

**JOÃO VITOR PELIZZARI**

**PRESENÇA E ATIVIDADE DA PROTEÍNA QUIESCINA SULFIDRIL  
OXIDASE NO SORO FETAL E NEONATAL**

Dissertação apresentada à Pós-Graduação em Ciências da Saúde da PUCPR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**Coordenador: Profº. Dr. Waldemiro Gremski**

**Orientadora: Profª. Dra. Lia Sumie Nakao**

**CURITIBA**

**2005**

Excluído: ¶

Formatado: Direita: 18 pt

*À minha família. À minha ilustre orientadora  
Dra. Lia Sumie Nakao pelo grande incentivo  
nas minhas conquistas.*

Formatado: Direita: 18 pt

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Lia Sumie Nakao, orientadora capaz de transformar conhecimento em prática; sábia pesquisadora, que com seu brilhantismo e dedicação, mostrou novos caminhos a serem descobertos.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Sílvio Zanata, co-orientador de grande valia na elaboração deste projeto, pelo seu grande conhecimento e respeito pelo trabalho.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Waldemiro Gremski, Diretor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pelo grande trabalho à direção deste programa.

Aos colegas de Laboratório de Radicais Livres, especialmente Lidiane, Joselito e Daniele, que sempre estiveram dispostos a colaborar com o êxito deste trabalho.

Aos colegas de Laboratório da Patologia da Universidade Federal do Paraná, especialmente Aline e Cecília que colaboraram com este projeto.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Especialmente à Fernanda Sabóia pelo excelente trabalho prestado neste período de elaboração do projeto.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>i</b>
<b>RESUMO</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iii</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 PAPEL DOS PROCESSOS REDOX NO DESENVOLVIMENTO FETAL</b>	<b>2</b>
1.2 SULFIDRIL OXIDASES	3
1.2.1 DESCOBERTA E ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA FAMÍLIA DE ENZIMAS QSOX	4
1.2.2 PAPEL DOS DOMÍNIOS NA CATÁLISE DA FORMAÇÃO DE PONTES DISSULFETO	5
1.2.3 LOCALIZAÇÃO E ABUNDÂNCIA DAS ENZIMAS QSOX NOS TECIDOS	6
1.2.4 LOCALIZAÇÃO INTRA E EXTRACELULAR DAS ENZIMAS QSOX	7
1.2.5 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS QSOX	8
(a) MATRIZ EXTRACELULAR	8
(b) GERAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	9
(c) ESTRESSE OXIDATIVO	9
(d) APOPTOSE	10
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>11</b>
<b>3 ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>13</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>15</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b>	<b>16</b>
<b>7 ANEXO</b>	<b>22</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina difosfato
ALR	proteína de regeneração hepática
AP-1	proteína ativadora-1
ATP	adenosina trifosfato
cGMP	glutaciona mono fosfato cíclica
DTT	reagente artificial ditioneitol
ER	retículo endoplasmático
ERV	<i>essential for respiration and vegetative growth</i>
FAD	flavina adenina dinucleotídeo
GSH	glutaciona reduzida
GSSG	glutaciona dissulfeto
HIF-1	fator induzido por hipóxia
IFN- $\gamma$	intérferon gama
mRNA	ribonuclease mensageiro
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP	nicotinamida adenina di nucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NF- $\kappa$ B	fator nuclear $\kappa$ B
PDI	proteína dissulfeto isomerase
QSOX	quiescina sulfidril oxidase
RNAse	ribonuclease
ROS	espécies reativas de oxigênio
TRX	tioredoxina
VEGF	fator de crescimento do endotélio vascular

## RESUMO

A produção de espécies reativas, particularmente de oxigênio e nitrogênio, durante o desenvolvimento embrionário e fetal tem sido bastante demonstrada nos últimos anos. Dentre essas espécies, destacam-se o ânion radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical óxido nítrico produzidos enzimaticamente. O controle bem regulado da produção destas espécies garante as concentrações adequadas necessárias para o processo. Além disso, o sistema antioxidante conta com biomoléculas redutoras e enzimas, sendo aquelas pertencentes à superfamília da tioredoxina essenciais para a manutenção do estado redox dependente do equilíbrio tiol-dissulfeto. De fato, a deleção dos genes das tioredoxinas 1 e 2 mostrou-se letal para embriões murinos. A quiescina sulfidril oxidase (QSOX) é uma tiol oxidase cuja função não está ainda definida e que catalisa a formação de pontes dissulfetos e de peróxido de hidrogênio. Sua expressão tem sido reportada em alguns tecidos embrionários e fetais. Neste trabalho, investigamos sua presença e atividade sulfidril oxidase em soros fetal e pós-natal, em modelo bovino. Foi observada uma quantidade expressiva da proteína no soro fetal bovino e quantidades pós-natal decrescentes em soros de bezerros. A identificação da QSOX foi inequivocamente caracterizada por Western blotting. A atividade sulfidril oxidase, determinada pela produção de peróxido de hidrogênio, correlacionou-se com os níveis de expressão. Estes dados sugerem um possível papel redox dependente da QSOX na modulação do processo de desenvolvimento.

Formatado: Direita: 18 pt

## ABSTRACT

Production of reactive oxygen and nitrogen species during embryonic and fetal development has been demonstrated in the last few years. Among these species, superoxide radical anion, hydrogen peroxide and nitric oxide radical, enzymatically produced, have been considered. Their tightly controlled production provides the adequate concentrations necessary for the developmental process. In addition, the antioxidant system consists of reducing biomolecules and enzymes, particularly those belonging to the thioredoxin superfamily, which are essential to the thiol-disulfide equilibrium-dependent redox state. Indeed, knockout of the thioredoxins-1 and -2 genes are lethal for murine embryos. Quiescin sulfhydryl oxidase (QSOX) is a thiol oxidase, whose function has not been established, that catalyzes disulfide bridges and hydrogen peroxide formation. Its expression in some fetal and embryonic tissues has been reported. In this project, we analyzed QSOX presence and activity in bovine fetal and neonatal sera. A high level of QSOX was found in fetal serum, which decreases with age. QSOX identity was unequivocally characterized by Western blotting. Sulfhydryl oxidase activity, determined by hydrogen peroxide production rate, correlated with its expression levels. These data suggest a possible QSOX-dependent redox role in the modulation of developmental programs.

Formatado: Direita: 18 pt

# 1 INTRODUÇÃO

Excluído: ¶

É bem conhecido que muitos processos celulares, incluindo as transições do ciclo celular, são influenciados pelo ambiente redox<sup>(1,2)</sup>. De um modo geral, considera-se que este ambiente seja determinado pelo potencial redox do par GSSG/2GSH, por ser bastante abundante intracelularmente<sup>(2)</sup>. De fato, os potenciais redox do par GSSG/2GSH podem ser indicadores dos estágios do ciclo celular, pois mostram que os ambientes redox de células em proliferação rápida, proliferação lenta, diferenciação e apoptose apresentam-se crescentemente mais oxidantes<sup>(1)</sup>, com respectivos potenciais de redução na faixa de -260 a -235 mV, -220mV, -200 a -185 mV e -170 a -160 mV<sup>(3)</sup>. O potencial redox do par GSSG/2GSH envolve não apenas os níveis intracelulares do GSH e GSSG, mas também equilíbrios (di)tiol-dissulfeto com grupos sulfidril de proteínas, P-SH ou P-(SH)<sub>2</sub>, representados pelas reações de tioação/destioação (eq.1).



