



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

## **Fosfatase Alcalina Reconstituída em “Lipid Rafts”**

**Maytê Bolean**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: **Química**.

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

## **Fosfatase Alcalina Reconstituída em “Lipid Rafts”**

**Maytê Bolean**

**Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: **Química**.

**RIBEIRÃO PRETO - SP**

**2010**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bolean, Maytê

Fosfatase Alcalina Reconstituída em "Lipid Rafts". Ribeirão Preto, 2010.

p. 85

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1.Fosfatase Alcalina 2.Lipossomos 3.Lipid Rafts 4.Proteolipossomos 5.DSC

# Agradecimentos especiais

*Tiago*

*Obrigada por fazer tudo parecer bem mais simples e prático do que parece aos meus olhos.*

*Obrigada pelas exaustivas esperas durante as provas dos vestibulares, por ter sido a primeira pessoa que viu minha aprovação nesta faculdade, por exercitar uma infinita paciência e compreensão durante os cinco animados anos de graduação, pelas prévias assistidas, referências bibliográficas acertadas, pelo amor e carinho dedicados a mim a cada dia, enfim por participar de maneira tão linda de minha vida e por sempre estar ao meu lado me ajudando a construir esta história. Seu incentivo e companheirismo me fortalecem e me fazem encarar os obstáculos como oportunidades de crescimento.*

*Sou honrada em tê-lo ao meu lado.*

*Dedico a você esta Dissertação  
Com todo o meu amor, hoje e sempre.*

## *Aos meus Pais*

*Pai, com você aprendi um pouco do significado do que é ser um  
“professor aloprado” ou um “cientista maluco”.*

*Sua mente aguçada e ávida pelo saber sempre me intrigaram e me  
inspiraram a trabalhar com o aprendizado diário.*

*Você Pai é meu primeiro Mestre, Mestre em Química, em amor  
incondicional, em ser humano.*

*Mãe, você é meu alicerce, minha amiga, minha confidente e  
minha principal encorajadora.*

*Você me proporcionou tranquilidade para estudar, me norteou  
nos momentos de indecisões e festejou comigo a cada conquista.*

*Você me conduz a ser uma pessoa melhor a cada dia.*

*Obrigada pela pessoa linda e doce que você é.*

*Dedico a vocês este trabalho, afinal não é qualquer um que tem  
pais Químicos como vocês.*

*Amo vocês!!!*

*Minhas irmãs queridas Soraia e Thais*

*Obrigada por sempre estarem presentes em minha vida, pelo amor de irmãs e amigas dedicado dia-a-dia e por de vez em quando me tirarem um pouco da faculdade em nossos almoços semanais, me trazendo um pouco para a realidade.*

*Vocês são essenciais em minha vida!!!*

*Vózinha, esta dissertação foi finalizada graças ao seu dedicado apoio técnico em minha casa.*

*Obrigada pelo amor e carinho a mim dedicados.*

*Amo muito a senhora!!!*

*Caio e Lucas*

*Vocês enchem o meu coração de luz e alegria. Obrigada por fazerem parte de minha vida.*

## *Pietro*

*É gratificante tê-lo como mestre durante este seis anos de trabalho. Além de um profissional excepcional, seu lado humano e ético dignifica nossa profissão.*

*Obrigada pelos conselhos que me nortearam nos momentos de indecisão, pelo incentivo nos momentos de dúvida, pela paciência com que tratou meus dilemas de estudante e pela amizade e companheirismo adquiridos durante todos estes anos.*

*É um privilégio poder chamá-lo de amigo.*

*Gostaria que soubesse que lecionar ao seu lado foi um dos momentos mais gratificantes de minha curta carreira acadêmica.*

*Obrigada por tudo!!!*



## **Agradecimentos**

Primeiramente agradeço a **Deus** por ter me confiado esta oportunidade de vida e por ter colocado em meu caminho na Terra alguns anjinhos da guarda (Vó Mercedes, Vô Libério, Vó Lina, Armenak, Elisabeth, Soraia, Júnior, Lucas e Miguel\*, Thais e Caio, Luiz Fernando, Tiago). Estas pessoas fazem todos os dias da minha vida serem especiais.

Ao meu mestre e amigo **Prof. Dr. Pietro Ciancaglini**, por estes 6 anos de convivência, paciência, cumplicidade e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Sistemas Miméticos de Membrana: **Ana, Andréia, Bruno, Carol, Cynara, Dani, Hérica, Fernandinha, Imaculada, Juliana, Kátia, Larissa, Thaís, Leonardo (Tchau), Luis Eduardo (Dudu), Mariana (Mari), Marcelle, Prislaine, Raissa, Ricardo (Torrone), Roberto (Pubs), Rodrigo (Diguinho), Rosângela, Simone, Tony**. Obrigada pela amizade, companheirismo nas horas de sufoco e risadas nos momentos de alegria. É um privilégio aprender junto com vocês e com vocês.

**Tony**, obrigada pelos ensinamentos iniciais durante a minha iniciação científica. Aprendi muito com você e hoje tenho orgulho em tê-lo como amigo.

**Ana Maria e Carol**, obrigada pela sincera amizade desenvolvida durante estes anos de convivência. Adoro vocês.

Ao amigo **Leandro** pela ajuda nas análises de DSC, pelas risadas durante o trabalho e pela ótima companhia nos momentos de descontração.

**Bruno**, seu entusiasmo com o aprendizado científico e apoio técnico contribuíram e muito para a realização deste trabalho. Obrigada pela amizade e pelas músicas.

**Nilton**, obrigada pela constante ajuda no laboratório e pelas informações sempre atualizadas sobre nosso Todo Poderoso Timão, Corinthians.

**Ivana...** o que seríamos de nós sem você! Obrigada pela competência que você emprega em tudo que faz no laboratório.

**Mércia**, obrigada pela amizade e apoio nas medidas com o HPLC.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Dr. Adalberto Luis Rosa** e **Dr. Paulo Tambasco de Oliveira**, pela colaboração e apoio durante esses dois anos.

Aos funcionários do Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Cirurgia, Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, **Júnia** e **Roger**, que colaboraram na realização deste trabalho. Em especial, agradeço a **Júnia** pelo suporte técnico, atenção, paciência no início deste trabalho.

Aos docentes, técnicos, funcionários e demais pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

Aos meus **amigos de graduação** que compartilharam comigo dos melhores anos da minha vida.

À **Priscila Cerviglieri**, pelas correções dos textos em inglês.

À **FAPESP, CAPES** e **CNPq**, pelos auxílios concedidos ao laboratório.

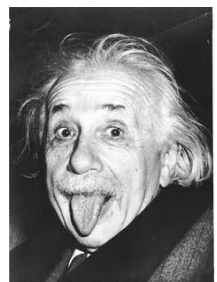
Enfim, agradeço a todos que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

"Quando a gente acha que tem todas as respostas...  
Vem a vida e muda todas as perguntas"

Luis Fernando Verissimo

"A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original".

Albert Einstein



## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	i
<b>Lista de Tabelas</b>	ii
<b>Lista de Figuras</b>	iii
<b>Resumo</b>	v
<b>Abstract</b>	vii
<b>1. Introdução</b>	1
1.1 Biomineralização	1
1.2 Fosfatase Alcalina e seu papel na biomineralização	5
1.3 Função de lipídios e de substratos na biomineralização	9
1.4 Lipid rafts e Calorimetria	11
<b>2. Objetivos</b>	17
<b>3. Material e Métodos</b>	18
3.1 Obtenção e cultura de células de medula óssea de rato	18
3.2 Obtenção das frações de membrana de osteoblastos	18
3.3 Dosagem de proteína	19
3.4 Determinação da atividade PNFFase	19
3.5 Solubilização da fração de membrana	19
3.6 Remoção do excesso de detergente	20
3.7 Preparação dos lipossomos	20
3.8 Incorporação da fosfatase alcalina em lipossomos	21
3.9 Obtenção de proteolipossomos após solubilização da TNAP com Fosfolipase C	21
3.10 Microscopia eletrônica com marcação negativa de lipossomos e proteolipossomos	21
3.11 Determinação do diâmetro médio dos sistemas vesiculares	22

3.12 Calorimetria Diferencial de Varredura - DSC	23
3.13 Estabilidade dos sistemas lipossomais	24
<b>4. Resultados e Discussão</b>	<b>25</b>
4.1 Obtenção de frações de membrana de osteoblastos a partir de cultura de células	25
4.2 Reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos de DPPC	28
a) Incorporação lipídio x proteína	28
b) Caracterização dos sistemas de lipossomos e proteolipossomos de DPPC utilizando a Técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura	32
4.3 Efeito do raio de curvatura de membranas constituídas de DPPC na reconstituição da fosfatase alcalina	36
4.4 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas binários constituídos de DPPC:Chol em diferentes concentrações	43
4.5 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas terciários constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1	53
4.6 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas binários constituídos de DPPC:SM e DPPC:GM1	60
4.7 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico do sistema terciário constituído de DPPC:SM:GM1	66
4.8 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1	69
<b>5. Conclusão</b>	<b>72</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b>	<b>74</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: Adenosina-5'-difosfato  
ALP: alkaline phosphatase  
AMP: adenosina-5'-monofosfato  
AMPOL: 2-amino-2-metil-1-propanol  
ATP: Adenosina-5'-trifosfato  
ATPase: Adenosina-5'-trifosfatase  
Bis-Tris: Bis[2-hidroxietil]amino-tris[hidroximetil]metano  
BSA: Albumina de soro bovino  
Chol: Colesterol  
Da: Dalton  
DSC: Calorimetria Diferencial de Varredura  
DPPC: Dipalmitoil fosfatidil colina  
GM1: Gangliosídeo GM1  
GPI: Glicosil fosfatidil inositol  
Hepes: Ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N-[2-etanosulfônico]  
Imidazol: 1,3-diazo-2,4-ciclopentadieno  
PIPLC: Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol  
PNFF: p-nitrofenilfosfato  
PNFFase: p-nitrofenilfosfatase  
Polidocanol: Polioxietileno-9-lauril éter  
PPase: Pirofosfatase  
P<sub>i</sub>: Fosfato inorgânico  
PP<sub>i</sub>: Pirofosfato inorgânico  
SDS: Dodecil sulfato de sódio  
SM: Esfingomielina  
TCA: Ácido tricloroacético  
TNAP: fosfatase alcalina tecido não-específica  
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano  
U: Unidade de atividade enzimática (nmol/min)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para as vesículas constituídas de DPPC (10 mg/mL). Lipossomos e TNAP foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.	29
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros termodinâmicos para as vesículas constituídas de DPPC (10 mg/mL). Lipossomos e TNAP foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente formando os proteolipossomos, os quais foram tratados com PIPLC conforme descrito no item 3.9 de Material e Métodos clivando a enzima do sistema vesicular.	34
<b>Tabela 3.</b> Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC na concentração de 1mg/mL utilizando membranas de policarbonato de diferentes diâmetros.	37
<b>Tabela 4.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC (1 mg/mL) em diferentes diâmetros. Lipossomos e fosfatase alcalina foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.	39
<b>Tabela 5.</b> Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções	44
<b>Tabela 6.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções. Lipossomos e fosfatase alcalina foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.	49
<b>Tabela 7.</b> Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1, com concentração igual a 10 mg/mL.	54
<b>Tabela 8.</b> Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1, com concentração igual a 10 mg/mL.	57
<b>Tabela 9.</b> Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para sistemas binários de lipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas, com concentração igual a 10 mg/mL.	62
<b>Tabela 10.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas binários de proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas, com concentração igual a 10 mg/mL.	63
<b>Tabela 11.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas terciários constituídos de DPPC:SM:GM1 na relação molar de 8:1:1, com concentração igual a 10 mg/mL.	66
<b>Tabela 12.</b> Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 na relação molar 7:1:1:1, com concentração igual a 10 mg/mL.	69



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura tridimensional da PLAP. Monômero A está representado em azul enquanto monômero B em amarelo. Estão indicados os sítios ativos metálicos (Zn1, Zn2, Mg e Ca) e a localização relativa da âncora GPI na enzima (Millán, 2006). 6
- Figura 2.** Modelo esquemático de microdomínios existentes na membrana: (A) meio intracelular ou citosol, (B) meio extracelular, (1) modelo de membrana, (2) microdomínio ou Lipid raft, (3) Proteína transmembrana associada ao lipid raft, (4) Proteína associada à membrana, (5) Glicoproteínas e glicolipídios, (6) Proteínas GPI-ancoradas, (7) Colesterol e (8) Glicolipídios. (Trends, 2001). 12
- Figura 3.** Esquema do extrusor utilizado na preparação dos lipossomos. 21
- Figura 4.** Cultura de células osteoblásticas após (A) 24 h; (B) 4 dias; (C) 10 dias e (D) 14 dias de crescimento. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo- $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 50  $\mu$ g/mL de vancomicina, 20  $\mu$ g/mL de ampicilina, 0,3  $\mu$ g/mL de fungizona,  $10^{-7}$  M de dexametazona, 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato. 26
- Figura 5.** Efeito do tempo de crescimento das culturas de células osteoblásticas na atividade PNFFase e concentração de proteína da fração de membrana rica em fosfatase alcalina. Após 7, 14 e 21 dias, o crescimento foi interrompido e as células foram processadas conforme descrito no item 4.2 de Material e Métodos. A fração de membrana foi analisada quanto à (●) concentração de proteína e (■) atividade PNFFase, conforme descrito no item 4.2 de Material e Métodos. 27
- Figura 6.** Microscopia eletrônica com marcação negativa de: (A) Lipossomos constituídos de DPPC e (B) Proteolipossomos com a fosfatase alcalina reconstituída, ambos com ampliação de 50x. As amostras foram preparadas e as imagens obtidas como descrito no item 4.6 de Material e Métodos. 30
- Figura 7.** Características dos parâmetros termodinâmicos de uma curva de DSC, utilizando no esquema lipossomos constituídos de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL. 32
- Figura 8.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T(^{\circ}\text{C})$  para vesículas constituídas de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL: Lipossomos ( \_\_\_ ), Proteolipossomos com TNAP ( \_\_\_ ) e Proteolipossomos sem TNAP ( \_\_\_ ). 35
- Figura 9.** Efeito da curvatura da membrana nos parâmetros termodinâmicos. Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T(^{\circ}\text{C})$  para lipossomos constituídos de DPPC com diâmetros médios de: (A) 238,2 nm, (B) 190,2 nm e (C) 109,7 nm. 38
- Figura 10.** Efeito do raio de curvatura da membrana de lipossomos nos parâmetros termodinâmicos: (A) Temperatura de transição, (B) Variação de Entalpia e (C) Cooperatividade. 40
- Figura 11.** Efeito da curvatura da membrana nos parâmetros termodinâmicos. Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T(^{\circ}\text{C})$  para proteolipossomos constituídos de DPPC formados com diâmetros de: (A) 410,0 nm, (B) 200,3 nm e (C) 149,1 nm. 41

- Figura 12.** Efeito do raio de curvatura da membrana de proteolipossomos nos parâmetros termodinâmicos: (A) Temperatura de transição, (B) Variação de Entalpia, (C) Cooperatividade e (D) Porcentagem de incorporação. 42
- Figura 13.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para lipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções, com concentração igual a 10 mg/mL, mostrando o progressivo alargamento dos picos de transição com o aumento na proporção de colesterol. 45
- Figura 14.** Efeito da concentração de colesterol em lipossomos constituídos de DPPC sobre os parâmetros termodinâmicos: (A) Diâmetro médio, (B) Temperatura de transição, (C) Variação de Entalpia e (D) Cooperatividade. 46
- Figura 15.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal} / \text{K mol}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para proteolipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções, com concentração igual a 10 mg/mL, mostrando o progressivo alargamento dos picos de transição com o aumento na proporção de colesterol. 50
- Figura 16.** Efeito da concentração de colesterol em proteolipossomos constituídos de DPPC sobre os parâmetros termodinâmicos: (A) Temperatura de transição, (B) Variação de Entalpia e (C) Cooperatividade. 51
- Figura 17.** Efeito do aumento da proporção do colesterol em lipossomos constituídos de DPPC na incorporação da fosfatase alcalina: avaliação da (■) incorporação da atividade enzimática e (●) monitoramento do diâmetro das vesículas formadas. 52
- Figura 18.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Lipossomos constituídos de: (A) DPPC:Chol (9:1), (B) DPPC:Chol:SM (8:1:1) e (C) DPPC:Chol:GM1 (8:1:1), razões molares. 55
- Figura 19.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Proteolipossomos constituídos de: (A) DPPC:Chol (9:1), (B) DPPC:Chol:SM (8:1:1) e (C) DPPC:Chol:GM1 (8:1:1), razões molares. 59
- Figura 20.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Lipossomos constituídos de: (A) DPPC:SM (9:1) e (B) DPPC:GM1 (9:1), razões molares. 61
- Figura 21.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Proteolipossomos constituídos de: (A) DPPC:SM (9:1) e (B) DPPC:GM1 (9:1), razões molares. 65
- Figura 22.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para sistemas terciários constituídos de DPPC:SM:GM1 (8:1:1), razões molares: (A) Lipossomos e (B) Proteolipossomos. 67
- Figura 23.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1), razões molares: (A) Lipossomos e (B) Proteolipossomos. 70

## Resumo

A organização da membrana biológica em microdomínios tem um papel chave em vários processos celulares semelhante a receptores protéicos e a transdução de sinal. A existência de microdomínios, também denominados de “rafts” tem sido explicada pela separação das membranas lipídicas em duas fases: líquida cristalina ( $L\alpha$ ) e fase líquida ordenada ( $L_o$ ) rica em colesterol e esfingolípídeos.

Assim, o enfoque deste projeto foi correlacionar mecanismos de controle da atividade da fosfatase alcalina (TNAP) com a organização intermolecular e o estado de fase de alguns lipídios que compõem as vesículas da matrix. Foi estudada a modulação da atividade da enzima e sua inserção à sistemas de lipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas (Dipalmitoilfosfatidilcolina, Colesterol, Esfingomielina e Gangliosídeo) como um mecanismo de regulação e transdução entre enzimas que não compartilham intermediários metabólicos comuns. Isto é, verificar como mudanças de organização molecular, induzida por colesterol e/ou outros lipídios, podem modular a atividade de enzimas regulando a produção de mensageiros lipídicos secundários e/ou processos de fusão e recombinação topológica da bicamada lipídica, modulando concomitantemente a atividade da fosfatase alcalina.

Com tal propósito, a TNAP foi reconstituída em lipossomos constituídos de DPPC e lipossomos mistos formando sistemas binários DPPC:Chol, DPPC:SM e DPPC:GM1 com razões molares de (9:1); sistemas terciários DPPC:Chol:SM, DPPC:Chol:GM1 e DPPC:SM:GM1 com razões molares de (8:1:1) e por fim sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1). Estes sistemas foram propostos com o intuito de mimetizarmos os “lipid rafts” existentes nas membranas biológicas, porém utilizando lipídios que já foram identificados e quantificados nas vesículas da matrix. Foram avaliados os efeitos da composição lipídica dos lipossomos na inserção da enzima aos sistemas vesiculares. Além disso, foram realizados estudos biofísicos de calorimetria analisando como os parâmetros termodinâmicos são afetados com as diferentes composições lipídicas e pela presença da enzima ancorada aos sistemas.

A reconstituição da enzima a lipossomos constituídos de DPPC proporcionou uma incorporação em torno de 80% da atividade enzimática. Estudos termodinâmicos dos proteolipossomos formados evidenciaram uma queda significativa nos valores de  $\Delta H$  em relação aos sistemas de lipossomos (de 7,63 a

1,88 kcal.mol<sup>-1</sup>). Lipossomos binários constituídos de DPPC:Chol em concentrações crescentes (9:1, 9:2, 9:3, 7:3, 9:4 e 9:5 razão molar) foram estudados tanto pelos parâmetros biofísicos como pela habilidade de inserção da enzima a tais sistemas. Foi observado um significativo decréscimo nos valores de variação entalpia com o aumento da proporção de colesterol no lipossomo. Além disso, a presença do colesterol proporcionou uma redução na inserção da atividade catalítica em até 42%, quando utilizada a composição lipídica de 9:5 DPPC:Chol.

Dos sistemas binários formados com razões molares 9:1, o que apresentou maior porcentagem de reconstituição da TNAP foi o sistemas DPPC:Chol, apresentando em torno de 62% de incorporação da enzima.

Os sistemas terciários apresentaram ao redor de 30% de incorporação da atividade catalítica e o sistema quaternário em torno de 25%.

Além dos ensaios de atividade enzimática, a incorporação da enzima aos sistemas vesiculares também pôde ser comprovada pelas mudanças nos parâmetros termodinâmicas detectados por DSC. Nos estudos de calorimetria de todos os sistemas de proteolipossomos formados, foram observadas significativas diminuições nos valores de variação de entalpia quando comparados aos sistemas de lipossomos correspondentes.

Deste modo, os resultados aqui apresentados fornecem novas informações que poderão contribuir tanto para a compreensão do comportamento da atividade da fosfatase alcalina na presença de diferentes composições lipídicas dos microdomínios existente membrana, quanto para o entendimento dos processos de regulação da enzima durante o processo de biomineralização.

## Abstract

The organization of the biological membrane in microdomains has a key roll in many cellular processes similar to proteic receptors and signal transduction. The existence of microdomains, also called “rafts”, has been explained by the lipid membrane separation in two phases: crystalline phase ( $L_{\alpha}$ ) and ordinate liquid phase ( $L_o$ ), rich in cholesterol and sphingolipids.

The focus of this Project was to correlate activity control mechanisms of the alkaline phosphatase (TNAP) with the intermolecular organization and the phase stat of some lipids that comprise the matrix vesicles. The enzyme activity modulation and its insertion into liposomes systems, constituted by different lipid compositions (DPPC, Chol, SM e GM1) as a regulation and transduction mechanism between enzymes that do not share common intermediary metabolites, was studied. That is, to verify how molecular organization changes, induced by cholesterol and/or other lipids, can modulate the enzyme activity regulating the production of secondary lipid messengers and/or fusion processes and topological recombination of the lipidic bilayer, concomitantly modeling the alkaline phosphatase activity.

TNAP was then reconstituted in liposomes constituted by DPPC and mixed liposomes forming binary systems DPPC:Chol , DPPC:SM , DPPC: Chol:GM1 with (9:1) molar rates; tertiary systems DPPC:Chol:SM, DPPC:Chol:GM1 and DPPC:SM:GM1 with (8:1:1) molar rates and finally quaternary system constituted by DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1). These systems were proposed aiming the mimetization of “lipid rafts” existent in biological membranes, but using lipids that had already been identified and quantified in the matrix vesicles. The effects of liposome lipid composition in the enzyme insertion to the vesicular systems were assayed. Besides that, calorimetry biophysical studies were done analyzing how the thermodynamic parameters are affected by the different lipid compositions e by the presence of the systems anchored enzyme.

The enzyme reconstruction to the DPPC constituted liposomes has provided an incorporation of around 80% of the enzyme activity. Thermodynamic studies of the proteoliposomes formed have shown a significant decrease in the  $\Delta H$  values in relation to the liposomes systems (from 7.63 to 1.88 kcal.mol<sup>-1</sup>). Binary liposomes constituted of DPPC:Chol in increasing concentrations (9:1, 9:2, 9:3, 7:3, 9:4 e 9:5 molar ratio) were studied by the biophysical parameters as well as by the insertion ability of the enzyme into those systems. A significant decrease in the enthalpy

values with the increase of the cholesterol proportion in the liposome was observed.

Besides that, the presence of cholesterol has allowed a reduction in the insertion of the catalytic activity in up to 42% when the lipid composition 9:5 DPPPC:Chol was used.

Among the binary systems formed with molar ratios of 9:1, the one which showed the highest percentage of TNAP reconstitution was the DPPC:Chol system, with around 62% enzyme incorporation.

The tertiary systems had around 30% incorporation of the catalytic activity, and the quaternary system around 25%.

Besides the enzymatic activity assays, the enzyme incorporation to the vesicular systems can also be verified by the thermodynamic parameter's change detected by DSC. In the calorimetry studies of all the proteoliposomes formed, significant decreases in the enthalpy values were observed when compared to the corresponding liposomes systems.

Thereby, the results presented here provide new information that can contribute to understand the alkaline phosphatase behavior in the presence of different microdomain lipid compositions existent in the membrane, as well as understanding the regulation processes of the enzyme during the biomineralization process.

## **1. Introdução**

### **1.1 Biomineralização**

O processo de biomineralização consiste no acúmulo de mineral constituído principalmente por íons de fosfato e cálcio que formam um sal de fosfato de cálcio, cuja estrutura se transforma em uma forma muito semelhante a da hidroxiapatita. O processo de ossificação mediado por osteoblastos (na formação dos ossos chatos) ou por odontoblastos (na formação do dente) é claramente distinto daquele que ocorre na calcificação da cartilagem epifisária (a partir de um modelo cartilaginoso), que é mediada por condrócitos hipertróficos. A natureza das células da matriz protéica e da interação entre a deposição de mineral e matriz protéica é claramente diferente. Não obstante, em todos esses sistemas existe um fator comum que é a viabilização do processo de mineralização (Boskey, 1981; Wuthier, 1986; Wuthier et al., 1985; Blumenthal, 1989; Poole et al., 1989; Freemont, 1993; Hsu e Anderson, 1995; Anderson, 1995, 2003; Millán, 2006).

A ossificação intramembranosa ocorre a partir do tecido conjuntivo onde as células mesenquimatosas são diferenciadas em osteoblastos, que produzem matriz. Além disso, há formação de osteócitos para a manutenção da matriz (Freemont, 1993).

Nos vertebrados superiores, o processo de ossificação endocondral é o responsável pelo crescimento longitudinal da maioria dos ossos do esqueleto. Em circunstâncias normais, a biomineralização ocorre no disco epifisário pela ação de células conhecidas como condrócitos, as quais se encontram em diferentes estágios de diferenciação, dependendo, principalmente, da sua localização no interior do disco de crescimento (Anderson, 1995; Gerber e Ferrara, 2000). O disco de crescimento é composto de cartilagem, formando uma estreita faixa de ligação (0,5 a 1 mm) entre a epífise e a diáfise, e pode ser dividido em várias regiões anatômicas: i. zona de reserva, que contém condrócitos aparentemente dispersos e inativos; ii. zona de proliferação, onde a maioria das divisões celulares ocorre. Essa região contém as células precursoras dos condrócitos (células progenitoras) em forma de disco. O nascimento de células jovens que se diferenciam em condrócitos acarreta um acúmulo de novas células que são deslocadas para baixo, formando uma coluna ao longo da zona proliferativa. A formação dessa coluna permite a subdivisão da matriz em septo transversal, que separa as colunas de células em diferentes

estágios, e em septo longitudinal, que separa as colunas de células adjacentes; iii. a zona de maturação é a região onde os condrócitos passam de uma fase de pós-divisão a um estado de maturação. O estado de maturação é caracterizado por uma fase de intensa síntese e secreção de matriz, e é nesse local onde aparece a enzima fosfatase alcalina. A zona hipertrófica contém condrócitos aumentados e muitas vesículas da matriz. Finalmente, existe a zona de biomineralização, onde os condrócitos sofrem degeneração. É nessa região que ocorre o depósito de fosfato de cálcio no interior das vesículas, que posteriormente se extravasa infiltrando nos interstícios do septo longitudinal.

O crescimento longitudinal do osso ocorre através do equilíbrio preciso entre a proliferação dos condrócitos, produção de matriz óssea, biomineralização biológica, hipertrofia e invasão vascular da lacuna do condrócito hipertrofiado. Assim, a diferenciação dos condrócitos é a etapa crucial do processo de ossificação endocondral (Anderson, 1995; Gerber e Ferrara, 2000; Farquharson e Jefferies, 2000; Jefferies et al., 2000).

O papel dos condrócitos no disco de crescimento é fascinante devido, principalmente, ao fato de que seu período de vida é sincronizado no tempo e no local onde sua atividade é requerida. O acúmulo de resultados experimentais, ao longo desses últimos anos, tem mostrado que a hipertrofia dos condrócitos é etapa essencial para invasão vascular e subsequente substituição da matriz calcificada por osso, sugerindo que a vascularização da região inferior do disco de crescimento representa uma etapa crucial na interação entre os processos de condrogênese (produção de cartilagem) e osteogênese (formação do tecido ósseo), principalmente durante o período de crescimento rápido dos ossos longos ou reparo de fraturas (Gerber e Ferrara, 2000). Mudanças nesse equilíbrio podem levar ao desenvolvimento de doenças esqueléticas, tais como osteoartrite, biomineralização ectópica e discondroplasia (Pizauro et al., 2002).

