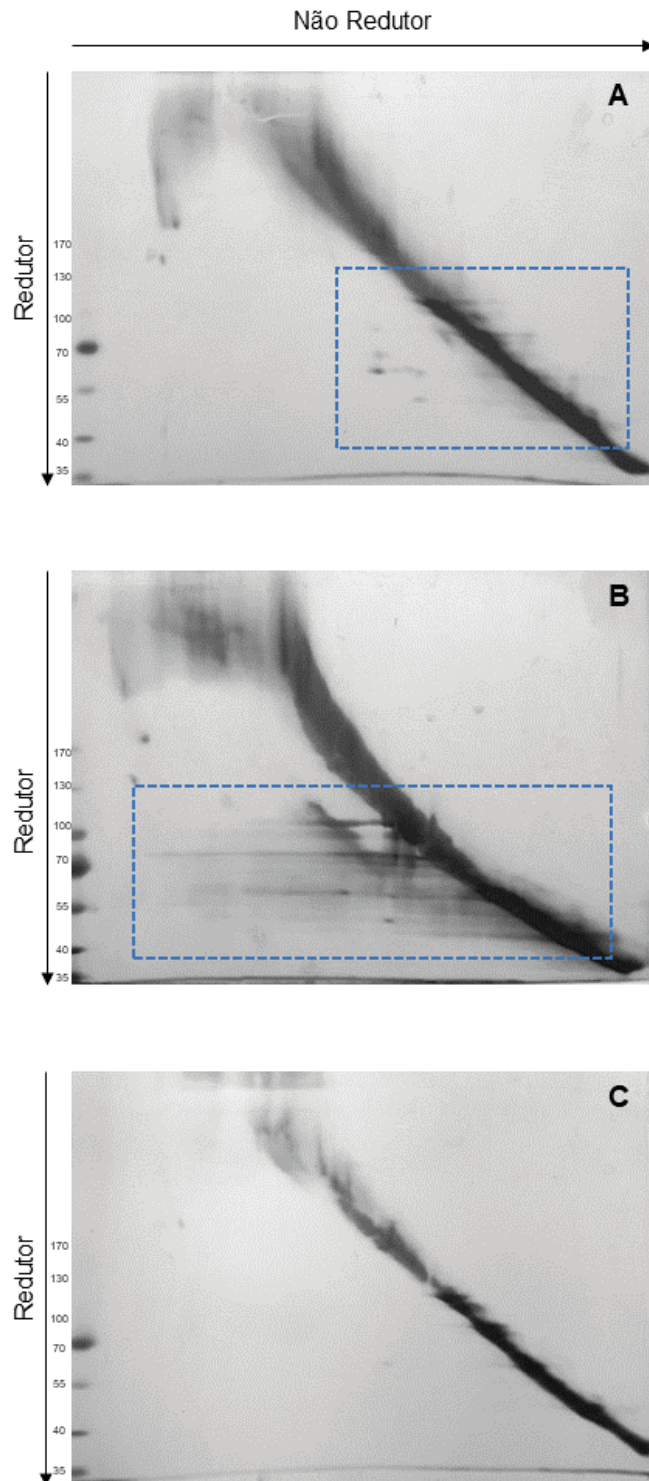
5.3.10 Detecção de alvos oxidáveis da QSOX1b recombinante selvagem

Através da técnica de eletroforeses bidimensional diagonal foi avaliado se a QSOX1b recombinante selvagem oxida proteínas dos fibroblastos L929 formando pontes dissulfeto intra- ou intermoleculares. Assim, proteínas abaixo da diagonal correspondem a proteínas contendo dissulfetos intermoleculares, enquanto que aquelas acima da diagonal principal correspondem a proteínas contendo dissulfetos intramoleculares.

Os resultados obtidos mostram que o peróxido de hidrogênio induziu a formação de pontes dissulfeto acima (intramoleculares) e abaixo (intermoleculares) da diagonal (Figura 35A). Já QSOX1b selvagem produziu uma oxidação mais intensa, observada tanto por um arrastado de bandas de alta massa molecular (com dissulfetos intermoleculares), como pela presença de uma segunda diagonal abaixo da diagonal principal (dissulfetos intermolecular de proteínas de média massa molecular) (Figura 35B). Estes dados indicam que QSOX1b recombinante induz a oxidação, direta ou indireta, de proteínas de alta e média massa molecular mediante pontes dissulfeto intermoleculares. No caso das proteínas do controle (células não

tratadas), estas migraram formando uma diagonal proeminente com escassas bandas ou pontos fora desta (Figura 35C).

FIGURA 35. DETECÇÃO DE PROTEÍNAS OXIDADAS PELA QSOX1b SELVAGEM



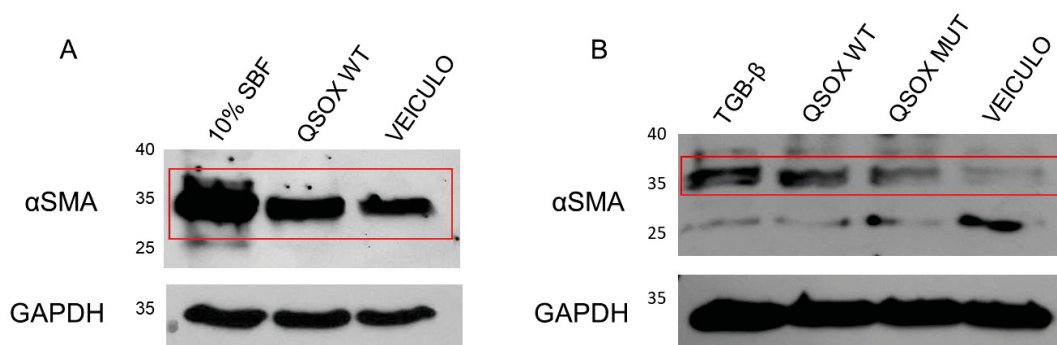
Nota: A figura mostra a corrida eletroforética bidimensional de células L929 tratadas com 100 μM de H_2O_2 (A), tratadas com 250 nM de QSOX1b recombinante selvagem (B) ou não tratadas (C). A região em azul das figuras A e B indicam as proteínas fora da diagonal, que foram oxidadas.

5.3.11 Avaliação da transição de fibroblastos a miofibroblastos induzida pela QSOX1b recombinante

Através da expressão de alfa-actina de musculo liso, foi avaliado se QSOX1b recombinante pode induzir a transição de fibroblastos a miofibroblastos após 72 horas de estímulo. No primeiro ensaio foi utilizado DMEM com 10% de soro fetal bovino como controle positivo durante as 72 horas do experimento, enquanto QSOX1b recombinante selvagem (500 nM) foi incubada somente por 30 minutos e após várias lavagens foi substituída por veículo. Na figura 36A se observa que depois de 72 horas, tanto as células incubadas com veículo quanto as incubadas com QSOX1b recombinante selvagem e 10% de soro fetal bovino expressam alfa-actina de musculo liso, porem estas duas últimas em maior quantidade que o veículo.

O experimento foi repetido utilizando o TGF- β 1 como controle positivo, por ser um conhecido indutor desta transição fibroblasto-miofibroblasto. Além disso os estímulos com QSOX1b recombinante foram permanentes, mas numa concentração menor (50 nM) que induz migração das células L929. Como observado na figura 36B, comparado ao veículo, TGF- β 1, QSOX1b recombinante selvagem e QSOX1b recombinante mutada aumentaram a expressão de alfa-actina de músculos liso, porém na mutada esse aumento foi mais sutil. Embora preliminares, esses resultados parecem indicar que o estímulo com QSOX1b recombinante pode regular o fenótipo dos fibroblastos.

FIGURA 36. EXPRESSÃO DE ALFA-ACTINA DE MUSCULO LISO APÓS ESTIMULO COM QSOX1b RECOMBINANTE



Nota: na figura A se mostra a expressão de alfa-actina de musculo liso após 72 horas do estímulo com 10% de soro fetal bovino ou 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem. Na figura B se observa a expressão de alfa-actina de musculo liso após estímulo com TGF- β , 50 nM de QSOX1b recombinante selvagem ou mutada durante 72 horas.