Como as variações dos níveis de GSH e GSSG são geralmente muito pequenas nas condições fisiológicas para controlarem de forma efetiva a regulação e a sinalização celular<sup>(3)</sup> e como a concentração de grupos P-SH/P(SH)<sub>2</sub> (oxidados e reduzidos) em células e tecidos é muito maior do que a de GSH<sup>(2)</sup>, parece evidente a importância de grupos sulfidrilas críticos, não protéicos e também protéicos, na manutenção e controle da regulação redox<sup>(2,3)</sup>.

Formatado: Direita: 18 pt

## 1.1 PAPEL DOS PROCESSOS REDOX NO DESENVOLVIMENTO FETAL

O estado redox é modulado por uma complexa interação entre moléculas oxidantes e redutoras. Para que ocorra um desenvolvimento fetal e organogênese adequados, a manutenção de um estado mais oxidante é necessária<sup>(4)</sup>. Por exemplo, o oxigênio molecular é necessário para a conversão de ADP em ATP na fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria. A utilização do oxigênio molecular para a obtenção de energia, por sua vez, favorece a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Em altas concentrações, as ROS tornam-se lesivas ao embrião ou feto, como ocorre no organismo maduro<sup>(5)</sup>. Mas em concentrações fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e de enxofre desempenham papel essencial em diversas etapas do desenvolvimento embrinário e fetal.

As ROS colaboram para a sinalização celular redox, co-modulando a expressão gênica através da ativação de fatores de transcrição redox<sup>(4,6)</sup>. Estes fatores incluem o fator induzido por hipóxia (HIF-1), o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteína ativadora 1 (AP-1) e o p53. O fator de transcrição HIF-1 é ativado em situações de hipóxia, resultando no aumento da transcrição de vários genes envolvidos no desenvolvimento vascular, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF); o NF- $\kappa$ B é um importante regulador da expressão de citocinas e genes anti-apoptóticos. Sua expressão aumentada pode ocasionar uma diminuição na taxa de apoptose e um aumento no estado pró-inflamatório; AP-1 é altamente sensível ao estresse oxidativo, modulando a expressão de diversas enzimas antioxidantes. A modulação de AP-1 pode modificar o estado redox celular e assim, alterar o desenvolvimento embrionário. Ainda neste contexto, a capacidade de produção de ROS dependente de NADH pelo trofoblasto sugere um papel ativo destas espécies no processo de implantação embrionária<sup>(7)</sup>.

Espécies reativas de nitrogênio, particularmente o óxido nítrico, têm sido descrito por participar do desenvolvimento normal, principalmente nos estágios de

Formatado: Direita: 18 pt

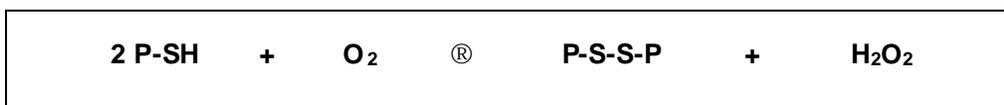
pré-implantação de embriões murinos<sup>(8,9)</sup>. Nestes estudos, foi demonstrado que concentrações críticas de óxido nítrico e cGMP são necessárias para o processo, e alterações nessas concentrações levam a um atraso no desenvolvimento e/ou apoptose do embrião.

O estado redox dependente de grupos tióis também tem recebido bastante atenção na literatura. Por exemplo, a glutathione modula importantes aspectos da oogênese, fertilização e desenvolvimento<sup>(10)</sup>; a oxidação de grupos sulfidrila de zigotos murinos por diamida leva a morte celular, por meio de um processo revertido por ditioneitol<sup>(10)</sup>; a deleção dos genes da tioredoxina1<sup>(11)</sup> e tioredoxina 2<sup>(12)</sup> ocasiona letalidade precoce em embriões murinos; a proteína dissulfeto isomerase (PDI), outra tiol-oxidoreductase, participa do estabelecimento da simetria em embriões de **zebrafish**<sup>(13)</sup>.

Assim, por sua larga distribuição, as tiol-oxidoreductases, representadas principalmente pelo sistema da tioredoxina parecem ser importantes moduladoras dos grupos tióis celulares críticos para o desenvolvimento embrionário.

## 1.2 SULFIDRIL OXIDASES

Sulfidril oxidases compreendem uma classe de enzimas que catalisam a geração de pontes dissulfeto às custas do oxigênio molecular, conforme a reação abaixo:



Estas enzimas foram primeiramente estudadas há cerca de 30 anos, como participantes do envelhecimento oxidativo de proteínas em vertebrados<sup>(14)</sup>. Naquela época, estas enzimas de vertebrados não despertaram muito interesse, e foram eventualmente obscurecidas pelo estudo do envelhecimento oxidativo protéico em

Formatado: Direita: 18 pt

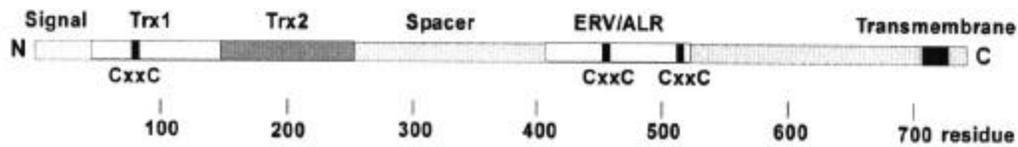
*Escherichia coli* e em leveduras<sup>(15,16)</sup>. Entretanto, a descoberta de uma nova classe de sulfidril oxidases dependentes de FAD (QSOX) em clara de ovo de galinha e a observação de que as enzimas de galinha<sup>(17,18)</sup> e de vesícula seminal de ratos<sup>(17)</sup> eram membros da mesma família de proteínas amplamente distribuídas, levou a um renovado interesse nestes catalisadores redox.

### 1.2.1 DESCOBERTA E ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DA FAMÍLIA DE ENZIMAS QSOX

Quiescina/sulfidril oxidases (QSOX) são proteínas que utilizam um domínio tiorredoxina (TRX)/proteína dissulfeto isomerase (PDI) N-terminal, e um pequeno domínio (próximo à região C-terminal) homólogo à proteína ERV1p de leveduras, o qual se liga a FAD, para oxidar grupos sulfidril a dissulfetos com redução do oxigênio a peróxido de hidrogênio<sup>(19)</sup>. Este arranjo de domínios foi inicialmente reconhecido na proteína QSOX, cuja expressão encontrava-se aumentada quando fibroblastos humanos entravam em quiescência<sup>(20)</sup>. Posteriormente, descobriu-se que a Quiescina Q6 possuía atividade sulfidril oxidase<sup>(17)</sup>.

O arranjo típico de domínios e aspectos estruturais encontrados nas enzimas QSOX está demonstrado na Figura 1<sup>(21)</sup>. A numeração provém da QSOX de clara de ovo - atualmente a enzima mais estudada desta família de sulfidril oxidases. As seqüências QSOX iniciam-se com uma seqüência sinal, consistente com a localização no interior do retículo endoplasmático (ER). Em seguida, aparece o domínio tiorredoxina contendo o motivo redox-ativo CXXC. A Figura 1 mostra ainda um segundo domínio tiorredoxina (TRX2), sem o motivo CXXC. Após uma região espaçadora de aproximadamente 270 aminoácidos, inicia-se o domínio ERV1/ALR, o qual é responsável pela catálise nas enzimas QSOX. Seguindo o domínio ERV1/ALR inicia-se a região C-terminal altamente variável de aproximadamente 200 aminoácidos, que termina com uma região transmembrana.

Alternativamente, formas truncadas de QSOX podem ser formadas pela remoção proteolítica desta região transmembrana.