Apoptose, ou morte programada da célula, é atualmente reconhecida como um fenômeno biologicamente útil que acontece na maioria dos tecidos que exibem crescimento ordenado. Assim sendo, um atraso na apoptose dos condrócitos pode resultar em um acúmulo de células hipertrofiadas no disco de crescimento. Logo, o estudo dos processos que regulam a maturação do condrócito poderá contribuir para a compreensão do(s) mecanismo(s) responsável(eis) pelo desenvolvimento da lesão. A morte programada dos condrócitos no disco de crescimento de ossos



longos tem sido muito estudada nos últimos anos (Clarke e Clarke, 1996), e os resultados obtidos mostraram que existe uma estreita relação entre a vascularização da cartilagem e a morte programada dos condrócitos hipertróficos (Floyd et al., 1987).

Atualmente, admite-se que o brotamento das vesículas da matriz representa um intrigante mecanismo de geração de organelas extracelulares, cuja função é a de realizar as etapas finais do processo de biomineralização antes da morte programada dos condrócitos por apoptose (Kirsch e Wuthier, 1994; Anderson, 1995; Ciancaglini et al., 2006).

Os eventos bioquímicos e biofísicos responsáveis pela biogênese das vesículas extracelulares ainda não estão perfeitamente elucidados, mas admite-se que eles estejam relacionados com o ciclo de vida dos condrócitos e, possivelmente, com o seu processo de apoptose (Anderson, 1995).

Um dos grandes desafios da biologia é a compreensão de como as células se replicam e se dividem, e um dos aspectos importantes desse problema é saber como as células formam as vesículas extracelulares. A nova vesícula deve ser formada com grande precisão e possuir todas as informações necessárias para criar um microambiente adequado para a formação e preservação de mineral de hidroxiapatita (Anderson, 1995; Millán, 2006).

As vesículas surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos e são secretadas no local específico do início da biomineralização da matriz do tecido ósseo. Nos osteoblastos, as vesículas surgem da membrana plasmática adjacente à matriz óssea recentemente formada, e nos odontoblastos, na porção apical da célula que se encontra em contato com a matriz da pré-dentina. O papel dessas vesículas como mediadoras da deposição mineral é fortemente sugerido pelos seguintes fatos: o local de aparecimento de depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (Hsu e Anderson, 1995), os primeiros cristais na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que precedem o crescimento do cristal extracelular, têm sido detectados dentro dessas vesículas (Anderson, 1995, 2003, 2004; Wuthier et al., 1985; Sela et al., 2000; Ciancaglini et al., 2006). Além disso, tem sido proposto que o interior das vesículas também serve como um microambiente selado, que protege o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino mais solúvel, antes de se converter em um cristal de hidroxiapatita. Tem sido verificado ainda que as vesículas isoladas também

possuem a capacidade de depositar sais de cálcio in vitro (Hsu e Anderson, 1986, 1995; Garimella et al., 2006; Millán, 2006).

De fato, evidências de que os lipídios podem estar envolvidos em alguma fase do processo de mineralização já foram obtidas através de estudos histoquímicos (Itving, 1973). Além disso, Wuthier et al. (1985) revelou que elevados níveis de colesterol, esfingomielina, fosfatidilserina, monoacil-colina-fosfoglicerol, diacil-colina-fosfoglicerol, serina-fosfoglicerol e etanolamina-fosfoglicerol podem ser encontrados em membranas de condrócitos, osteócitos e vesículas da matriz. Roberts e colaboradores (2004) também demonstraram que fosfocolina e fosfoetanolamina podem ser hidrolisados por uma fosfatase ácida expressa em condrócitos (Houston et al., 2004), sugerindo que a geração de Pi em células envolvidas no processo de biomineralização pode estar acoplada à degradação de fosfolipídios.

Os fosfolipídios ácidos que tem grande afinidade por cálcio, principalmente a fosfatidilserina, são geralmente encontrados na região de mineralização das membranas das vesículas extracelulares (Boskey, 1981; Boyan et al., 1989) e são capazes de promover a formação de hidroxiapatita in vitro, mesmo na ausência de fosfatase alcalina (Eanes e Hailer, 1985; Vogel, 1986; Heywood e Eanes, 1987). Este fato sugere uma possível associação dos fosfolipídios com o processo de mineralização. Além disso, eles podem atuar na regulação da biomineralização biológica regulando o transporte de íons cálcio através da organização estrutural da membrana e também promovendo a nucleação de hidroxiapatita pela interação com íons cálcio e estabilização de associações de fosfato de cálcio amorfo (Boskey, 1981; Wuthier et al., 1985; Boyan et al., 1989). A composição lipídica das vesículas da matriz parece ser controlada pela vitamina D e/ou pela presença de colesterol. Provavelmente, mudanças na atividade da fosfatase alcalina podem ser resultantes de alterações na composição lipídica da membrana celular. Assim, alterações que podem ocorrer nas funções das vesículas podem representar um mecanismo de regulação da formação do mineral (Brasitus et al., 1988; Boyan et al., 1989). Um problema que tem dificultado os estudos in vitro é que a reação de indução de deposição de minerais por complexos lipídio - cálcio - fosfato é lenta, necessitando freqüentemente de vários dias para a obtenção significativa de mineral. Além disso, os níveis de íons minerais e/ou pH nas soluções metaestáveis de fosfato de cálcio geralmente usados nestes estudos são baixos.

Em síntese, qualquer conclusão acerca da importância dos complexos de

lipídios na mineralização mediada por vesículas extracelulares necessita de estudos mais aprofundados sobre a cinética da mineralização induzida por tais complexos, especialmente num sistema onde o pH e os níveis de eletrólitos sejam semelhantes àqueles encontrados no interior da vesícula ou no fluido extracelular nativo.

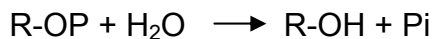
Outro aspecto a ser considerado é que o processo de ossificação endocondral pode ser reproduzido experimentalmente *in vivo* através do implante de matriz óssea desmineralizada (Reddi e Huggins, 1972), ou pelo implante de proteína morfogênica, extraída do tecido ósseo, no tecido subcutâneo de ratos (Urist et al., 1973), ou ainda pelo implante de proteína morfogênica ou matriz óssea desmineralizada associada com plasma enriquecido em plaqueta (Marx et al., 1998). Reddi e Huggins (1972) demonstraram que o implante de matriz óssea desmineralizada em tecido subcutâneo de ratos age como um estímulo que desencadeia um processo de diferenciação e organização celular, levando à formação seqüencial de cartilagem e osso. Os estudos histológicos e bioquímicos envolvidos no processo de biomineralização ectópica dessas placas, via ossificação endocondral, foram descritos por esses mesmos autores, que observaram uma estreita correlação entre a atividade da fosfatase alcalina e os sítios histológicos de formação do tecido ósseo (Leone et al., 1997).

## **1.2 Fosfatase Alcalina e seu papel na Biomeniralizaçã**

Até agora, têm sido identificadas três moléculas presentes em osteoblastos que afetam a deposição controlada de mineral ósseo, por meio da regulação dos níveis de PPI extracelular: fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP), NPP1 (uma isoenzima nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase) e o produto do gene ANK.

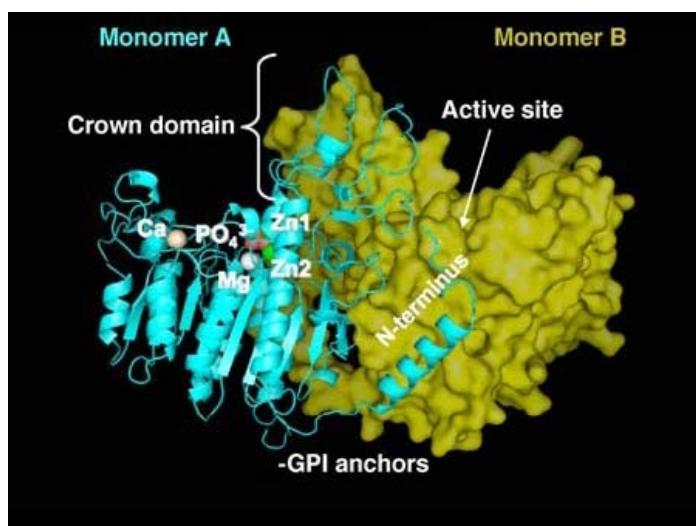
As fosfatases alcalinas pertencem a uma família multigênica que codifica diferentes formas da enzima, distribuídas em quase todos os tecidos. No homem e nos primatas superiores, três isoformas distintas têm sido identificadas: a da placenta, a do intestino e a do fígado-osso-rim (Lowe et al., 1990; Le Du e Millán, 2002). As isoformas da placenta e do intestino são tecido-específicas e são expressas unicamente na placenta e no intestino, respectivamente, enquanto a isoforma do fígado-osso-rim é encontrada em quase todos os tecidos, sendo também denominada por esta razão de fosfatase alcalina tecido não-específica (TNAP). Além disso, níveis elevados desta isoforma têm sido encontrados, também,

nas membranas dos osteoblastos durante a formação e a mineralização do tecido ósseo (Wuthier e Register, 1985; Nakamura et al., 1988; Anderson, 1995; Hsu e Anderson, 1995). As fosfatases alcalinas catalisam a seguinte reação geral:



onde a hidrólise de R-OP origina fosfato inorgânico (Pi) e um álcool, açúcar, fenol etc. Portanto, são membros da classe de enzimas conhecidas como fosfomonoesterases, e são denominadas “alcalinas” por sua habilidade de efetuar esta reação mais eficientemente em pH acima do neutro (pH 8-11).

A fosfatase alcalina de diversos tecidos de mamíferos é uma fosfomonohidrolase inespecífica (E.C.3.1.3.1), capaz de hidrolisar em pH alcalino monoésteres de fosfato (ATP, ADP, AMP, p-nitrofenilfosfato, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato), pirofosfato, diésteres de fosfato (bis-p-nitrofenilfosfato e AMP-cíclico), bem como catalisar reações de transfosforilação (McComb et al., 1979; Hsu et al., 1985; Curti et al., 1987; Pizauro et al., 1987, 1993, 1994, 1995; Ciancaglini et al., 1990a; Rezende et al., 1998; Leone et al., 1997a, 1998).



**Figura 1.** Estrutura tridimensional da PLAP. Monômero A está representado em azul enquanto monômero B em amarelo. Estão indicados os sítios ativos metálicos (Zn1, Zn2, Mg e Ca) e a localização relativa da âncora GPI na enzima (Millán, 2006).

Independentemente de sua origem, as fosfatases alcalinas são enzimas homodiméricas e cada sítio catalítico contém três íons metálicos (dois íons zinco e um íon magnésio), necessários para a atividade da enzima (Millán, 2006). Um novo sítio não-catalítico que se liga a um metal e parece ser ocupado por cálcio foi descoberto após a resolução da estrutura tridimensional da fosfatase alcalina de placenta (PLAP) (Le Du et al., 2001; Mornet et al., 2001). A importância estrutural e funcional deste novo sítio metálico ainda não foi elucidada, mas a descoberta de sua existência confirma estudos anteriores que indicavam que, em cartilagem, a fosfatase alcalina era uma glicoproteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (De Bernard et al., 1986).

Os estudos referentes à participação da fosfatase alcalina no processo calcificação têm demonstrado a presença de duas formas de enzima, uma associada à membrana e outra solúvel. Embora existam controvérsias em relação ao papel fisiológico da fosfatase alcalina, somente a forma ligada à membrana tem sido associada ao processo de calcificação (Cyboron e Wuthier, 1981; Wuthier e Register, 1985; Curti et al., 1986; Say et al., 1991; Leone et al., 1997a).

Há cerca de vinte anos foi demonstrado que a fosfatase alcalina, bem como outras enzimas (5'-nucleotidase e a colinesterase), não são proteínas integrais da membrana lipoprotéica, mas estão associadas à membrana por uma âncora de fosfatidilinositol. A estrutura da âncora resulta em mobilidade lateral na membrana e permite a liberação da proteína da membrana pela ação de fosfolipases (Pizauro et al., 1995; Leone et al., 1997a; Millán, 2006). Esta descoberta surgiu pelo fato de que a fosfatase alcalina podia ser removida da membrana através de um tratamento com uma fosfolipase C específica para fosfatidilinositol.

Além disso, já foi demonstrado que a fosfatase alcalina também pode hidrolisar o ATP, liberando o fosfato inorgânico. A enzima é regulada alostericamente pelo ATP (Pizauro et al., 1993) e inibida competitivamente pelo produto da reação, o fosfato inorgânico (Pizauro et al., 1987), sugerindo que os níveis relativos de PPI, um inibidor da biomineralização, e de Pi, um inibidor da fosfatase alcalina, presentes no fluido extracelular da matriz, também desempenham um papel importante na regulação do processo de mineralização biológica (Ciancaglini, et al., 2010; Simão et al., 2010).

Recentemente foi demonstrado que a fosfatase alcalina pode também contribuir para a geração de PPI através de sua atividade de fosfodiesterase, hidrolisando ATP (Zhang et al., 2005), contradizendo evidências de que a enzima

teria uma função antagonista à da glicoproteína-1 no processo de mineralização (Hessle et al., 2002), embora uma das principais funções já descrita da fosfatase alcalina seja a remoção de PPI do ambiente de mineralização através de sua atividade de fosfomonohidrolase (Rezende et al., 1998). Mas recentemente Nakano e colaboradores (2007) demonstraram que a fosfatase alcalina não é a principal enzima responsável pela hidrólise de ATP e consequente mineralização de culturas de células osteoblásticas, mas que outras enzimas, tais como ATPase 1 transportadora de cálcio da membrana plasmática (PMCA1) e transglutaminase 2 (TG2), podem agir como fosfatases hidrolisando ATP, propondo uma ação sinérgica das três enzimas na regulação do processo de mineralização da matriz óssea.

Uma deficiência na isoenzima TNAP causa um erro de metabolismo congênito conhecido como hipofosfatasia e o estudo dessa doença tem fornecido grandes evidências da importância da TNAP para a mineralização óssea. (Millán, 2006). No osso, a TNAP está localizada na superfície celular de osteoblastos e condrócitos, incluindo as membranas de suas vesículas da matriz desprendidas (Ali et al., 1970; Bernard, 1978). De fato, por um mecanismo desconhecido, MVs são altamente enriquecidas em TNAP quando comparadas com células inteiras e com a membrana plasmática (Morris et al., 1992). Tem sido proposto que a função da TNAP na matriz óssea é gerar o fosfato inorgânico necessário para a cristalização da hidroxiapatita (Robison, 1923; Majeska e Wuthier, 1975; Fallon et al., 1980). É conhecido há algum tempo que fosfatases alcalinas, tanto de origem bacteriana quanto de origem mamífera, possuem atividade fosfodiesterase (Moss e Walli, 1969; Rezende et al., 1994; O'Brien e Herschlag, 2001) e são capazes de produzir PPI a partir de ATP. Além disso, TNAP também é capaz de defosforilar ATP, ADP e AMP, que são substratos e biprodutos da função da NPP1 (Picher e Boucher, 2001; Picher et al., 2003). No entanto, TNAP também tem sido considerada hidrolisar o inibidor da mineralização PPI (Meyer, 1984) para facilitar o crescimento e a precipitação do mineral (Moss et al., 1967; Rezende et al., 1994; Anderson et al., 2005). Estudos de microscopia eletrônica revelaram que vesículas da matriz deficientes em TNAP, tanto em humanos quanto em ratos, contêm cristais de apatita, mas que a propagação extravesicular do cristal é retardada (Anderson et al., 1997, 2004). Este atraso no crescimento poderia ser devido tanto à falta da função de pirofosfatase da TNAP ou à falta da geração de fosfato inorgânico. Recentes estudos têm demonstrado que a função da TNAP no tecido ósseo consiste em hidrolisar PPI para

manter uma concentração adequada deste inibidor da mineralização, de modo a assegurar uma mineralização óssea normal (Anderson et al., 2004; Millán, 2006; Ciancaglini, et al., 2010; Simão et al., 2010).

Recentemente, Ciancaglini et al. (2006) e Simão et al (2010) demonstraram que as propriedades catalíticas da fosfatase alcalina de placas ósseas variam dependendo do microambiente onde a enzima se encontra. Assim, diferentes formas da enzima (ligada à membrana, solubilizada com detergente ou tratada com PIPLC) apresentaram diferentes especificidades para os diversos substratos estudados, mostrando que a cinética da enzima é grandemente afetada pela presença tanto da âncora de fosfatidilinositol quanto de outros componentes da membrana celular.

### **1.3 Função de lipídios e de substratos na biomineralização**

Estudos para determinar os tipos de lipídios, de eletrólitos e, principalmente, as enzimas presentes nas vesículas extracelulares, têm revelado que a fosfatase alcalina não é a única enzima importante para o processo de biomineralização biológica presente na membrana, mas apresenta um papel crucial (Hsu, 1994; Anderson, 1995, 2004; Pizauro et al., 1998; Hamade et al., 2003; Millán, 2006). Dentre elas, tem sido demonstrada a presença de elevados níveis de pirofosfatase, de adenosina-5'-trifosfatase (Pizauro et al., 1998; Hsu e Anderson, 1995; Simão et al., 2007), de nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase1) (Demenis et al., 2003), de PHOSPHO1 (Houston et al., 1999, 2004) e da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (Johnson et al., 2000; Gijbers et al., 2001; Hessle et al., 2002). Segundo Johnson et al. (1999, 2000) e Gijbers et al. (2001), a ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase utiliza o ATP presente no fluido extracelular da cartilagem para gerar o substrato da ectofosfatase alcalina, o pirofosfato inorgânico (PPi). Já a fosfatase PHOSPHO1 está envolvida na geração de Pi acoplada à degradação de fosfolipídios, através da hidrólise de fosfocolina e fosfoetanolamina (Roberts et al., 2004), sugerindo um novo caminho para a regulação da concentração de fosfato necessária para a formação do cristal de hidroxiapatita. Segundo Demenis e colaboradores (2003), a ectoenzima NTPDase1 estaria envolvida no processo de calcificação fornecendo fosfato através da hidrólise de ATP e ADP em pH fisiológico. Há evidências de que a ação conjunta de fosfatase alcalina e fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase é capaz de regular os níveis de

PPi no fluído extracelular, promovendo assim um controle coordenado do processo de mineralização (Harmey et al., 2004; Millán, 2006; Ciancaglini, et al., 2010; Simão et al., 2010).

Uma nova fosfoglicoproteína da matrix extracelular (Mepe), expressa em osteócitos e osteoblastos, também parece atuar como um regulador negativo do processo de mineralização, inibindo a formação óssea, embora sua função exata durante este processo não seja conhecida (Petersen et al., 2000; Rowe et al., 2000; Argiro et al., 2001; Gowen et al., 2003; Millán, 2006).

Como relatado anteriormente, a fosfatase alcalina também pode hidrolisar o ATP, liberando o fosfato inorgânico. A enzima é regulada alostericamente pelo ATP (Pizauro et al., 1993) e inibida competitivamente pelo produto da reação, o fosfato inorgânico (Pizauro et al., 1987), sugerindo que os níveis relativos de PPi, um inibidor da biomineralização, e de Pi, um inibidor da fosfatase alcalina, presentes no fluído extracelular da matriz, também desempenham um papel importante na regulação do processo de mineralização biológica. Esta hipótese é suportada pela recente demonstração de que o nível de fosfato inorgânico, derivado da hidrólise do PPi pela fosfatase alcalina, atua como um sinal da indução da expressão da glicoproteína fosforilada osteopontina em osteoblastos (Beck et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que a fosfatase alcalina pode também contribuir para a geração de PPi através de sua atividade de fosfodiesterase, hidrolisando ATP (Zhang et al., 2005).

O pirofosfato inorgânico (PPi) participa da regulação de vários eventos intracelulares e extracelulares de uma grande variedade de tecidos, sugerindo que a regulação da sua síntese, degradação e transporte ocorre por meio de mecanismos altamente especializados. O papel fisiológico do pirofosfato inorgânico (PPi) extracelular tem sido muito estudado nos últimos anos, principalmente em relação ao processo de mineralização biológica. A compreensão dos eventos que participam da síntese e do metabolismo do pirofosfato no tecido ósseo pode contribuir para elucidar sua participação no processo de biomineralização. O pirofosfato é um potente inibidor da mineralização biológica, da formação de “complexos de minerais” nos rins e em outros fluidos extracelulares (Anderson et al., 1997; Galperin et al., 1998; Okawa et al., 1998; Johnson et al., 1999, 2000; Rutsch et al., 2001; Hessle et al., 2002; Terkeltaub, 2001; Millán, 2006; Ciancaglini et al., 2006, 2010; Simão et al., 2007, 2010).

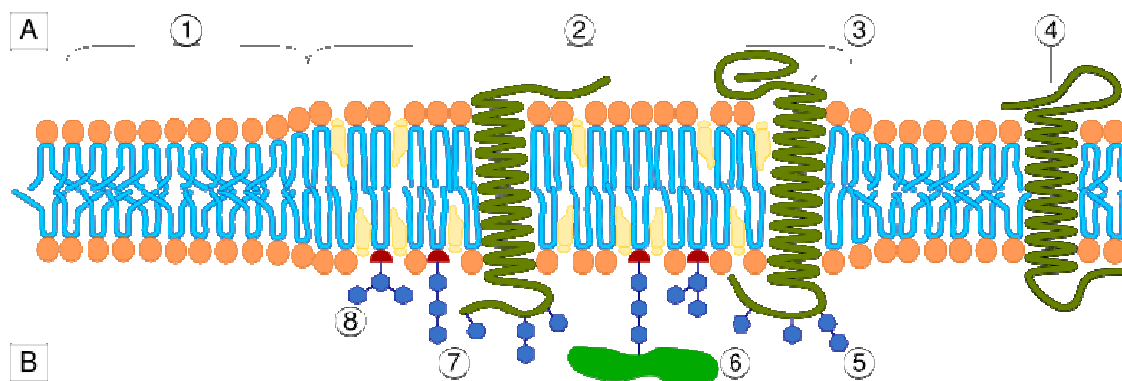


Além disso, tem sido verificado que o pirofosfato inibe a capacidade dos condrócitos de depositar minerais diretamente (especificamente cristais de hidroxiapatita e de fosfato de cálcio básico) na matriz pericelular do tecido ósseo (Poole et al., 1989; Johnson et al., 1999, 2000). Especula-se, ainda, que a remoção e/ou a degradação do pirofosfato é necessária para destruir seu efeito inibitório da mineralização biológica mediada pelas vesículas extracelulares (Rezende et al., 1998; Anderson, 1995; Anderson et al., 1997; Leone et al., 1997; Hessle et al., 2002; Garimella et al., 2006; Ciancaglini, et al., 2010; Simão et al., 2010).

Por outro lado, a propagação dos cristais de hidroxiapatita fora das vesículas extracelulares também é inibida pelo PPI (Anderson, 1995, 2003, 2004). Assim, acredita-se que a fosfatase alcalina apresenta um papel fundamental no processo de calcificação atuando na remoção do PPI através de sua hidrólise, já que foi demonstrada acentuada hipomineralização em camundongos nocauteados para o gene de fosfatase (Anderson et al., 2004).

#### **1.4 Lipid Rafts e Calorimetria**

“Lipid rafts” são comumente definidos como microdomínios existentes em membranas enriquecidos com colesterol e esfingolipídios que funcionam como plataformas que concentram e segregam proteínas dentro do plano da bicamada em constante flutuação dinâmica tanto de composição quanto de movimentação, por isso o nome “raft” – jangada (Simons and Ikonen 1997). Na hipótese dos “rafts” é proposto que certos lipídios naturalmente segregam-se no plano da membrana dirigidos somente por distintas interações intermoleculares, incluindo interações de van der Waals entre as longas cadeias saturadas da esfingomiéline e glicosfingolipídios, bem como ligações de hidrogênio entre as porções glicosil adjacentes dos glicosfingolipídios (Simons and Ikonen, 1997). Além disso, a natural saturação dos lipídios nos lipid rafts e a ação dos glicolipídios promovem suas interações com o colesterol (Brown, 1998). Todas essas interações acreditam-se ser responsáveis pela formação de domínios detergente-resistentes formados pela mistura de certos lipídios, particularmente aqueles contendo esfingomiéline, colesterol, glicosfingolipídios e fosfolipídios saturados (Dietrich et al., 2001)



**Figura 2.** Modelo esquemático de microdomínios existentes na membrana: (A) meio intracelular ou citosol, (B) meio extracelular, (1) modelo de membrana, (2) microdomínio ou Lipid raft, (3) Proteína transmembrana associada ao lipid raft, (4) Proteína associada à membrana, (5) Glicoproteínas e glicolipídios, (6) Proteínas GPI-ancoradas, (7) Colesterol e (8) Glicolipídios. (Trends, 2001).

Interações lipídio-lipídio são de fundamental importância na formação dos lipid rafts, com o colesterol desempenhando um papel especial como uma “cola” que mantém esses domínios unidos (Barenholz, 2002 e Zeljka and Kenworthy 2008). Em um modelo proposto por Simons and Ikonen 1997, esfingolipídios associam-se lateralmente um com o outro, provavelmente através de interações fracas entre os carboidratos presentes nos grupos cabeça de glicosfingolipídios. Os grupos cabeça dos esfingolipídios ocupam grandes áreas de exclusão no plano da camada exoplasmática em comparação com suas cadeias hidrocarbônicas predominantemente saturadas. As associações entre esfingolipídios são evitadas pelo preenchimento com colesterol que funciona como espaçador (Zeljka and Kenworthy 2008). Glicosfingolipídios têm normalmente uma longa cadeia de ácidos graxos as quais são ligações amida de base esfingosina que podem interdigitar com a camada citoplasmática da bicamada lipídica. Como o colesterol está presente em ambas as camadas, ele funciona como um espaçador na camada citoplasmática bem como preenchendo vazios criados pela interdigitação das cadeias dos ácidos graxos (Zeljka and Kenworthy 2008).

As diferentes espécies de lipídios são assimetricamente distribuídas na monocamada externa e interna da membrana. SM e PC são os maiores constituintes da parte externa da membrana plasmática de células (Ramstedt e Slotte, 2002). Resultados obtidos mostram uma substancial organização lateral desses dois lipídios e proteínas na membrana biológica (Brown, 1998; Simons e Ikonen, 1997;

Brown e London, 2000). Esfingolipídios, incluindo SM, juntamente com colesterol são comumente encontrados em domínios laterais formados nas membranas biológicas.

A SM apresenta-se como um componente estrutural nas biomembranas juntamente com outros fosfolipídios, glicolipídios, colesterol e algumas proteínas integrais de membrana. A importância da SM, tanto estruturalmente como funcionalmente, mantém um contínuo interesse neste lipídio de membrana nos últimos anos (Barenholz e Gatt, 1999).

Gangliosídeos (GM1) funcionam como receptores na superfície da célula, bem como participam do crescimento, diferenciação e transformação da célula. Apesar de suas múltiplas funções, é conhecido relativamente pouco sobre sua estrutura e propriedades físicas em sistemas de membrana. Em adição, foi descrito a presença de domínio na membrana, detergente-resistentes, ricos em glicoesfingolipídios e colesterol (Brown e Rose, 1992).

As MVs e microvillar vesículas exibem a mesma composição lipídica, com mais alto conteúdo de colesterol, esfingomiélna e fosfatidilserina quando comparado à membrana plasmática (Thouverey et al., 2009). A composição de fosfolipídios das MVs foi estudada por Thouverey e colaboradores (2009) encontrando valores aproximados de 36% de fosfatidiletanolamina (PE), 26,5% de fosfatidilcolina (PC), 3,5% de ácido fosfátídico (PA), 7% de fosfatidilinositol (PI), 16,5% de fosfatidilserina (PS) e 11% de esfingomiélna (SM). Deve ser lembrado que estes autores não descreveram a presença de GM1 na composição lipídica das vesículas da matrix, provavelmente devido à técnica empregada para a extração, detecção dos diferentes lipídios e complexidade para separação de glicolipídios. Porém, a incorporação de GM1 em monocamadas de DPPC/colesterol fornece evidências de heterogeneidade, com a observação de pequenos micro domínios ricos em GM1. Acredita-se que estes micro domínios são relevantes para o entendimento dos mecanismos de formação de lipid rafts em membranas (Yuan e Johnston, 2000).