6 DISCUSSÃO

QSOX1 é uma proteína predominante secretada que nos últimos anos tem adquirido importância clínica pois foi detectada em diversos tipos de tumores e células cancerosas e parece favorecer a invasão e progressão tumoral (Baek *et al.*, 2018; Katchman *et al.*, 2011; Soloviev *et al.*, 2013; Lacerenza *et al.*, 2020; Hanavan *et al.*, 2015; Fifiel *et al.*, 2020; Sung *et al.*, 2018). Esse efeito proliferativo e migratório também foi observado em fibroblastos (Ilani *et al.*, 2013) e células de músculo liso vasculares (Borges *et al.*, 2015; França *et al.*, 2020). Até agora esse papel tem sido atribuído à sua função sulfidril oxidase na matriz extracelular, onde foi mostrado que QSOX1 contribui na remodelagem da matriz através da incorporação de proteínas como laminina, fibronectina e colágeno (Ilani *et al.*, 2013; Javitt *et al.*, 2018; Feldman *et al.*, 2020) além da ativação de metaloproteases (Katchman *et al.*, 2013), criando dessa forma um microambiente favorável para adesão, proliferação e migração de células tumorais (Feldman *et al.*, 2020; Millar-Haskell *et al.*, 2022).

Nosso grupo mostrou em VSMC que a migração celular induzida por QSOX1b depende da atividade sulfidril oxidase e é mediada por peróxido de hidrogênio intracelular derivado da Nox1 (França *et al.*, 2020). Nesse sentido, ensaios prévios neste trabalho foram realizados nesse modelo celular. Assim, utilizando microscopia de fluorescência foi evidenciado que QSOX1b (recombinante ou secretada de células HEK293T) liga-se na membrana plasmática e depois é rapidamente internalizada nas VSMC em um processo independente da atividade oxidase e dependente da temperatura. Além disso, após análise por espectrometria de massas das frações de membrana de VSMC crossligadas a QSOX1b recombinante selvagem, mutada e AIF (controle negativo) permitiu identificar aproximadamente vinte proteínas com peptídeos únicos ausentes ou em menor quantidade no controle negativo e mais abundantes nas amostras teste. Apesar dos resultados corresponderem a uma única análise, os resultados mostraram-se interessantes pois detectaram-se duas proteínas da matriz extracelular conhecidas por ser possíveis alvos da QSOX1, como é fibronectina e colágeno (Javitt *et al.*, 2018; Feldman *et al.*, 2020). Além disso identificaram-se proteínas como filamina A, miosina e LRP1 que possuem resíduos de cisteínas (Page *et al.*, 2011; Prochniewicz *et al.*, 2008; De Nardis *et al.*, 2016) que poderiam ser alvos oxidáveis da QSOX1b, ou cavina que poderia estar relacionada com o fenômeno de internalização da QSOX1b. Embora os resultados com VSMC

foram promissórios, as limitações de trabalhar com cultura primária levaram a validar um novo modelo celular. Para isso, foi utilizada a linhagem de fibroblasto murino L929.

Nos fibroblastos L929, demonstramos que QSOX1b recombinante selvagem, mas não a QSOX1b recombinante mutada, induz a migração celular, dados semelhantes aos anteriormente observados em VSMC (Borges *et al.*, 2015; França *et al.*, 2020). Como nas VSMC, por imunofluorescência evidenciamos que QSOX1b recombinante selvagem e mutada são rapidamente internalizadas através da via endocítica, sendo localizadas nos endossomos iniciais. Mostramos também que um pulso de 30 minutos com a proteína recombinante selvagem foi suficiente para estimular a migração durante as próximas 24 horas. Para entender se essa resposta era produto da proteína internalizada, utilizamos diferentes inibidores da endocitose e detectamos que quando a endocitose mediada por caveola foi inibida com metil- β -ciclodextrina o efeito pró-migratório da QSOX1b selvagem foi reduzido totalmente. Devido a que esses inibidores químicos podem ser inespecíficos, também realizamos o silenciamento de caveolina 1, a principal proteína das caveolas. Como esperado, após o silenciamento de caveolina, a migração celular induzida por QSOX1b selvagem foi inibida. As imagens obtidas por microscopia confocal mostraram a co-localização de QSOX1b recombinante com caveolina 1 e a retenção de QSOX1b na superfície celular após a inibição (química ou gênica) da endocitose mediada por caveola.

Esses dados evidenciam que a migração de fibroblastos depende da internalização de QSOX1b selvagem. A ruptura da caveola com metil- β -ciclodextrina ou por silenciamento de caveolina 1 e a co-localização de QSOX1b com caveolina 1 confirmam que tal internalização é mediada pela caveola, embora outras vias endocíticas não possam ser descartadas. Até onde sabemos, a endocitose de QSOX1b extracelular nunca foi considerada. O fato de QSOX1b selvagem e mutada serem igualmente internalizadas indica que a via endocítica empregada por QSOX1b não requer atividade tiol oxidase. Em vez disso, a captação deve depender da estrutura ou conformação QSOX1b, uma vez que sua interação com a membrana plasmática pode não ser significativamente alterada pela única mutação C452S. De fato, essa ideia é apoiada pelo acúmulo observado de QSOX1b selvagem e mutada na superfície celular quando a endocitose foi inibida. Em contraste com a endocitose mediada por clatrina, a endocitose mediada por caveola recebeu mais atenção apenas

recentemente. Agora é aceito que as caveolas são uma plataforma de sinalização dinâmica e transportadores endocíticos intracelulares (Popov, 2022). Várias moléculas plasmáticas, como albuminas nativa e modificada (Schnitzer e Oh, 1994), LDL oxidado (Luchetti *et al.*, 2021), toxinas bacterianas (Herrerros *et al.*, 2001) e vírus (Xing *et al.*, 2020) foram relatadas como sendo internalizadas por endocitose caveolar após a ligação aos seus receptores. A adição de PDCD5 recombinante (proteína de morte celular programada 5), uma proteína secretada envolvida na morte celular, induziu sua endocitose mediada por caveola (Wang *et al.*, 2006). Da mesma forma, aqui propomos a QSOX1b extracelular como uma molécula de carga para endocitose dependente de caveola.

Após a captação, a carga caveolar é entregue aos endossomos iniciais, uma estação de distribuição compartilhada por outras vias endocíticas. De fato, QSOX1b co-localizou com os marcadores de endossomos iniciais EEA1 e Rab5, mas não com o marcador de endossomos tardios Rab7, indicando que a degradação lisossomal não é o destino da QSOX1b internalizada. Não é a primeira vez que QSOX1 é relatada em endossomos. QSOX1 foi encontrado no aparelho de Golgi e endossomos iniciais e tardios em macrófagos durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila melanogaster*. Nesse caso, a QSOX1 se dispôs na via secretora, possivelmente contribuindo para a secreção de laminina (Valoskova *et al.*, 2019). No contexto da sinalização do EGFR, QSOX1 foi encontrada tanto em endossomos iniciais quanto tardios em células de hepatocarcinoma, interagindo com o EGFR e favorecendo seu tráfego para a via de degradação lisossomal (Sun *et al.*, 2021). Apesar de investigar diferentes rotas de tráfego, esses dados junto com os nossos representam novas informações sobre a localização endossomal de QSOX1.