**Figura 1:** Esquema ilustrativo dos domínios da proteína QSOX de clara de ovo de galinha. Os domínios estão desenhados aproximadamente em escala. As linhas verticais em negro representam os três motivos redox-ativos CXXC. A caixa sólida à direita representa a região transmembrana com a região C-terminal voltada para o citoplasma. (Fonte: Coppock & Thorpe, 2005).

Em humanos, dois mRNA codificam proteínas QSOX distintas (604 e 747 aminoácidos), com um sítio de *splicing* alternativo no exon 12. A forma mais longa retém a segunda região espaçadora e a região C-terminal transmembrana. Ainda não é conhecido se uma determinada classe celular produz ambas as proteínas. Entretanto, é importante notar que na maioria dos tecidos, os níveis de QSOX são consideravelmente mais abundantes que os de QSOXN<sup>(19)</sup>.

### 1.2.2 PAPEL DOS DOMÍNIOS NA CATÁLISE DA FORMAÇÃO DAS PONTES DISSULFETO

Estudos de proteólise parcial com quimotripsina demonstraram que esta protease corta a enzima QSOX de clara de ovo em 2 porções: (a) a porção N-terminal contendo ambos domínios TRX e não apresentando atividade sulfidril oxidase, e (b) a porção C-terminal contendo o domínio ERV1/ALR, e retendo FAD ligada, e mostrando atividade sulfidril oxidase muito fraca com o reagente artificial ditioneitol (DTT). Este fragmento não mostra atividade detectável com RNase

Formatado: Direita: 18 pt

reduzida. Importaneamente, o domínio contendo TRX reduzida quimicamente é um substrato para o fragmento ERV1/ALR. Estes dados demonstram a vantagem catalítica que as enzimas QSOX exploram com a fusão de um domínio tiorredoxina/PDI com um módulo ERV1/ALR oxidase<sup>(22)</sup>.

### 1.2.3 LOCALIZAÇÃO E ABUNDÂNCIA DAS ENZIMAS QSOX NOS TECIDOS

O gene das enzimas QSOX é amplamente distribuído em eucariotos e genes similares foram encontrados em protistas (*Trypanosoma brucei*), plantas (*Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*) e metazoários (vertebrados, *Drosophila* e *Caenorhabditis elegans*). Estas enzimas não foram encontradas em fungos (incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Neurospora*).

As funções específicas das enzimas QSOX na fisiologia celular e dos organismos, embora ainda desconhecidas, poderão ser definidas pelos seus substratos *in vivo*. Apesar do fato desses substratos ainda não terem sido identificados, existem indícios importantes a partir da distribuição das enzimas QSOX e da abundância de seu mRNA, os quais já foram encontrados em uma grande variedade de tecidos em muitas espécies<sup>(19)</sup>.

Dados de imunohistoquímica mostraram uma expressão generalizada de QSOX em humanos, mas com expressão específica de localização impressionante. Por exemplo, nas glândulas apócrinas da pele a enzima QSOX está fortemente expressa nas células epiteliais, particularmente nas suas superfícies secretórias luminais, e exibem coloração perinuclear intensa consistente com o envolvimento do complexo de Golgi. Em geral, a coloração para QSOX está concentrada e é mais intensa nos sítios celulares que estão envolvidos com secreção apócrina. Um padrão similar de coloração foi observado também no endométrio, alguns tumores de mama, na mama normal e na próstata. A coloração altamente localizada foi também encontrada nas células epiteliais secretórias do ducto das glândulas parótidas, as quais secretam mucinas e defensinas e nas ilhotas de Langerhans, as quais produzem insulina e

Formatado: Direita: 18 pt

somatostatina. Em vários insulinomas humanos foram encontrados altos níveis de expressão da QSOX, dados consistentes com a hipótese de que a QSOX esteja envolvida na síntese da insulina<sup>(19)</sup>.

Um grande número de outras indicações dos níveis de expressão das enzimas QSOX em linhagens celulares e tecidos está disponível na Internet. Um dos sites mais interessantes demonstra a distribuição de QSOX1 em 60 linhagens de células tumorais<sup>(23)</sup>.

As enzimas QSOX também foram encontradas por imunolocalização em um grande número de estruturas em cérebro de rato e cobaia. Neurônios que produzem neuropeptídeos contendo pontes dissulfeto expressam QSOX fortemente. Estas enzimas podem estar envolvidas no direcionamento, fixação e maturação neuronais. Ainda, foi localizado QSOX em adenohipófise de rato e demonstraram que os níveis destas enzimas eram reguladas por estradiol<sup>(24)</sup>.

Em ratos e camundongos, QSOX foi encontrada em níveis muito altos no sistema reprodutor masculino<sup>(18)</sup>.

Todas estas observações sugerem que os altos níveis de QSOX1 são induzidos somente naqueles tecidos onde existe uma alta demanda de peptídeos e proteínas secretadas contendo pontes dissulfeto.

#### **1.2.4 LOCALIZAÇÃO INTRA E EXTRACELULAR DAS ENZIMAS QSOX**

Os primeiros estudos relacionados com as enzimas QSOX mostraram que estas proteínas podem ser encontradas extracelularmente, como por exemplo, no fluido seminal de ratos<sup>(18,25)</sup>, clara de ovo de galinha<sup>(17,26)</sup> e sobrenadante de fibroblastos quiescentes<sup>(27)</sup>. Entretanto, as enzimas QSOX também já foram encontradas intracelularmente, no retículo endoplasmático<sup>(19,24)</sup>, complexo de Golgi<sup>(19,24,28)</sup>, grânulos secretórios<sup>(24,28)</sup>, e nos grânulos densos centrais da glândula pituitária<sup>(24)</sup>. A imunoreatividade da sulfidril oxidase já foi reportada também em mitocôndria ou na matriz mitocondrial durante o desenvolvimento de células testiculares de mamíferos<sup>(18,29)</sup>. Finalmente, estudos demonstraram que a QSOXN está predominantemente direcionada para as membranas nuclear e

Formatado: Direita: 18 pt

plasmática<sup>(30)</sup>. Desta maneira, pode-se observar que as enzimas QSOX mostram-se estar presentes em uma grande variedade de locais na célula, refletindo talvez suas múltiplas funções intra e extracelulares em diversos tipos celulares e tecidos.

### 1.2.5 FUNÇÕES FISIOLÓGICAS DAS ENZIMAS QSOX

A facilidade com que a enzima QSOX introduz pontes dissulfetos em peptídeos e proteínas e o achado de que a enzima de clara de ovo de galinha coopera com PDI *in vitro* para, rapidamente, gerar os pares dissulfetos corretos em RNase reduzida, induz ao conceito de que a principal função das enzimas QSOX seja a de gerar pontes dissulfeto *in vivo*. Entretanto, várias precauções devem ser tomadas. Primeiro, o único estudo detalhado da especificidade enzimática até o momento foi feito utilizando-se a QSOX de clara de ovo de galinha. Segundo, não existem estudos de *knock-out* para QSOX de vertebrados, nem alguma mutação que tenha levado ao aparecimento de doenças. Terceiro, as vias para a interconversão de tióis e dissulfetos são marcadas por uma multiplicidade de catalisadores e processos com especificidades que se sobrepõem<sup>(21)</sup>. Assim, vários estudos sugerem possíveis funções para as enzimas da família QSOX:

#### (a) Matriz extracelular

Uma correlação da função da QSOX provém de uma observação de dados de microarranjo de uma linhagem celular do tumor NCI 60. Uma análise para os genes cuja expressão correlacionava-se mais proximamente com a expressão de QSOX1 mostrou que as proteínas mais altamente envolvidas eram o colágeno tipo IV $\alpha$ 1 e lisil oxidase, proteínas com papéis chaves na formação da matriz extracelular. Esta observação reforça as sugestões anteriores<sup>(19,20)</sup> de que a QSOX é importante na formação/remodelamento da matriz extracelular. Na verdade, QSOX foi originalmente identificada como produto de um gene que foi induzido quando fibroblastos humanos alcançavam a quiescência proliferativa com a elaboração da matriz extracelular<sup>(19,20)</sup>. Desta maneira, QSOX pode ser

Formatado: Direita: 18 pt

secretada, ou estar ligada à membrana plasmática via sua região C-terminal transmembrana, atuando como um catalisador oxidativo para a elaboração das estruturas extracelulares que não poderiam ser completadas intracelularmente<sup>(19)</sup>.