Várias proteínas da superfície de células eucarióticas tem a porção C-terminal modificada com glicosilfosfatidilinositol (GPI) que serve como uma âncora para proteínas da membrana. Proteínas GPI-ancoradas apresentam diversificadas funções biológicas incluindo atividade de hidrólise enzimática, sinalização transmembrana e interações de adesão celular (Low, 1989; Ferguson, 1999). A fosfatase alcalina é um exemplo deste tipo de proteína (Pizauro et al., 1994, 1995; Simão et al., 2007). Acredita-se que a organização da membrana biológica em micro

domínios tem um papel chave em vários processos celulares semelhante à receptores protéicos (proteínas alvo) e a transdução de sinal.

A existência de micro domínios tem sido explicada pela separação das membranas lipídicas em duas fases: líquida cristalina ( $L_{\alpha}$ ) e fase líquida ordenada ( $L_o$ ) rica em colesterol, esfingosina e glicolípídios não carregados. Deste modo, Milhiet et al. (2002) demonstraram por microscopia de força atômica a inserção espontânea da fosfatase alcalina via GPI a micro domínios em fase ordenada ou na presença de colesterol. Resultado anterior, de outro grupo de pesquisa, também já tinha mostrado a dependência do colesterol na reconstituição da fosfatase alcalina em sistemas de lipossomos (Nosjean e Roux, 1999; Morandat et al., 2002). Conseqüentemente, já foi demonstrado que a fosfatase alcalina pode ser um marcador eficiente de “lipid rafts”.

Uma grande variedade de métodos tem sido aplicados para determinar a presença de domínios presentes em modelos de membranas e membranas biológicas. Métodos de visualização usando microscopia de fluorescência são úteis na obtenção de informações diretas sobre tamanho e composição molecular do domínio na membrana. Entretanto, deve ser reconhecido que a visualização usando microscopia de luz tem uma resolução comparativamente baixa e pode somente determinar domínios maiores que 100 nm de diâmetro. Em adição, as sondas fluorescentes que devem ser introduzidas podem perturbar o sistema (Epan, 2007). Differential Scanning Calorimetry (DSC) tem sido extensivamente utilizada para estudo de formação de domínios. Esta técnica apresenta certas vantagens sobre outros métodos usados na observação de formação de domínios. O método não requer introdução de sondas estranhas que possam perturbar o sistema, além de ser insensível ao tamanho dos domínios. Assim, evidências da presença de pequenos domínios, não identificados com microscopia de luz podem ser obtidos por DSC. (Epan, 2007).

DSC é uma técnica de primária importância na obtenção de informações sobre a termodinâmica de modelos de membranas e biomembranas. É utilizada para monitorar e caracterizar mudanças nos estados físicos de lipídios polimórficos e também para caracterizar perturbações de lipídios puros pela interação com outros materiais, como outros lipídios, proteínas, íons ou pequenas moléculas hidrofóbicas. Nas análises de DSC, a amostra e a referência são aquecidas independentemente mantendo suas temperaturas idênticas. Em uma transição endotérmica gel- líquido

cristalino de uma bicamada lipídica, por exemplo, o calor requerido seria exigido em excesso em relação ao calor necessário para manter a mesma temperatura na referência.

Recentemente, Ciancaglini et al. (2006) e Simão et al. (2010) demonstraram que as propriedades catalíticas da fosfatase alcalina variam dependendo do microambiente onde a enzima se encontra. Assim, diferentes formas da enzima (ligada à membrana, solubilizada com detergente ou tratada com PIPLC) apresentaram diferentes especificidades para os diversos substratos estudados, mostrando que a cinética da enzima é grandemente afetada pela presença tanto da âncora de fosfatidilinositol quanto de outros componentes da membrana celular.

Empregando-se os sistemas vesiculares de lipossomos ou de células ghost, cuja metodologia de obtenção foi padronizada em nosso laboratório (Camolezi et al., 2002; Ierardi et al., 2002; Simão et al., 2010), o envolvimento da enzima e dos lipídios durante o processo de mineralização será mais fácil de ser estudado, pois estes sistemas podem mimetizar a função das vesículas tanto em sistemas *in vitro* bem como *in vivo*.

Estes estudos demonstraram que a fosfatase alcalina pode ser reconstituída em um sistema de DPPC ou DMPC com cerca de 80% de recuperação em atividade (Camolezi et al., 2002). Resultados preliminares de estrutura obtidos por espectros de dicroísmo circular (CD), empregando-se inicialmente a enzima solubilizada (forma dimérica) sugerem uma correlação entre a estrutura e a atividade (função) da enzima.

Como pode ser avaliado, o estudo realizado até o momento, se limitam a caracterizações bioquímicas e de cinética enzimática as quais não se aprofundam a aspectos de biofísica molecular em relação à dinâmica estrutural da membrana. Com estes enfoques se poderiam correlacionar mecanismos de controle da atividade desta enzima com a organização intermolecular e o estado de fase dos lipídeos da membrana. Além disso, é importante ressaltar que a atividade da fosfatase alcalina pode ser afetada quando embebida em micelas reversas (Chang e Shiao, 1994). Assim, seria de extrema importância estudar também a modulação da sua atividade devido à ação/proximidade de fosfolipídios como um mecanismo de regulação e transdução entre enzimas que não compartilham intermediários metabólicos comuns. Isto é, verificar como mudanças de organização molecular, induzida por colesterol e ou outros lipídeos, podem modular a atividade de enzimas regulando a

produção de mensageiros lipídicos secundários e/ou processos de fusão e recombinação topológica da bicamada lipídica modulando concomitantemente a atividade da fosfatase alcalina. Em adição, avaliar se existe intercomunicação e modulação cruzada na interface entre vias enzimáticas diferentes que não compartilham de intermediários lipídicos comuns, importantes no processo de mineralização. Deste modo, estes estudos poderão trazer um significativo avanço do conhecimento tanto do papel da enzima quanto do processo de biomineralização.

## 2. Objetivos

- I. Obtenção de frações de membrana de osteoblastos a partir de cultura de células de medula óssea de ratos.
- II. Reconstituir a fosfatase alcalina em lipossomos constituídos de DPPC enriquecidos com Colesterol, Esfingomielina e Gangliosídeo.
- III. Monitoramento dos diâmetros médios dos sistemas vesiculares por espalhamento de luz.
- IV. Estudo do comportamento termotrópico dos sistemas de lipossomos e proteolipossomos formados utilizando a Calorimetria Diferencial de Varredura de Alta Sensibilidade

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Obtenção e cultura de células de medula óssea de ratos

As células de medula óssea de ratos serão obtidas e cultivadas conforme descrito por Simão e colaboradores (2007). A medula óssea será obtida de ratos machos jovens adultos da linhagem Wistar, pesando 110-120 g. Para realização da cirurgia será utilizado anti-séptico, campo cirúrgico e instrumental estéril. Antes da cirurgia o animal será anestesiado (0,4 mL de Ketamina Agener 10% e 0,4 mL de Dopaser para cada 100g de animal). Em seguida será feita a anti-sepsia da barriga, pernas e rabo com álcool iodado 1% para a retirada local da pele do animal. Após a retirada da pele será feita a assepsia do local com o uso de clorexidina 2,5%. O fêmur será separado da tíbia com cortes no tendão do joelho e em seguida os tecidos serão retirados para obtenção do fêmur com cortes de tesoura nas articulações próximas à bacia. Os fêmures retirados asepticamente serão colocados em meio de transporte (meio essencial mínimo, antifúngico (fungisone), antibiótico gentamicina) e serão transportados até o laboratório para realização da extração de medula óssea dentro de uma capela de fluxo laminar. Para a extração da medula óssea serão realizadas três passagens em meio de transporte. Cada passagem deverá levar no mínimo 30 minutos entre uma passagem e outra, onde serão retirados os restos de tecidos presos ao fêmur com o auxílio de um bisturi. As epífises serão removidas e a medula será extraída com jato de 20 mL de meio de cultura (meio essencial mínimo- $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina, 0,3  $\mu$ g/mL de fungizona,  $10^{-7}$  M de dexametazona, 5  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico e 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato) esguichado por uma seringa com agulha de 20 gauges. Faz-se assim uma lavagem interna do fêmur com meio de cultura extraindo toda a medula óssea. As células liberadas serão cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> contendo meio de cultura e cultivadas por cerca de 14 dias, sempre mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Os meios serão trocados a cada 3 ou 4 dias.

#### 3.2 Obtenção das frações de membrana de osteoblastos

As frações de membrana ricas em fosfatase alcalina foram extraídas das culturas osteoblásticas conforme descrito por Simão e colaboradores (2007a). As células que cresceram durante aproximadamente 14 dias em frasco plástico de



cultura de 75 cm<sup>2</sup> foram lavadas com tampão de estoque Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, raspadas com espátula plástica e ressuspensas em 40 mL de tampão de choque osmótico Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgSO<sub>4</sub> 10 mM e NaCl 0,8 M. O material ressuspenso foi homogeneizado empregando-se um homogeneizador do tipo “potter” e, em seguida, ultracentrifugado a 100.000xg por 1 hora, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, que corresponde à fração de membrana de células osteoblásticas rica em fosfatase alcalina, foi ressuspenso em 5 mL de tampão de estoque. Este material foi fracionado em alíquotas de 1 mL, rapidamente congelado e armazenado a -20°C.

### **3.3 Dosagem de proteína**

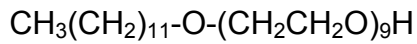
As concentrações de proteína foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v). A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão. As determinações foram feitas em duplicatas e a concentração de proteína foi estimada a partir da curva padrão feita para cada dosagem.

### **3.4 Determinação da atividade PNFFase**

A atividade PNFFase da enzima foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da formação do íon p-nitrofenolato (PNF<sup>-</sup>) ( $\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , pH 13), em 410 nm, em tampão AMPOL 50 mM, pH 10,0, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e PNFF 10 mM, em um volume final de 1 mL, de acordo com o procedimento descrito por Simão e colaboradores (2007). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional e interrompida pela adição de NaOH 1 M, em intervalos predeterminados. Em cada experimento foram incluídos controles sem a enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de enzima foi definida como sendo a quantidade de fosfatase alcalina que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, nas condições padrões do teste.

### **3.5 Solubilização da fração de membrana**

A fração de membrana obtida contendo 0,2 mg/mL de proteína foi incubada com polidocanol 1% (p/v) (concentração final), a 25°C. A enzima foi então armazenada em detergente a 10 °C, evitando assim uma possível agregação. Amostras da enzima solubilizada foram analisadas quanto à atividade PNFFase.



Estrutura do polioxietileno-9-lauril éter (polidocanol)

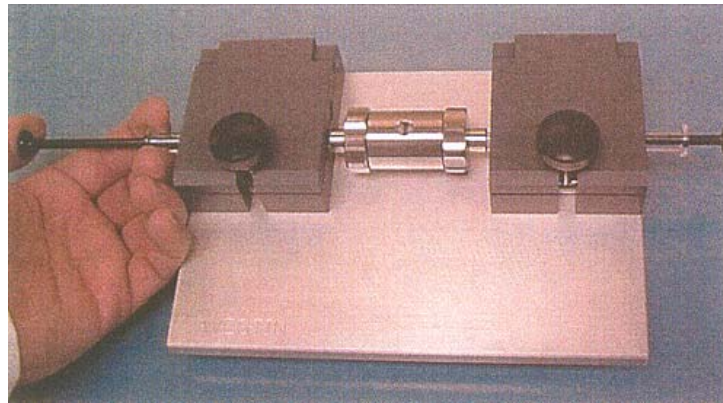
### 3.6 Remoção do excesso de detergente

A fosfatase alcalina solubilizada com polidocanol foi incubada sob agitação constante, durante 2 horas, a 4°C, com a resina Calbiosorb na proporção de 200 mg/mL (peso úmido), previamente tratada com metanol e equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, conforme descrito por Camolezi e colaboradores (2002).

### 3.7 Preparação dos lipossomos

Lipossomos com concentrações de 1,0 e 10 mg/mL foram preparados pesando-se uma massa apropriada do lipídeo (ou mistura) que foi dissolvida em clorofórmio. Em seguida o solvente foi removido através da passagem de nitrogênio pela solução formando um filme nas paredes do tubo. Estes filmes foram mantidos a vácuo por 1 hora, para garantir a completa desidratação do meio. Em seguida, o filme lipídico foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM a fim de formar uma solução de concentração final de 10 mg/mL. Esta mistura foi incubada a 60°C por 1 hora, com agitações constantes em vortex a cada 10 minutos. Um mini extrusor (Liposofast da Sigma-Aldrich) foi montado com duas seringas de 0,50 mL e a solução de lipídeos transferida de uma seringa para outra por 20 vezes, passando através de uma membrana de policarbonato (100, 200 e 400 nm), colocada entre dois suportes na forma de anel para que não ocorra a ruptura desta. Este procedimento é realizado sob fluxo de ar quente para o sistema atingir a temperatura de transição. A solução extrusada foi então recolhida e armazenada em geladeira.

Foram preparados os seguintes lipossomos: lipossomos constituídos de DPPC com diferentes diâmetros; lipossomos mistos constituídos de DPPC:Chol nas proporções molares de 9:1, 9:2, 9:3, 9:4 e 9:5; sistemas binários formados por DPPC: Chol, DPPC:SM e DPPC:GM1 nas proporções molares de 9:1; sistemas de lipossomos ternários constituídos de DPPC:Chol:SM, DPPC:Chol:GM1 e DPPC:SM:GM1 nas proporções molares de 8:1:1 e finalmente o sistema de lipossomos quaternário constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 nas proporções molares de 7:1:1:1.



**Figura 3.** Esquema do extrusor utilizado na preparação dos lipossomos.

### **3.8 Incorporação da fosfatase alcalina em lipossomos**

Amostras de lipossomos e fosfatase alcalina (em torno de 35  $\mu\text{g/mL}$ ) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, foram misturadas e incubadas a 25°C durante 1 hora, na proporção 1:10000 proteína:lipídio (razão molar). Em seguida, a solução foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 hora, a 4°C, e o pellet foi ressuspensão no mesmo tampão acima descrito. A atividade PNFFase total antes da incorporação, antes da ultracentrifugação e a atividade presente no sobrenadante e no pellet ressuspensão foram determinadas para calcular a porcentagem de incorporação.

### **3.9 Obtenção de proteolipossomos após solubilização da TNAP com Fosfolipase C**

Os proteolipossomos constituídos de DPPC foram incubados com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (0,2 U de PIPLC de *Bacillus thuringiensis* por mL) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, por 2 horas, a 37°C, com agitação constante. Em seguida, a mistura foi avaliada segundo sua concentração de proteína e atividade enzimática, descritos nos itens 3.3 e 3.4 respectivamente.

### **3.10 Microscopia eletrônica com marcação negativa de lipossomos e proteolipossomos**

Este experimento foi realizado em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. José Luis Millán, do Burnham Institute for Medical Research, La Jolla, Califórnia.

Para a visualização dos lipossomos e proteolipossomos constituídos de DPPC por microscopia eletrônica, foi utilizada a técnica conhecida como marcação negativa, colocando-se 5  $\mu\text{L}$  da suspensão de lipossomos ou proteolipossomos em grades de cobre recobertas com carbono, por 1 min, para a sedimentação das vesículas. O excesso de tampão foi removido, trocado por uma solução aquosa de acetato de uranila (AU) 2% e incubado por 15 segundos; o excesso de AU foi removido e as grades foram secas com ar por 2-5 min e colocadas no microscópio eletrônico para observação. O microscópio eletrônico de transmissão Hitachi H-600A foi operado a 75 kV e com diferentes aumentos instrumentais. As imagens foram coletadas com CCD (charge coupled device, ou dispositivo de carga acoplada) resfriado por nitrogênio líquido (L9C) e câmera de 11,2 mega pixel (SIA).

### 3.11 Determinação do diâmetro médio dos sistemas vesiculares

O diâmetro médio das vesículas formadas foi determinado através de medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico, empregando-se o equipamento Beckman Coulter (modelo N5 Submicron Particle Size Analyser), com cubetas de 1 cm de passo óptico. As amostras foram previamente filtradas (Millipor filter 0,8  $\mu\text{m}$ ) e diluídas de modo a se obter uma intensidade dentro da faixa requerida pelo aparelho. O valor apresentado é a média de 5 medidas realizadas à temperatura ambiente.

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio é determinado a partir do coeficiente de difusão,  $D$ , das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Browniano. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

$$g(\tau) = 1 + e^{(-2Dq^2 \tau)} \quad (\text{Equação 1})$$

onde  $g(\tau)$  é função de auto-correlação temporal,

$D$  é o coeficiente de difusão das partículas,

$q$  é o módulo do vetor de espalhamento

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação e  $\theta$  é o ângulo da luz coletada em relação ao feixe incidente.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Browniano das vesículas que se difundem resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado.

O raio hidrodinâmico pode ser obtido pela equação de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_H} \quad (\text{Equação 3})$$

onde  $K_B$  é a constante de Boltzmann

$T$  é a temperatura (kelvin)

$\eta$  é a viscosidade do solvente

$R_H$  é o raio hidrodinâmico

### 3.12 Caloria Diferencial de Varredura - DSC

Os estudos de calorimetria foram realizados utilizando um equipamento N - DSC II: Differential Scanning Calorimeter da Calorimetry Sciences Corporation.

As amostras de lipossomos, proteolipossomos e a referência (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo  $MgCl_2$  2 mM) foram inicialmente deaeradas e aplicadas no calorímetro (300  $\mu$ L de cada). Foi realizada uma varredura de temperatura de 0°C a 100°C, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min e uma varredura de 100°C a 0°C com velocidade de resfriamento de 0,5°C/min. Os ciclos de aquecimento e resfriamento foram repetidos por pelo menos 3 vezes.

Um sistema de controle aumenta imediatamente a energia fornecida para a amostra quando o processo é endotérmico, e aumenta a energia fornecida para a referência quando o processo é exotérmico, conservando assim o sistema com a mesma temperatura. Um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações, uma vez que a compensação de potência é proporcional à energia envolvida na reação.

Os dados de potência ( $\mu$ W) são transformados em capacidade calorífica molar (Equação 4) e finalmente determinam-se os valores de temperatura de transição, variação de entalpia (Equação 5), variação de entropia (Equação 6) e a

energia livre de Gibbs (Equação 7).

$$C_p(T) = \frac{\frac{dt}{dT} \cdot \Delta P \cdot V_{cel} \cdot \rho \cdot C_{solvente} - (V_{cel} - V_{soluto}) \cdot \rho \cdot C_{solvente}}{V_{cel} \cdot [Soluta]} \cdot MM \quad (\text{Equação 4}),$$

onde

$V_{cel}$  = volume da célula do calorímetro

$\rho$  = densidade do solvente

$V_{soluto}$  = volume do soluto na célula da amostra

$C_{solvente}$  = capacidade calorífica do solvente

$MM$  = massa molar do soluto

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_i) + \int_{T_i}^T \Delta C_p(T) dT \quad (\text{Equação 5})$$

$$\Delta S(T) = \frac{\Delta H(T_i)}{T_i} + \int_{T_i}^T \Delta C_p(T) d \ln(T) \quad (\text{Equação 6})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Equação 7})$$

As análises de deconvolução, para melhor resolução de picos distintos em uma mesma corrida, foram feitas utilizando o programa Origin, versão 8.0.

### 3.13 Estabilidade dos sistemas lipossomais

A estabilidade dos lipossomos, bem como dos sistemas de proteolipossomos preparados, foi acompanhada através de medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico, empregando-se o equipamento Beckman Coulter (modelo N5), sendo as amostras previamente diluídas, de modo a se obter um índice de polidispersão adequado.

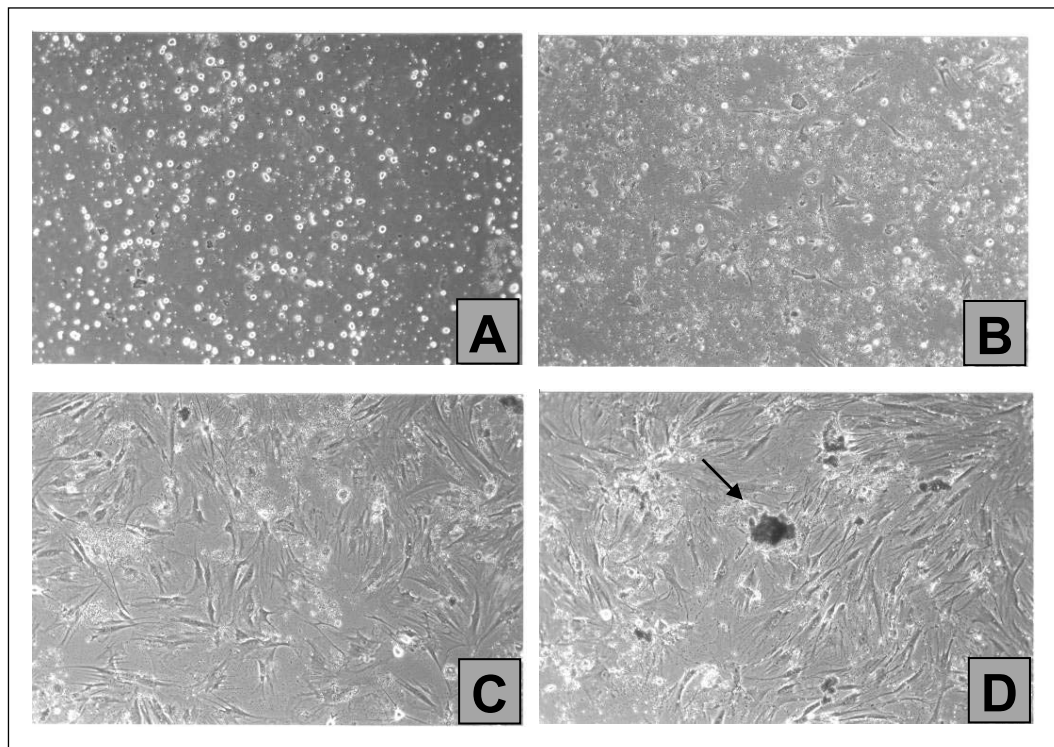
## **4. Resultados e Discussão**

### **4.1 Obtenção de frações de membrana de osteoblastos a partir de cultura de células.**

Células da medula óssea podem ser isoladas, cultivadas e induzidas a se diferenciar em células envolvidas no processo de calcificação, como condrócitos ou osteoblastos (Phinney, 2002; Prockop et al., 2003; Osyczka e Leboy, 2005). Vários estudos indicam que o sistema de células de medula óssea é um modelo útil para se estudar tanto a expressão temporal e espacial de proteínas relacionadas ao processo de biomineralização durante a osteogênese, bem como a formação, mineralização e maturação de nódulos ósseos (Simão et al., 2007; van den Dolder e Jansen, 2007).

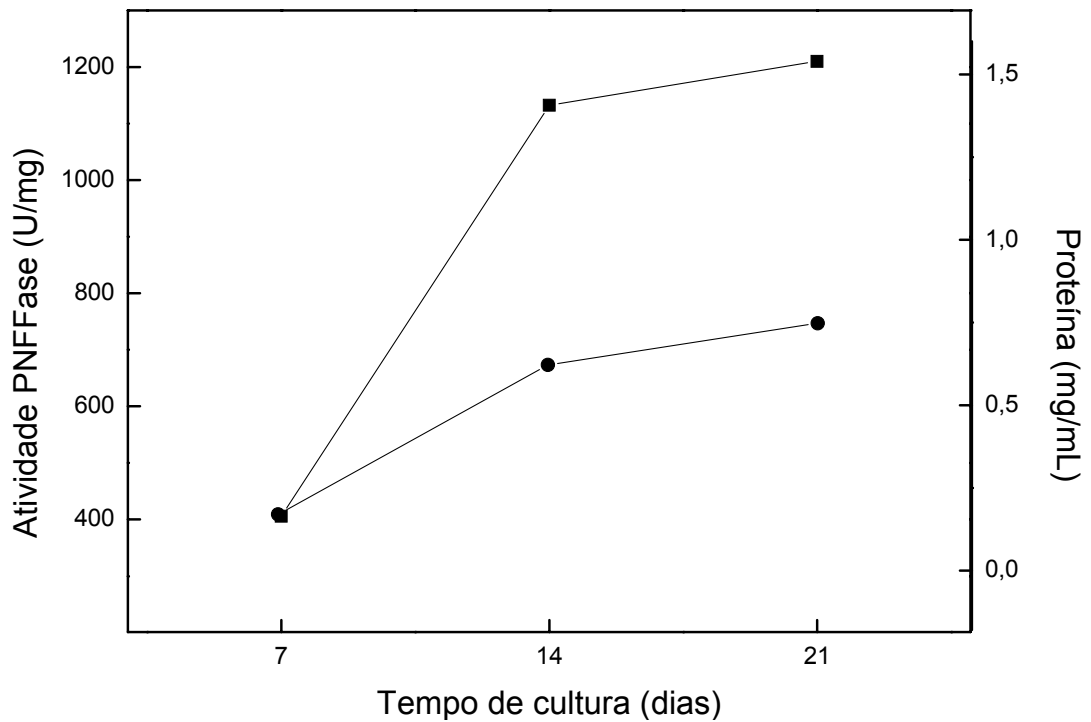
As células da medula óssea de rato foram então cultivadas, diferenciando-se e aderindo no fundo do frasco de cultura. O desenvolvimento das culturas foi monitorado por diferentes períodos de tempo: 24 horas (Figura 4A), 4 dias (Figura 4B), 10 dias (Figura 4C) e 14 dias de crescimento (Figura 4D). Através da Figura 4, pode-se observar um aumento gradativo do número de células com o passar do tempo. Além disso, com 14 dias já podem ser visualizados nódulos de mineralização (Figura 4D). As culturas foram monitoradas durante 21 dias de crescimento quanto aos níveis de proteína e atividade de fosfatase alcalina, sendo interrompidas após 7, 14 e 21 dias para o processamento das células e obtenção da fração de membrana.

A variação com o tempo de cultura da atividade PNFFase e da concentração de proteína presentes na fração de membrana é mostrada na Figura 5. Níveis máximos de atividade PNFFase e concentração de proteína foram obtidos após 14 dias de cultura, com valores ao redor de 1.200 U/mg e 0,6 mg/mL, respectivamente.



**Figura 4.** Cultura de células osteoblásticas após **(A)** 24 h; **(B)** 4 dias; **(C)** 10 dias e **(D)** 14 dias de crescimento. As células foram cultivadas em meio essencial mínimo- $\alpha$  ( $\alpha$ -MEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de vancomicina, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina, 0,3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de fungizona,  $10^{-7}$  M de dexametazona, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ácido ascórbico e 7 mM de  $\beta$ -glicerofosfato.





**Figura 5.** Efeito do tempo de crescimento das culturas de células osteoblásticas na atividade PNFFase e concentração de proteína da fração de membrana rica em fosfatase alcalina. Após 7, 14 e 21 dias, o crescimento foi interrompido e as células foram processadas conforme descrito no item 4.2 de Material e Métodos. A fração de membrana foi analisada quanto à (●) concentração de proteína e (■) atividade PNFFase, conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4 de Material e Métodos.

## 4.2 Reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos de DPPC.

### a) Incorporação lipídio x proteína.

Para se obter um eficiente sistema que mimetize as vesículas da matriz, é essencial estudar as melhores condições necessárias para a otimização da incorporação da fosfatase alcalina em lipossomos, de modo a se obter um máximo de incorporação da enzima às vesículas com mínima perda em atividade, o que envolve conhecimento dos lipídios ou misturas de lipídios mais adequados para a reconstituição em termos do tipo do grupo cabeça polar, carga, comprimento da cadeia hidrocarbônica e tamanho das vesículas formadas. Assim, os estudos de incorporação foram iniciados utilizando o extrato bruto solubilizado com polidocanol e livre de detergente.

Os estudos de obtenção de proteolipossomos foram realizados com o DPPC, que é um fosfolipídio comumente utilizado para a reconstituição de fosfatases alcalinas de diferentes fontes, bem como outras proteínas de membrana, em lipossomos (Angrand et al., 1997; Nosjean e Roux, 1999; Camolezi et al., 2002; Morandat et al., 2002, 2003; Daghasanli et al., 2004; Ronzon et al., 2004; de Lima Santos et al., 2005; Giocondi et al., 2007) e é frequentemente empregado em estudos de modelos de biomembranas (Santos et al., 2006; Colhone et al., 2009).

As análises dos diâmetros médios dos lipossomos constituídos por DPPC, determinado por espalhamento de luz dinâmico, foram condizentes com o esperado utilizando uma membrana de 100 nm no processo de extrusão (Tabela 1).