Os endossomos foram inicialmente caracterizados como compartimentos usados pelas células para reprimir o sinal do receptor endocitado, mas agora eles foram reconhecidos como plataformas de sinalização (Platta e Stenmark, 2011). Alguns deles foram denominados redoxossomos, por serem locais de sinalização redox (Oakley *et al.*, 2009). A ligação de IL1 β e TNF α aos seus receptores nas regiões caveolares da membrana plasmática, onde as proteínas Nox1 e/ou Nox2 são enriquecidas, promove a endocitose do complexo receptor-ligante e da proteína Nox. Essas proteínas são direcionadas aos endossomos iniciais, onde são produzidos ânions superóxidos derivados de Nox (Miller Jr *et al.*, 2007). O superóxido

intraendossomal pode dismutar espontaneamente dentro do redoxossomo para peróxido de hidrogênio ou pode ser transportado para o citosol por canais aniônicos, onde será dismutado (Oakley *et al.*, 2009). O peróxido de hidrogênio é o oxidante final envolvido na sinalização redox. Os redoxossomos foram descritos para as vias de IL1 β e TNF α , principalmente em VSMC, mas outras citocinas e fatores de crescimento, como EGF, PDGF, Ang II também podem formar redoxossomos, uma vez que ativam Nox1 (Gimenez *et al.*, 2016). Em um trabalho anterior demonstramos que QSOX1b selvagem promoveu a migração de VSMC por um mecanismo dependente da produção de Nox1 e peróxido de hidrogênio entanto que QSOX1b inativa não foi capaz de induzir a migração, uma vez que não foi produzido peróxido de hidrogênio (França *et al.*, 2020). Aqui propomos que QSOX1b selvagem e mutada são endocitadas com Nox1, uma vez que Nox1 colocaliza com QSOX1b endocitada em fibroblastos, provavelmente em endossomos iniciais. Com base nos resultados dos ensaios de migração, propomos também que QSOX1b selvagem, mas não a mutada, ativa Nox1 nos endossomos, induzindo a produção de superóxido que irá dismutar posteriormente em peróxido de hidrogênio. Os mecanismos de ativação de Nox1 neste cenário ainda precisam ser investigados. No entanto, foi recentemente demonstrado que Nox1 pode ser ativado pelo dímero ligado por dissulfeto entre p47phox-proteína dissulfeto isomerase (PDI), que facilita a fosforilação de p47phox e a montagem do complexo Nox1 (Gimenez *et al.*, 2019). Considerando que Nox1 foi ativado pela inserção de dissulfetos em p47phox, pode-se imaginar um papel oxidativo para QSOX1 na ativação de Nox1. O ensaio de eletroforese bidimensional, evidenciou uma grande quantidade de proteínas formando pontes dissulfetos intermoleculares após incubação com QSOX1b recombinante selvagem indicando que podiam ter sido oxidadas direta ou indiretamente pela QSOX1b, não podemos descartar que Nox1 seja um de esses alvos.

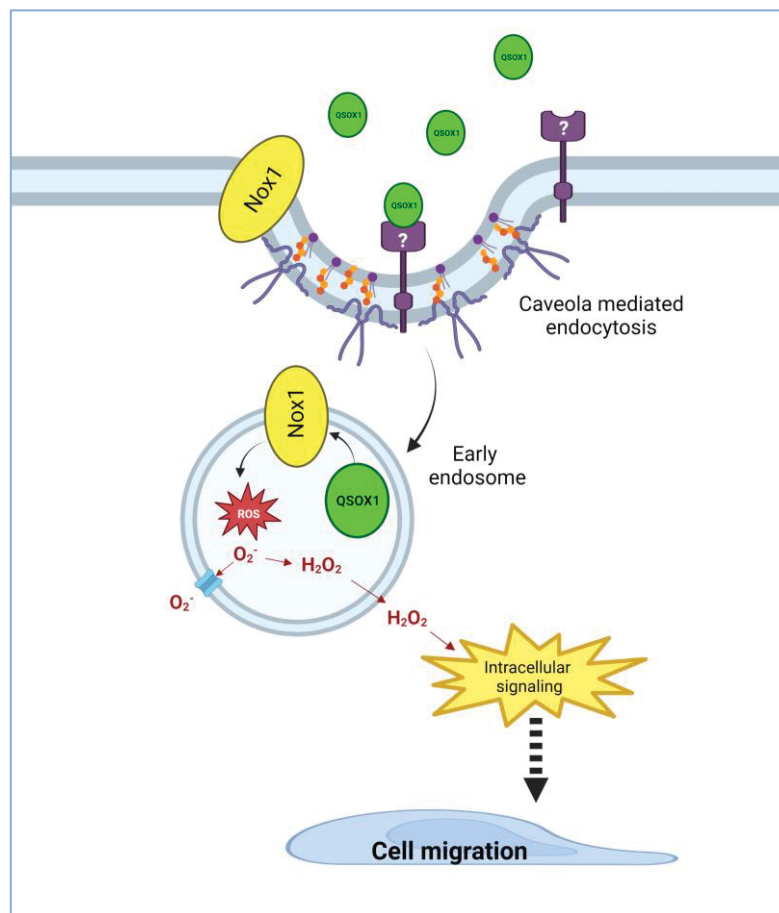
A demonstração de que QSOX1b promove a migração de fibroblastos indica que QSOX1 pode estar envolvida na cicatrização de tecidos e fibrose, processos em que os fibroblastos são os principais atores. Nas etapas inflamatória e proliferativa da cicatrização, os fibroblastos são recrutados e migram para o tecido lesado, onde adquirem um fenótipo contrátil e aumentam a secreção de proteínas da matriz extracelular (Tai *et al.*, 2021; Cialdai *et al.*, 2022). Nesse sentido, avaliamos se QSOX1b estimula a transição de fibroblastos para miofibroblastos (FMT). Embora

preliminares, nossos resultados evidenciaram um aumento na expressão de actina de musculo liso nos fibroblastos estimulados com QSOX1b recombinante selvagem comparado com os que somente foram incubados com veículo. Esses dados recapitulam o papel proposto para QSOX1 durante a formação do tecido neointimal após uma lesão vascular em ratos (Borges *et al.*, 2015). Como a expressão de QSOX1 aumentou na formação da neoíntima, assumimos que ela era produzida e secretada pelas células da neoíntima. A QSOX1 extracelular secretada induziu células musculares lisas (SMC) da camada média a proliferar e migrar para a íntima (Borges *et al.*, 2015). Adicionalmente, embora não tenhamos analisado a expressão de QSOX1 na camada adventícia, de acordo com os presentes dados, também pode ser considerado que QSOX1 induziu a migração desses fibroblastos para a íntima. SMC e fibroblastos são as principais células que migram para fornecer as proteínas da matriz extracelular durante a reestenose (Déglise *et al.*, 2023) e fibrose (Tai *et al.*, 2021), respectivamente. Curiosamente, a QSOX1 promoveu as mesmas respostas nessas duas células, indicando uma possível participação nos processos de reparo tecidual. Dado que a QSOX1b demonstrou estar mais expressa durante a cicatrização tecidual (Borges *et al.*, 2015) e que os fibroblastos e as células musculares lisas são estimulados a migrar em resposta à QSOX1b solúvel, sugerimos que QSOX1b pode desempenhar um papel na ativação da cicatrização.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo, demonstramos que QSOX1b induz a migração de fibroblastos L929. Evidenciamos que QSOX1b é endocitada por um mecanismo mediado por caveolas e depois é direcionada aos endossomos iniciais. Nesse sentido, mostramos que a migração celular depende da endocitose de QSOX1b. A co-localização de QSOX1b com Nox1 indica um possível papel de QSOX1b na ativação de Nox1. Finalmente, o aumento na expressão de actina de musculo liso, sugere que QSOX1b pode estimular a transição de fibroblastos para miofibroblastos.