### **(b) Geração de peróxido de hidrogênio**

Outra função proposta para as enzimas QSOX está relacionada com a produção de peróxido de hidrogênio. Por exemplo, tem-se sugerido a secreção de sulfidril oxidase como um contribuinte para ação antimicrobiana<sup>(25)</sup>, apesar desta sugestão ainda não ter sido explorada experimentalmente. Talvez, a QSOX extracelular ou de membrana, acoplada com a secreção de GSH<sup>(31,32)</sup> pela superfície apical das células, possa contribuir para a geração de peróxido de hidrogênio fora da superfície da membrana plasmática. O peróxido de hidrogênio, em conjunto com peroxidases extracelulares, poderia apresentar ação antimicrobiana. A reabsorção dos fragmentos de glutathione oxidada<sup>(33)</sup> poderia então manter um ciclo para a geração contínua de peróxido de hidrogênio nas regiões extracelulares luminais. Um possível envolvimento antimicrobiano, sugeriram que as enzimas QSOX poderiam estar envolvidas na formação de peróxido de hidrogênio no cérebro e desta maneira, na transdução de sinais<sup>(28)</sup>.

### **(c) Estresse oxidativo**

Acredita-se que o estresse oxidativo possa ser um fator significativo na morte eventual das células beta durante a progressão do diabetes tipo II<sup>(33,34)</sup>. Grande ênfase tem sido dada ao papel das espécies reativas de oxigênio, geradas pelos altos níveis de glicose, na morte das células beta. Entretanto, existe uma fonte adicional, ainda muito negligenciada, de espécies reativas de oxigênio nas células beta: o peróxido de hidrogênio que é um produto imediato da formação das pontes dissulfeto da insulina promovidas pelas sulfidril oxidases flavina-dependente<sup>(19,36,37)</sup>. Os níveis elevados de peróxido de hidrogênio poderiam ser consequência direta da hiperinsulinemia: as três pontes dissulfeto de cada molécula de insulina madura poderia levar à liberação de 3 moléculas de peróxido

Formatado: Direita: 18 pt

de hidrogênio. Em termos de expressão protéica, dados de imunohistoquímica mostraram que as ilhotas de Langerhans coram-se fortemente para QSOX1 e que esta expressão está fortemente aumentada na hipersecreção de insulina associada com insulinomas. Ainda não se sabe se os níveis de sulfidril oxidades encontram-se aumentados durante a progressão do diabetes tipo II<sup>(19)</sup>.

#### **(d) Apoptose**

Em um importante estudo, Schwab *et al.* recentemente identificaram uma QSOX (SOXN, QSOXN) em neuroblastoma humano. Foi demonstrado neste estudo um papel pró-apoptótico para a QSOX, uma vez que ela aumenta a susceptibilidade das células do neuroblastoma à apoptose induzida por interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )<sup>(30)</sup>.

## 2 OBJETIVOS

Considerando o importante papel de tiol-oxidoreduases no desenvolvimento embrionário e fetal, e considerando a reação catalisada pela nova tiol-oxidoreduase QSOX, o objetivo deste trabalho foi investigar a presença e atividade desta proteína no soro fetal e pós-nato, em modelo bovino.

**Artigo aceito para publicação na revista Redox Report**  
(carta de aceitação em anexo)

**HIGH LEVELS OF ACTIVE QUIESCIN Q6 SULFHYDRYL OXIDASE  
(QSOX) ARE SELECTIVELY PRESENT IN FETAL SERUM**

Excluído: ¶

Zanata, S.M.<sup>1</sup> PhD, Luvizon, A.C.<sup>1</sup>, Batista, D.F.<sup>4</sup>, Ikegami, C.M.<sup>1</sup>, Pedrosa, F.O.<sup>2</sup>  
PhD, Souza, E.M.<sup>2</sup> PhD, Chaves, D.F.S.<sup>2</sup>, Caron, L.F.<sup>1</sup>MSc, Pelizzari, J.V.<sup>4</sup>,  
Laurindo, F.R.M.<sup>3</sup> PhD, Nakao, L.S.<sup>3,4</sup> PhD

**Department of <sup>1</sup>Basic Pathology and <sup>2</sup>Biochemistry, Universidade  
Federal do Paraná**

<sup>3</sup>Vascular Biology Laboratory, Heart Institute (InCor), School of Medicine,  
Universidade de São Paulo

<sup>4</sup>Center for Advanced Molecular Investigation, Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná

Corresponding author:

Dr. Lia S. Nakao

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Center for Advanced Molecular Investigation

Rua Imaculada Conceição, 1155, CEP 80215-901

Curitiba, PR, Brazil

Tel: 55-41-3271-2619

Fax: 55-41-3271-1657

Email address: [lia.nakao@pucpr.br](mailto:lia.nakao@pucpr.br)

*Running title: High levels of QSOX in fetal serum*

Formatado: Direita: 18 pt

### 3.1 ABSTRACT

The participation of thiol-oxidoreductases such as thioredoxin during implantation, embryogenesis and fetal development has been extensively studied. Here, we analyzed the expression of the thioredoxin superfamily enzyme quiescin Q6/sulfhydryl oxidase (QSOX) during development. Our results show that QSOX is present in fetal bovine serum (4 months-gestation), but its levels decrease with time after birth (from P1 to P60). We also demonstrate that a sulfhydryl oxidase activity correlates with QSOX expression in such sera, suggesting a putative role in the redox modulation of developmental programs.

**Keywords:** thiol-disulfide oxidoreductase, fetal development, sulfhydryl oxidase, bovine fetal serum, QSOX

#### Footnotes

Abbreviations: QSOX, quiescin Q6/sulfhydryl oxidase; Trx, thioredoxin; PDI, protein disulfide isomerase; DTT, dithiothreitol; HRP, horseradish peroxidase; EST, expressed sequence tag.

### 3.2 INTRODUCTION

The role of redox processes during implantation, embryonic and fetal development has been evidenced for more than a decade<sup>1-3</sup>. Superoxide, hydrogen peroxide<sup>4-6</sup> and nitric oxide<sup>7,8</sup> are some species produced during development, which in appropriate localization and concentrations, seem to underlie important aspects of cellular phenotypes, such as proliferation, migration, differentiation<sup>2, 9-11</sup> and particularly the apoptosis required for embryonic morphogenesis<sup>12</sup>. Several lines of evidence have suggested that redox modulation of critical protein thiol groups is a key event in those processes<sup>2, 4, 13</sup>. In this context, the importance of thiol-oxidoreductases such as the antioxidant proteins thioredoxin (Trx), thioredoxin reductase and peroxiredoxins becomes evident<sup>14</sup>.

