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

Tese de Doutorado

Sistemas Miméticos de Vesículas da Matriz: Correlação entre Microambiente Lipídico e a atividade da Fosfatase Alcalina no processo de Biomineralização.

Me. Bruno Zoccaratto Favarin

Tese 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 Doutor em Ciências. Área: **Química.**

RIBEIRÃO PRETO - SP
2018

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

Tese de Doutorado

Sistemas Miméticos de Vesículas da Matriz: Correlação entre Microambiente Lipídico e a atividade da Fosfatase Alcalina no processo de Biomineralização.

Me. Bruno Zoccaratto Favarin
Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Tese 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 Doutor em Ciências. Área: **Química.**

RIBEIRÃO PRETO – SP
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Favarin, Bruno Zoccaratto

Sistemas Miméticos De Vesículas Da Matriz: Correlação Entre Microambiente Lipídico e a Atividade Da Fosfatase Alcalina No Processo De Biomineralização. Ribeirão Preto, 2018.p.97

Tese de Doutorado, 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.Colesterol 4.Proteolipossomos 5.Cinética enzimática

Agradecimentos Especiais

A minha Familia!
Se não fosse por vocês, tenho certeza que hoje não teria que escrever esses agradecimentos, porque esta Tese não existiria.

Vocês não mediram esforços para que meus objetivos fossem alcançados
Sempre estiveram ao meu lado, nas horas de dificuldade e alegria, e que, mesmo à distancia, fizeram chegar até mim, seus incentivos e carinhoso cuidado.

Ao meu pai, Sidnei, verdadeiramente o maior mestre que tive, exemplo de dedicação, um exemplo de pessoa e profissional.

À minha Mãe, Noeli, que sempre acreditou em mim e, apesar das muitas dificuldades, manteve a fé.

Ao meu irmão, Gabriel, que além de irmão e amigo, é exemplo de carinho e companheirismo.

À minha irmã, AnaClara sinto sua falta, esta conquista também é sua, sua vontade de viver me ensinou muito, a nunca desistir.

A toda minha família, tios, tias, primos e primas, agradeço imensamente pelas orações e apoio.

Serei eternamente grato pela oportunidade de estudar, pelos exemplos de caráter, honestidade e determinação, pelas palavras amigas, orações, apoio, atenção, paciência, dedicação, incentivo e amor incondicionais.

Tenho muito orgulho de vocês!
A vocês, devo todo amor, admiração e respeito.

Esta Tese eu dedico a vocês!!

Pietro

É de extrema gratifição tê-lo como
orientador e mestre durante estes onze anos de trabalho.
Além de um profissional excepcional, seu lado humano
e ético é um exemplo a nossa profissão.

obrigado pelos conselhos e "puxões de orelha" que me nortearam nos
momentos de indecisão, devido a minha falta de experiência,
pelo incentivo nos momentos de dúvida, pela paciência
com que tratou meus dilemas de estudante e pela amizade e
companheirismo adquiridos durantes todos estes anos
.
É um privilégio poder fazer parte do seu grupo de pesquisa.
Gostaria que soubesse que fazer parte do laboratório foi crucial para
minha formação e lecionar ao seu lado foi um dos
momentos mais gratificantes de minha curta carreira acadêmica.

Obrigado por tudo!!!

Agradecimentos

Especialmente Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior **(CAPES)** pela Bolsa de Doutorado.

Agradeço a **Deus** por ter me confiado esta oportunidade de vida, aos meus pais, irmãos, que me são essenciais e de quem me orgulho.

Ao meu mestre e amigo **Prof. Dr. Pietro Ciancaglini**, por estes 11 anos de convivência, paciência, cumplicidade e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Sistemas Miméticos de Membrana: **Ana, Camila, Carol, Claudio, Ekeveliny, Heitor, Luiz, Luiza, Marina, Maytê.** Obrigado pela amizade, companheirismo nas horas de sufoco e risadas nos momentos de alegria. É um privilégio aprender junto com vocês.

Maytê. Obrigado TT pelos ensinamentos durante a minha iniciação científica, pela paciência e amizade, tenho toda gratidão do mundo por ter a oportunidade de aprender com você.

Ana Maria. Obrigado, Ana, pois aprendi muito com você, obrigado pela amizade e imensa paciencia, pelos relatórios e milhões de duvidas tiradas contigo.