FIGURA 37. MECANISMO DE INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR MEDIADA POR ENDOCITOSE DA QSOX1b



Nota: A figura representa o mecanismo proposto para o processo de migração celular de fibroblastos L929 induzida pela endocitose de QSOX1b. FONTE: A autora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOLA, J. O., JIM, P. A., WARD, H. H., BASURAY, S., & WANDINGER-NESS, A. Rab GTPases as regulators of endocytosis, targets of disease and therapeutic opportunities. **Clinical genetics**, 80(4), 305–318, 2011.
- ALON A, GROSSMAN I, GAT Y, KODALI VK, DIMAIO F, MEHLMAN T, HARAN G, BAKER D, THORPE C, FASS D. The dynamic disulphide relay of quiescin sulphydryl oxidase. **Nature**, 488(7411):414-8, 2012.
- AL-BARGHOUTH, B. M., MESNER, L. D., CALABRESE, G. M., BROOKS, D., TOMMASINI, S. M., BOUXSEIN, M. L., HOROWITZ, M. C., ROSEN, C. J., NGUYEN, K., HADDOX, S., FARBER, E. A., ONENGUT-GUMUSCU, S., POMP, D., & FARBER, C. R. Systems genetics in diversity outbred mice inform BMD GWAS and identify determinants of bone strength. **Nature communications**, 12(1), 3408, 2021.
- ARAÚJO DG, NAKAO L, GOZZO P, SOUZA CD, BALDERRAMA V, GUGELMIN ES, KUCZYNSKIAP, OLANDOSKI M, DE NORONHA L. Expression level of quiescin sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1) in neuroblastomas. **Eur J Histochem**, 58(1):2228, 2014.
- ANTWI, K., HOSTETTER, G., DEMEURE, M., KATCHMAN, B., DECKER, G., RUIZ, Y., SIELAFF, T., KOEP, L., LAKE, D. 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**, 8(10), pp.4722-4731, 2009.
- 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. **J Biol Chem**. 276(17):13830-7, 2001.
- BORGES, B., APPEL, M., COFRÉ, A., PRADO, M., STECLAN, C., ESNARD, F., ZANATA, S., LAURINDO, F., NAKAO, L. The flavo-oxidase QSOX1 supports vascular smooth muscle cell migration and proliferation: Evidence for a role in neointima growth. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. 1852(7), pp.1334-1346, 2015.
- CHAKRAVARTHI S, JESSOP CE, WILLER M, STIRLING CJ, BULLEID NJ. Intracellular catalysis of disulfide bond formation by the human sulfhydryl oxidase, QSOX1. **Biochem J**. 404(3):403-11, 2007.
- CIALDAI, F., RISALITI, C., & MONICI, M. Role of fibroblasts in wound healing and tissue remodeling on Earth and in space. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, 10-958381, 2022.
- COPPOCK DL, CINA-POPPE D, GILLERAN S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. **Genomics**. 54(3):460-8, 1998.
- COPPOCK DL, KOPMAN C, SCANDALIS S, GILLERAN S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell Growth Differ**. 4(6):483-93, 1993.
- COPPOCK DL, THORPE C. Multidomain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antioxid Redox Signal**. 8(3-4):300-11, 2006.
- DÉGLISE S, BECHELLI C, ALLAGNAT F. Vascular smooth muscle cells in intimal hyperplasia, an update. **Front Physiol**. 13:1081881, 2023.

DE ANDRADE CR, STOLF BS, DEBBAS V, ROSA DS, KALIL J, COELHO V, LAURINDO FR. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is expressed in the human atheroma core: possible role in apoptosis. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 47(10):716-27, 2011.

DE NARDIS, C., LÖSSL, P., DEN BIGGELAAR, M. Recombinant Expression of the Full-length Ectodomain of LDL Receptor-related Protein 1 (LRP1) Unravels pH-dependent Conformational Changes and the Stoichiometry of Binding with Receptor-associated Protein (RAP). **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 3, p. 912-924, 2016.

DU, N., WEI, Z. C., DENG, Y. Y., ZHANG, Y., TANG, X. J., LI, P., HUANG, Y. B., ZENG, Q. H., WANG, J. J., ZHANG, M. W., & LIU, G. Characterization of recombinant rice quiescin sulfhydryl oxidase and its improvement effect on wheat flour-processing quality. **Food chemistry**, 333, 127492, 2020.

DUTTA, D., & DONALDSON, J. G. Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. **Cellular logistics**, 2(4), 203–208, 2012.

FRANÇA KC, MARTINEZ PA, PRADO ML, LO SM, BORGES BE, ZANATA SM, SAN MARTIN A, NAKAO LS. Quiescin/sulfhydryl oxidase 1b (QSOX1b) induces migration and proliferation of vascular smooth muscle cells by distinct redox pathways. **Arch Biochem Biophys.** 679:108220, 2020.

ELKIN, S. R., LAKODUK, A. M., & SCHMID, S. L. Endocytic pathways and endosomal trafficking: a primer. **Wiener medizinische Wochenschrift**, 166(7-8), 196–204, 2016.

FELDMAN, T., GROSSMAN-HAHAM, I., ELKIS, Y., VILELA, P., MOSKOVITS, N., BARSHACK, I., SALAME, T. M., FASS, D., & ILANI, T. Inhibition of fibroblast secreted QSOX1 perturbs extracellular matrix in the tumor microenvironment and decreases tumor growth and metastasis in murine cancer models. **Oncotarget**, 11(4), 386–398, 2020.

FIFIELD AL, HANAVAN PD, FAIGEL DO. Molecular Inhibitor of QSOX1 Suppresses Tumor Growth In Vivo. **Mol Cancer Ther.** 19(1):112-122, 2020.

GANIG N, BAENKE F, THEPKAYSONE ML, LIN K, RAO VS, WONG FC, POLSTER H, SCHNEIDER M, HELM D, PECQUEUX M, SEIFERT AM, SEIFERT L, WEITZ J, RAHBARI NN, KAHLERT C. Proteomic Analyses of Fibroblast- and Serum-Derived Exosomes Identify QSOX1 as a Marker for Non-invasive Detection of Colorectal Cancer. **Cancers (Basel)**, 13(6):1351, 2021.

GENG Y, XU C, WANG Y, ZHANG L. Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 Regulates the Proliferation, Migration and Invasion of Human Glioblastoma Cells via PI3K/Akt Pathway. **Onco Targets Ther.**13:5721-5729, 2020.

GIMENEZ M, SCHICKLING BM, LOPES LR, MILLER FJ JR. Nox1 in cardiovascular diseases: regulation and pathophysiology. **Clin Sci (Lond)**. 130(3):151-65, 2016

GIMENEZ M, VERÍSSIMO-FILHO S, WITTIG I, SCHICKLING BM, HAHNER F, SCHÜRMANN C, NETTO LES, ROSA JC, BRANDES RP, SARTORETTO S, DE LUCCA CAMARGO L, ABDULKADER F, MILLER FJ JR, LOPES LR. Redox Activation of Nox1 (NADPH Oxidase 1) Involves an Intermolecular Disulfide Bond Between Protein Disulfide Isomerase and p47phox in Vascular Smooth Muscle Cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 39(2):224-236, 2019.

- GUO, S., ZHANG, X., ZHENG, M., ZHANG, X., MIN, C., & WANG, Z. *et al.* Selectivity of commonly used inhibitors of clathrin-mediated and caveolae-dependent endocytosis of G protein-coupled receptors. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1848(10), 2101-2110, 2015.
- HANAVAN, P., BORGES, C., KATCHMAN, B., FAIGEL, D., HO, T., MA, C., SERGIENKO, E., MEURICE, N., PETIT, J. AND LAKE, D. Ebselen inhibits QSOX1 enzymatic activity and suppresses invasion of pancreatic and renal cancer cell lines. **Oncotarget**, 6(21), 2015.
- HECKLER EJ, ALON A, FASS D, THORPE C. Human quiescin-sulfhydryl oxidase, QSOX1: probing internal redox steps by mutagenesis. **Biochemistry**, 47(17):4955-63, 2008.
- HERREROS J, NG T, SCHIAVO G. Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. **Mol Biol Cell**. 12(10):2947-60, 2001.
- HINZE C, BOUCROT E. Endocytosis in proliferating, quiescent and terminally differentiated cells. **J Cell Sci**. 131(23):jcs216804, 2018.
- ILANI, T., REZNIK, N., YESHAYA, N., FELDMAN, T., VILELA, P., LANSKY, Z., JAVITT, G., SHEMESH, M., BRENNER, O., ELKIS, Y., VARSANO, N., JARAMILLO, A. M., EVANS, C. M., & FASS, D. The disulfide catalyst QSOX1 maintains the colon mucosal barrier by regulating Golgi glycosyltransferases. **The EMBO journal**, 42(2), e111869, 2023.
- ILANI T, ALON A, GROSSMAN I, HOROWITZ B, KARTVELISHVILY E, COHEN SR, FASS D. A secreted disulfide catalyst controls extracellular matrix composition and function. **Science**, 341(6141):74-6, 2013.
- ISKANDAR, H., ANDERSSON, G., SONJAYA, H., ARIFIANTINI, R. I., SAID, S., HASBI, H., MAULANA, T., & BAHARUN, A. Protein Identification of Seminal Plasma in Bali Bull (*Bos javanicus*). **Animals: an open access journal from MDPI**. 13(3), 514, 2023.
- ISRAEL BA, JIANG L, GANNON SA, THORPE C. Disulfide bond generation in mammalian blood serum: detection and purification of quiescin-sulfhydryl oxidase. **Free Radic Biol Med**. 69:129-35, 2014.
- JAJE J, WOLCOTT HN, FADUGBA O, CRIPPS D, YANG AJ, MATHER IH, THORPE C. A flavin-dependent sulfhydryl oxidase in bovine milk. **Biochemistry**, 46(45):13031-40, 2007.
- JAVITT, G., GROSSMAN-HAHAM, I., ALON, A., RESNICK, E., MUTSAFI, Y., ILANI, T. AND FASS, D. cis-Proline Mutants of Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 With Altered Redox Properties Undermine ECM Integrity and Cell Adhesion in Fibroblast Cultures. **Protein Science**, 2018.
- KATCHMAN BA, ANTWI K, HOSTETTER G, DEMEURE MJ, WATANABE A, DECKER GA, MILLER LJ, VON HOFF DD, LAKE DF. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes invasion of pancreatic tumor cells mediated by matrix metalloproteinases. **Mol Cancer Res**. 9(12):1621-31, 2011.
- KATCHMAN BA, OCAL IT, CUNLIFFE HE, CHANG YH, HOSTETTER G, WATANABE A, LOBELLO J, LAKE DF. 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 Res**. 15(2):R28, 2013.