Recently, a novel family of thiol-oxidoreductases has reemerged<sup>15</sup>. Sulfhydryl oxidases are enzymes that catalyze disulfide formation by oxygen reduction to hydrogen peroxide. The quiescin Q6/sulfhydryl oxidases (QSOX) comprise a family of FAD-dependent sulfhydryl oxidases, which contain an N-terminal protein disulfide isomerase (PDI)-type Trx domain and a C-terminal FAD-containing ERV1 domain<sup>16-24</sup>. QSOX enzymes have been described in male reproductive tract<sup>16, 17</sup>, fetal lung fibroblasts<sup>18, 19</sup>, egg white<sup>20</sup>, endometrial cells<sup>21</sup>, epidermis<sup>22</sup>, nervous system<sup>23, 24</sup>, and secretory tissues<sup>15</sup>. They are found both in the extracellular milieu<sup>16, 17, 19, 20</sup> and intracellularly<sup>15, 22</sup>. Regarding functions, QSOX members have been suggested to be involved in the oxidative folding pathway of secreted proteins, and possibly in extracellular matrix modeling<sup>15, 17</sup>, in

cell cycle control and cell adhesion<sup>19</sup> and in guiding migrating cells during neuronal maturation<sup>24</sup>.

In this paper, we show the expression and regulation of a QSOX member in bovine fetal and newborn sera and a correlating sulfhydryl oxidase activity in these samples. These data support the concept that QSOX activity may have an extracellular role during fetal development.

Formatado: Direita: 18 pt

### 3.3 MATERIALS AND METHODS

*Samples.* Several batches of fetal bovine sera (4 months gestation) were purchased from Cultilab (Campinas, Brazil). They were collected in the same way as those used for cell culture, except for the 0.22  $\mu\text{m}$ -filtration. Filtering did not affect the results, as observed for Invitrogen (Carlsbad, CA) fetal serum (result not shown). Sera from newborn calves (P1-P60, post natal) or pregnant (4-5 months gestational age) and non-pregnant cows were obtained aseptically from jugular vein blood.

*2D-PAGE.* 2D-gels were run as previously described<sup>25</sup> with some modifications. Briefly, fetal bovine serum (10  $\mu\text{L}$  or 1 mg) was dissolved in re-hydration buffer (7 M urea, 2M thiourea, 2% w/v CHAPS, 0,5% v/v IPG buffer). Samples were applied directly to Immobiline DryStrip gel, pH range 4-7 L (GE Biosciences, Piscataway, NJ) and run at 55.000V.h. Second dimension was carried out using an 818% gradient gel. Proteins from two identical gels were either transferred onto nitrocellulose membrane or stained with Coomassie Brilliant Blue.

*Immunoblotting.* Proteins were separated in a 10% SDS-PAGE, immobilized onto a nitrocellulose membrane, which was then blocked with 10% skim milk, incubated with goat antibody against synthetic QSOX peptide EDPQFPKVQWPPRE<sup>20</sup> (Bethyl Co., Montgomery, TX), 1/1000, and with anti-goat-HRP 1/2000. Western blotting signals were detected with SuperSignal West Pico (Pierce, Rockford, IL).

*Enzymatic activity.* Sulfhydryl oxidase activity was determined by the homovanillic acid/HPR method using 50 $\mu$ L of diluted bovine semen (156  $\mu$ g of total protein) or sera (5 mg of total protein), in a final volume of 500 $\mu$ L, as described previously<sup>26</sup>. The fluorescence was monitored with a RF-5301PC Shimadzu spectrofluorophotometer.

### 3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Development requires cellular proliferation, migration, adhesion, differentiation and programmed death. Such events are closely associated with the environmental redox state, and particularly with thiol-disulfide exchange reactions<sup>2, 11</sup>. In the developmental context, a few reports have demonstrated the role of thiol-oxidoreductases<sup>14</sup>. Recently, the requirement of PDI, a potential QSOX substrate<sup>33</sup>, for determining left/right asymmetries in zebrafish embryos was shown<sup>27</sup>. Also, thioredoxin is believed to prevent oxidative stress mainly during implantation and embryogenesis, when protein thiol oxidation may block embryo development<sup>4, 13, 14</sup>. Its importance is evidenced by early lethality caused by targeted disruption of mouse thioredoxin-1 and -2 genes<sup>28, 29</sup>. QSOX, which is a fusion protein of the PDI/Trx with the Erv1 families<sup>30</sup>, is an oxidant enzyme, since it produces disulfide and hydrogen peroxide<sup>15-24</sup>. Although discrete shifts from reducing to a more oxidant environments are associated with the transition proliferation/differentiation<sup>2, 11</sup>, the possible involvement of QSOX during embryonic and fetal development has not yet been considered. However, several evidences support the idea that QSOX may be relevant for fetal development. For instance, ESTs from E10-E12 mouse embryos (Genbank AK 012943 and AK083938) have been characterized as QSOX; the human QSOX mRNA was first described when fetal lung fibroblasts enter a reversible quiescence<sup>18, 19</sup>, and a recent report demonstrated a differential distribution of QSOX in rat brain from E12 to P30<sup>24</sup>. Finally, a transmembrane QSOX has been identified in human neuroblastoma cell and named QSOXN<sup>31</sup>. Interestingly, human QSOXN mRNA is more expressed in

some fetal tissues than in the corresponding adult tissues, such as lung, liver and kidney<sup>31</sup>. These studies and the fact that QSOX is a secreted protein prompted us to investigate QSOX in fetal and neonatal sera.

The results show that fetal bovine serum has a high level of QSOX, as judged by western blotting assays using antibody against QSOX peptide (Fig.1A). Interestingly, the level decreases with age in early newborn (P1 to P10) sera, until complete disappearance in P30 and P60 calf sera. (Fig.1A). The surprisingly high level of QSOX in fetal serum led us to examine the antibody specificity. It had been previously demonstrated that the antibody anti-EDPQFPKVQWPPRE (anti-QSOX peptide) recognizes bovine semen QSOX<sup>20</sup>. The recognition of bovine semen QSOX by such antibody was confirmed under our experimental conditions (Fig. 1B). Antibody specificity was tested by incubating membranes containing bovine semen or fetal and neonatal (P3) sera with goat anti-QSOX peptide and anti-goat-HRP or anti-goat-HRP antibodies. QSOX in either serum or semen was not detected in the absence of primary antibody, while a 50kDa band present in calf serum is a result of a nonspecific reaction of the secondary antibody (Fig. 1B). In addition, anti-QSOX peptide reactivity against both recombinant and fetal QSOX was blocked by pre-incubating the polyclonal antibody with purified recombinant protein (data not shown).

Albumin has an apparent molecular mass of ca. 66 kDa and is present in high concentrations in serum. Then, to exclude cross-reactivity between QSOX and albumin, we performed a 2D-electrophoresis and western blotting. Figure 2 shows that anti-QSOX peptide does not recognize albumin. The presence of several spots recognized by the antibody (Fig. 2B) may indicate post-translational

modifications. It is known that rat, human and mouse QSOX contain 2 sites of *N*-glycosylation<sup>17, 22</sup>. A similar pattern of spots in the 2-dimensional protein gel has been shown for adiponectin purified from bovine fetal serum, indicating multiple glycosylated isoforms<sup>32</sup>. The results altogether (Figs 1 and 2) indicate that bovine fetal and newborn calf (by day 10) sera present a high level of QSOX and its presence decreases with age after birth.

To ensure that the observed QSOX had not been transferred from the maternal blood to the fetal serum, we analyzed the sera of pregnant and non-pregnant cows (Fig. 3). Immunoblots of these samples demonstrated that cow sera does not contain QSOX in detectable levels, as it is probably absent in adult sera. These results suggest that the QSOX observed in fetal and newborn calf sera is produced by fetal tissues and/or circulating cells. The contribution of the placenta, however, cannot be disregarded, since QSOX expression has been described in this tissue, particularly in the syncytiotrophoblasts<sup>15</sup>. We are unable to ascertain the secreting tissue at this moment.