Heitor. Obrigado, pelos momentos de conversa, almoços, desabafos e muita risada, esta amizade que fez parte da minha formação e que vai continuar presente em minha vida com certeza

Ivana, **Janaina e Nilton,** obrigado pela constante ajuda no laboratório.

Obrigado a todos também que atualmente não estão no laboratório, mas que quando presentes estiveram dispostos e me ajudaram.

Ao Laboratório da Profa Dr. Ana Paula Ramos no qual abriu as portas para que aprendesse técnicas, realizasse experimentos que foram de suma importância para minha formação.

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,** que compartilharam comigo as dificuldades e alegrias dos melhores anos da minha vida.

À **Priscila Cerviglieri, Ana Maria Sper Simão e Maytê Bolean** pelas correções dos textos em inglês.

À **CAPES, FAPESP**, 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.

“Talento é 1% inspiração e 99% transpiração” (Thomas Edison).

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas
Lista de Tabelas
Lista de Figuras
Resumo
Abstract

1. **Introdução**

1.1 Biomineralização..... **pág 08**

1.2 A Hipofosfatasia..... **pág 10**

1.3 Fosfatases Alcalinas.....**pág 11**
1.3.1 Diferença entre Fosfatases Alcalinas Rato x Humano.....**pág 11**

1.4 Fosfatase Alcalina e Interação Com Membrana..... **pág 15**
1.5 Técnicas Bioquímicas e Biofísicas
1.5.1 Cinética Enzimática.....**pág 23**
1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....**pág 25**
1.5.3 Análise do Formato da Gota do Eixo Simétrico..... **pág 26**

2. Objetivos gerais

2.1 Objetivos específicos: .....**pág 29**

3. Materiais e Métodos:

3.1 Obtenção e cultura de células de medula óssea de ratos.....**pág 30**
3.2 Obtenções das frações de membrana de osteoblastos de Rato... **pág 31**
3.3 Obtenção da Fosfatase Alcalina Humana..... **pág 31**
3.4 Dosagem de proteína..... **pág 32**
3.5 Determinação da atividade da fosfatase alcalina..... **pág 32**
3.6 Solubilização da fração de membrana..... **pág 33**
3.7 Remoção do excesso de detergente.....**pág 33**
3.8 Preparação dos lipossomos..... **pág 34**
3.9 Determinação do diâmetro médio das vesículas..... **pág 35**
3.10 Determinação dos dados cinéticos..... **pág 35**
3.11 Ensaios de Mineralização..... **pág 35**
3.12 Espectrofotometria ultravioleta-visível acoplado a análise de tensão superficial..... **pág 37**
3.13 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)..... **pág 38**

4 . Resultados e Discussão

4.1 Caracterização biofísica por DSC de lipossomos e proteolipossomos ..... **pág 39**
4.2 Caracterizações biofísicas da TNAP incorporada em lipossomos. **pág 44**
4.3 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DPPC e esteróis.....**pág 47**

4.4 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DOPC e esteróis.....**pág 52**
4.5 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DMPC e esteróis.....**pág 59**
4.6 Estudo cinético de proteolipossomos contendo “rafts”.....**pág 64**
4.7 Ensaio de Atividade catalítica simultânea a pressão de exclusão γ.....**pág 68**
4.8 Estudo da propagação da biomineralização .....**pág 70**
4.9 TNAP Rato (rattus norvegicus) x Humano (homo sapiens).....**pág 73**