**Tabela 1:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para as vesículas constituídas de DPPC (10 mg/mL). Lipossomos e TNAP foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.

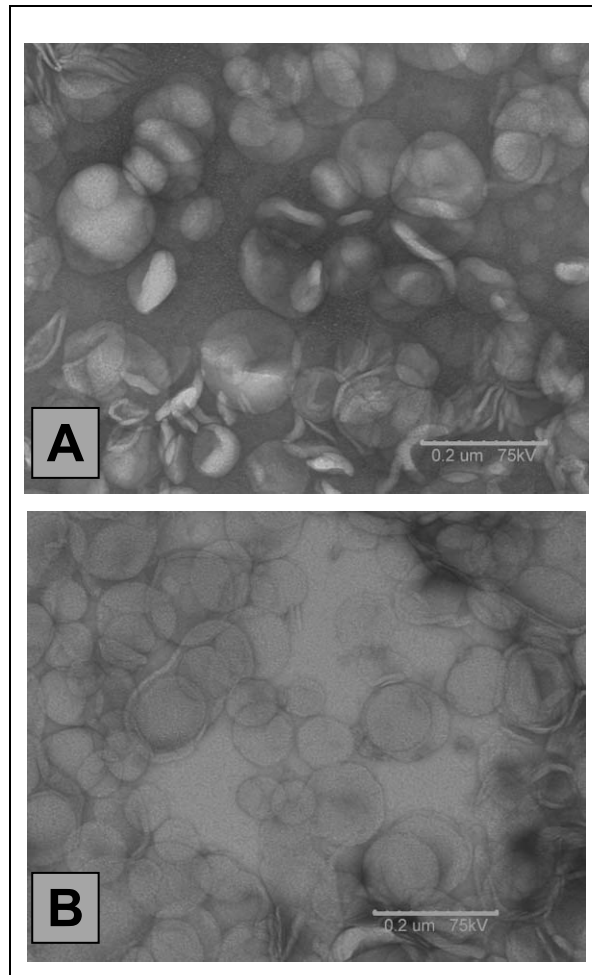
Vesículas	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
Lipossomo	-	136,4	0,08	0,20*	34,6*	3,47*
				7,63	41,5	1,81
Proteolipossomo	80	330	0,16	0,02*	34,3*	3,18*
				1,88	41,5	1,88

(\*) Parâmetros da pré-transição

A fosfatase alcalina, solubilizada com polidocanol e livre de detergente segundo item 3.6 do Material e Métodos, foi incorporada aos lipossomos constituídos de DPPC na concentração de 10 mg/mL. O sistema de proteolipossomo formado foi analisado por espalhamento de luz, sendo evidenciado um considerável aumento no diâmetro médio das vesículas, em torno de 330 nm, devido ao processo de incorporação da enzima.

Assim, a incubação do lipossomo e proteína (35 µg/mL) na proporção de 1:10000 (proteína:lipídio razão molar) a 25°C por 1 hora, proporcionou cerca de 80% de incorporação da atividade PNFFase da enzima. Resultados semelhantes de incorporação foram obtidos por Camolezi e colaboradores (2002) na reconstituição de fosfatase alcalina de placas ósseas em lipossomos constituídos de DPPC, e por Angrand e colaboradores (1997), que empregaram uma metodologia de reconstituição de fosfatase alcalina de intestino bovino mediado por detergente.

Amostras de lipossomos (Figura 6A) e de proteolipossomos (Figura 6B) também foram submetidas à microscopia eletrônica e pode ser observado que a reconstituição da enzima não altera a estrutura dos lipossomos de DPPC.



**Figura 6.** Microscopia eletrônica com marcação negativa de: **(A)** Lipossomos constituídos de DPPC e **(B)** Proteolipossomos com a fosfatase alcalina reconstituída, ambos com ampliação de 50x. As amostras foram preparadas e as imagens obtidas como descrito no item 4.6 de Material e Métodos.

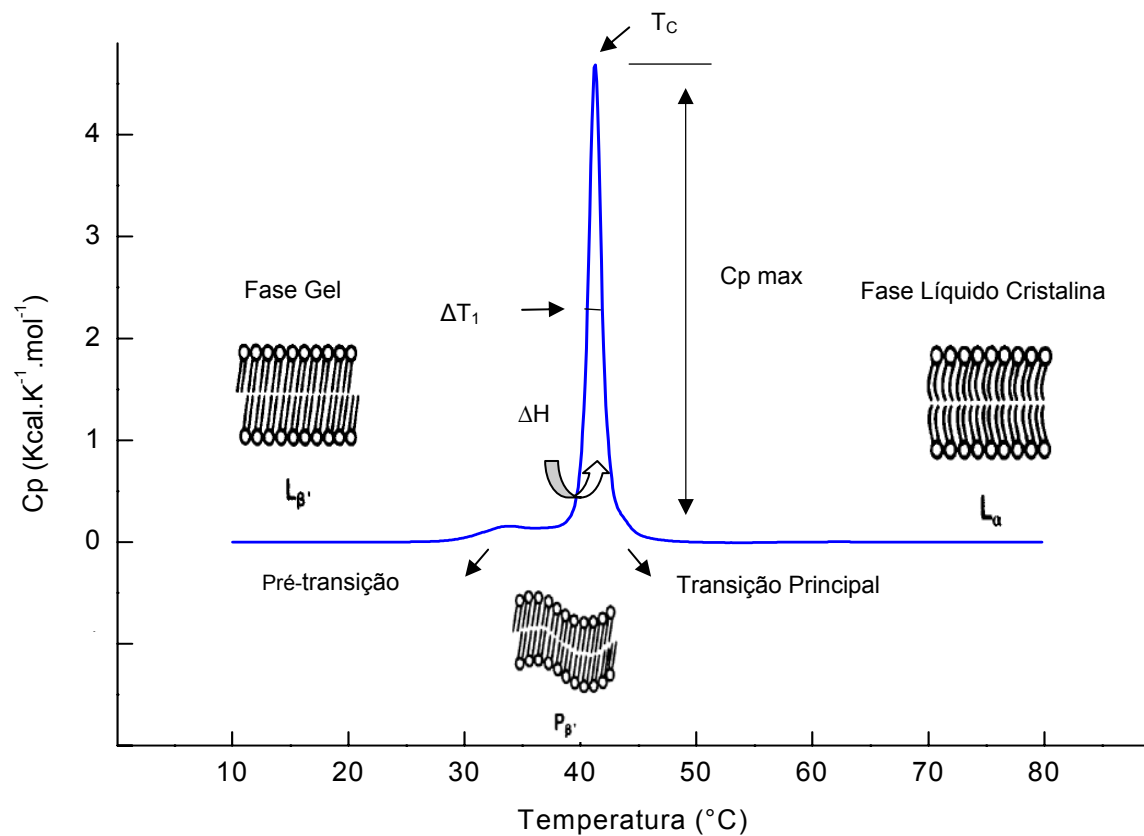
**b) Caracterização dos sistemas de lipossomos e proteolipossomos de DPPC utilizando a Técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura.**

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é uma técnica de grande importância na caracterização termodinâmica de modelos de membranas e biomembranas, além disso, representa um dos métodos mais empregados em estudos de desenovelamento de proteínas, fornecendo informações na organização estrutural e interações dos domínios cooperativos. Baseado nos valores fornecidos por essa técnica, a análise termodinâmica de enovelamento de uma proteína permite a elucidação de características da sua estrutura terciária e ainda a determinação das contribuições das interações que mantêm a estabilidade da estrutura nativa (Minetti e Remeta, 2006).

Os lipídios podem adotar diferentes estados lamelares chamados fase gel ou semi-cristalina e estado fluido cristalino. O parâmetro determinante do comportamento físico-químico da membrana é a temperatura crítica ( $T_c$ ) a qual é a temperatura de transição entre o estado gel e o estado fluido-cristalino: abaixo da  $T_c$  os lipídios estão empacotados em um estado ordenado na fase gel, entretanto acima dessa temperatura eles estão mais desordenados em um estado fluido (fluido cristalino) (Tristram-Nagle e Nagle, 2004; Mannock et al., 2006). Esta transição ocorre em membranas biológicas produzindo sua funcionalidade.

No esquema ilustrado na Figura 7 utilizou-se lipossomos constituídos de DPPC (10 mg/mL) para a observação dos parâmetros termodinâmicos que podem ser extraídos de uma curva de DSC.

Fosfolipídios, especialmente glicerofosfolipídios, são grupos de lipídios que consistem em uma ampla variedade de moléculas, que tem a habilidade de formar estruturas de bicamada. Em meio aquoso este sistema é muito semelhante às membranas biológicas e por isso é utilizado como modelo em estudos de calorimetria.



**Figura 7.** Características dos parâmetros termodinâmicos de uma curva de DSC, utilizando no esquema lipossomos constituídos de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL.

Neste esquema pode-se obter a temperatura crítica de transição ( $T_c$ ), temperatura na qual a amostra apresenta máxima capacidade calorífica pontuando a transição da fase gel à fase fluido cristalino. A entalpia de transição ( $\Delta H$ ) é um parâmetro representado pela área total do pico, o qual está relacionado à estabilidade do sistema analisado. A cooperatividade das moléculas durante o processo de transição apresenta grande importância em relação ao comportamento termotrófico da amostra e pode ser definido como a largura que corresponde à meia altura do pico de transição ( $\Delta T_{1/2}$ ). Na transição de fase do DPPC pode ser observado o aparecimento de um pico agudo e bem definido, devido às favoráveis interações de van der Waals das cadeias hidrocarbônicas do lipídio, resultando em uma alta cooperatividade das moléculas. Neste esquema podemos observar dois picos de transição: o primeiro ao redor de 33°C que corresponde à pré-transição e o segundo pico que corresponde à transição principal em 41°C.

Com o objetivo de padronizar a técnica, foram realizados alguns experimentos de calorimetria, a fim de comparar os resultados obtidos com resultados descritos na literatura. Para isto, foram feitos estudos utilizando lipossomos constituídos somente por DPPC, analisando sua temperatura de transição entre a fase gel e a fase líquido-cristalina (fluido). O gráfico de capacidade calorífica ( $C_p$ ) vs. temperatura ( $T$ ) obtido para tal sistema está apresentado na Figura 8 e os respectivos parâmetros termodinâmicos na Tabela 1. Além do pico de transição principal do DPPC em torno de 41°C, detectou-se um pico menor e largo referente à sua pré-transição com  $T_c$  em torno de 34°C. Estes resultados são condizentes com os valores descritos na literatura (Tristram-Nagle e Nagle, 2004).

A fim de se analisar o comportamento termotrófico dos sistemas de proteolipossomos, a fosfatase alcalina foi reconstituída em lipossomos de DPPC. Comparando-se os estudos termodinâmicos feitos e apresentados na Tabela 1, observa-se uma queda significativa nos valores de  $\Delta H$  (de 7,63 a 1,88 kcal.mol<sup>-1</sup>) para os sistemas de proteolipossomos, demonstrando que a incorporação da enzima ao lipossomo o torna mais fluido e instável. Entretanto, os valores correspondentes à  $T_c$  e cooperatividade não foram significativamente afetados. Deve ser destacado que a reconstituição em sistema vesicular constituídos de DPPC já foi previamente estudada em nosso laboratório (Camolezi et al., 2002) mas dando ênfase apenas ao comportamento cinético da enzima após sua reconstituição. Estas abordagens biofísicas, avaliando mudanças no comportamento dos lipídeos após a inserção da

fosfatase alcalina, são inéditas.

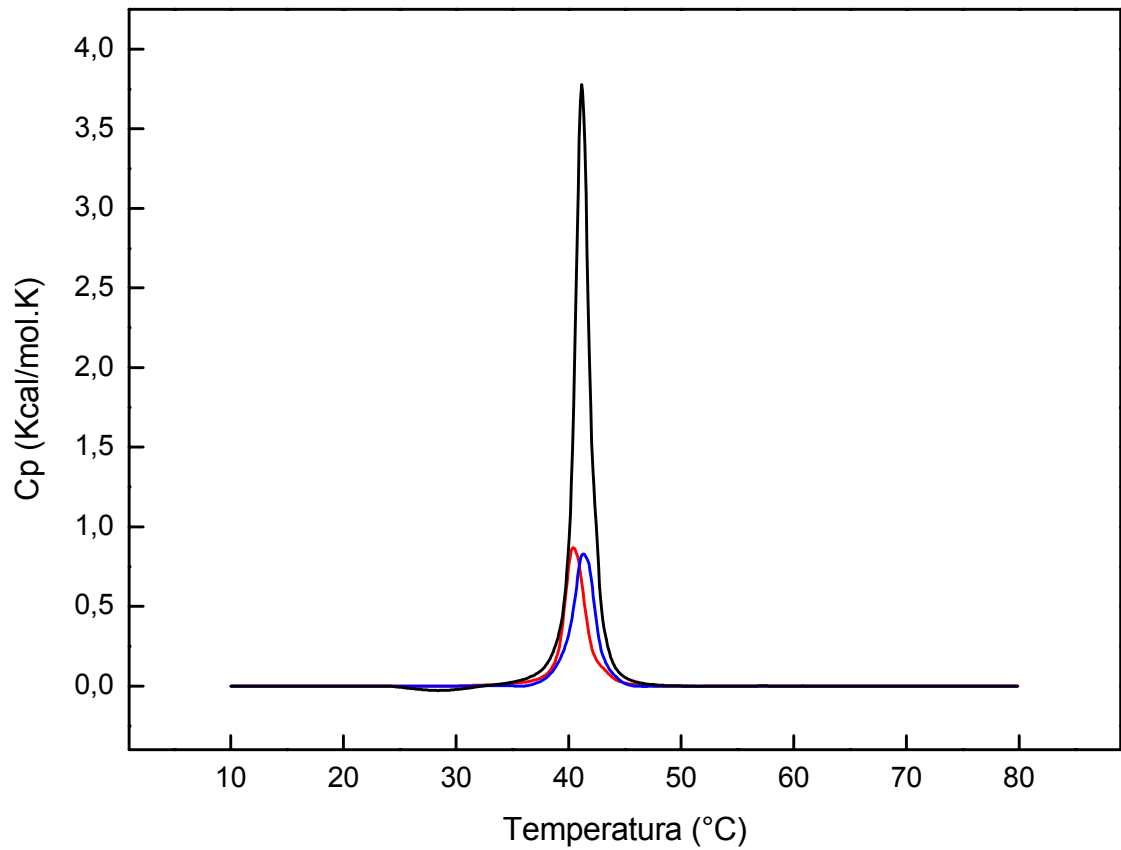
Até o momento foi apresentado que a presença da enzima inserida ao sistema de lipossomo o torna mais fluido e instável, porém não está esclarecido o que provoca esta diminuição brusca nos valores de  $\Delta H$ , se é a presença da enzima ou apenas a inserção de sua âncora ao sistema vesicular. Para tal esclarecimento, os proteolipossomos formados foram incubados com fosfolipase C (PIPLC) conforme item 3.9 de Material e Métodos. Após incubação com PIPLC a TNAP foi parcialmente liberada em solução, resultando em sistemas de vesicular onde apenas a âncora de GPI permanece inserida na maioria dos sistemas. Esta amostra foi então analisada por DSC, resultando no termograma da Figura 8 apresentado abaixo.

**Tabela 2.** Parâmetros termodinâmicos para as vesículas constituídas de DPPC (10 mg/mL). Lipossomos e TNAP foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente formando os proteolipossomos, os quais foram tratados com PIPLC conforme descrito no item 3.9 de Material e Métodos clivando a enzima do sistema vesicular.

<b>Vesículas</b>	<b>Tratamento com PIPLC</b>	<b><math>\Delta H</math> (Kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>T_c</math> (°C)</b>	<b><math>\Delta t_{1/2}</math> (°C)</b>
<b>Lipossomo</b>	-	7,63	41,5	1,81
<b>Proteolipossomo</b>	não	1,88	41,5	1,88
<b>Proteolipossomo</b>	sim	2,42	41,3	2,21

Através do termograma apresentado abaixo na Figura 8 e dos dados da Tabela acima, observa-se uma acentuada diminuição nos valores de  $\Delta H$  quando comparamos os sistemas de lipossomos com os de proteolipossomos. Entretanto, os valores de  $\Delta H$  não são significativamente alterados com a ausência da TNAP, isto é após sua clivagem com PIPLC. Pode-se então concluir que as alterações que os sistemas de proteolipossomos sofrem em relação à sua fluidez, evidenciadas pelas diminuições nos valores de  $\Delta H$ , estão relacionadas principalmente à inserção da âncora de GPI.





**Figura 8.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para vesículas constituídas de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL: Lipossomos ( — ), Proteolipossomos com TNAP ( — ) e Proteolipossomos sem TNAP ( — ).

### **4.3 Efeito do raio de curvatura de membranas constituídas de DPPC na reconstituição da fosfatase alcalina.**

O efeito dos microambientes existentes nas membranas na atividade enzimática da fosfatase alcalina ainda não está esclarecido. Assim, são necessários estudos utilizando modelos que mimetizem esses microambientes, quanto em composição quanto em raio de curvatura. Para tal ensaio, foram preparados lipossomos com a mesma composição (DPPC 1,0 mg/mL), porém com tamanhos diferentes, afim de relacionar como a curvatura da membrana influencia na atividade catalítica.

A determinação do tamanho das vesículas formadas pelo método de extrusão foi avaliada utilizando medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico, segundo item 3.11 do Material e Métodos. Os lipossomos foram formados utilizando membranas de policarbonato de 100, 200 e 400 nm. Os valores médios de diâmetros obtidos, juntamente com os respectivos IP (índice de polidispersão), estão detalhados na Tabela 2, onde pode-se observar dados condizentes para lipossomos com diâmetro médio de 100 e 200 nm, apresentando também baixos valores de polidispersão. Quando utilizada a membrana de 400 nm, não foram obtidos sistemas com valores experimentais próximo ao esperado, além de apresentar valor de polidispersão superior aos outros sistemas. Este fato pode ser explicado pela instabilidade que as vesículas adquirem quando formadas com maiores tamanhos.

Os resultados referentes aos estudos de calorimetria realizados para os sistemas de lipossomos também estão apresentados na Tabela 3. Os perfis dos termogramas obtidos para os três sistemas estão apresentados na Figura 9.

**Tabela 3.** Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC na concentração de 1mg/mL utilizando membranas de policarbonato de diferentes diâmetros.

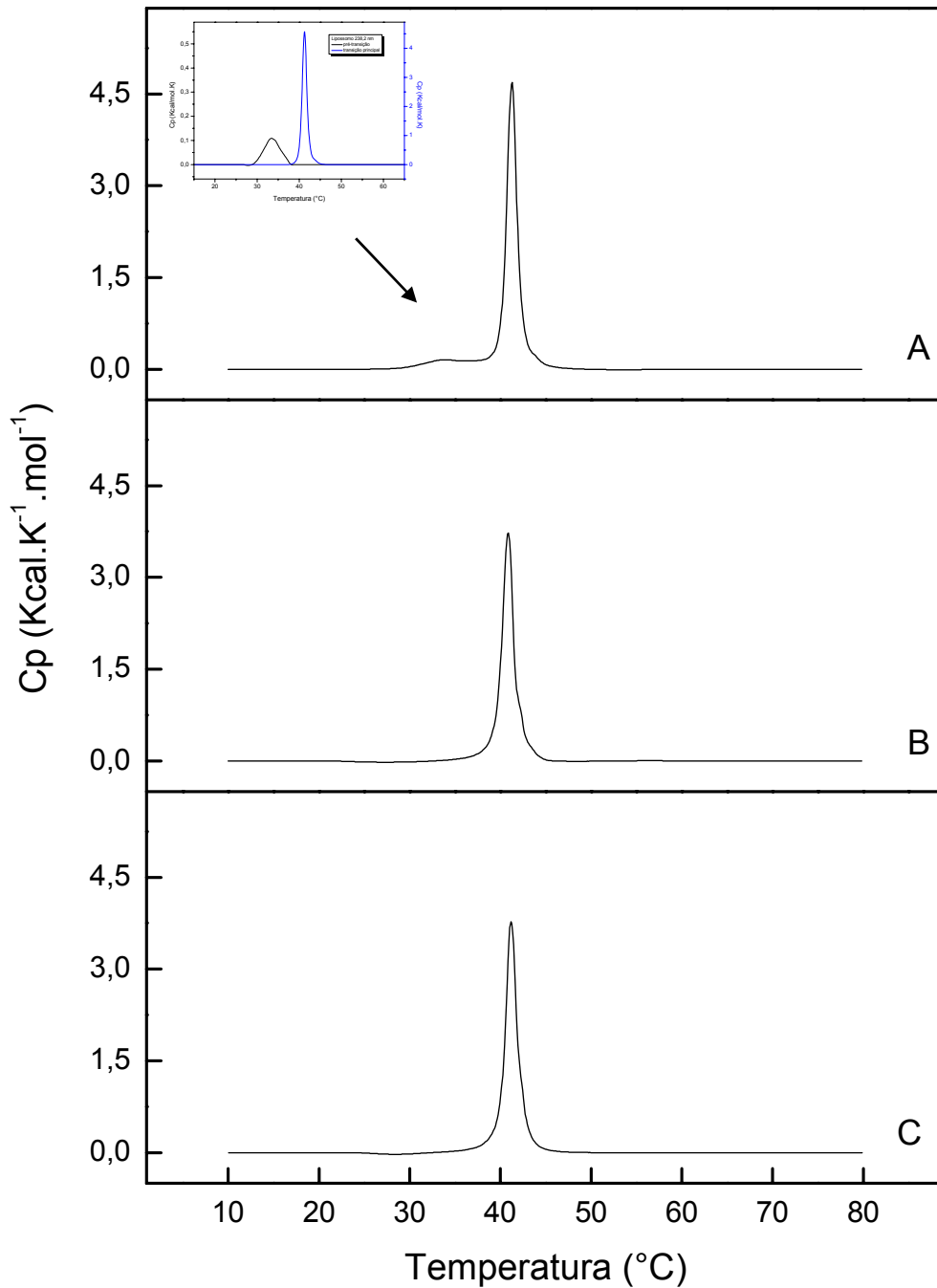
Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
109,7	0,13	7,31	41,2	1,46
190,2	0,05	7,59	40,9	1,39
238,2	0,26	0,56*	33,4*	5,25*
		8,76	41,3	1,19

\*Pré-tansição

Como era esperado, através do gráfico da Figura 10-A, pode-se observar que a T<sub>c</sub> não é afetada quando se compara sistemas de igual composição e diferentes diâmetros. Porém, os parâmetros termodinâmicos são fortemente afetados, como ilustrado na Figura 10-B e 10-C, onde pode ser observado um aumento progressivo nos valores de  $\Delta H$  com o aumento do diâmetro dos lipossomos. Maiores valores de  $\Delta H$  sugerem um maior empacotamento dos lipídios, apresentando assim maior resistência da bicamada na mudança da fase gel a líquido cristalina. O  $\Delta t_{1/2}$  dos sistemas também foi analisado e está apresentado na Figura 10-D, na qual pode ser observada uma pequena redução com o aumento do diâmetro das vesículas, tornando a transição de fase mais cooperativa.

A enzima foi incubada com os diferentes sistemas de lipossomos segundo descrito no item 3.5 de Material e Métodos, formando assim sistemas de proteolipossomos. Estes foram submetidos a testes de atividade catalítica para cálculo de porcentagem de incorporação e calorimetria para análise dos parâmetros termodinâmicos. Os termogramas obtidos para os três sistemas de proteolipossomos formados estão apresentados na Figura 11.

Em relação à atividade catalítica, observa-se uma diminuição ao redor de 15% na incorporação da atividade da enzima com o aumento do diâmetro das vesículas formadas (Figura 12-D).



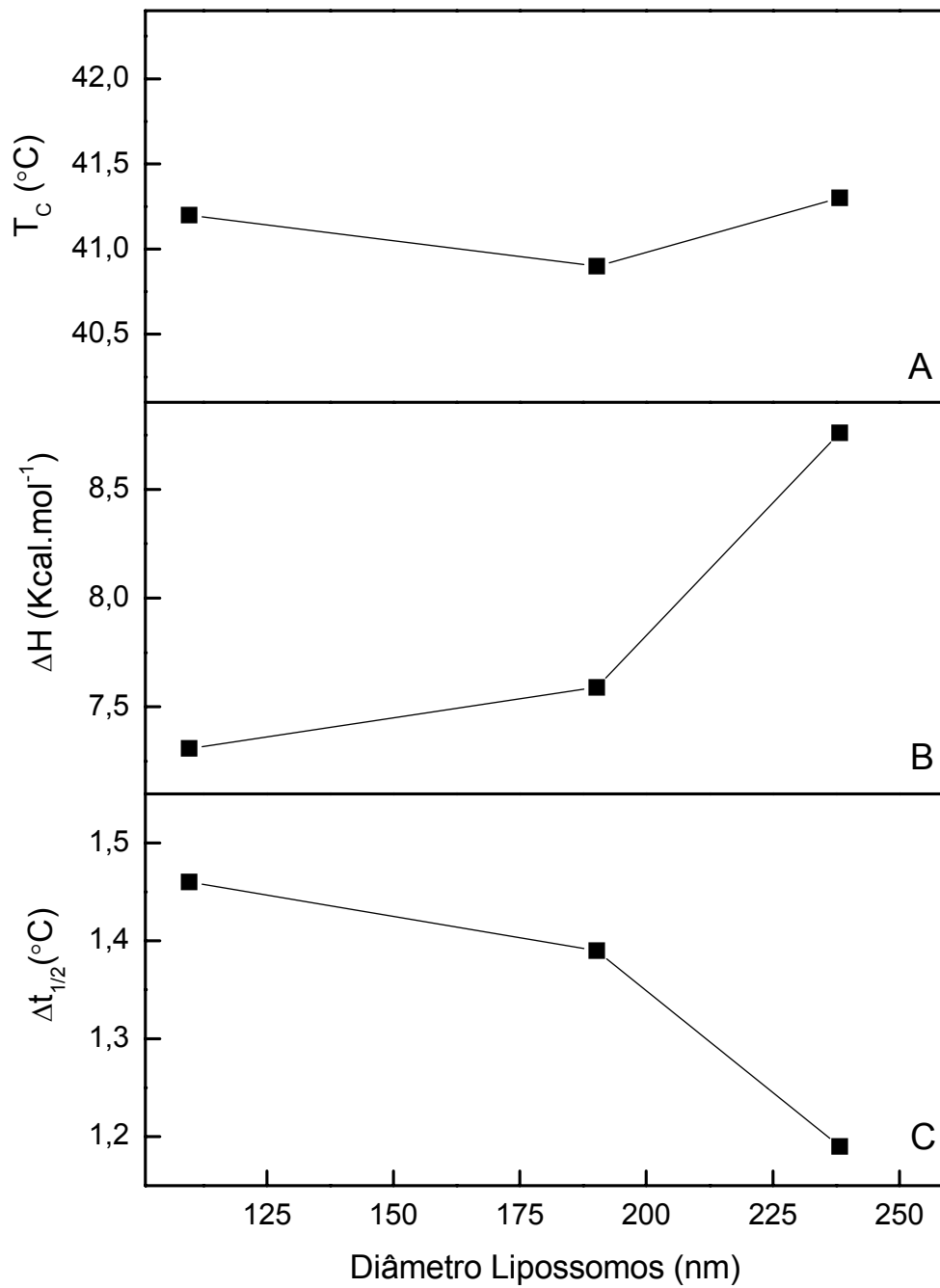
**Figura 9.** Efeito da curvatura da membrana nos parâmetros termodinâmicos. Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para lipossomos constituídos de DPPC com diâmetros médios de: **(A)** 238,2 nm, **(B)** 190,2 nm e **(C)** 109,7 nm.

Resultados similares foram obtidos por Sesana et al. (2008), o qual estudou como o raio de curvatura da membrana afeta a atividade enzimática de proteínas com ancoras de GPI. Entretanto, a inserção da enzima ao modelo foi feito por cosolubilização, resultando em difícil determinação da proporção inserida na parte interna ou externa da membrana. Em nossos estudos, os proteolipossomos foram formados pelo método de inserção direta da enzima, havendo precisão da orientação da inserção pela parte externa do lipossomo, mostrando assim ser um método mais adequado para tal estudo.