KHAN, I., & STEEG, P. S. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. **British journal of cancer**, 124(1), 66–75, 2021.

KIRSCHENLOHR HL, METCALFE JC, GRAINGER DJ. Cultures of proliferating vascular smooth muscle cells from adult human aorta. **Methods in Molecular Medicine**, v. 2, p. 319-34, 1996.

KNUTSVIK, G., COLLETT, K., ARNES, J., AKSLEN, L. AND STEFANSSON, I. QSOX1 expression is associated with aggressive tumor features and reduced survival in breast carcinomas. **Modern Pathology**, 29(12), pp.1485-1491, 2016.

KODALI VK, THORPE C. Oxidative protein folding and the Quiescin-sulfhydryl oxidase family of flavoproteins. **Antioxid Redox Signal**. 13(8):1217-30, 2010.

KODALI VK, THORPE C. Quiescin sulfhydryl oxidase from *Trypanosoma brucei*: catalytic activity and mechanism of a QSOX family member with a single thioredoxin domain. **Biochemistry**, 49(9):2075-85, 2010.

KUMARI, S., MG, S. & MAYOR, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. **Cell Res**. 256–275, 2010.

KUHN, D. A., VANHECKE, D., MICHEN, B., BLANK, F., GEHR, P., PETRI-FINK, A., & ROTHEN-RUTISHAUSER, B. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages. **Beilstein journal of nanotechnology**, 5, 1625–1636, 2014.

LACERENZA, S., CIREGIA, F., GIUSTI, L., BONOTTI, A., GRECO, V., GIANNACCINI, G., D'ANTONGIOVANNI, V., FALLAHI, P., PIERONI, L., CRISTAUDO, A., LUCACCHINI, A., MAZZONI, M. R., & FODDIS, R. Putative Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma Suggested by Proteomic Analysis of Cell Secretome. **Cancer genomics & proteomics**, 17(3), 225–236, 2020.

LAKE, D. F., & FAIGEL, D. O. The emerging role of QSOX1 in cancer. **Antioxidants & redox signaling**, 21(3), 485–496, 2014.

LI Y, LI M, XING G, HU Z, WANG Q, DONG C, WEI H, FAN G, CHEN J, YANG X, ZHAO S, CHEN H, GUAN K, WU C, ZHANG C, HE F. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor by hepatopoietin. **J Biol Chem**. 275(48):37443-7, 2000.

LIMOR-WAISBERG K, ALON A, MEHLMAN T, FASS D. Phylogenetics and enzymology of plant quiescin sulfhydryl oxidase. **FEBS Lett**. 586(23):4119-25, 2012.

LIN, X. P., MINTERN, J. D., & GLEESON, P. A. Macropinocytosis in Different Cell Types: Similarities and Differences. **Membranes**, 10(8), 177, 2020.

LUCHETTI F, CRINELLI R, NASONI MG, BENEDETTI S, PALMA F, FRATERNALE A, IULIANO L. LDL receptors, caveolae and cholesterol in endothelial dysfunction: oxLDLs accomplices or victims? **Br J Pharmacol**. 178(16):3104-3114, 2021.

MAGALHAES T, BRACKNEY DE, BEIER JC, FOY BD. Silencing an *Anopheles gambiae* catalase and sulfhydryl oxidase increases mosquito mortality after a blood meal. **Arch Insect Biochem Physiol**. 68(3):134-43, 2008.

MÄGER, I., LANGEL, K., LEHTO, T., EIRÍKSDÓTTIR, E., & LANGEL, Ü. The role of endocytosis on the uptake kinetics of luciferin-conjugated cell-penetrating peptides. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1818(3), 502-511, 2012.

- MAIRET-COELLO G, TURY A, ESNARD-FEVE A, FELLMANN D, RISOLD PY, GRIFFOND B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. **J Comp Neurol.** 473(3):334-63, 2004.
- MAIRET-COELLO G, TURY A, FELLMANN D, RISOLD PY, GRIFFOND B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression in rat brain. **J Comp Neurol.** 484(4):403-17, 2005.
- MARITZEN T, SCHACHTNER H, LEGLER DF. On the move: endocytic trafficking in cell migration. **Cell Mol Life Sci.** 72(11):2119-34, 2015.
- MARTINEZ P. **Interação da QSOX1b extracelular com a membrana plasmática de células musculares lisas de aorta.** Tese de mestrado. PPG Biologia Celular e Molecular, UFPR, 2018.
- MATSUBA S, SUGA Y, ISHIDOH K, HASHIMOTO Y, TAKAMORI K, KOMINAMI E, WILHELM B, SEITZ J, OGAWA H. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. **J Dermatol Sci.** 30(1):50-62, 2002.
- MATTHAEUS, C., & TARASKA, J. W. Energy and Dynamics of Caveolae Trafficking. **Frontiers in cell and developmental biology**, 8, 614472, 2021.
- MEBAZAA A, VANPOUCKE G, THOMAS G, VERLEYSSEN K, COHEN-SOLAL A, VANDERHEYDEN M, BARTUNEK J, MUELLER C, LAUNAY JM, VAN LANDUYT N, D'HONDT F, VERSCHUERE E, VANHAUTE C, TUYTTEN R, VANNESTE L, DE CREMER K, WUYTS J, DAVIES H, MOERMAN P, LOGEART D, COLLET C, LORTAT-JACOB B, TAVARES M, LAROY W, JANUZZI JL, SAMUEL JL, KAS K. Unbiased plasma proteomics for novel diagnostic biomarkers in cardiovascular disease: identification of quiescin Q6 as a candidate biomarker of acutely decompensated heart failure. **Eur Heart J.** 33(18):2317-24, 2012.
- METTLEN, M., CHEN, P. H., SRINIVASAN, S., DANUSER, G., & SCHMID, S. L. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. **Annual review of biochemistry**, 87, 871–896, 2018.
- MILLER FJ JR, FILALI M, HUSS GJ, STANIC B, CHAMSEDDINE A, BARNA TJ, LAMB FS. Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. **Circ Res.** 101(7):663-71, 2007.
- MILLER, F. J., JR, CHU, X., STANIC, B., TIAN, X., SHARMA, R. V., DAVISSON, R. L., & LAMB, F. S. A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1. **Antioxidants & redox signaling**, 12(5), 583–593, 2010.
- MUSARD JF, SALLOT M, DULIEU P, FRAÎCHARD A, ORDENER C, REMY-MARTIN JP, 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. **Biochem Biophys Res Commun.** 287(1):83-91, 2001.
- OAKLEY, F. D., ABBOTT, D., LI, Q., & ENGELHARDT, J. F. Signaling components of redox active endosomes: the redoxosomes. **Antioxidants & redox signaling**, 11(6), 1313–1333, 2009.
- OSTROWSKI MC, KISTLER WS. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry**, 19(12):2639-45, 1980.