We also determined a sulfhydryl oxidase activity in semen and serum samples, employing the fluorescent method of homovanillic acid and HRP<sup>26</sup>. Using DTT as substrate, we showed that bovine semen has detectable sulfhydryl oxidase activity, producing hydrogen peroxide at a rate of 0.22 nmol/min/mg total protein (Fig. 4). Fetal bovine serum also exhibited such activity, with hydrogen peroxide production in the order of 4.2 pmol/min/mg total protein. In agreement with the QSOX level (Fig.1), the activity of the 6-day newborn serum is lower (in the order of 2.6 pmol/min/mg total protein) than that of fetal serum, and no activity was found in 60-day calf serum or in reactions without serum (Fig. 4). The hydrogen peroxide

production rates measured here are in the range for those reported for other tissues and secretions<sup>26</sup>. These data demonstrate that the expression of QSOX in fetal, newborn and calf sera correlates with the determined sulfhydryl oxidase activity. Although the activity detected in serum likely corresponds to QSOX, we cannot fully exclude that other sulfhydryl oxidase(s) may have contributed to those signals.

The amount of QSOX in semen, as measured by the immunoblots (Fig. 1), is much lower than those in sera samples, but the semen sulfhydryl oxidase activity is approximately 1000-fold higher, suggesting that bovine serum QSOX is partially inactivated or has distinct substrate specificity or affinity. It is known, for example, that although being a versatile enzyme, the chicken egg white QSOX preferentially oxidizes reduced peptide and proteins than small monothiol compounds<sup>33</sup>.

The remarkable role of the extracellular matrix during developmental processes involving proliferation, migration and differentiation supports the hypothesis that QSOX may be essential in elaborating or modeling the extracellular matrix. In fact, extracellular thiol-disulfide redox environment may affect the functionality of several cell surface and extracellular molecules<sup>11</sup>.

In conclusion, our work shows that QSOX is present in fetal serum, and that its levels, as well as the sulfhydryl oxidase activity determined, decrease after birth. Although QSOX physiological substrates and functions remain unclear, its possible role in the redox modulation of developmental programs is further suggested.

### 3.5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Vanete Thomaz Soccol (UFPR) for providing the cow sera, and Dr. Humberto Madeira (PUCPR) for providing the bovine semen. This work was supported by Fundo Bunka de Pesquisa-Banco Sumitomo-Mitsui, FAPESP, Fundação Araucária and CNPq.

Formatado: Direita: 18 pt

### 3.6 REFERENCES

1. Allen RR, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989; **6**: 631-661.
2. Schafer F Q, Buettner GA. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; **30**: 1191-1212.
3. Dennery PA. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. *Antioxid Redox Signal* 2004; **6**: 147-153.
4. Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. *Free Radic Biol Med* 1992; **13**: 47-53.
5. Gagiotti S, Colepicolo P, Bevilacqua E. Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. *Reprod Fertil Dev* 1995; **7**: 1111-1116.
6. Fantel AG, Mackler B, Stamps LD, Tran TT, Person RE. Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. *Free Radic Biol Med* 1998; **25**: 95-103.
7. Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet-Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998; **58**: 875-879.
8. Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1538-1544.

9. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; **16**: 775-794.
10. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001; **11**: 153-166.
11. Moriarty-Craige SE, Jones DP. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* 2004; **24**: 481-509.
12. Salas-Vidal E, Lomeli H, Castro-Obregon S, Cuervo R, Escalante-Alcalde D, Covarrubias L. Reactive oxygen species participate in the control of mouse embryonic cell death. *Exp Cell Res* 1998; **238**: 136-147.
13. Liu L, Trimarchi JR, Keefe DL. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. *Biol Reprod* 1999; **61**: 1162-1169.
14. Das KC. Thioredoxin system in premature and newborn biology. *Antioxid Redox Signal* 2004; **6**: 157-164.
15. Thorpe C, Hooper KL, Raje S, Glynn NM, Burnside J, Turi GK, Coppock DL. Sulfhydryl oxidase: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. *Arch Biochem Biophys* 2002; **405**: 1-12.
16. Ostrowski MC, Kistler WS. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. *Biochemistry* 1980; **17**: 2639-2645.
17. 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* 2001; **276**: 13830-13837.

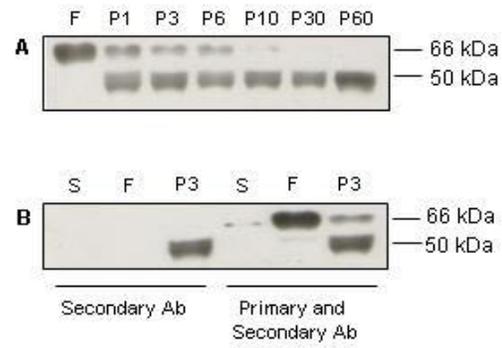
18. Coppock DL, Kopman C, Scandalis S, Gilleran S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. *Cell Growth & Differ* 1993; **4**: 483-493.
19. Coppock D, Kopman C, Gudas J, Cina-Poppe D. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**: 604-610.
20. Hooper KL, Glynn NM, Burnside J, Coppock DL, Thorpe C. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. *J Biol Chem* 1999; **274**: 31559-31562.
21. Musard JF, Sallot M, Dulie P, Fraichard A, Ordener C, Remy-Martin JP, 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* 2001; **287**: 83-91.
22. Matsuba S, Suga Y, Ishidoh K, Hashimoto Y, Takamori K, Kominami E, et al. Sulfhydryl oxidase (SOx) from mouse epidermis: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of recombinant protein in the cultured cells. *J Dermatol Sci* 2002; **30**, 50-62.
23. Mairet-Coello G, Tury A, Fellman D, Jouvenot M, Griffond B. Expression of SOx-2, a member of the FAD-dependent sulfhydryl oxidase/quiescin Q6 gene family, in rat brain. *Neuroreport* 2002; **13**: 2049-2051.

24. Mairet-Coello G, Tury A, Fellman D, Risoldi PY, Griffond B. Ontogenesis of the sulfhydryl oxidase QSOX expression expression in rat brain. *J Comp Neurol* 2005; **484**: 403-415.
25. Zanata SM, Lopes MH, Mercadante AF, Hajj GN, Chiarini LB, Nomizo R, et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J* 2002; **21**: 3307-3316.
26. Raje S, Glynn NM, Thorpe C. A continuous fluorescence assay for sulfhydryl oxidase. *Anal Biochem* 2002; **307**: 266-272.
27. Hoshijima K, Metherall JE, Grunwald DJ. A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. *Genes & Dev* 2002; **16**: 2516-2529.
28. Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 1996; **158**: 159-165.
29. Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G. The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 916-922.
30. Coppock DL, Cina-Poppe D, Gilleran S. The quiescin Q6 gene (QSCN6) is a fusion of two ancient gene families: thioredoxin and ERV1. *Genomics* 1998; **54**: 460-468.
31. Wittke I, Wiedemeyer R, Pillmann A, Savelyeva L, Westermann F, Schwab M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl

oxidase/quiescin6 family, regulates sensitization to interferon  $\gamma$ -induced cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 2003; **63**: 7742-7752.