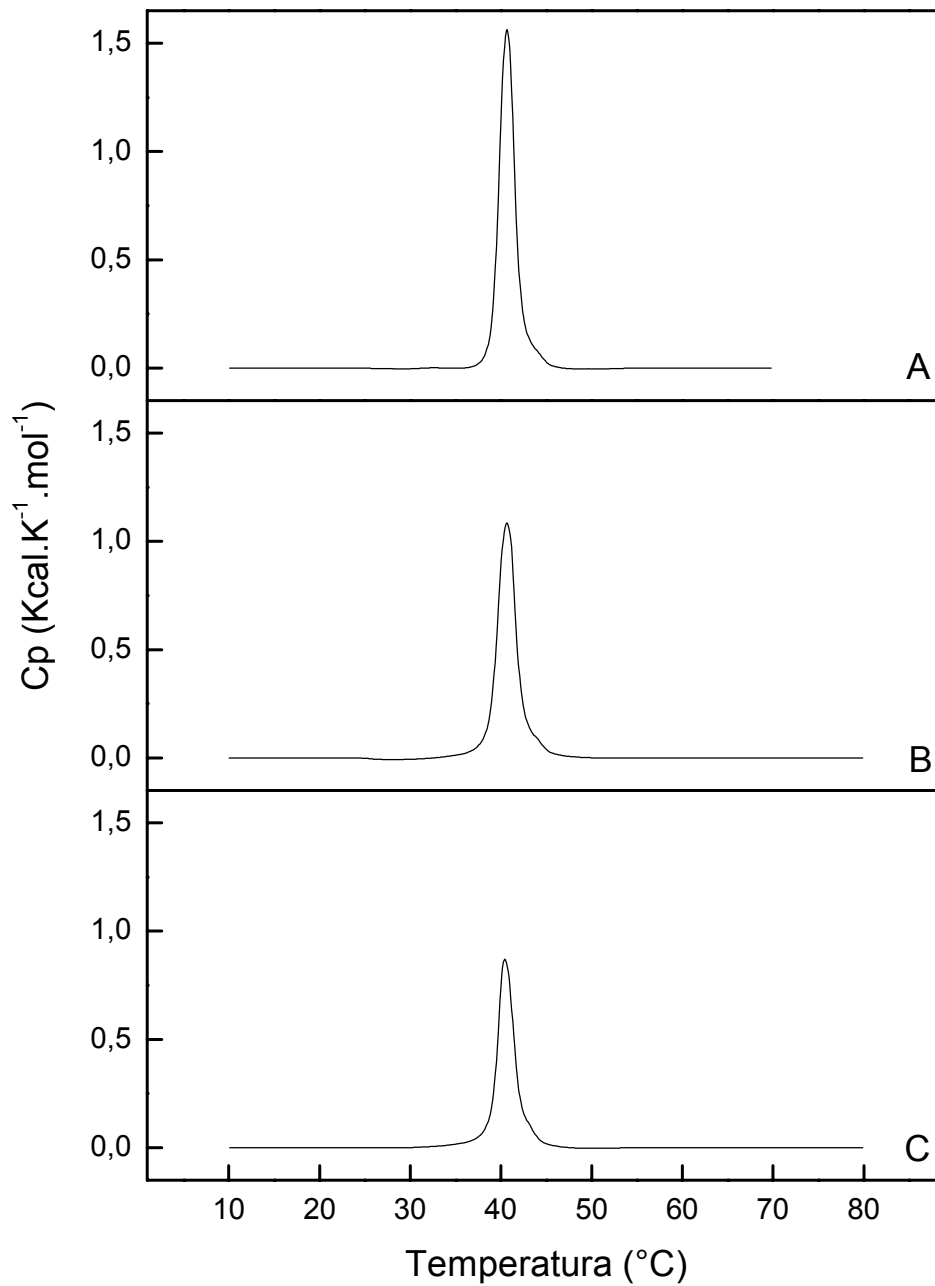
Os parâmetros termodinâmicos para os sistemas de proteolipossomos formados apresentam o mesmo perfil quando comparados aos lipossomos, uma vez que a  $T_c$  não foi alterada, os valores de  $\Delta H$  aumentaram e os valores de  $\Delta t_{1/2}$  diminuíram com o aumento do diâmetro das vesículas. Entretanto, considerando os valores absolutos apresentados da Tabela 3, observa-se uma considerável redução nos valores de  $\Delta H$  dos proteolipossomos em relação aos lipossomos, demonstrando a formação de sistemas mais instáveis e fluidos. A inserção da enzima provoca um alargamento nos termogramas dos proteolipossomos, tornando a transição de fase gel a líquido-cristalina menos cooperativa.

**Tabela 4:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC (1 mg/mL) em diferentes diâmetros. Lipossomos e fosfatase alcalina foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.

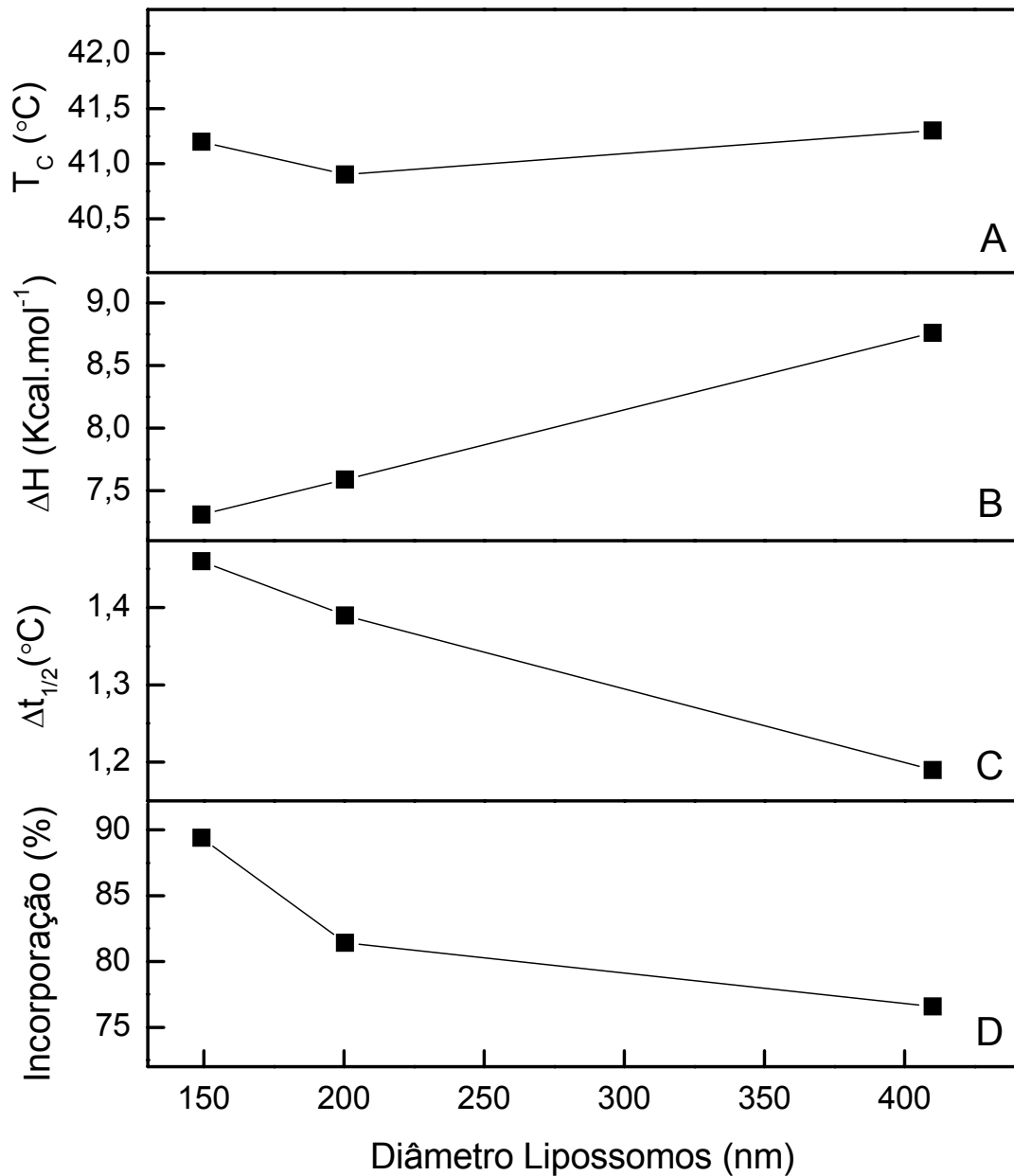
Diâmetro (nm)	IP	Incorporação (%)	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
149,1	0,28	89,4	2,24	40,4	2,19
200,3	0,14	81,4	3,30	40,7	2,35
410,0	0,30	76,6	3,80	40,7	1,98



**Figura 10:** Efeito do raio de curvatura da membrana de lipossomos nos parâmetros termodinâmicos: **(A)** Temperatura de transição, **(B)** Variação de Entalpia e **(C)** Cooperatividade.



**Figura 11.** Efeito da curvatura da membrana nos parâmetros termodinâmicos. Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para proteolipossomos constituídos de DPPC formados com diâmetros de: **(A)** 410,0 nm, **(B)** 200,3 nm e **(C)** 149,1 nm.



**Figura 12:** Efeito do raio de curvatura da membrana de proteolipossomos nos parâmetros termodinâmicos: **(A)** Temperatura de transição, **(B)** Variação de Entalpia, **(C)** Cooperatividade e **(D)** Porcentagem de incorporação.



#### **4.4 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas binários constituídos de DPPC:Chol em diferentes concentrações.**

O colesterol é um componente lipídico essencial das membranas plasmáticas de células de animais e é também encontrado em menores concentrações em certas membranas intracelulares em comunicação com a membrana plasmática. Embora ele tenha diferentes funções em células animais, um dos papéis primários dessa molécula são a modulação das propriedades físicas e organização lateral da bicamada lipídica da membrana plasmática, além de ser considerado essencial na formação dos “lipids rafts”. Acredita-se que a organização da membrana biológica em micro domínios tem um papel chave em vários processos celulares semelhante a receptores protéicos (proteínas alvo) e a transdução de sinal. A existência de micro domínios, também denominador de “rafts” tem sido explicada pela separação das membranas lipídicas em duas fases: líquida cristalina ( $L_{\alpha}$ ) e fase líquida ordenada ( $L_o$ ) rica em colesterol e esfingolipídios. Deste modo, Milhiet et al. (2002) demonstrou por microscopia de força atômica a inserção espontânea da fosfatase alcalina via GPI a micro domínios em fase ordenada ou na presença de colesterol.

No presente trabalho, visou-se estudar as modificações termodinâmicas provocadas pela presença do colesterol aos sistemas de lipossomos estudados, com o objetivo de identificar possíveis alterações que nos possibilitem na próxima etapa criar sistemas mais complexos (com a fosfatase alcalina) que mimetizem os “lipids rafts” presentes em bicamadas lipídicas.

Para isto, lipossomos constituídos de DPPC:Chol, em razões molares crescentes, foram preparados pelo método de extrusão utilizando membrana policarbonada de 100 nm. Os diâmetros médios destes sistemas foram analisados por espalhamento de luz (Tabela 5) e os termogramas estão apresentados na Figura 13.

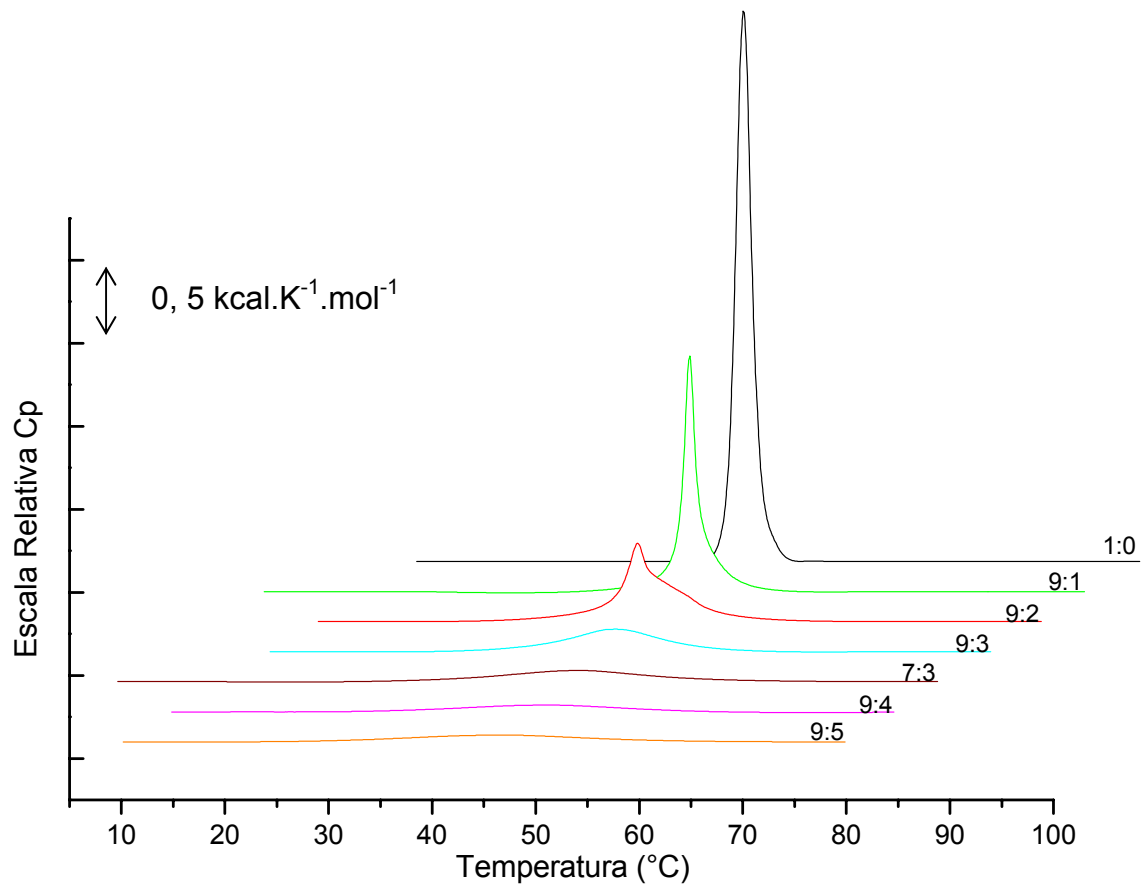
Pode-se observar na Figura 14-A um progressivo aumento no diâmetro médio dos lipossomos constituídos por DPPC:Chol, quando comparado com vesículas formadas apenas por DPPC, porém obtive-se valores de IP baixos para todos os sistemas analisados, demonstrando que as amostras apresentaram valores homogêneos de diâmetros médios.

Como a solubilidade do colesterol em bicamadas de PC é 0,66 em fração molar, existindo tendência para separação dos microcristais de monohidrato de

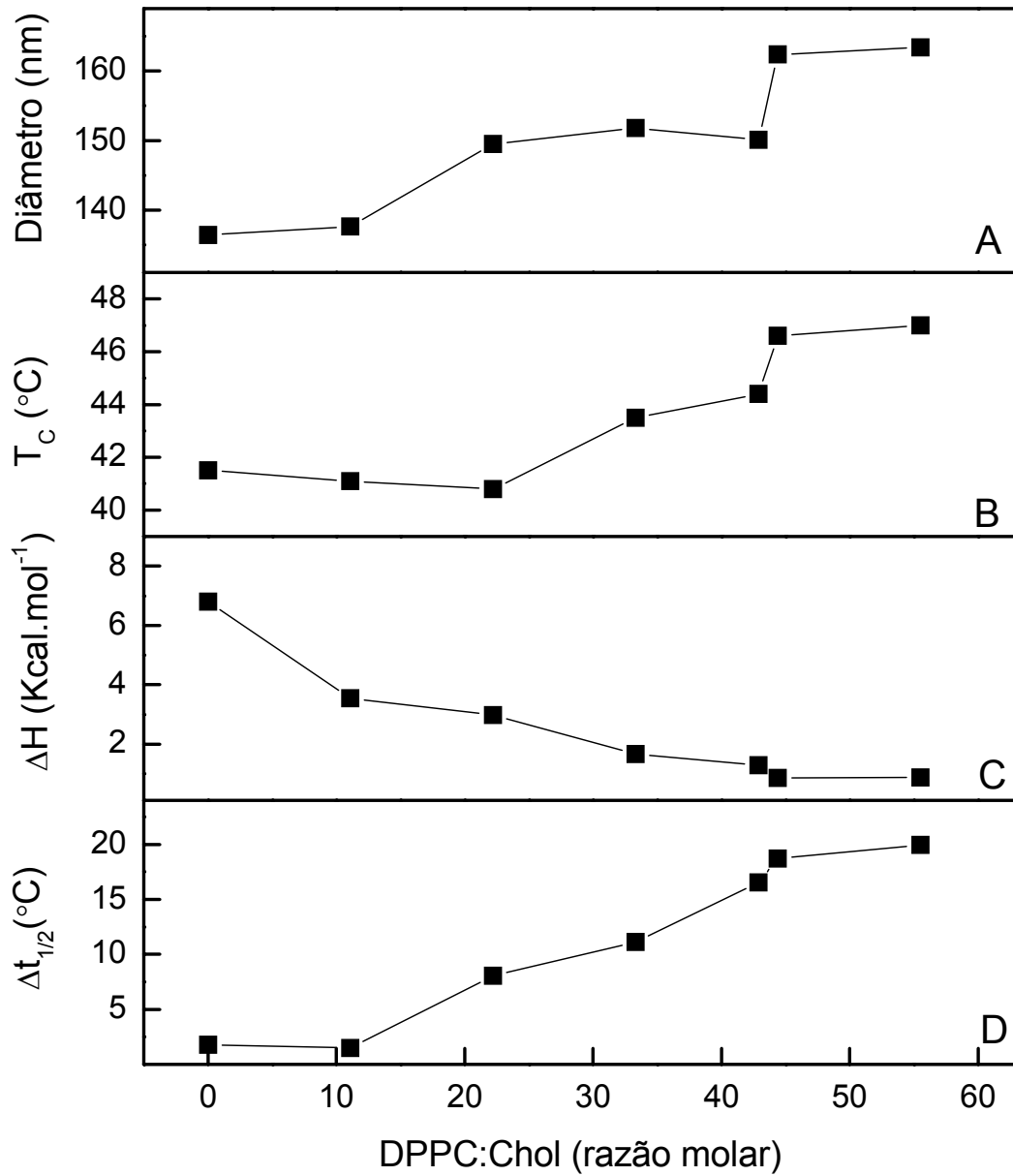
colesterol para frações de colesterol superiores, utilizou-se os lipossomos com frações molares de até 55%, em mol, de colesterol. Em adição, estudos relatam que a distinção de domínios ricos e pobres em colesterol quando este é inserido em bicamadas de fosfolipídios, não são detectáveis por DSC quando a concentração do esterol está acima de 50 mol% (McMullen, 1993). Estas amostras foram analisadas por DSC e os dados obtidos estão na Tabela 5.

**Tabela 5:** Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções.

DPPC:Chol (razão molar)	Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
1:0	136,4	0,08	7,63	41,5	1,81
9:1	137,6	0,02	3,54	41,1	1,48
9:2	149,5	0,08	2,98	40,8	8,06
9:3	151,8	0,04	1,67	43,5	11,14
7:3	147,1	0,07	1,29	44,4	16,52
9:4	162,3	0,16	0,86	46,6	18,73
9:5	163,4	0,05	0,87	47,0	19,97



**Figura 13.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para lipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções, com concentração igual a 10 mg/mL, mostrando o progressivo alargamento dos picos de transição com o aumento na proporção de colesterol.



**Figura 14:** Efeito da concentração de colesterol em lipossomos constituídos de DPPC sobre os parâmetros termodinâmicos: **(A)** Diâmetro médio, **(B)** Temperatura de transição, **(C)** Variação de Entalpia e **(D)** Cooperatividade.

A partir dos resultados termodinâmicos apresentados na Figura 14-C, podemos observar um decréscimo nos valores de entalpia com o aumento da proporção de colesterol no lipossomo, demonstrando que o colesterol torna os sistemas lipídicos menos estáveis. Estes resultados são condizentes com os apresentados por Halling e Slotte (2004).

Também pode ser notado um pequeno aumento na temperatura de transição dos lipossomos com o aumento da proporção de colesterol (Figura 14-B). A inserção provoca um aumento da área por molécula em monocamadas na fase gel, podendo aumentar assim as interações lipídio/lipídio na monocamada, e conseqüentemente aumentando a temperatura de transição do sistema binário. Além disso, o DPPC possui uma geometria cilíndrica e devido seu raio de curvatura, apresenta-se na forma esférica vesicular (lipossomos). Esta geometria é apropriada para a inserção da molécula de colesterol nas lacunas entre as moléculas de DPPC, uma vez que o colesterol possui uma geometria cônica.

Através da Figura 13 é evidente observar um intenso e progressivo alargamento dos picos de transição devido ao aumento da concentração de colesterol nos sistemas lipídicos. Estes alargamentos ocorrem devido a uma diminuição da cooperatividade da transição de fase provocado pela presença de altas concentrações deste esterol. Este evento também foi descrito por Halling e Slotte (2004). Além disso, em concentrações de 10 a 22% de colesterol, é notória a segregação lateral de fase evidenciada por um ombro largo à direita do pico de transição principal, indicando a formação de regiões ricas em colesterol.

Um dos principais efeitos da incorporação do colesterol em sistemas lipídicos é uma eventual eliminação da transição de fase cooperativa gel a líquido-cristalino e sua substituição por uma fase com um grau de organização intermediário. Então, na fase líquido-cristalino, a qual deve existir a temperaturas fisiológicas na ausência de esterol em membranas biológicas, a presença do colesterol aumenta significativamente a orientação das cadeias hidrocarbônicas e diminui a área ocupada pelas moléculas de fosfolipídios. Além disso, a presença do colesterol aumenta a espessura e força mecânica e diminui a permeabilidade da bicamada fosfolipídica na fase líquido-cristalina (Mannock et al., 2006).

Um grande número de técnicas tem sido usado para investigar a influência do colesterol nas bicamadas, tais como espectroscopias de ESR, NMR e fluorescência, bem como calorimetria e estudos teóricos. Estes estudos demonstram os seguintes

efeitos: do ponto de vista termodinâmico, alargamento e eventual eliminação da transição de fase gel/fluido para proporções elevadas de colesterol. Além disso, a eliminação da pré-transição, no caso de lipídios que a sofram, ocorre para uma concentração de colesterol relativamente baixa (Loura e Almeida, 2004). Este último evento resgatado da literatura foi reproduzido em nossos experimentos, uma vez que em baixas concentrações de colesterol a pré-transição referente ao DPPC foi eliminada.

Outros efeitos do colesterol são ainda: aumento da área por molécula em monocamadas na fase gel e o inverso para a fase fluida; diminuição da ordem orientacional das cadeias na fase gel (aumento do número de conformações gauche), e o inverso para a fase fluida; aumento da permeabilidade passiva de bicamadas na fase gel e o inverso para a fase fluida. Torna-se claro que estes efeitos estão correlacionados com as alterações termotrópicas acima descritas (Loura e Almeida, 2004).

Tais observações indicam que o colesterol incorporado em membranas faz com que a estrutura da bicamada se torne intermediária entre o gel e o fluido. Para vesículas na fase gel, o colesterol introduz alterações em propriedades características de fase no sentido de torná-la mais fluida ocorrendo o inverso acima da  $T_c$  (Loura e Almeida, 2004).

Quando o colesterol foi utilizado com até 11% (DPPC:Chol - 9:1 razão molar) nos sistemas de lipossomos, detectou-se um ligeiro aumento na cooperatividade da transição de fase, evidenciado com uma diminuição nos valores de  $\Delta t_{1/2}$  de 1,81°C para 1,48°C (Figura 14-D). Este fato sugere que em baixas concentrações o colesterol é capaz de estabilizar as vesículas, devido a sua geometria cônica que é apropriada para interação em bicamadas lipídicas. Estudos de difração de raios-X revelam que a molécula de esterol se insere com seu eixo principal normal à bicamada, e com o grupo hidroxilo próximo dos carbonilos fosfolipídicos (Loura e Almeida, 2004).

Os parâmetros termodinâmicos para os sistemas de proteolipossomos formados apresentam o mesmo perfil quando comparados aos lipossomos (Figura 15), com um pequeno aumento na  $T_c$  (Figura 16-A), diminuição dos valores de  $\Delta H$  (Figura 16-B) e por fim um expressivo aumento nos valores de  $\Delta t_{1/2}$  com o aumento da concentração de colesterol nas vesículas (Figura 16-C).

Entretanto, considerando os valores absolutos apresentados nas Tabelas 5 e

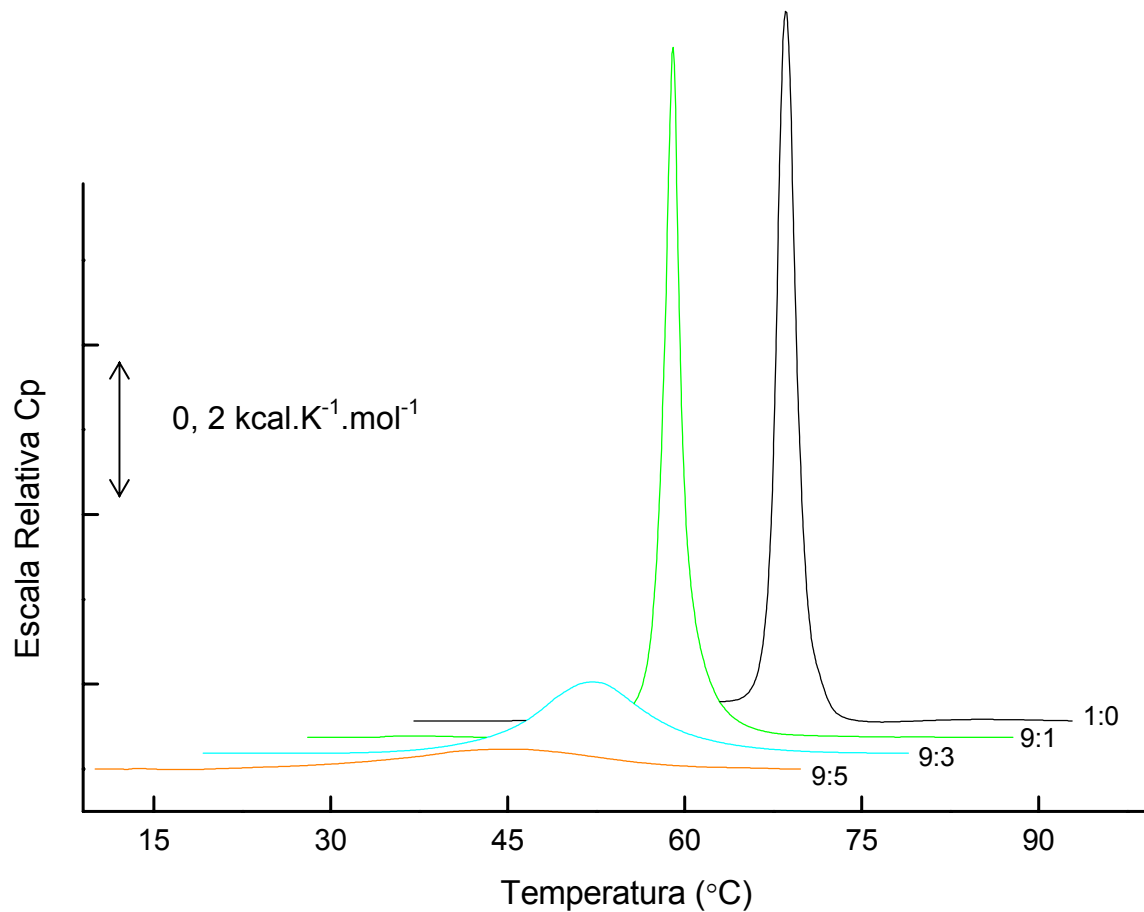
6, observa-se uma considerável redução nos valores de  $\Delta H$  e aumento nos valores de  $\Delta t_{1/2}$  dos proteolipossomos em relação aos lipossomos, demonstrando a formação de sistemas mais instáveis e fluidos, chegando até a coexistência das duas fases, uma vez que o alargamento do pico de transição torna-se muito brusco.

Os resultados dos estudos da influência do colesterol na porcentagem de incorporação da enzima aos sistemas lipossomais estão mostrados na Figura 17, a qual demonstra que o colesterol apresenta um efeito negativo, podendo reduzir a inserção da atividade catalítica em até 42%, quando utilizada a composição lipídica de 9:5 DPPC:Chol (Tabela 6).

**Tabela 6:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções. Lipossomos e fosfatase alcalina foram incubados por 1 hora à temperatura ambiente conforme descrito no item 3.8 de Material e Métodos.