5 Conclusão.

6 Referencias bibliográficas.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Achol:	Colestenona
ADP:	Adenosina-5'-difosfato
ALP:	Fosfatase Alcalina
AMP:	Adenosina-5'-monofosfato
AMPOL:	2-amino-2-metil-1-propanol
ATP:	Adenosina-5'-trifosfato
ATPase:	Adenosina-5'-trifosfatase
BSA:	Albumina de soro bovino
Chol:	Colesterol
Da:	Dalton
DLS:	Varredura dinâmica de luz
DMPC:	Dimisterioil fosfatidil colina
DOPC:	Dioleoil fosfatidil colina
DPPC:	Dipalmitoil fosfatidil colina
DSC:	Calorimetria Diferencial de Varredura
Ergo:	Ergosterol
GM1:	Gangliosídeos
GPI:	Glicosil fosfatidil inositol
ICP:	Tampão Contendo (K^+, Na^+, Mg^{2+} Cl^-, Pi, HCO_3^-, SO_4^{2+} e N_3^-
$K_{0,5}$:	Constante de Afinidade
Kcat:	Numero de Renovação
kcat/$K_{0.5}$:	Eficiência catalítica
Lα:	Fase Liquido-Cristalina
Lo	Fase Liquido-ordenada
MLV:	Vesículas Multilamelares
MVs:	Vesículas da Matriz
n:	Coeficiente de Hill
NPP1:	nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1
PA:	Ácido Fosfatídico
PC:	Fosfatidilcolina
PE:	Fosfatidiletanolamina
PI:	Fosfatidilinositol
P_i:	Fosfato inorgânico
PIPLC:	Fosfolipase C específica para fosfatidilinositol
PNFF:	p-nitrofenilfosfato
PNFFase:	p-nitrofenilfosfatase
PS-CPLX:	Nucleador (Emulsão de PS, Tampão ICP, $CaCl_2$)
Polidocanol:	Polioxietileno-9-lauril éter
PPase:	Pirofosfatase
PP_i:	Pirofosfato inorgânico
PS:	Fosfatidilserina
SCL:	Tampão linfa de cartilagem sintética
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SM:	Esfingomielina
T_c:	Temperatura Crítica de Transição
TCA:	Ácido tricloroacético
TNAP:	fosfatase alcalina de tecido não-específico
U:	Unidade de atividade enzimática (nmol/min)
$V_{máx}$:	Velocidade máxima de hidrólise do Substrato.
ΔH:	Variação de Entalpia de transição de Fase
$\Delta t_{1/2}$:	Cooperatividade de Transição de Fase

Lista de Tabelas

Tabela 1. Resumo da nomenclatura genética, números de acesso, nomes comuns, distribuição e função tecidual, se conhecido, para o humano e camundongo isoenzimas da fosfatase alcalina. Tabela adaptada (Millan, 2006)..... .**pág 12**

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos de lipossomos (10 mg/mL) constituídos por DPPC, DMPC, Chol, SM com diferentes proporções molares..... **pág 44**

Tabela 3: Diâmetro médio dos lipossomos e proteolipossomos preparados com diferentes proporções de lipídeos e porcentagem de incorporação da TNAP..... .**pág.45**

Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP ou PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos constituídos de DPPC com diferentes proporções de esteróis.....**pág 51**

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP ou PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos constituídos de DOPC com diferentes proporções de esteróis.....**pág 57**

Tabela 7: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP e de PP_i pela TNAP reconstituído em lipossomos de diferentes composições.....**pág 67**

Tabela 8 - Atividade p-NPPase da TNAP quando presentes em interface compostos por DPPC, DOPC e esteróis com pressão de 30 mN/m..... **pág 68**

Tabela 9: Variação na pressão superficial após a adição da enzima TNAP.....**pág 77**

Lista de Figuras

Figura 1: Representação da fita da estrutura 3D da fosfatase alcalina (1EW2). O local do sitio ativo (PO_4^{3-}) ligado a Ser92 durante a catálise é mostrado em verde. Os três metais do sitio ativo, dois $Zn2^+$ (Zn1 e Zn2) e um $Mg2^+$ (Mg), são mostrados em branco, bem como o estrutural $Ca2^+$ ion (Ca). Também são indicados sequência exposta flexível conhecida como "domínio da coroa"; a Hélice N-terminal de uma subunidade que chega perto do local ativo da subunidade contralateral; e a localização onde a âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) está ligada ao terminal C do enzima adaptado de (Millan, 2006)..... **pág 14**

Figura 2: Esquema representativo do modelo homodimérico de TNAP ancorado em uma bicamada lipídica por meio da modificação pós-traducional GPI. Os anéis representados na estrutura do GPI representam os oligossacarídeos presentes, etan: etanolamina; man: manose; GlcN: glucosamina; inos: inositol; P: fosfato. Figura construída a partir do modelo da TNAP gerado no software modeler 9.11, baseado na estrutura da PLAP, código de acesso no PDB: 1EW2. Adaptado de (Le Du *et al.*, 2001). ..... **pág 15**

Figura 3: Diferentes estruturas dos esteróis estudados. Adaptado de (Favarin *et al.*, 2017). **pág18**

Figura 4: Influência do Microambiente lipídico na Atividade da Fosfatase Alcalina (TNAP) na presença do Fosfolipidio (DPPC, DMPC ou DOPC) e de um Esterol (colesterol, Ergosterol ou Colestenona). (Adaptado de Favarin e colaboradores, 2017 (Favarin *et al.*, 2017))..... **pág 22**