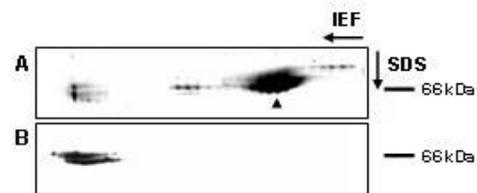
32. Wang Y, Lu G, Wong WPS, Vligenthart JFG, Gerwig GJ, Lam KSL, et al. Proteomic and functional characterization of endogenous adiponectin purified from fetal bovine serum. *Proteomics* 2004; **4**: 3933-3942.
33. Hooper KL, Sheasley SL, Gilbert HF, Thorpe C. Sulfhydryl oxidase from egg white. A facile catalyst for disulfide bond formation in proteins and peptides. *J Biol Chem* 1999; **274**: 22147-22150.

### 3.7 Figure 1



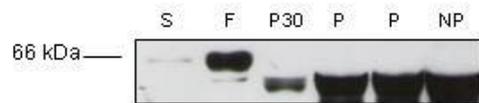
Formatado: Direita: 18 pt

3.8 Figure 2



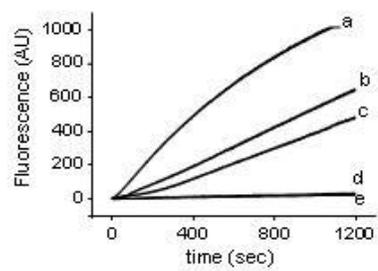
Formatado: Direita: 18 pt

### 3.9 Figure 3



Formatado: Direita: 18 pt

### 3.10 Figure 4



Formatado: Direita: 18 pt

### 3.11 FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** *QSOX levels in fetal and newborn sera.* Diluted samples (corresponding to 40 µg of total serum protein or 125 µg of total semen protein) of fetal (F) and newborn 1 (P1), 3 (P3), 6 (P6), 10 (P10), 30 (P30) and 60 (P60) days after birth sera were analyzed for the presence of QSOX (66 kDa) (A), or for antibody specificity (B). Bovine semen (S), as a positive control, and fetal (F) and neonatal 3 days after birth (P3) sera were analyzed using anti-goat-HRP only, or anti-QSOX peptide and anti-goat-HRP antibodies.

**Figure 2.** *2D-PAGE-Western blotting analysis of bovine fetal serum.* (A) Coomassie blue-stained proteins. The prominent spot (arrow head) with pI ranging from 5.5 to 6.5 represents albumin. (B) Immunoblotting of an identical gel reacted with anti-QSOX peptide and developed using HRP-labeled anti-goat Ig. Cross-reactivity with albumin is excluded once a series of spots is recognized by anti-QSOX peptide antibody at acidic region of 2D-gel map.

**Figure 3.** *Pregnant cow sera do not present detectable levels of QSOX protein.* Diluted samples (corresponding to 40 µg of total serum protein or 125 µg of total semen protein) of bovine semen (S) and fetal (F), newborn P30, pregnant cows (P) and non-pregnant cow (NP) sera were analyzed for the presence of QSOX (66 kDa band).

**Figure 4.** *Sulfhydryl oxidase activity in bovine sera samples.* Sulfhydryl oxidase activity was determined in bovine semen (a) and fetal (b), P6 (c) and P60 (d) sera by a continuous fluorescence assay, as described<sup>26</sup>. Negative control (e) was performed in the absence of serum in the reaction mixture.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença e atividade da QSOX em soros fetal e pós-nato mostradas neste trabalho evidenciam a importância desta enzima no contexto do desenvolvimento embrionário, fetal e pós-natal, embora ainda sem função definida. Estes fatos estão de acordo com dados do Genbank, que mostram a presença de EST da QSOX em embriões de camundongos em E10-E12 (números de acesso AK 012943 e AK 083938). Além disso, a caracterização da QSOXN do cromossomo 9 humano mostrou que ela é expressa abundantemente em tecidos embrionários e sensibiliza células neuroblastoma a apoptose<sup>(30)</sup>. Apesar de se tratar de outra proteína, os domínios funcionais da QSOXN são similares a QSOX do cromossomo 1, e portanto poderiam compartilhar funções, como proteínas pró-apoptóticas. A apoptose, um tipo de morte celular programada é um componente necessário não somente para manter a homeostase celular e resposta imune na vida adulta, como também durante o desenvolvimento embrionário<sup>(38)</sup>. Seu papel durante a embriogênese é classicamente evidenciado na morfogênese tecidual, como a formação dos dedos dos vertebrados superiores, onde a apoptose elimina as células entre os dedos em formação. Caso a apoptose seja inibida, a formação correta dos dedos é bloqueada<sup>(39)</sup>. O processo apoptótico, assim como outros estados fenotípicos celulares são altamente influenciados pelo estado redox, como evidenciado pelos crescentes potenciais de redução que acompanham a transição das células dos fenótipos proliferativos rápido (-260 a -235 mV), lento (-220 mV), diferenciação (-200 a -185 mV) e apoptótico (-170 a -160 mV)<sup>(1)</sup>. A QSOX, sendo

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

uma proteína oxidante, poderia ser co-responsável pela apoptose na embriogênese e no desenvolvimento fetal.

**Formatado:** Direita

**Formatado:** Direita: 18 pt

**Formatado:** Direita, Direita:  
18 pt

## 5 CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra que:

1. A QSOX está presente no soro fetal bovino, em níveis elevados
2. Os níveis da QSOX, bem como a atividade sulfidril oxidase determinada, diminui após o nascimento.
3. O soro de vacas, prenhes e não prenhes, não apresentam níveis detectáveis por Western blotting de QSOX.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

## 6 REFERÊNCIAS

1. Allen, R.G., Tresini, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radic. Biol. Med.** 2000, 28:463-499.
2. Schafer, F.Q.; Buettner, G.A. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.** 2001, 30: 1191-1212.
3. Kirilin, W.G.; Cai, J.; Thompson, S.A.; Diaz, D.; Kavanigh, T.J. & Jones, D.P.; Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. **Free Radical Biology & Medicine** 1999, 27: 1208-1218.
4. Dennerly, A.P. Role of redox in fetal development and neonatal diseases. **Antioxid. Redox Signal.** 2004, 6:147-153.
5. Fantel, A.; Mackler, B.; Stamps, L.D.; Tran, T.T.; Person, R.E. Reactive oxygen species and DNA oxidation in fetal rat tissues. **Free Radical Biology & Medicine** 1998, 25:95-103.
6. Harvey, A.J.; Kind, K.L.; Thompson, J.G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction** 2002, 123:479-486.
7. Gaglioti, S.; Colepicolo, P.; Bevilacqua, E. Post-implantation mouse embryos have the capability to generate and release reactive oxygen species. **Reprod. Fertil. Dev.** 1995, 7:1111-1116.
8. Gouge, R.C.; Marshburn, P.; Gordon, B.E., Nunley, W.; Huet-Hudson, Y.M. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. **Biology of Reproduction** 1998, 58:875-879.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

9. Tranguch, S.; Steuerwald, N.; Huet-Hu Dson, Y.M. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of primplantation embryo development. **Biology of Reproduction** 2003, 68:1538-1544.
10. Liu, L.; Trimarchi, J.R.; Keefe, D.L. Thiol oxidation-induced embryonic cell death in mice is prevented by the antioxidant dithiothreitol. **Biology of Reproduction** 1999, 61:1162-1169.
11. Matsui, M.; Oshima, M.; Oshima, H.; Takaku, K.; Maruyama, T.; Yodoi, J.; Taketo, M.M. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse Thioredoxin gene. **Developmental Biology** 1996, 178:179-185.
12. Nonn, L.; Williams, R.R.; Erickson, R.P.; Powis, G. The absence of mitochondrial Thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. **Molecular and Cellular Biology** 2003, 23:916-922.
13. Hoshijima, K.; Metherall, J.E. Grunwald, D.J. A protein disulfide isomerase expressed in the embryonic midline is required for left/right asymmetries. **Genes & development** 2002, 16:2518-2529.
14. Janolino, V.G.; Swaisgood, H.E. Isolation and characterization of sulfhydryl oxidase from bovine milk. **J. Biol. Chem.** 1975, 250:2532-2538.
15. Kadokura, H.; Katzen, F.; Beckwith, J. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. **Ann. Rev. Biochem.** 2003, 72:111-135.
16. Nakamoto, H.; Bardwell, J.C. Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the Escherichia coli periplasm. **Biochem. Biophys. Acta** 2004, 1694:111-119.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