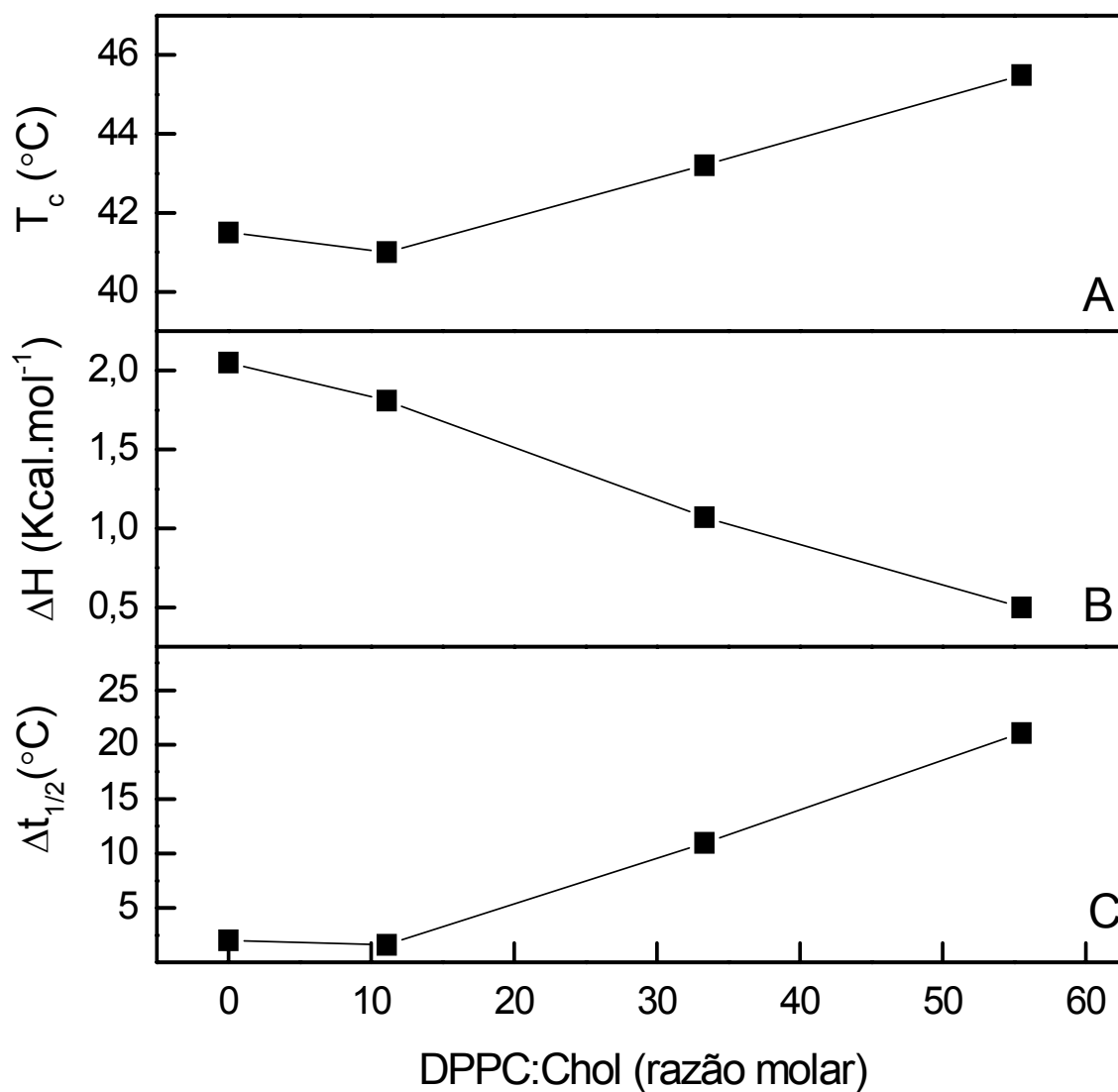
DPPC:Chol (razão molar)	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
1:0	85,0	152,5	0,12	2,05	41,5	2,00
9:1	62,1	180,3	0,12	1,81	41,0	1,60
9:3	58,0	183,2	0,11	1,07	43,2	10,96
9:5	49,3	197,1	0,03	0,50	45,5	21,07

Não há relatos do uso destes sistemas na reconstituição da fosfatase alcalina, sendo esta abordagem inédita. Assim, não foi possível relacionar os dados aqui apresentados aos dados da literatura.

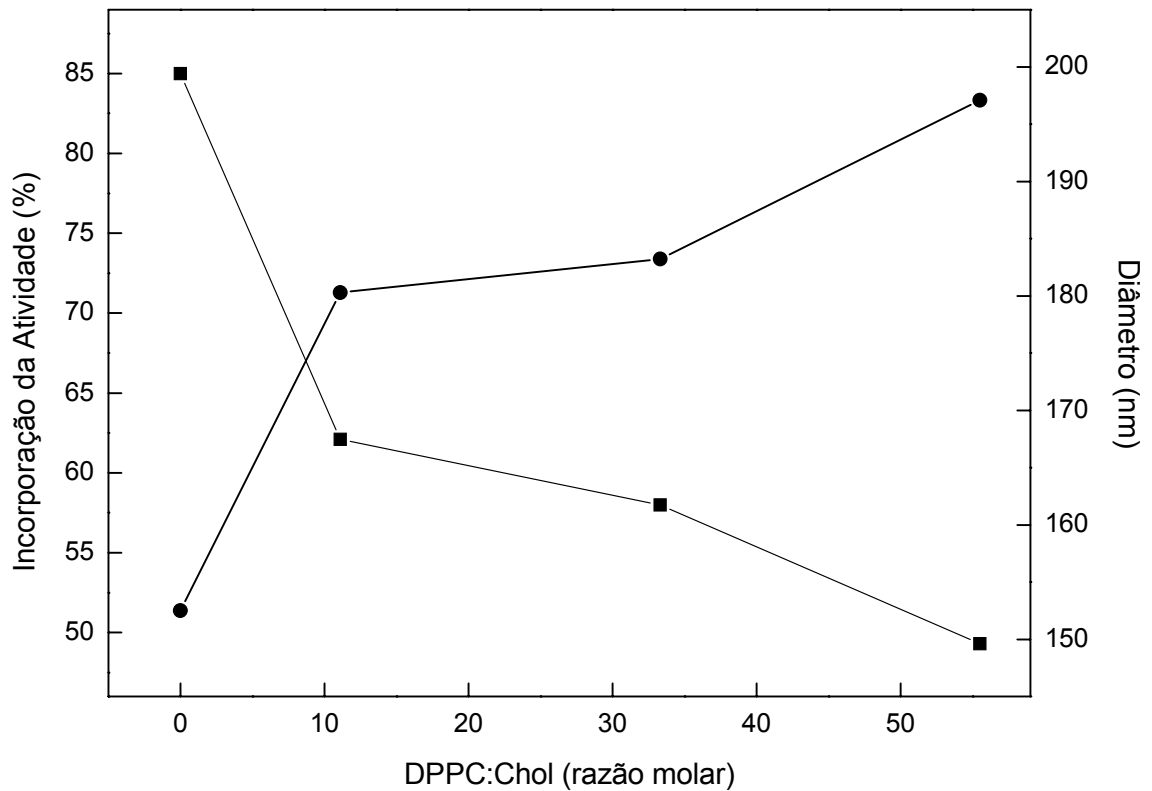


**Figura 15.** Termograma Cp (kcal / K mol) vs. T (°C) para proteolipossomos constituídos de DPPC e Colesterol em diferentes proporções, com concentração igual a 10 mg/mL, mostrando o progressivo alargamento dos picos de transição com o aumento na proporção de colesterol.





**Figura 16.** Efeito da concentração de colesterol em proteolipossomos constituídos de DPPC sobre os parâmetros termodinâmicos: **(A)** Temperatura de transição, **(B)** Variação de Entalpia e **(C)** Cooperatividade.



**Figura 17.** Efeito do aumento da proporção do colesterol em lipossomos constituídos de DPPC na incorporação da fosfatase alcalina: avaliação da (■) incorporação da atividade enzimática e (●) monitoramento do diâmetro das vesículas formadas.

#### **4.5 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas terciários constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1.**

Uma vez estudado o efeito da concentração de colesterol na incorporação da enzima e no comportamento biofísico do sistema binário formado, caminhamos na busca de sistemas lipossomais de composição mais complexa na tentativa de obter melhores sistemas modelos, uma vez que as biomembranas são compostas por uma variedade grande de lipídios. Assim escolhemos componentes como a SM e o GM1 para adicionarmos aos sistemas já estudados. Estes componentes foram escolhidos devido a relatos da presença dos mesmos em lipids rafts, como podemos observar nas referências abaixo.

SM e PC são os maiores constituintes da parte externa da membrana plasmática de células eucarióticas (Koval e Pagano, 1991). Na maioria dos tecidos de mamíferos a SM está presente de 2 a 15% no total de fosfolipídios, dependendo do tecido estudado. Resultados obtidos mostram uma substancial organização lateral desses dois lipídios e proteínas na membrana biológica (Simons e Ikonen, 1997; Brown, 1998; Brown e London 2000). Esfingolipídios, incluindo SM, juntamente com colesterol foram implicados no domínio lateral ou formação de “rafts” na membrana biológica.

SM naturais normalmente constituem uma mistura populacional com ligações-amida da cadeia hidrocarbônica diferenciando na largura e comprimento (de 16 a 24 carbonos) (Barenholz, 1984). A composição da cadeia hidrocarbônica da SM varia entre os tecidos, embora uma característica comum seja que as cadeias são excepcionalmente longas, dando à molécula uma natural assimetria. PCs possuem normalmente cadeias hidrocarbônicas moderadamente longas (16-18 carbonos) com comprimentos aproximadamente iguais (Merrill et al., 1997).

GM1, o mais complexo lipídio dos esfingolipídios, contem uma ceramida ligada à cadeia polar de oligossacarídeos contendo um ou mais resíduos de ácido siálico. Geralmente são encontrados em maiores concentrações no cérebro, porém estão presentes em muitos tipos de células e foram conhecidos por residir exclusivamente na monocamada extracelular das membranas biológicas (Fishman and Brady, 1976). Em sistemas utilizados como modelos de membranas, por exemplo, vesículas unilamelares, foi apresentado que GM1 distribuem-se entre as duas superfícies das monocamadas (Cestaro et al., 1980; Maggio et al., 1988).

Após escolha dos componentes, lipossomos constituídos de DPPC:Chol (9:1), DPPC:Chol:SM (8:1:1) e DPPC:Chol GM1 (8:1:1) (razões molares), com concentração de 10 mg/mL, foram preparados segundo item 3.4 do Material e Métodos e avaliados pela técnica de espalhamento de luz, apresentando diâmetros médios relativamente condizentes com a membrana utilizada no método de extrusão (100 nm). Além disso, obtiveram-se baixos valores de IP para todas as amostras. Estes dados podem ser observados na Tabela 7.

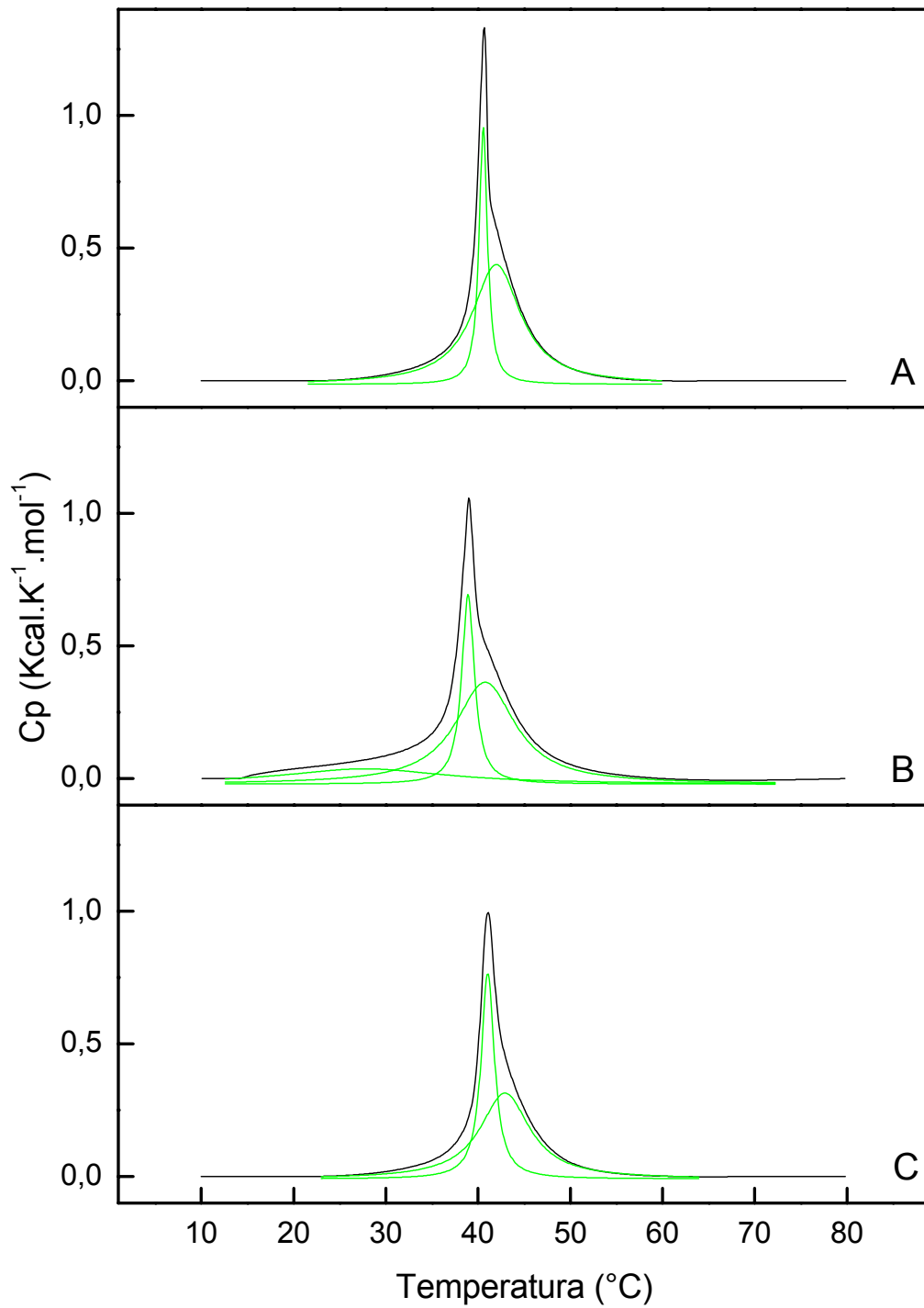
**Tabela 7:** Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para lipossomos constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1, com concentração igual a 10 mg/mL.

Razão Molar	Diâmetro (nm)	IP	Pico	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
DPPC:Chol (9:1)	175,5	0,09	1*	1,64	40,6	1,08
			2	4,52	42,0	6,37
DPPC:Chol:SM (8:1:1)	146,1	0,10	1	2,29	27,8	23,52
			2*	1,87	38,9	1,66
			3	4,79	40,8	7,98
DPPC:Chol:GM1(8:1:1)	169,6	0,27	1*	2,12	41,1	1,75
			2	3,30	42,9	6,51

(\*) Transição Principal.

Os sistemas de lipossomos formados foram analisados por calorimetria, resultando nos termogramas apresentados na Figura 18. Em todos os termogramas foram feitas análises de deconvolução para melhor resolução dos distintos picos existentes em cada caso.

Através das análises apresentadas na Figura 18-A pode-se notar que lipossomos formados por DPPC:Chol (9:1) sofrem segregação lateral de fase, com formação de domínios ricos em colesterol na membrana. Este fato pode ser analisado com a separação dos picos característicos para os dois componentes, DPPC e Chol, através de análises de deconvolução.



**Figura 18.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Lipossomos constituídos de: **(A)** DPPC:Chol (9:1), **(B)** DPPC:Chol:SM (8:1:1) e **(C)** DPPC:Chol:GM1 (8:1:1), razões molares.

A inserção da SM no sistema DPPC:Chol proporcionou um alargamento considerável em todos os picos apresentados na Figura 18-B, aumentando todos os valores de  $\Delta t_{1/2}$  apresentados na Tabela 7, evidenciando assim uma diminuição na cooperatividade da transição de fase. Além disso, uma larga transição centrada em  $T_C = 27,8^\circ\text{C}$  pode ser observada neste termograma, podendo ser relacionada à pré-transição da SM ou do DPPC. A entalpia total do sistema DPPC:Chol:SM ( $8,95 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) aumentou em relação ao sistema binário DPPC:Chol ( $6,16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Este efeito pode ser explicado pela geometria da molécula da SM, capaz de estabilizar a membrana através das interações das pontes de hidrogênio entre as cadeias hidrocarbônicas.

Ao contrário do colesterol, é conhecido que GM1 quando adicionado em vesículas constituídas de DPPC não sofre segregação lateral de fase (Sillerud, 1979; Masserini et al. 1986), e com tal dado podemos constatar através da Figura 18-C que a segregação lateral de fase com pico centrado em uma temperatura de transição maior ( $T_C = 42,9^\circ\text{C}$ ) se refere ao domínio rico em colesterol. Neste caso, a presença do GM1 no sistema terciário influencia principalmente na variação de entalpia e na cooperatividade da transição de fase.

Estudos de DSC e difração de raios-X mostraram que GM1 de cérebro bovino, com baixa hidratação, exibem uma larga transição térmica e forma uma fase hexagonal cilíndrica, ao invés de bicamada (Curatolo et al., 1977). Dispersões aquosas com gangliosídeos e DPPC de gema de ovo foram examinadas usando microscopia eletrônica; estruturas lamelares foram observadas em baixas concentrações de gangliosídeos (<30%), micelas esféricas em altas concentrações de gangliosídeos (>80%) e estruturas cilíndricas na proporção de 45:48% GM1:DPPC, respectivamente. Isso sugere que a estrutura cilíndrica representou um intermediário na conversão da fase lamelar para a fase micelar (Hill and Lester, 1972). É importante salientar que as curvas de DSC obtidas para GM1, sozinho ou em sistemas vesiculares na presença de DPPC, descritas por Reed e Shipley (1996) são de difícil comparação, pois apresentaram picos muito largos além de terem sido obtidos com velocidades de aquecimento e resfriamento muito grandes, o que contribui para uma perda na qualidade das medidas.

Uma vez analisados os comportamentos termotrópicos dos lipossomos acima mencionados, a fosfatase alcalina foi incubada por 1 hora com tais sistemas segundo item 3.8 de Material e Métodos.

Os proteolipossomos formados foram avaliados pela técnica de espalhamento de luz e os valores de diâmetros médios e polidispersão estão apresentados na Tabela 8. As análises de DSC feitas para tais sistemas resultaram nos termogramas apresentados na Figura 19.

**Tabela 8:** Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol enriquecidos com SM e GM1, com concentração igual a 10 mg/mL.

Razão Molar	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	Pico	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
DPPC:Chol (9:1)	62,1	132,7	0,11	1*	0,58	40,4	1,59
				2	1,17	42,4	5,75
DPPC:Chol:SM (8:1:1)	30,2	136,3	0,12	1*	0,56	38,6	1,93
				2	1,24	41,0	7,18
DPPC:Chol:GM1 (8:1:1)	30,6	127,5	0,22	1*	0,45	40,4	2,32
				2	1,48	43,1	7,11

(\*) Transição Principal

Através da Figura 19-A referente ao termograma dos proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol (9:1), pode-se notar a presença de dois picos distintos referentes à segregação lateral de fase, com formação de domínios ricos em colesterol na membrana. Desta forma, pode-se salientar que a enzima não é capaz de influenciar no perfil calorimétrico deste sistema, entretanto os parâmetros termodinâmicos são expressivamente alterados. Comparando-se os valores dos parâmetros termodinâmicos dos lipossomos apresentados na Tabela 7 com os parâmetros dos proteolipossomos da Tabela 8, pode-se observar uma intensa diminuição nos valores totais de entalpia, demonstrando o quanto a enzima é capaz de desestabilizar e fluidificar o sistema. Os valores de temperatura de transição não foram significativamente alterados. Em relação à cooperatividade, pode-se notar através dos valores de  $\Delta t_{1/2}$  apresentados na Tabela 8 que o primeiro pico centrado em 40°C torna-se um pouco mais largo, porém o segundo pico centrado em 42°C

torna-se levemente mais cooperativo, apresentando menor valor de  $\Delta t_{1/2}$ .

A reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos de DPPC:Chol resultou em uma incorporação de 62,1% da atividade catalítica, demonstrando que a presença do colesterol tem um efeito negativo na incorporação da enzima.

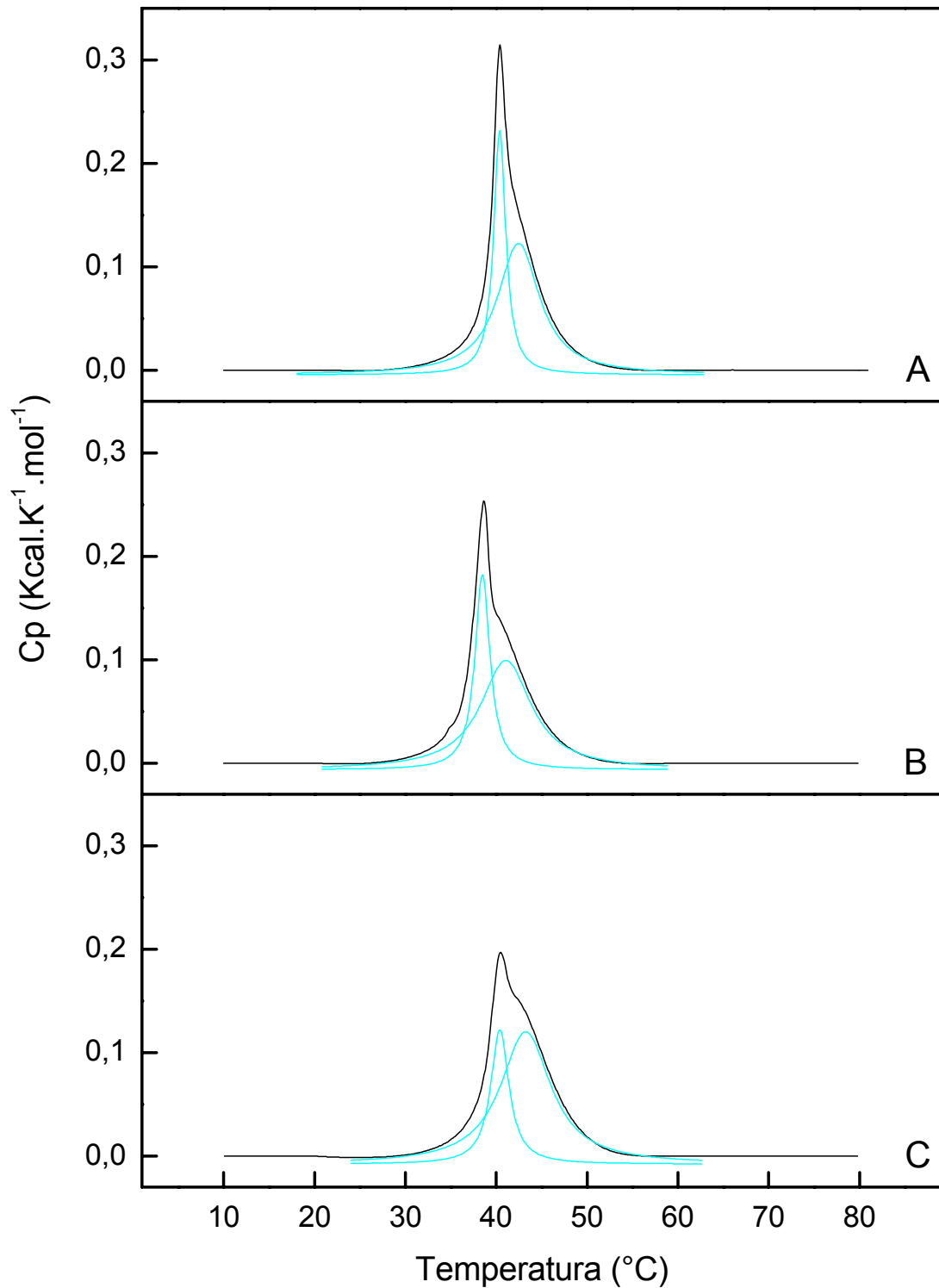
Na Figuras 16-B e 16-C pode-se observar os perfis dos termogramas para os proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol:SM e DPPC:Chol:GM1 (8:1:1) razão molar, respectivamente. No primeiro caso vemos que na presença da enzima o pico referente à pré-transição é eliminado. No segundo caso o perfil se mantém muito parecido quando comparado ao sistema de lipossomo.

Comparando os valores termodinâmicos para os dois casos, pode-se analisar que a presença da enzima desestabiliza e fluidifica os sistemas, pois os valores de  $\Delta H$  são intensamente reduzidos. Entretanto, os valores de  $T_C$  e  $\Delta t_{1/2}$  não foram significativamente alterados.

A reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos que possuem SM e GM1 na composição resultou em uma incorporação de em torno de 30% da atividade catalítica, demonstrando que a presença desses lipídios tem um efeito negativo ainda maior na incorporação da enzima quando comparados com os valores obtidos para proteolipossomos na presença de colesterol.

Sesana et al. (2008) mostraram que a presença de GM1 nos sistemas PC/Chol reduz o diâmetro dos lipossomos e a  $V_{max}$  de hidrólise é ligeiramente aumentada, enquanto que a presença de SM no mesmo sistema não influencia significativamente no diâmetro, mas proporciona um pequeno aumento na  $V_{max}$  de hidrólise.





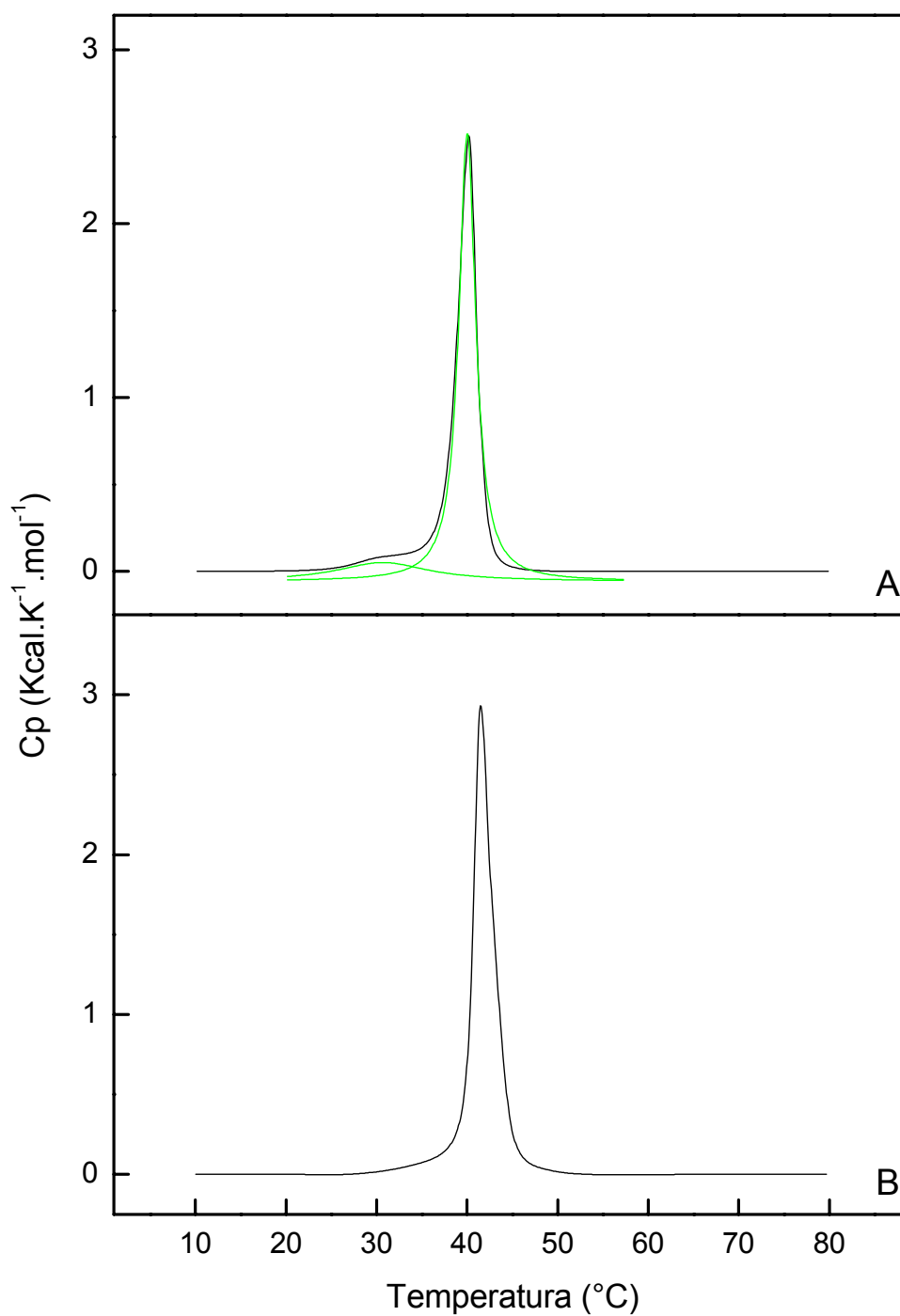
**Figura 19.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Proteolipossomos constituídos de: **(A)** DPPC:Chol (9:1), **(B)** DPPC:Chol:SM (8:1:1) e **(C)** DPPC:Chol:GM1 (8:1:1), razões molares.