- OUYANG X, DEWEESE TL, NELSON WG, ABATE-SHEN C. Loss-of-function of Nkx3.1 promotes increased oxidative damage in prostate carcinogenesis. **Cancer Res.** 65(15):6773-9, 2005.
- PAGE, R. C., CLARK, J. G., & MISRA, S. Structure of filamin A immunoglobulin-like repeat 10 from Homo sapiens. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications**, 67(Pt 8), 871–876, 2011.
- PAN, Y., WU, L., HE, S., WU, J., WANG, T., & ZANG, H. Identification of hub genes in thyroid carcinoma to predict prognosis by integrated bioinformatics analysis. **Bioengineered**, 12(1), 2928–2940, 2021.
- PERNODET N, HERMETET F, ADAMI P, VEJUX A, DESCOTES F, BORG C, ADAMS M, PALLANDRE JR, 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 Res.** 14(5):R136, 2012.
- PLATTA HW, STENMARK H. Endocytosis and signaling. **Curr Opin Cell Biol.** 23(4):393-403, 2011.
- POILLET, L., PERNODET, N., BOYER-GUITTAUT, M., ADAMI, P., BORG, C., JOUVENOT, M., DELAGE-MOURROUX, R., DESPOUY, G. QSOX1 Inhibits Autophagic Flux in Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, 9(1), p.e86641, 2014.
- POPOV LD. Deciphering the relationship between caveolae-mediated intracellular transport and signalling events. **Cell Signal.** 97:110399. doi: 10.1016/j.cellsig.2022.110399, 2022.
- PORTES KF, IKEGAMI CM, GETZ J, MARTINS AP, DE NORONHA L, ZISCHLER LF, KLASSEN G, CAMARGO AA, ZANATA SM, BEVILACQUA E, NAKAO LS. Tissue distribution of quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) in developing mouse. **J Mol Histol.** 39(2):217-25, 2008.
- PROCHNIEWICZ, E., LOWE, D. A., SPAKOWICZ, D. J., *et al.* Functional, structural, and chemical changes in myosin associated with hydrogen peroxide treatment of skeletal muscle fibers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 294, n. 2, p. C613-C626, 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. **Biochim Biophys Acta.** 2006.
- RAJE S, GLYNN NM, THORPE C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. **Anal Biochem.** 307(2):266-72, 2002.
- RANCY PC, THORPE C. Oxidative protein folding in vitro: a study of the cooperation between quiescin-sulfhydryl oxidase and protein disulfide isomerase. **Biochemistry**, 47(46):12047-56, 2008.
- SCHIEFERMEIER, N., TEIS, D., & HUBER, L. A. Endosomal signaling and cell migration. **Current opinion in cell biology**, 23(5), 615–620, 2011.
- SCHNITZER JE, OH P. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. **J Biol Chem.** 269(8):6072-82, 1994.

SCHWARZ, C. AND NICKELSEN, J. 2D Diagonal Redox SDS-PAGE of Proteins. **Bio-protocol**, 3(11): e781, 2013.

SENGUPTA S, PARENT CA, BEAR JE. The principles of directed cell migration. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 22(8):529-547. 2021.

SIGISMUND, S., LANZETTI, L., SCITA, G., & DI FIORE, P. Endocytosis in the context-dependent regulation of individual and collective cell properties. **Nature reviews. Molecular cell biology**, 22(9), 625–643, 2021.

SOLOVIEV M, ESTEVES MP, AMIRI F, CROMPTON MR, RIDER CC. Elevated transcription of the gene QSOX1 encoding quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 in breast cancer. **PLoS One**, 8(2):e57327, 2013.

SONG H, ZHANG B, WATSON MA, HUMPHREY PA, LIM H, MILBRANDT J. Loss of Nkx3.1 leads to the activation of discrete downstream target genes during prostate tumorigenesis. **Oncogene**, 28(37):3307-19, 2009.

SPENCER, N. Y., & ENGELHARDT, J. F. The basic biology of redoxosomes in cytokine-mediated signal transduction and implications for disease-specific therapies. **Biochemistry**, 53(10), 1551–1564, 2014.

SUN, J., ZHOU, C., ZHAO, Y., ZHANG, X., CHEN, W., ZHOU, Q., HU, B., GAO, D., RAATZ, L., WANG, Z., NELSON, P. J., JIANG, Y., REN, N., BRUNS, C. J., & ZHOU, H. Quiescin sulfhydryl oxidase 1 promotes sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma by driving EGFR endosomal trafficking and inhibiting NRF2 activation. **Redox biology**, 41, 101942, 2021.

SUNG, H., AHN, J., YOON, Y., NA, S., CHOI, Y., KIM, Y., LEE, S., LEE, E., CHO, S., CHO, J. Quiescin Sulfhydryl Oxidase 1 (QSOX1) Secreted by Lung Cancer Cells Promotes Cancer Metastasis. **Int. J. Mol. Sci**. 19(10), 2018.

TAI Y, WOODS EL, DALLY J, KONG D, STEADMAN R, MOSELEY R, MIDGLEY AC. Myofibroblasts: Function, Formation, and Scope of Molecular Therapies for Skin Fibrosis. **Biomolecules**, 11(8):1095, 2021.

THORPE C, COPPOCK DL. Generating disulfides in multicellular organisms: emerging roles for a new flavoprotein family. **J Biol Chem**. 282(19):13929-33, 2007.

THORPE C, HOOBER KL, RAJE S, GLYNN NM, BURNSIDE J, TURI GK, COPPOCK DL. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch Biochem Biophys**. 405(1):1-12, 2002.

THORPE C, HOOBER KL, RAJE S, GLYNN NM, BURNSIDE J, TURI GK, COPPOCK DL. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch Biochem Biophys**. 405(1):1-12, 2002.

TREPAT, X., CHEN, Z., & JACOBSON, K. Cell migration. **Comprehensive Physiology**, 2(4), 2369–2392, 2012.

VALOSKOVA K, BIEBL J, ROBLEK M, EMTENANI S, GYOERGY A, MISOVA M, RATHEESH A, REIS-RODRIGUES P, SHKARINA K, LARSEN ISB, VAKHRUSHEV SY, CLAUSEN H, SIEKHAUS DE. A conserved major facilitator superfamily member orchestrates a subset of O-glycosylation to aid macrophage tissue invasion. **Elife**, 8:e41801, 2019.

VANHAVERBEKE, M., VAUSORT, M., VELTMAN, D., ZHANG, L., WU, M., LAENEN, G., GILLIJNS, H., MOREAU, Y., BARTUNEK, J., VAN DE WERF, F., DEVAUX, Y.,

- JANSSENS, S., SINNAEVE, P. R., & EU-CARDIORNA COST ACTION CA17129. Peripheral Blood RNA Levels of QSOX1 and PLBD1 Are New Independent Predictors of Left Ventricular Dysfunction After Acute Myocardial Infarction. **Circulation. Genomic and precision medicine**, 12(12), e002656, 2019.
- VERCAUTEREN, D., VANDENBROUCKE, R. E., JONES, A. T., REJMAN, J., DEMEESTER, J., DE SMEDT, S. C., SANDERS, N. N., & BRAECKMANS, K. The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers: optimization and pitfalls. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, 18(3), 561–569, 2010.
- WANDINGER-NESS, A., & ZERIAL, M. Rab proteins and the compartmentalization of the endosomal system. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 6(11), a022616, 2014.
- WANG Y, LI D, FAN H, TIAN L, ZHONG Y, ZHANG Y, YUAN L, JIN C, YIN C, MA D. Cellular uptake of exogenous human PDCD5 protein. **J Biol Chem**. 281(34):24803-17, 2006.
- WILSON, B. J., ALLEN, J. L., & CASWELL, P. T. Vesicle trafficking pathways that direct cell migration in 3D matrices and in vivo. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, 19(12), 899–909, 2018.
- XING Y, WEN Z, GAO W, LIN Z, ZHONG J, JIU Y. Multifaceted Functions of Host Cell Caveolae/Caveolin-1 in Virus Infections. **Viruses**, 12(5):487, 2020.
- ZANATA SM, LUVIZON AC, BATISTA DF, IKEGAMI CM, PEDROSA FO, SOUZA EM, CHAVES DF, CARON LF, PELIZZARI JV, LAURINDO FR, NAKAO LS. High levels of active quiescin Q6 sulfhydryl oxidase (QSOX) are selectively present in fetal serum. **Redox Rep**. 10(6):319-23, 2005.
- ZHANG, L., CHENG, Q., ZHANG, L., WANG, Y., MERRILL, G., ILANI, T., FASS, D., ARNÉR, E., ZHANG, J. Serum thioredoxin reductase is highly increased in mice with hepatocellular carcinoma and its activity is restrained by several mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, 99, pp.426-435, 2016.
- ZHANG, X. F., WANG, J., JIA, H. L., ZHU, W. W., LU, L., YE, Q. H., NELSON, P. J., QIN, Y., GAO, D. M., ZHOU, H. J., & QIN, L. X. Core fucosylated glycan-dependent inhibitory effect of QSOX1-S on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. **Cell death discovery**, 5, 84, 2019.
- ZHENG, W., LIU, F., DU, F., YANG, F., KOU, X., HE, Y., FENG, H., FAN, Q., LUO, E., MIN, H., MIAO, J., CUI, L., & CAO, Y. Characterization of a Sulfhydryl Oxidase From *Plasmodium berghei* as a Target for Blocking Parasite Transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 10, 311, 2020.