17. Hooper, K.L.; Glynn, N.M.; Burnside, J.; Coppock, D.L.; Thorpe, C. Homology between egg white sulfhydryl oxidase and quiescin Q6 defines a new class of flavin-linked sulfhydryl oxidases. **J. Biol. Chem.** 1999, 274:31759-31762.
18. 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.** 2001, 276:13830-13837.
19. Thorpe, C.; Hooper, K.L.; Raje, S.; Glynn, N.M.; Burnside, J.; Turi, G.K.; Coppock, D.L. Sulfhydryl oxidases: emerging catalysts of protein disulfide bond formation in eukaryotes. **Arch. Biochem. Biophys.** 2002, 405:1-12.
20. Coppock, D.L.; Kopman, C.; Scandalis, S.; Gillerman, S. Preferential gene expression in quiescent human lung fibroblasts. **Cell Growth Differ.** 1993, 4:483-493.
21. Coppock, D. L.; THORPE, C. Multi-domain flavin-dependent sulfhydryl oxidases. **Antiox. Redox Signal.**, *in-press*.
22. Raje, S.; Thorpe, C. Inter-domain redox communication in flavoenzymes of the quiescin/sulfhydryl oxidases family: role of a thioredoxin domain in disulfide bond formation. **Biochemistry** 2003, 42:4560-4568.
23. Ross, D.T.; Scherf, U.; Eisen, M.B.; Perou, C.M.; Rees, C.; Spellman, P.; Iyer, V.; Jeffrey, S.S.; Van de Rijn, M.; Waltham, M.; Pergamenschikov, A.; Lee, J.C.; Lashkari, D.; Shalon, D.; Myers, T.G.; Weinstein, J.N.; Botstein, D.; Brown, P.O. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat. Genet.** 2000, 24:227-235. <http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/nci260/search>.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

24. Tury, A.; Mairet-Coello, G.; Poncet, F.; Jacquemard, C.; Risold, P.Y.; Fellmann, D.; Griffond, B. QSOX sulfhydryl oxidases in rat adenohypophysis: localization and regulation by estrogens. **J. Endocrinol.** 2004, 183:353-363.
25. Ostrowski, M.C.; Kistler, W.S. Properties of a flavoprotein sulfhydryl oxidase from rat seminal vesicle secretion. **Biochemistry** 1980, 19:2639-2645.
26. Hooper, K.L.; Joneja, B.; White, H.B.; Thorpe, C. A sulfhydryl oxidase from chicken egg white. **J. Biol. Chem.** 1996, 271:30510-30516.
27. Coppock, D.L.; Kopman, C.; Gudas, J.; Cina-Poppe, D.A. Regulation of the quiescence-induced genes: quiescin Q6, decorin, and ribosomal protein S29. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2000, 269:604-610.
28. Mairet-Coello, G.; Tury, A.; Esnard-Fève, A.; Fellman, D.; Risold, P.Y.; Griffond, B. FAD-linked sulfhydryl oxidase QSOX: topographic, cellular, and subcellular immunolocalization in adult rat central nervous system. **J. Comp. Neurol.** 2004, 473:334-363.
29. Kumari, M.; Aumuller, G.; Bergmann, M.; Meinhardt, A.; Seitz, J. Stage-dependent appearance of sulfhydryl oxidase during spermatogenesis in the testis of rat and hamster. An immunohistochemical study. **Histochemistry** 1990, 94:365-371.
30. Wittke, I.; Wiedemeyer, R.; Pillman, A.; Savelyeva, L.; Westermann, F.; Schwab, M. Neuroblastoma-derived sulfhydryl oxidase, a new member of the sulfhydryl oxidase/Quiescin6 family, regulates sensitization to interferon gamma-induced cell death in human neuroblastoma cells. **Cancer Res.** 2003, 63:7742-7752.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

31. Griffith, O.W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic. Biol. Med.** 1999, 27:922-935.
32. Sies, H.; Graf, P. Hepatic thiol and glutathione efflux under the influence of vasopressin, phenylephrine and adrenaline. **Biochem. J.** 1985, 226:545-549.
33. Tate, S.S.; Grau, E.M.; Meister, A. Conversion of glutathione to glutathione disulfide by cell membrane-bound oxidase activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 1979, 76:2715-2719.
34. Araki, E.; Oyadomari, S.; MORI, M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. **Exp. Biol. Med. (Maywood)** 2003, 228:1213-1217.
35. Hayden, M.R.; Tyagi, S.C. Islet redox stress: the manifold toxicities of insulin resistance, metabolic syndrome and amylin derived islet amyloid in type 2 diabetes mellitus. **J. Pancreas** 2002, 3:86-108.
36. Cabibbo, A.; Pagani, M.; Fabbri, M.; Rocchi, M.; Farmery, M.R.; Bulleid, N.J.; Sitia, R. ERO1-L, a human protein that favors disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. **J. Biol. Chem.** 2000, 275:4827-483.
37. Tu, B.P.; Weissman, J.S. The FAD- and O<sub>2</sub>-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. **Mol. Cell.** 2002, 10:983-994.
38. GUIMARÃES, C. A.; LINDEN, R. programmed cell death apoptosis and alternative deathstyles. **J. Biol. Chem.**, 271:1638-1650, 2004.
39. MILLIGAN, C. E.; PREVETTE, D.; YAGINUMA, H.; HOMMA, S.; CARDWELL, C.; FRITZ, L. C.; TOMASELLI, K. J.; OPPENHEIM, R. W.; SCHWARTZ, L. M.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

Peptide inhibitors of the ICE protease family arrest programmed cell death of motoneurons in vivo and vitro. **Neuron**, 15:385-393, 1995.

Formatado: Direita

Formatado: Direita: 18 pt

Formatado: Direita, Direita:  
18 pt

7 ANEXO

**Formatado:** Direita

**Formatado:** Direita: 18 pt

**Formatado:** Direita, Direita:  
18 pt

De "Nick Hunt" nhunt@med.usyd.edu.au  
Assunto MS 2050821  
Data Ter, Novembro22, 2005 5:56am  
Para lia.nakao@pucpr.br

Formatado: Cor da fonte:  
Preto

Dear Dr Nakao,

Your manuscript number 2050821 has been evaluated by an expert reviewer and a member of the Editorial Advisory Board. Both were supportive of your manuscript and did not require any changes. I therefore am pleased to accept it for publication in Redox Report.

The manuscript will undergo preliminary editing and then be forwarded to the journal for publication.

Thank you for submitting your interesting work for publication in Redox Report.

Yours sincerely,

Nick Hunt

--

Nicholas Hunt  
Professor of Pathology  
Director, Institute for Biomedical research, University of Sydney  
Editor, Redox Report  
University of Sydney Department of Pathology  
Medical Foundation Building (K25)  
92-94 Parramatta Rd Camperdown,  
NSW 2042  
Australia

Formatado: Direita  
Formatado: Direita: 18 pt  
Formatado: Direita, Direita:  
18 pt