#### 4.6 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas binários constituídos de DPPC:SM e DPPC:GM1.

Após realizados estudos com sistemas terciários formados com DPPC:Cho:SM e DPPC:Chol:GM1, necessitamos focar nossos estudos aos efeitos da esfingomielina e do gangliosídeo separadamente nos sistemas constituídos de DPPC. Com esse enfoque, análises de DSC foram realizadas para lipossomos constituídos de DPPC:SM e DPPC:GM1 (9:1) razão molar. Tais termogramas estão apresentados na Figura 20.

Através de análises de deconvolução, pode-se observar na Figura 20-A a presença de uma pré-transição centrada em uma  $T_C = 29,0^\circ\text{C}$  e um pico de transição principal em  $T_C = 40,0^\circ\text{C}$ . Estes dados são comparáveis aos encontrados na literatura, onde foi encontrada uma  $T_C$  para SM (16:0) aproximadamente de  $41^\circ\text{C}$ , com uma pequena pré-transição em  $29^\circ\text{C}$  (Bar et al., 1997; Ramstedt e Slotte, 1999).

SM e PC têm formas moleculares regularmente cilíndricas, formando bicamadas quando hidratados para minimizar a energia livre (Marsh, 1991). Entretanto, a SM exibe um comportamento na membrana mais complexo que PC (Barenholz, 1984; Koynova e Caffrey, 1995; Bar et al., 1997). O comportamento termotrópico de SMs sintéticos parece corresponder aos PCs sintéticos. SMs com cadeias hidrocarbônicas saturadas com comprimento de 16 a 24 carbonos possuem transição principal entre  $37$  e  $48^\circ\text{C}$ , com um aumento, embora não linear, na temperatura com o aumento da cadeia carbônica (Koynova e Caffrey, 1995). Em uma revisão na literatura em relação ao comportamento termotrópico da SM, Koynova e Caffrey (1995) dizem que a entalpia de transição exibida foi descontínua e o aumento da  $T_C$  com o comprimento da cadeia carbônica foi nivelado no comprimento da cadeia com 20 carbonos. Os valores de  $T_C$  para a SM são geralmente menos afetados pela inserção de cis-insaturações dentro da cadeia carbônica quando comparados com outros fosfolipídios. Este fenômeno foi atribuído a estabilização da bicamada por ligações de hidrogênio (Koynova e Caffrey, 1995).



**Figura 20.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Lipossomos constituídos de: **(A)** DPPC:SM (9:1) e **(B)** DPPC:GM1 (9:1), razões molares.

É conhecido que o empacotamento em membranas de colesterol e esfingomielina se diferenciam das membranas constituídas de DPPC:Chol (Li et al. 2001; Snyder e Freire, 1980; Needham e Nunn, 1990). A compressibilidade de membranas contendo SM/Chol foi de fato muito melhor do que em membranas compostas por DPPC com igual concentração de colesterol (Li et al. 2001; Needham e Nunn, 1990). Além disso, a permeabilidade de água foi menor em SM/Chol do que em DPPC/Chol, indicando a formação de um empacotamento mais eficiente.

Através dos dados da Tabela 9 é possível observar um significativo aumento no valor de variação de entalpia para o sistema DPPC:SM ( $\Delta H = 8,89 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) em relação ao sistema DPPC:Chol ( $\Delta H_{\text{total}} = 6,16 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) apresentado na Tabela 7. Este fato demonstra que a geometria da molécula da SM é capaz de estabilizar a membrana composta de DPPC. Este empacotamento mais eficiente em parte pode ser explicado por uma melhor atração das forças de van der Waals entre as cadeias hidrocarbônicas saturadas da SM com as do DPPC.

**Tabela 9:** Valores de espalhamento de luz e parâmetros termodinâmicos para sistemas binários de lipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas, com concentração igual a 10 mg/mL.

Razão Molar (9:1)	Diâmetro (nm)	IP	Pico	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
DPPC:SM	168,4	0,13	1	0,91	29,0	8,02
			2*	8,89	40,0	2,20
DPPC:GM1	178,5	0,95	1	9,33	41,5	2,29

(\*) Transição Principal

A adição de GM1 às vesículas de DPPC, não foi capaz de afetar a temperatura de transição característica do DPPC (41,5°C), evidenciando apenas um pequeno alargamento do pico com diminuição da cooperatividade da transição de fase do sistema (Figura 20-B). Estes dados podem ser relacionados com resultados encontrados por Reed e Shipley (1996), o qual mostra um pequeno efeito na TC e alargamento do pico de transição de fase do DPPC com adição de até 9,5% em mol

de GM1.

Através dos dados da Tabela 9 observa-se que a presença de GM1 foi capaz de aumentar a variação de entalpia, tornando assim os sistemas vesiculares mais estáveis.

É importante ressaltar que em nenhum dos termogramas acima analisados (DPPC:SM e DPPC:GM1) foi detectado segregação lateral de fase, utilizando a razão molar de 9:1. Confirma-se assim que o colesterol é o responsável por tal evento quando as análises de deconvolução foram feitas para os termogramas referentes aos sistemas terciários DPPC:Chol:SM e DPPC:Chol:GM1 no item 4.5.

Padronizados os estudos calorimétricos para os sistemas de lipossomos, foram realizados estudos com sistemas de proteolipossomos. Para isso, a fosfatase alcalina foi incubada por 1 hora com os sistemas acima mencionados segundo item 3.8 de Material e Métodos. Os proteolipossomos formados foram avaliados pela técnica de espalhamento de luz e os valores de diâmetros médios e polidispersão estão apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas binários de proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas, com concentração igual a 10 mg/mL.

Razão Molar (9:1)	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	$T_c$ (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
DPPC:SM	21,9	133,1	0,09	2,71	39,6	2,60
DPPC:GM1	17,9	145,8	0,29	3,01	41,4	2,87

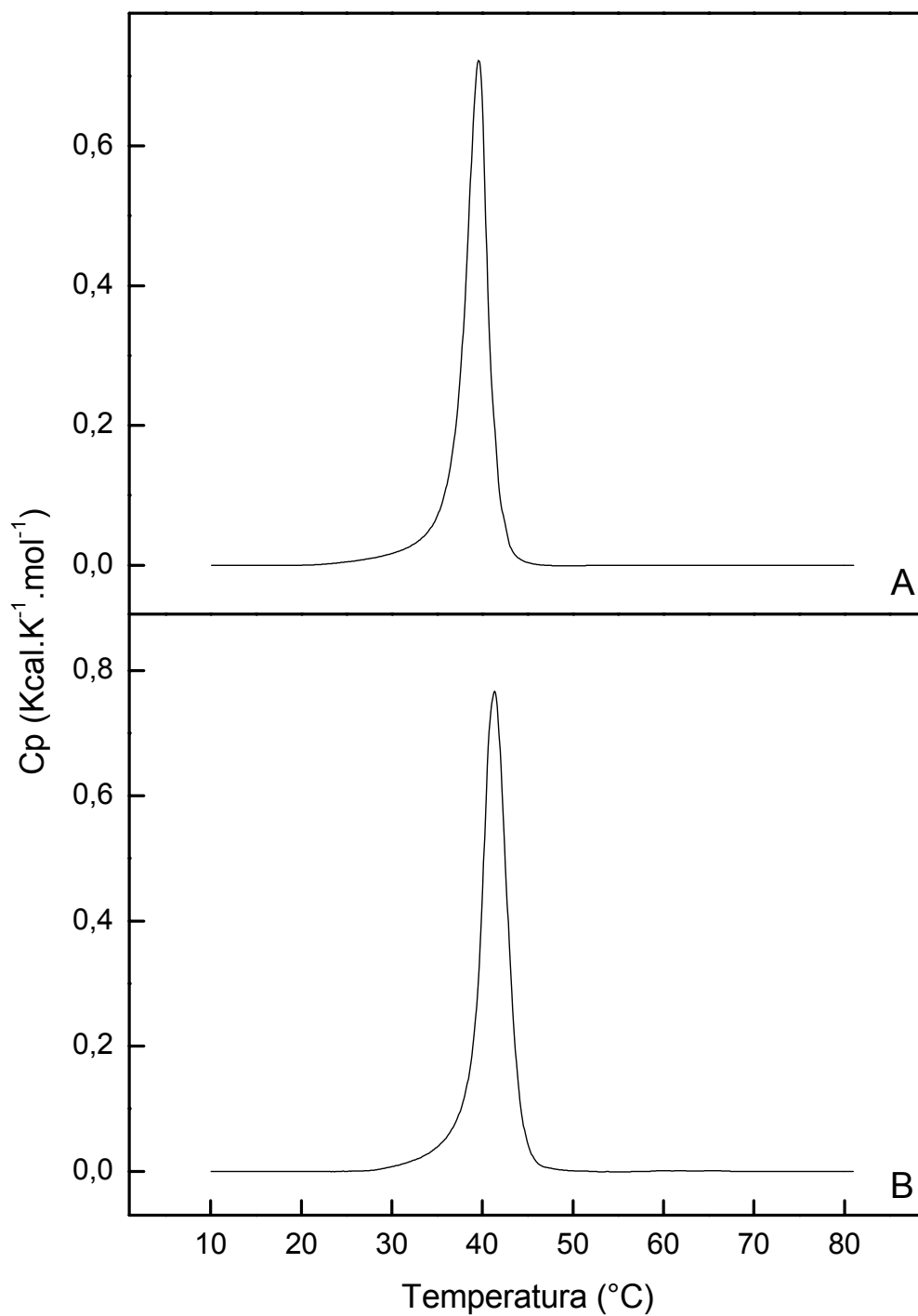
Através da Figura 21-A referente ao termograma dos proteolipossomos constituídos por DPPC:SM (9:1), pode-se notar que na presença da enzima o pico referente à pré-transição é eliminado. Em relação aos proteolipossomos DPPC:GM1 (9:1) apresentados na Figura 21-B, pode-se observar que a enzima não é capaz de influenciar no perfil calorimétrico deste sistema, entretanto os parâmetros termodinâmicos são expressivamente alterados. Comparando-se os valores dos parâmetros termodinâmicos dos lipossomos apresentados na Tabela 9 com os

parâmetros dos proteolipossomos da Tabela 10, pode-se observar uma intensa diminuição nos valores totais de entalpia, demonstrando o quanto a enzima é capaz de desestabilizar e fluidificar o sistema.

A presença da enzima não proporciona alterações significativas na temperatura de transição dos dois sistemas. A cooperatividade é levemente afetada com um pequeno alargamento dos picos, evidenciados pelos pequenos aumentos nos valores de  $\Delta t_{1/2}$  (Tabela 10).

Nos estudos de reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos de DPPC:SM e DPPC:GM1, obteve-se uma incorporação ao redor de 20% da atividade catalítica, demonstrando um efeito negativo ainda maior na incorporação da enzima quando comparado com os valores obtidos para os proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol.

Sesana et al. (2008) apresentou uma redução nos valores de  $V_{max}$  de hidrólise da fosfatase alcalina na presença de Chol e SM em proteolipossomos constituídos por uma matriz de PC. Além disso, houve um aumento nos diâmetros dos lipossomos. A presença GM1, entretanto, proporcionou um pequeno aumento na  $V_{max}$  de hidrólise e não alterou significativamente nos diâmetros dos lipossomos.



**Figura 21.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para Proteolipossomos constituídos de: **(A)** DPPC:SM (9:1) e **(B)** DPPC:GM1 (9:1), razões molares.

#### 4.7 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico do sistema terciário constituído de DPPC:SM:GM1.

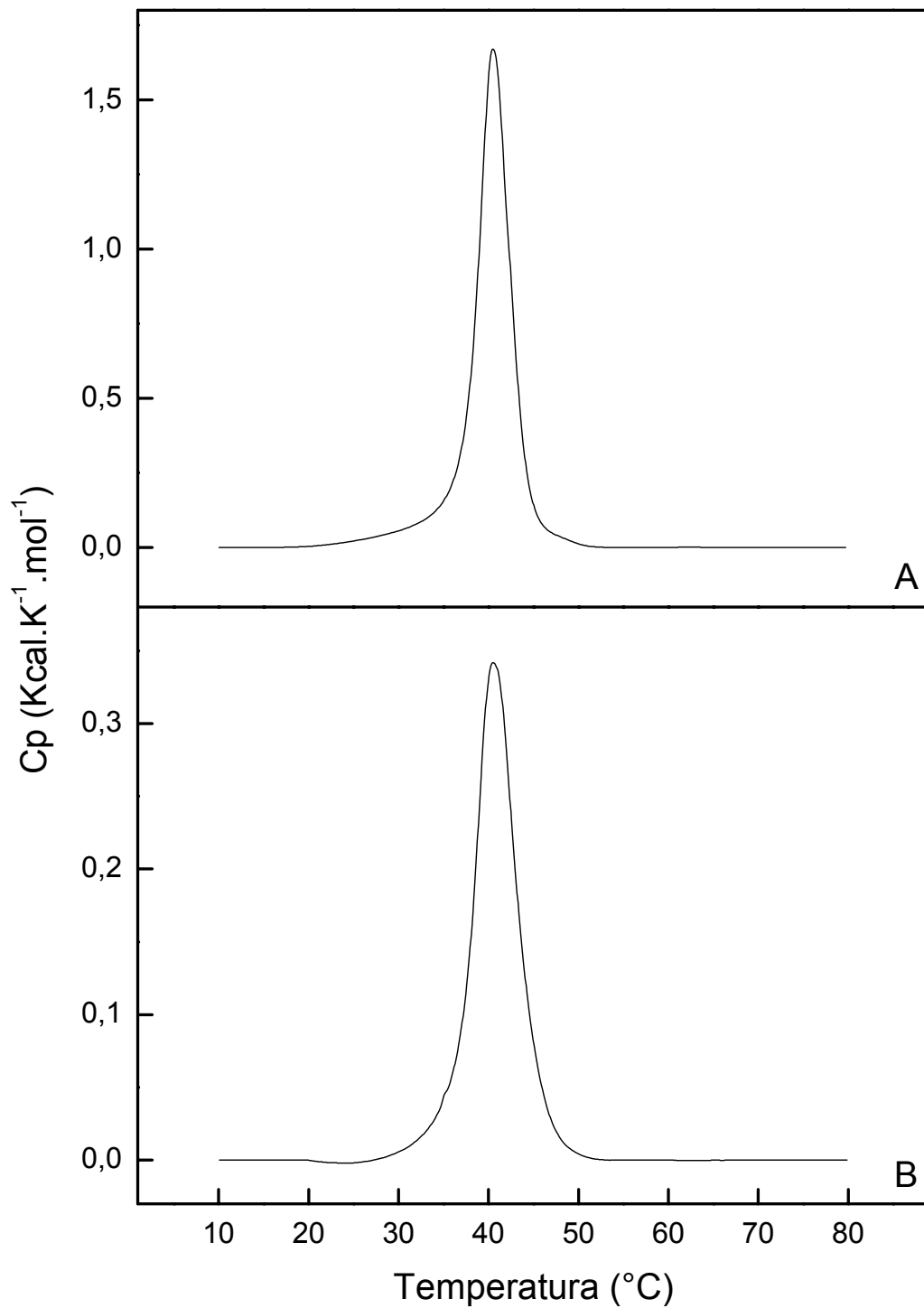
Para melhor entendimento em relação aos dados apresentados até o momento, foi necessário a realização de estudos envolvendo agora os sistemas terciários constituídos de DPPC:SM:GM1, ou seja na ausência de colesterol, para assim entender quais são as conseqüências provocadas pelas interações entre a SM e o GM1. Para isto, lipossomos constituídos por tais lipídios com a razão molar 8:1:1 e concentração de 10 mg/mL, foram feitos segundo item 3.7 Material e Métodos e avaliados pela técnica de espalhamento de luz. Os dados de diâmetros médios e valores de polidispersão estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas terciários constituídos de DPPC:SM:GM1 na relação molar de 8:1:1, com concentração igual a 10 mg/mL.

Vesículas	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
Lipossomos	----	245,7	0,72	8,42	40,5	3,70
Proteolipossomo	27,6	140,7	0,27	2,11	40,5	5,00

Os sistemas então formados foram analisados por calorimetria, resultando nos termogramas apresentados na Figura 22. Analisando a Figura 22-A é possível observar a eliminação do pico característico à pré-transição, centrado em torno de 29°C, o qual está presente no termograma obtido para os lipossomos DPPC:SM (9:1). Além disso, não foi detectada segregação lateral de fase para este sistema, confirmado assim que as interações entre SM e GM1, nestas condições, também não provocam a existência de micro domínios ricos em determinado composto.





**Figura 22.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para sistemas terciários constituídos de DPPC:SM:GM1 (8:1:1), razões molares: **(A)** Lipossomos e **(B)** Proteolipossomos.

Através dos dados da Tabela 10 é possível observar um alto valor de variação de entalpia para o sistema lipossomal ( $\Delta H = 8,42 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ ) demonstrando mais uma vez que a geometria das moléculas de SM e GM1 estabilizam a membrana composta de DPPC, tornando mais eficiente o empacotamento entre os lipídios. Os três sistemas terciários, DPPC:Chol:SM, DPPC:Chol:GM1 e DPPC:SM:GM1 apresentam temperaturas de transição muito semelhantes, de 40°C a 41°C. Além disso, estes sistemas apresentam picos alargados com altos valores de  $\Delta t_{1/2}$ .

Os proteolipossomos formados após inserção da enzima foram então avaliados pela técnica de espalhamento de luz e os valores estão apresentados na Tabela 11.

Comparando as Figuras 22-A e 22-B referentes aos termogramas dos sistemas terciários constituídos por DPPC:SM:GM1 (8:1:1), pode-se observar que a enzima não é capaz de influenciar significativamente no perfil calorimétrico deste sistema, porém os parâmetros termodinâmicos são alterados. É nítido observar uma intensa diminuição nos valores de variação de entalpia, demonstrando o quanto a enzima desestabiliza e fluidifica o sistema.

A presença da enzima não proporciona alterações na temperatura de transição dos dois sistemas, porém torna a cooperatividade menor com um aumento no valor de  $\Delta t_{1/2}$  (Tabela 11).

A reconstituição da fosfatase alcalina em lipossomos terciários constituídos de DPPC:SM:GM1 (Tabela 11) proporcionou uma incorporação da atividade catalítica ao redor de 30%, sendo assim muito próxima aos valores obtidos para os demais sistemas terciários, DPPC:Chol:SM e DPPC:Chol:GM1 (Tabela 8). Estes dados demonstrando um efeito negativo muito similar entre os sistemas terciários na incorporação da enzima.

#### 4.8 Estudos de reconstituição da fosfatase alcalina e comportamento termotrópico de sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1.

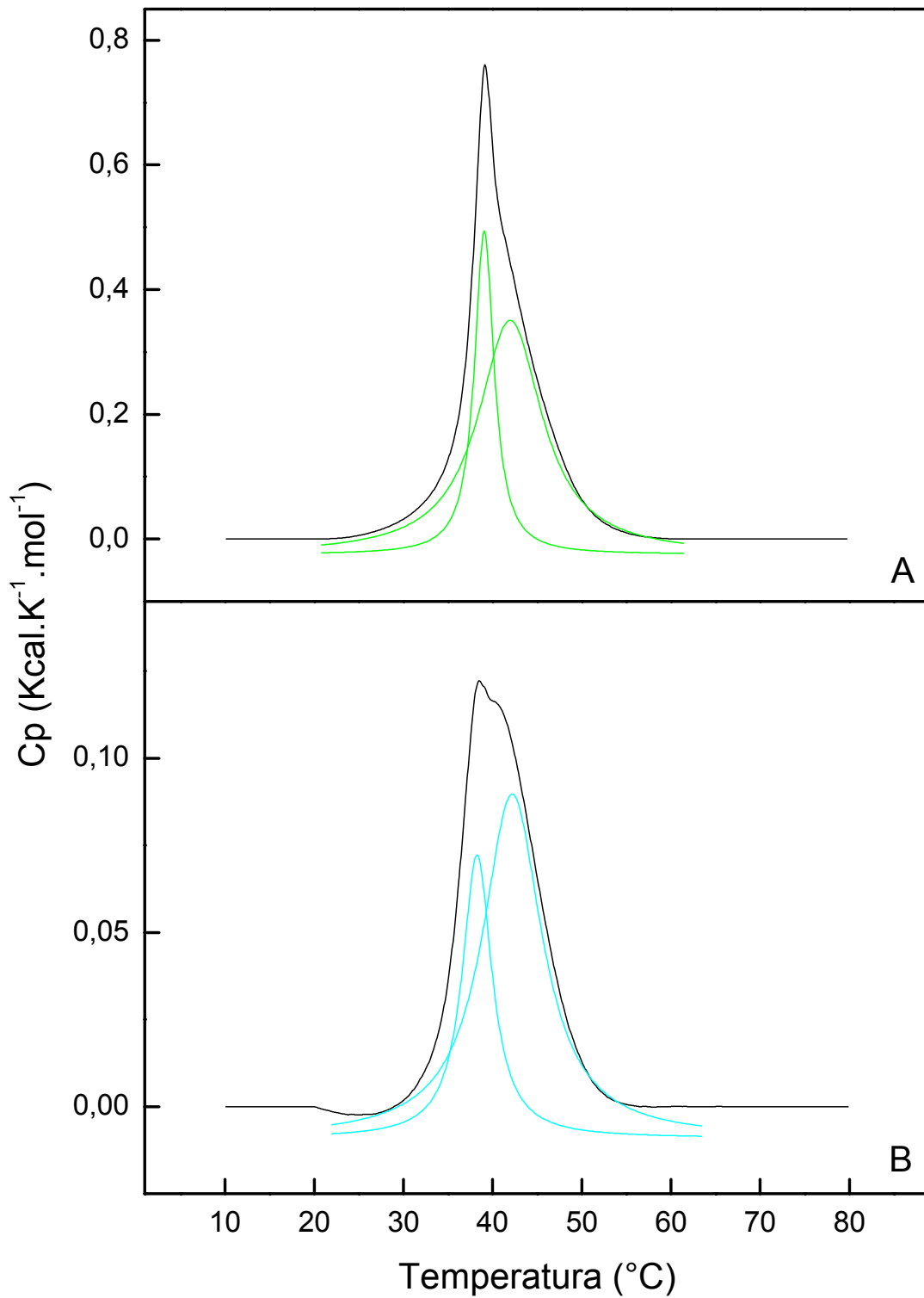
Por fim, foram realizados estudos visando aumentar a complexidade do sistema com o objetivo de aproximar os sistemas miméticos utilizados aos micros domínios existentes nas membranas biológicas, os chamados “lipids rafts”. Com esse objetivo, foram constituídos sistemas quaternários DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1) razão molar, com concentração de 10 mg/mL, formados nas mesmas condições acima citadas. Tais sistemas foram avaliados com espalhamento de luz, calorimetria e testes de atividade catalítica e estes dados estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12:** Valores de espalhamento de luz, atividade catalítica e parâmetros termodinâmicos para sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 na relação molar 7:1:1:1, com concentração igual a 10 mg/mL.

Vesículas	Incorporação (%)	Diâmetro (nm)	IP	Pico	$\Delta H$ (Kcal.mol <sup>-1</sup> )	T <sub>c</sub> (°C)	$\Delta t_{1/2}$ (°C)
Lipossomos	----	151,5	0,12	1*	2,54	39,1	2,88
				2	4,20	42,3	7,82
Proteolipossomo	25,6	113,1	0,25	1	0,45	38,2	4,10
				2*	1,41	42,0	8,37

(\*) Transição Principal.

O perfil calorimétrico dos sistemas lipossomo e proteolipossomo estão na Figura 23. Com as análises de deconvolução realizadas, pose-se observar na Figura 23-A a presença de um domínio rico em colesterol, caracterizado pelo segundo pico centrado em 42,3°C. Este valor de temperatura de transição é muito semelhante ao encontrado nos sistemas binários e terciários onde o colesterol está presente, sendo esta mais uma evidência de que esta transição está relacionada à segregação lateral de fase provocada pelo esterol. Esta segregação de fase é ainda mais acentuada quando há presença da enzima no sistema (Figura 23-B), uma vez que a área do segundo pico centrado em 42°C torna-se maior (Tabela 11), apresentando maior valor de entalpia ( $\Delta H = 1,41 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).



**Figura 23.** Termograma  $C_p$  ( $\text{kcal.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ ) vs.  $T$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) para sistemas quaternários constituídos de DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1), razões molares: **(A)** Lipossomos e **(B)** Proteolipossomos.

As temperaturas de transição de fase, tanto do pico de transição principal como do pico referente ao domínio rico em colesterol, para os sistemas de lipossomos e proteolipossomos são muito semelhantes, mostrando que a enzima não influencia na transição dos sistemas. O lipossomo quaternário apresenta uma transição de fase pouco cooperativa com alto valor de  $\Delta t_{1/2}$  e este alargamento é ainda maior na presença da enzima (Tabela 11).

A reconstituição da fosfatase alcalina em tal sistema foi avaliada, obtendo-se em torno de 25% de incorporação da atividade catalítica. Este foi o menor valor de porcentagem de incorporação dentre todos os sistemas estudados, mostrando que a união dos quatro componentes provoca um efeito negativo ainda maior na incorporação da enzima.

É imprescindível ressaltar que tais estudos são de alta complexidade e de abordagens inéditas, sendo difícil a comparação desses dados com estudos encontrados na literatura, principalmente quando usados sistemas terciários e quaternários.

## 5. Conclusão

A técnica utilizada para obtenção da fração de membrana rica em TNAP a partir do cultivo de células de medula óssea mostrou-se eficiente e reprodutiva. Obteve-se níveis máximos de atividade PNFFase e concentração de proteína após 14 dias de cultura.

O estudo de reconstituição da enzima em sistemas de lipossomos iniciou-se com vesículas constituídas apenas por DPPC. A utilização deste lipídio nos sistemas vesiculares mostrou-se eficiente, uma vez que se conseguiu reproduzir altos níveis de inserção da TNAP aos sistemas propostos, viabilizando os estudos pela técnica de calorimetria (DSC).

Os parâmetros termodinâmicos foram fortemente afetados com o aumento do diâmetro médio das vesículas formadas, através de um aumento progressivo nos valores de  $\Delta H$  com o aumento do diâmetro dos lipossomos. Além disso, este aumento do diâmetro proporcionou uma diminuição ao redor de 15% na incorporação da atividade da enzima.

O aumento da concentração de colesterol em lipossomos de DPPC proporcionou um progressivo alargamento dos picos de transição até uma eventual eliminação da transição de fase gel/fluido para proporções elevadas de colesterol. De 10 a 22% de colesterol, houve uma segregação lateral de fase evidenciada por um ombro largo à direita do pico de transição. Este sistema apresentou um efeito negativo na inserção da TNAP, reduzindo sua inserção em até 42%, quando utilizada a composição lipídica de DPPC:Chol (9:5).

Lipossomos formados por DPPC:Chol (9:1) sofrem segregação lateral de fase. A inserção da SM a este sistema proporciona uma considerável diminuição na cooperatividade da transição de fase e aparecimento de uma larga pré-transição em  $T_C = 27,8^\circ\text{C}$ . A  $\Delta H_{\text{total}}$  do sistema DPPC:Chol:SM (8:1:1) aumentou em relação ao sistema DPPC:Chol. A presença de GM1 ao sistema DPPC:Chol:GM1 influencia principalmente na  $\Delta H$  e  $\Delta T_{1/2}$ . A reconstituição da TNAP a estes sistemas resultou em uma incorporação de 62,1% da atividade catalítica ao sistema DPPC:Chol e uma incorporação ao redor de 30% aos sistemas terciários que possuem SM e GM1.