APÊNDICE 1: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA QSOX1b RECOMBINANTE

SELVAGEM

M S M V K Q I E S K T A F Q E A L D A A G D K L V V V D F S A T W C G P C K M I K P
 F F H S L S E K Y S N V I F L E V D V D D C Q D V A S E C E V K C M P T F Q F F K K
 G Q K V G E F S G A N K E K L E A T I N E L V L A G S G S G H M H H H H H S S G L
 V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T Y S S S D P L T L L D A D S V
 R P T V L G S S S A W A V E F F A S W C G H C I A F A P T W K E L A N D V K D W R P
 A L N L A V L D C A E E T N S A V C R E F N I A G F P T V R F F Q A F T K N G S G A
 T L P G A G A N V Q T L R M R L I D A L E S H R D T W P P A C P P L E P A K L N D I
 D G F F T R N K A D Y L A L V F E R E D S Y L G R E V T L D L S Q Y H A V A V R R V
 L N T E S D L V N K F G V T D F P S C Y L L L R N G S V S R V P V L V E S R S F Y T
 S Y L R G L P G L T R D A P P T T A T P V T A D K I A P T V W K F A D R S K I Y M A
 D L E S A L H Y I L R V E V G K F S V L E G Q R L V A L K K F V A V L A K Y F P G Q
 P L V Q N F L H S I N D W L Q K Q Q K K R I P Y S F F K A A L D S R K E D A V L T E
 K V N W V G C Q G S E P H F R G F P C S L W V L F H F L T V Q A N R Y S E A H P Q E
 P A D G Q E V L Q A M R S Y V Q F F F G C R D C A D H F E Q M A A A S M H Q V R S P
 S N A I L W L W T S H N R V N A R L S G A L S E D P H F P K V Q W P P R E L C S A C
 H N E L N G Q V P L W D L G A T L N F L K A H F S P A N I V I D S S

MUTADA

M S M V K Q I E S K T A F Q E A L D A A G D K L V V V D F S A T W C G P C K M I K P
 F F H S L S E K Y S N V I F L E V D V D D C Q D V A S E C E V K C M P T F Q F F K K
 G Q K V G E F S G A N K E K L E A T I N E L V L A G S G S G H M H H H H H S S G L
 V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T Y S S S D P L T L L D A D S V
 R P T V L G S S S A W A V E F F A S W C G H C I A F A P T W K E L A N D V K D W R P
 A L N L A V L D C A E E T N S A V C R E F N I A G F P T V R F F Q A F T K N G S G A
 T L P G A G A N V Q T L R M R L I D A L E S H R D T W P P A C P P L E P A K L N D I
 D G F F T R N K A D Y L A L V F E R E D S Y L G R E V T L D L S Q Y H A V A V R R V
 L N T E S D L V N K F G V T D F P S C Y L L L R N G S V S R V P V L V E S R S F Y T
 S Y L R G L P G L T R D A P P T T A T P V T A D K I A P T V W K F A D R S K I Y M A
 D L E S A L H Y I L R V E V G K F S V L E G Q R L V A L K K F V A V L A K Y F P G Q
 P L V Q N F L H S I N D W L Q K Q Q K K R I P Y S F F K A A L D S R K E D A V L T E
 K V N W V G C Q G S E P H F R G F P C S L W V L F H F L T V Q A N R Y S E A H P Q E
 P A D G Q E V L Q A M R S Y V Q F F F G S R D C A D H F E Q M A A A S M H Q V R S P
 S N A I L W L W T S H N R V N A R L S G A L S E D P H F P K V Q W P P R E L C S A C
 H N E L N G Q V P L W D L G A T L N F L K A H F S P A N I V I D S S

Trx-tag

His-tag

Primeiro motivo de cisteínas

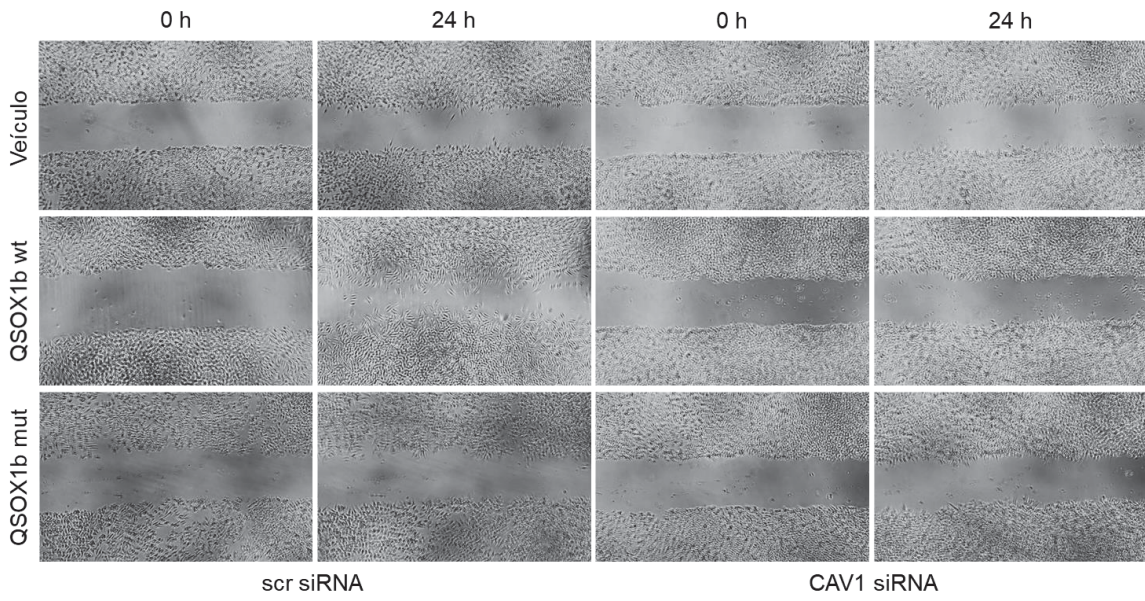
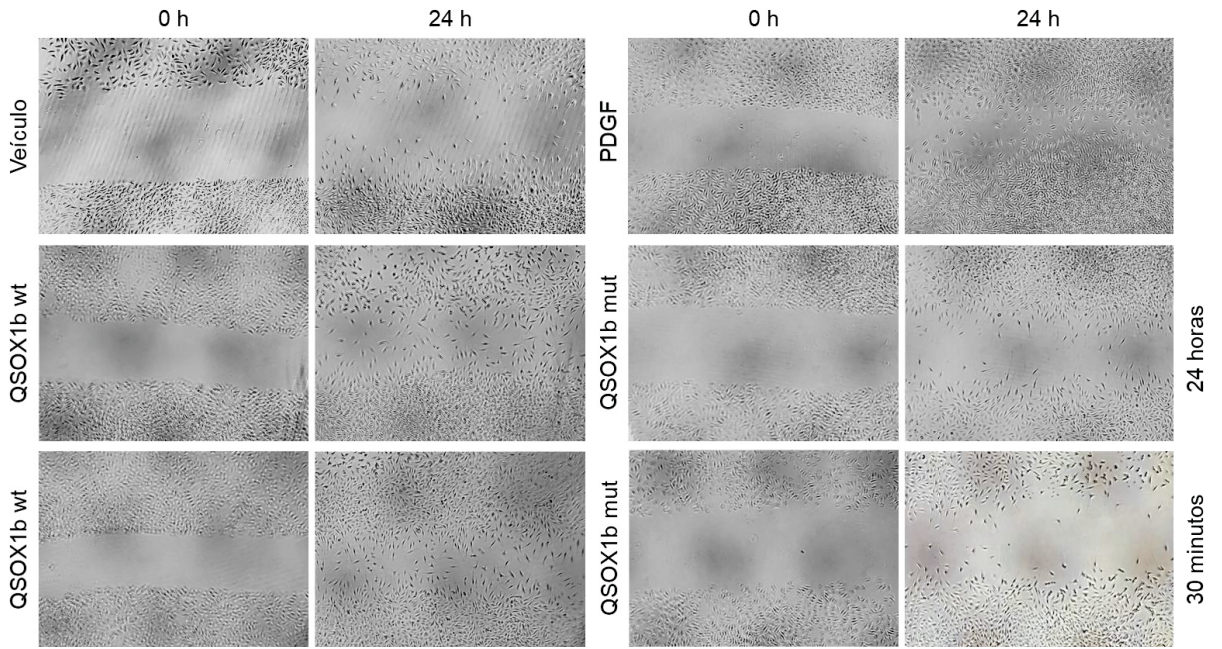
Segundo motivo de cisteínas

Segundo motivo de cisteínas, mutação cisteína x serina

Terceiro motivo de cisteínas

Sequência NP_075757.1 sulfhydryl oxidase 1 isoform b precursor [Mus musculus]

APÊNDICE 2: REPRESENTAÇÃO DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO



APÊNDICE 3: INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b SECRETADA

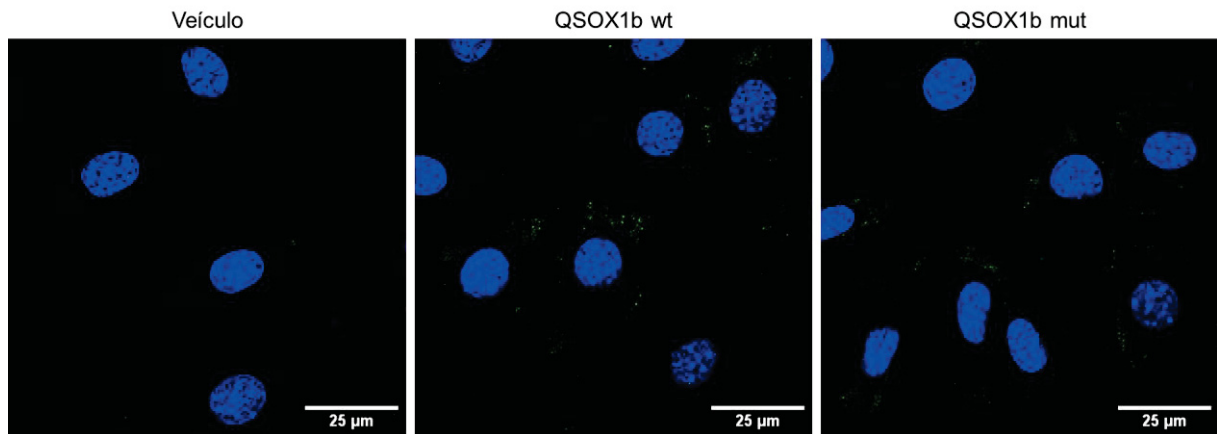


Imagem de microscopia confocal das células L929, na ausência (veículo) ou presença de meio condicionado contendo QSOX1b selvagem e mutada secretada por células HEK293T. incubação de 30 min a 37 °C. A marcação verde detecta QSOX1-HA após reação com anti-HA e anti-rabbit Alexa Flúor 488, em azul o núcleo corado com DAPI. As imagens foram obtidas com objetiva de 60x.

APÊNDICE 4: VISÃO ORTOGONAL DA INIBIÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO DE QSOX1b RECOMBINANTE

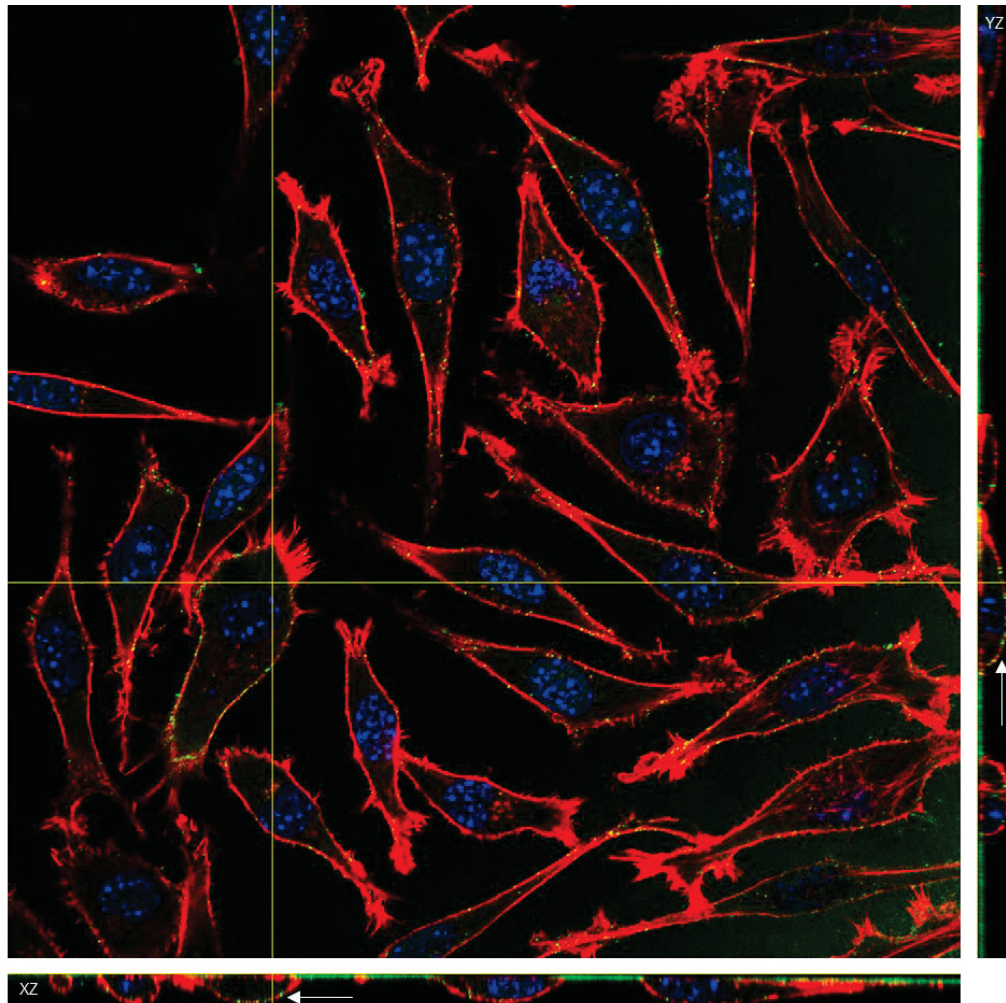


Imagem de microscopia confocal representando uma visão ortogonal (planos XZ e YZ) das células L929 incubadas com 500 nM de QSOX1b recombinante selvagem por 30 min a 37 °C na presença de Metil- β -ciclodextrina. A marcação verde detecta QSOX1; a marcação vermelha detecta citoesqueleto de actina e em azul o núcleo corado com DAPI. As setas brancas mostram a marcação da QSOX1b recombinante selvagem na superfície celular após inibição da internalização pela Metil- β -ciclodextrina. As imagens foram captadas com objetiva de 60X.