Com as análises de DSC realizadas para os sistemas DPPC:SM e DPPC:GM1 (9:1) razão molar, foi possível observar um significativo aumento nos valores de  $\Delta H$  em relação ao sistema DPPC:Chol, demonstrando que a geometria

das moléculas de SM e GM1 proporcionaram um melhor empacotamento dos lipídios que compõem a membrana. Além disso, não foi detectada segregação lateral de fase neste dos termogramas, confirmando-se assim que o colesterol é o responsável por tal evento. Nos proteolipossomos DPPC:SM e DPPC:GM1, obteve-se uma incorporação da atividade catalítica ao redor de 22% e 18% respectivamente. Com estes dados conclui-se que o sistema DPPC:GM1 apresentou o maior efeito negativo na incorporação da TNAP de todos os sistemas analisados.

No sistema terciário DPPC:SM:GM1 (8:1:1), não foi detectada segregação lateral de fase, concluindo assim que as interações entre SM e GM1, nestas condições, não provocam a existência de microdomínios, sendo mais uma evidência de que o colesterol é responsável por tal evento quando incorporado ao sistema.

Os três sistemas terciários, DPPC:Chol:SM, DPPC:Chol:GM1 e DPPC:SM:GM1 apresentam  $T_C$  muito semelhantes ( $\sim 41^\circ\text{C}$ ) e incorporação da atividade catalítica ao redor de 30%.

O sistema quaternário DPPC:Chol:SM:GM1 (7:1:1:1) razão molar, apresentou um domínio rico em colesterol centrado em  $T_C = 42,3^\circ\text{C}$ , pico este muito semelhante ao encontrado nos demais sistemas onde o colesterol está presente. Este sistema apresentou em torno de 25% de incorporação da atividade catalítica.

Em todas as análises realizadas com proteolipossomos observa-se que a presença da enzima provoca uma intensa diminuição nos valores de  $\Delta H$ , porém esta não é capaz de influenciar significativamente nos valores de  $T_C$ . Através da clivagem da TNAP utilizando PIPLC do sistema de proteolipossomo e posterior análise por DSC dos três sistemas (lipossomo, proteolipossomo e proteolipossomo tratado com PIPLC) pode-se concluir que as alterações relacionadas à fluidez do sistema de proteolipossomo, estão relacionadas principalmente à inserção da âncora de GPI.

Esta abordagem de estudos biofísicos e reconstituição da TNAP em lipossomos com diferentes composições lipídicas são abordagens inéditas e de difícil comparação com estudos apresentados na literatura. Estes dados confirmam a idéia da importância do microambiente na interação da proteína com a membrana.

A relevância dos resultados aqui apresentados nos incentiva à continuidade de tais estudos biofísicos de membranas que mimetizem as vesículas da matrix e estudos do comportamento cinético da TNAP nestes diferentes microambientes lipídicos, contribuindo assim no entendimento da função dos lipídios e suas interações com a TNAP no processo de biomineralização.

## 6. Referências Bibliográficas

- Ali, S.Y.; Sajdera, S.W. and Anderson, H.C. (1970) Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1513-20.
- Anderson, H.C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Rel. Research*. 314: 266-280.
- Anderson, H.C.; Hsu, H.H.; Morris, D.C.; Fedde, K.N. and Whyte, M.P. (1997) Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. *Am. J. Pathol.* 151: 1555-61.
- Anderson, H.C. (2003) Matrix vesicles and calcification. *Curr. Rheumatol. Rep.* 5: 222-226.
- Anderson, H.C.; Sipe, J.B.; Hessle, L.; Dharmyramaju, R.; Atti, E.; Camacho, N.P. and Millán, J.L. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 164: 841-847.
- Anderson, H.C.; Garimella, R. and Tague, S.E. (2005) The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci.* 10: 822-37.
- Angrand, M.; Briolay, A.; Ronzon, F. and Roux, B. (1997) Detergent-mediated reconstitution of a glycosyl-phosphatidylinositol-protein into liposomes. *Eur. J. Biochem.* 250: 168-76.
- Argiro, L.; Desbarats, M.; Glorieux, F.H. and Ecarot, B. (2001) Mepe, the gene encoding a tumor-secreted protein in oncogenic hypophosphatemic osteomalacia, is expressed in bone. *Genomics* 74: 342-51.
- Bar, L.K.; Barenholz, Y. and Thompson T.E. (1997) Effect of Sphingomyelin Composition on the Phase Structure of Phosphatidylcholine–Sphingomyelin Bilayers. *Biochem.* 36, 2507–2516.
- Barenholz, Y. (1984) in: *Physiology of Membrane Fluidity* (Shinitzky, M., Ed.), Vol. 1, pp. 131–174, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Barenholz, Y. and Gatt, S. (Eds.) (1999) Sphingomyelin: Chemistry, Biophysics, Metabolism, Genetics and Signalling, *Chem. Phys. Lipids* 102, Spec. Issue.
- Barenholz, Y (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to “rafts”. *Prog Lipid Res* 41:1-5.
- Beck, G.R.; Zerler, B. and Moran, E. (2000) Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8352-8357.
- Bernard, G.W. (1978) Ultrastructural localization of alkaline phosphatase in initial intramembranous osteogenesis. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 135: 218-25.



- Blumenthal, N.C. (1989) Mechanism of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 247: 279-289.
- Boskey, A.L. (1981) Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop.* 157: 225-257.
- Boyan, B.D.; Schwartz, Z.; Swain, L.D. and Khare, A. (1989) Role of lipids in calcification of cartilage. *Anatomical Records* 224: 211-219.
- Brasitus, T.A.; Dahiya, R.; Dudeja, P.K. and Bissonnette, B.M. (1988) Cholesterol modulates alkaline phosphatase activity of rat intestinal microvillus membranes. *J. Biol. Chem.* 263: 8592-8597.
- Brown, R.E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: What physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Science* 111, 1-9
- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts *J. Biol. Chem.* 275, 17221-17224.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68, 533-544.
- Camolezi, F.L.; Daghanli, K.P.R.; Magalhães, P.P.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1282: 1-11.
- Cestaro, B.; Barenholz, Y.; Gatt, S. (1980) Hydrolysis of di- and trisialo gangliosides in micellar and liposomal dispersion by bacterial neuraminidases. *Biochem.* 19(4):615-619.
- Chang, G.G and Shiao, S.L. (1994) Possible kinetic mechanism of human placental alkaline phosphatase in vivo as implemented in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 220: 861-870.
- Ciancaglini, P.; Pizauro, J.M.; Rezende, A.A.; Rezende L.A. and Leone, F.A. (1990a) Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9- lauryl ether (polidocanol): purification and metalloenzyme properties. *Int. J. Biochem.* 22: 385-92.
- Ciancaglini P.; Simão, A.M.S.; Camolezi, F.L.; Millán, J.L. and Pizauro, J.M. (2006) Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39(5): 603-610.
- Ciancaglini, P.; Yadav, M. C.; Simão, A. M. S.; Narisawa, S.; Pizauro, J. M.; Farquharson, C.; Hoylaerts, M.F. and Millán, J.L. (2010) Kinetic Analysis of Substrate Utilization by Native and TNAP-, NPP1- or PHOSPHO1-Deficient Matrix Vesicles. *J. Bone and Mineral Research*, Pages 1-37.
- Clarke, P.G. and Clarke, S. (1996) Nineteenth century research on naturally occurring cell

- death and related phenomena. *Anat. Embryol.* 193: 81-99.
- Colhone; M.C; Nobre, T.M; Zaniquelli, M.E.D.; Stabeli, R.G and Ciancaglini, P. (2009) Incorporation of antigenic GPI-proteins from *Leishmania amazonensis* in membrane mimetic systems: influence of DPPC:cholesterol ratio. *J. Colloid Interface Science* 333: 373-379.
- Curatolo, W.; Small, D.M.; Shipley, G.G. (1977) Phase behavior and structural characteristics of hydrated bovine brain gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta.* 468(1):11–20.
- Curti, C.; Pizauro J.M.; Rossinholi, G.; Vugman, I.; Mello de Oliveira, J.A. and Leone, F.A. (1986) Isolation and kinetic properties of an alkaline phosphatase from rat bone matrix-induced cartilage. *Cell. Mol. Biol.* 32: 55-62.
- Curti, C.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1987) Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix- induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 33: 625-35.
- Cyboron, G.W. and Wuthier, R.E. (1981) Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 256: 7262-8.
- Daghasanli, K.R.; Ferreira, R.B.; Thedei, G.Jr.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2004) Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 36: 127-37.
- de Bernard, B.; Bianco, P.; Bonucci, E.; Costantini, M.; Lunazzi, G.C.; Martinuzzi, P.; Modricky, C.; Moro, L.; Panfili, E. and Pollesello, P. (1986) Biochemical and immunohistochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca<sup>2+</sup>-binding glycoprotein. *J. Cell. Biol.* 103: 1615-23.
- de Lima Santos, H.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 41: 239-48.
- Demenis, M.A.; Furriel, R.P.M. and Leone, F.A. (2003) Characterization of an ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 activity in alkaline phosphatase-depleted rat osseous plate membranes: possible functional involvement in the calcification process. *Biochim. Biophys. Acta* 1646: 216-225.
- Dietrich, C.; Bagatolli, L.A.; Volovyk, Z.N.; Thompson, N.L.; Levi, M.; Jacobson, K. and Gratton, E. (2001) Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* 8: 1417-1428.
- Eanes, E.D. and Hailer, A.W. (1985) Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif. Tissue Int.* 37: 390-394.

- Epand, R.M. (2007) Detecting the presence of membrane domains using DSC. *Biophysical Chemistry* 126: 197–200.
- Fallon, M.D.; Whyte, M.P. and Teitelbaum, S.L. (1980) Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab. Invest.* 43: 489-94.
- Farquharson, C. and Jefferies, D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.* 79: 994-1004.
- Ferguson MA. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contribution of trypanosome research. *J. Cell. Sci.* 112: 2799–2809.
- Fishman, P.H.; Brady, R.O. (1976) Biosynthesis and function of gangliosides. *Science.* 26;194(4268):906–915.
- Floyd, W.E. 3rd; Zaleske, D.J.; Schiller, A.L.; Trahan, C. and Mankin, H.J. (1987) Vascular events associated with the appearance of the secondary center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. *J. Bone Joint Surg. Am.* 69:185-190.
- Freemont, A. J. (1993) Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Path.* 74: 411-416.
- Galperin, M.Y.; Bairoch, A.; Koonin, E.V. (1998) A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases. *Protein Sci.* 7:1829-1835.
- Garimella, R.; Bi, X.; Anderson, H.C.; Camacho, N.P. (2006) Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study. *Bone* 38: 811-7.
- Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc. Med.* 10: 223-228.
- Gijsbers, R.; Ceulemans, H.; Stalmans, W. and Bollen, M. (2001) Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/ phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 276: 1361-1368.
- Giocondi, M.C.; Besson, F.; Dosset, P.; Milhiet, P.E. and Grimellec, C.L. (2007) Remodeling of ordered membrane domains by GPI-anchored intestinal alkaline phosphatase. *Langmuir* 23: 9358-64.
- Gowen, L.C.; Petersen, D.N.; Mansolf, A.L.; Qi, H.; Stock, J.L.; Tkalcevic, G.T.; Simmons, H.A.; Crawford, D.T.; Chidsey-Frink, K.L.; Ke, H.Z.; McNeish, J.D.; Brown, T.A. (2003) Targeted disruption of the osteoblast/osteocyte factor 45 gene (OF45) results in increased bone formation and bone mass. *J. Biol. Chem.* 278: 1998-2007.

- Halling, K.K. and Slotte J.P. (2004) Membrane properties of plant sterols in phospholipid bilayers as determined by differential scanning calorimetry, resonance energy transfer and detergent-induced solubilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1664, 161–171.
- Hamade, E.; Azzar, G.; Radisson, J.; Buchet, R. and Roux, B. (2003) Chick embryo anchored alkaline phosphatase and mineralization process in vitro. *Eur. J. Biochem.* 270: 2082-90.
- Harmey, D.; Hessle, L.; Narisawa, S.; Johnson, K.A.; Terkeltaub, R. and Millán, J.L. (2004) Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *Am. J. Pathol.* 164: 1199-1209.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Heerkoltz, H. and Tsamaloukas (2006) Gradual change or phase transition: characterizing fluid lipid-cholesterol membranes on the basis of thermal volume changes. *Biophys. J.* 91:600-607.
- Hessle, L.; Johnson, K.A.; Anderson, H.C.; Narisawa, S.; Sali, A.; Goding, J.W.; Terkeltaub, R. and Millán, J.L. (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9445-9.
- Heywood, B.R. and Eanes, E.D. (1987) An ultrastructural study of calcium phosphate formation in multilamellar liposome suspension. *Calcif. Tissue Int.* 41:192-201.
- Hill, M.W. and Lester, R. (1972) Mixtures of gangliosides and phosphatidylcholine in aqueous dispersions. *Biochim Biophys Acta.* 282(1):18–30.
- Houston, B.; Seawright, E.; Jefferies, D.; Hoogland, E.; Lester, D.; Whitehead, C. and Farquharson, C. (1999) Identification and cloning of a novel phosphatase expressed at high levels in differentiating growth plate chondrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1448: 500-506.
- Houston, B.; Stewart, A.J. and Farquharson, C. (2004) PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralization in bone and cartilage. *Bone* 34: 629-637.
- Hsu, H.H.T.; Munoz, P.A.; Barr, J.; Oppliger, I.; Morris, D.C.; Vaananem, H.K.; Tarkenton, N. and Anderson, H.C. (1985) Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 260: 1826-31.
- Hsu, H.H.T. (1994) Mechanisms of initiating calcification. ATP-stimulated Ca- and Pi-depositing activity of isolated matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 26:1351-1356.
- Hsu, H.H.T and Anderson, H.C. (1986) The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *Int. J.*

- Biochem.* 18: 1141-1146.
- Hsu, H.H.T. and Anderson, H.C. (1995) A role for ATPase in the mechanisms of ATP-dependent Ca and phosphate deposition by Isolated rachitic matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 27: 1349-1356.
- Ierardi, D.F.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. (2002) Erythrocyte ghost cell- alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1567: 183-192.
- Itving, J.T. (1973) Theories of mineralization of bone. *Clin. Orthop.* 97: 225-236.
- Jefferies, D.; Houston, B.; Lester, D.; Whitehead, C.C.; Thorp, B.H.; Botman, M. and Farquharson, C. (2000) Expression patterns of chondrocyte genes cloned by differential display in tibial dyschondroplasia. *Biochim. Biophys. Acta* 1501:180-188.
- Johnson, K.; Moffa, A.; Chen, Y.; Pritzker, K.; Goding, J.; Terkeltaub, R.(1999) Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. *J. Bone Miner. Res.* 14: 883-892.
- Johnson, K.A.; Hesse, L.; Vaingankar, S.; Wennberg, C.; Mauro, S.; Narisawa, S.; Goding, J.W.; Sano, K.; Millan, J.L. and Terkeltaub, R. (2000) Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R1365-R1377.
- Kirsch, T. and Wuthier, R.E. (1994) Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J. Biol. Chem.* 269:11462-11469.
- Koval, M. and Pagano, R.E. (1991) Intracellular transport and metabolism of sphingomyelin. *Biochim. Biophys Acta* 1082, 113-125.
- Koynova, R.D. and Caffrey, M. (1995) Phases and phase transitions of the sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1255, 213-236.
- Le Du, M.H.; Stigbrand, T.; Taussig, M.J.; Menez, A. and Stura, E.A. (2001) Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 Å resolution. Implication for a substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 276: 9158-65.
- Le Du, M.H. and Millán, J.L. (2002) Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277: 49808-14.
- Leone, F.A.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (1997a) Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. *Trends in Comparative Biochem. Physiol.* 3: 57-73.
- Leone, F.A.; Rezende, L.A.; Ciancaglini, P. and Pizauro, J.M. (1998) Allosteric modulation of pyrophosphatase activity of rat osseous plate alkaline phosphatase by magnesium ions. *Int.*

- J. Biochem. Cell. Biol. 30: 89-97.
- Li, X.M., Momsen, M.M., Smaby, J.M., Brockman, H.L. and Brown, R.E. (2001) Cholesterol Decreases the Interfacial Elasticity and Detergent Solubility of Sphingomyelins *Biochemistry*, 2001, 40 (20), 5954–5963
- Loura, L.M.S. and de Almeida, R.F.M. (2004) Tópicos de Biofísica de Membranas. (Ed. Lidel), 49-52.
- Low MG. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 427–454.
- Lowe, M.K.; Strauss, A.W.; Alpers, R. and Seetharam, S. (1990) Molecular clone and expression of cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 1037: 170-7.
- Maggio B, Montich GG, Cumar FA. (1988) Surface topography of sulfatide and gangliosides in unilamellar vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids*. 46(2):137–146.
- Majeska, R.J. and Wuthier, R.E. (1975) Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 391: 51-60.
- Mannock, D.A.; Lewis, R.A.H.; McElhaney, R.N. (2006) Comparative calorimetric and spectroscopic studies of the effects of lanosterol and cholesterol on the thermotropic phase behavior and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. J.* 91:3327-3340.
- Marsh, D. (1991) in General features of phospholipid phase transitions. *Chem. and Phys. of Lipids* 57, 109-120.
- Masserini, M. and Freire, E. (1986) Thermotropic characterization of phosphatidylcholine vesicles containing ganglioside GM1 with homogeneous ceramide chain length. *Biochem.* 25(5):1043–1049.
- Marx, R.E.; Carlson, E.R.; Eichstaedt, R.M.; Schimmele, S.R.; Strauss, J.E. and Georgeff, K.R. (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 85: 638-46.
- McComb, R.B.; Bowers, G.N. and Posen, S. (1979) In: “Alkaline phosphatase”. Plenum Press, New York.
- McMullen, T.P.; Lewis, R.N.; McElhaney, R.N. (1993) Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochem.* 32(2):516-22.

- Merrill Jr., A.H.; Schmelz, E.M.; Dillehay, D. L.; Spiegel, S.; Shayman, J.A.; Schroeder J.J.; Riley, R.T.; Voss, K.A. and Wang, E. (1997) Sphingolipids—The Enigmatic Lipid Class: Biochemistry, Physiology, and Pathophysiology. *Toxico. and Pharmaco.* 142, 208–225.
- Milhiet, P.E.; Giocondi, M.C.; Baghdadi, O.; Ronzon, F.; Roux, B. and Le Grimellec, C. (2002) Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO report* 3: 485-490.
- Meyer, J.L. (1984) Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 1-8.
- Millán, J.L. (2006) In: *Mammalian Alkaline Phosphatase: From Biology to Applications in Medicine and Biotechnology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Minetti, C.A., Remeta, D.P. (2006) Energetics of membrane protein folding and stability. *Arch Biochem Biophys*. In Press
- Morandat, S.; Bortolato, M.; Roux, Bernard (2002) Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1564: 473-478.
- Morandat, S.; Bortolato, M. and Roux, B. (2003) Role of GPI-anchored enzyme in liposome detergent-resistance. *J. Membr. Bio.* 191: 215-21.
- Mornet, E.; Stura, E.; Lia-Baldini, A.S.; Stigbrand, T.; Ménez, A. and Le Du, M.H. (2001) Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J. Biol. Chem.* 276: 31171-8.
- Morris, D.C.; Masuhara, K.; Takaoka, K.; Ono, K. and Anderson, H.C. (1992) Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner.* 19: 287-98.
- Moss, D.W.; Eaton, R.H.; Smith, J.K. and Whitby, L.G. (1967) Association of inorganic-pyrophosphatase activity with human alkaline-phosphatase preparations. *Biochem. J.* 102: 53-7.
- Moss, D.W. and Walli, A.K. (1969) Intermediates in the hydrolysis of ATP by human alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 476-7.
- Nakamura, T.; Nakamura, K. and Stinson, R.A. (1988) Release of alkaline phosphatase from human osteosarcoma cell by phosphatidylinositol phospholipase C: effect of tunicamycin. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 190-6.
- Nakano, Y.; Addison, W.N. and Kaartinen, M.T. (2007) ATP-mediated mineralization of MC3T3-E1 osteoblast cultures. *Bone* 41: 549-61.
- Needham, D. and Nunn R.S. (1990) Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *J. Biophys.* 58, 997-1009.

- Nosjean, O.; Roux, B. (1999) Ectoplasmic insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-and cholesterol-containing phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.* 263: 865-870.
- O'Brien, P.J. and Herschlag, D. (2001) Functional interrelationships in the alkaline phosphatase superfamily: phosphodiesterase activity of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *Biochemistry* 40: 5691-9.
- Okawa, A.; Nakamura, I.; Goto, S.; Moriya, H.; Nakamura, Y. and Ikegawa, S. (1998) Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* 19: 271-273.
- Osyczka, A.M. and Leboy, P.S. (2005) Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology* 146: 3428-37.
- Petersen, D.N.; Tkalcevic, G.T.; Mansolf, A.L.; Rivera-Gonzalez, R. and Brown, T.A. (2000) Identification of osteoblast/osteocyte factor 45 (OF45), a bone-specific cDNA encoding an RGD-containing protein that is highly expressed in osteoblasts and osteocytes. *J. Bio. Chem.* 275: 36172-80.
- Phinney, D.G. (2002) Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. *J. Cel. Biochem. Sup.* 38: 7-12.
- Picher, M. and Boucher, R.C. (2001) Metabolism of extracellular nucleotides in human airways by a multienzyme system. *Drug Dev. Res.* 52: 66-75.
- Picher, M.; Burch, L.H.; Hirsh, A.J.; Spychala, J. and Boucher, R.C. (2003) Ecto 5'-nucleotidase and nonspecific alkaline phosphatase. Two AMP-hydrolyzing ectoenzymes with distinct roles in human airways. *J. Biol. Chem.* 278: 13468-79.
- Pizauro, J.M.; Curti, C.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1987) Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 921-926.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1993) Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta.* 1202: 22-28.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1994) Osseous plate alkaline phosphatase is anchored by GPI. *Brazilian J. Med. Res.* 27: 453-456.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1995) Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Molecular and Cel. Biochem.* 152: 121-129.



- Pizauro, J.M.; Demenis, M.A.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1998) Kinetic characterization of membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. *Biochim. Biophys. Acta* 1368: 108-114.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Macari, M. (2002) Tibial Dyschondroplasia : mechanisms of the lesion and control. *Poultry Science* 3: 169-185.
- Poole, A.R.; Mitsui, Y.; Hinek, A. and Lee, E.R. (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anatomical Record* 224: 167-179.
- Prockop, D.J.; Gregory, C.A. and Spees, J.L. (2003) One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11917-23
- Ramstedt, B. and Slotte J.P. (1999) Comparison of the Biophysical Properties of Racemic and d-Erythro-N-Acyl Sphingomyelins *Biophys. J.* 77, 1498–1506
- Ramstedt, B. and Slotte J.P. (2002) Membrane properties of sphingomyelins. *FEBS Letters* 531, 33-37.
- Reddi, A.H. and Huggins, C. (1972) Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblast in adolescent rat. *Proc. Natl. Acad. Science* 69: 1601-1605.
- Reed, R. A.; Shipley, G. G. (1996) Properties of ganglioside GM1 in phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biophys. J.* 70, 1363-1372.
- Rezende, A.A.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1994) Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem. J.* 301: 517-22.
- Rezende, A.A.; Pizauro J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1998) Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cel. Mol. Biol.* 44: 293-302.
- Roberts, S.J.; Stewart, A.J.; Sadler, P.J. and Farquharson, C. (2004) Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem. J.* 382: 59-65.
- Robison, R. (1923) The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17: 286-93
- Ronzon, F.; Morandat, S.; Roux, B. and Bortolato, M. (2004) Insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme into liposomes. *J. Membr. Biol.* 197: 169-77
- Rowe, P.S.; de Zoysa, P.A.; Dong, R.; Wang, H.R.; White, K.E.; Econs, M.J. and Oudet, C.L. (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia.

- Genomics* 67: 54-68.
- Rutsch, F.; Vaingankar, S.; Johnson, K.; Goldfine, I.; Maddux, B.; Schauerte, P.; Kalhoff, H.; Sano, K.; Boisvert, W.A.; Superti-Furga, A. and Terkeltaub, R. (2001) PC-1 nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency in idiopathic infantile arterial calcification. *Am. J. Pathol.* 158: 543-554.
- Santos, F.R.; Ferraz, D.B.; Daghasanli, K.R.P.; Ramalho-Pinto, F.J. and Ciancaglini, P. (2006) Mimetic membrane system to carry multiple antigenic proteins from *Leishmania amazonensis*. *J. Membr. Bio.* 210:173-181.
- Say, J.C.; Ciuffi, K.; Furriel, R.P.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1991) Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta* 1074: 256-62.
- Sela, J.; Gross, U.M.; Kohavi, D.; Shani, J.; Dean, D.D.; Boyan, B.D. and Schwartz, Z. (2000) Primary mineralization at the surfaces of implants. *Critical Reviews in Oral Bio. and Med.* 11: 423-436.
- Sesana, S.; RE, F.; Bulbarelli, A.; Salerno, D.; Cazzaniga, E.; Masserini, M. (2008) Membrane features and activity of GPI-anchored enzymes: Alkaline phosphatase reconstituted in model membranes. *Biochem.* 47, 5433-5440.
- Sillerud, L.O.; Schafer, D.E.; Yu, R.K.; Konigsberg, W.H. (1979) Calorimetric properties of mixtures of ganglioside GM1 and dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem.* 254(21):10876–10880.
- Simão, A.M.S.; Beloti, M.M.; Cezarino, R.M.; Rosa, A.L.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2007) Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146: 679-87.
- Simão, A.M.S.; Yadav, M.C.; Narisawa, S.; Bolean, M.; Pizauro, J. M.; Hoylaerts, M. F.; Ciancaglini, P. and Millán, J.L. (2010). Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicles' biomimetics. *JBC – The Journal of Biological Chemistry – In Press*
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572
- Snyder, B. and Freire, E. (1980) Compositional domain structure in phosphatidylcholine-cholesterol and sphingomyelin-cholesterol bilayers *Prodc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4055-4059.
- Terkeltaub, R.A. (2001) Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281: C1-C11.
- Thouverey, C., Strzelecka-Kiliszek, A.; Belcerzak, M.; Buchet, R. and Pikula, S. (2009)

- Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J. Cel. Biochem.* 106, 127-138.
- Trends in Cell Biology Vol.11 No.12 dezembro 2001 492
- Tristram-Nagle, S.; Nagle, J.F. (2004) Lipid bilayers:thermodynamics, structure, fluctuations and interactions. *Chem. Phys. Lipids* 127:3-14.
- Urist, M.R.; Iwata, H.; Ceccotti, P.L.; Dorfman, R.L.; Boyd, S.D.; McDowell, R.M. and Chien, C. (1973) Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3511-3515.
- van den Dolder, J. and Cansen, J.A. (2007) Enrichment of osteogenic cell populations from rat bone marrow stroma. *Biomaterials* 28: 249-55.
- Vogel, J.J. (1986) The membrane interface in biologic calcification. In Cell Mediated Calcification and Matrix Vesicles. (Ed. Ali, S.Y.) pp. 181-185 *Elsevier Sciences Publishers B.V. Amsterdam*
- Wuthier, R.E.; Chin, J.E.; Hole, J.E.; Register, T.C.; Laura, Y.H. and Ishikawa, Y. (1985) Isolation and characterization of calcium accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.* 260: 15972-15979.
- Wuthier, R.E. (1986) Mechanism of matrix vesicles mediated mineralization. In Cell Mediated Calcification and Matrix-Vesicles. (Ali, S.Y. ed.) *Elsevier Sciences Publishers B.V. Amsterdam*, 47-55.
- Yuan, C. and Johnston, L.J. (2000) Distribution of Ganglioside GM1 in L- $\alpha$ -Dipalmitoylphosphatidylcholine/Cholesterol Monolayers: A Model for Lipid Rafts. *J. Biophys.* 79, 2768-2781.
- Zeljka, K. and Kenworthy, A.K. (2008) Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *NIH Publicm Accessm Neuropharmacology* 55(8): 1265-1273.
- Zhang, L.; Balcerzak, M.; Radisson, J.; Thouverey, C.; Pikula, S.; Azzar, G. and Buchet, R. (2005) Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca<sup>2+</sup> and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 280: 37289-37296.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)