Figura 5: Características dos parâmetros termodinâmicos de uma curva de DSC, utilizando no esquema lipossomos constituídos de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL. Figura adaptada de (Demetzos, 2008).....**pág 26**

Figura 6: Diagrama esquemático da tensão superficial ADSA [(1) Luz; (2) Difusor; (3) Gota pendente; (4) CCD câmera; (5) Seringa; (6) Deposição da amostra; (7) Computador com *frame grabber*] e UV-Vis Espectrofotometria c [(I) Difusor da amostra; (II) Luz de deuterium/halogenia ; (III) Espectrômetro] analisador retirado de Andrade e colaboradores (Andrade *et al.*, 2016)…… .**pág.27**

Figura 7: Termogramas, para determinação da capacidade calorífica, Cp (kcal.K-1.mol-1) em função da temperatura (°C) das vesículas (10 mg/mL): lipossomo (Preto) e proteolipossomo (Vermelho) composições (A): DPPC; (B): DPPC:Chol (90:10) mol%; (C): DMPC e (D): DMPC:Chol (90:10) mol%..... **pág 40**

Figura 8: Termogramas, para determinação da capacidade calorífica, Cp (kcal.K-1.mol-1) em função da temperatura (°C) das vesículas (10 mg/mL): lipossomo (Preto) e proteolipossomo (Vermelho) composições (A): DPPC:SM (90:10); (B): DPPC:Chol:SM (80:10:10); (C): DMPC:SM (90:10) e (D): DMPC:Chol:SM (80:10:10) mol%..... .**pág 41**

Figura 9: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.....**pág 48**

Figura 10: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DPPC e por diferentes esteróis: (■) DPPC puro; (▼) DPPC:Chol (64:36 mol%); (★) DPPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DPPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 50**

Figura 11: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.....**pág 53**

Figura 12: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DOPC e por diferentes esteróis: (■) DOPC puro; (▼) DOPC:Chol (64:36 mol%); (★) DOPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DOPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 55**

Figura 13: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DMPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 60**

Figura 14: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DMPC e por diferentes esteróis: (■) DMPC puro; (▼) DMPC:Chol (64:36 mol%); ( ) DMPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DMPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 62**

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP e o PP_i TNAP reconstituído em lipossomos de diferentes proporções de DMPC e esteróis..... **pág 63**

Figura 15: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática de TNAP reconstituída em lipossomos compostos de÷ (■) DPPC sozinho; (●) de DPPC:Chol (90:10); (▲) DPPC:SM (90:10) e (▼) DPPC:Chol:SM (80:10:10) mol% . Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 65**

Figura 16: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática de TNAP reconstituída em lipossomos compostos de (■) DMPC sozinho; (●) de DMPC:Chol (90:10); (▲) DMPC:SM (90:10) e (▼) DMPC:Chol:SM (80:10:10) mol% . Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente..... **pág 66**

Figura 17: Efeito dos proteolipossomos contendo a TNAP e compostos por DPPC e esteróis* (A), DOPC e esteróis* (B) DMPC e esteróis (C), responsável pela propagação mineral na presença do nucleador PS-CPLX- e SCL, na presença de ATP acima da $V_{máx}$ de hidrolises, após 48 h de incubação em 37°C. Lipossomos vazios incorporados sem enzimas foram utilizadas como controle e as barras mostram o incremento na absorvâncias após 48 h. *Adaptado de Favarin et al. (Favarin *et al.*, 2017)..... **pág 72**

Figura 18. Alinhamento de sequências de fosfatase alcalina humana (*Homo sapiens*) em comparação com rato (rattus norvegicus). Código de cores de propriedades de resíduos de aminoácidos: Vermelho – resíduos com pequenas cadeias laterais ou aromáticos ; Azul – resíduos com propriedades ácidas; azul – resíduos com propriedades básicas; Verde – resíduos com grupos hidroxilo, sulfihidrilo e amina; Amarelo – resíduos de amino/iminoácidos incomuns. Abaixo de cada sítio (i.e., posição) do alinhamento da sequência proteica é uma chave que denota sítios conservados (*), sítios com substituições conservativas (:), sítios com substituições semi-conservativas (.), e sítios com substituições não-conservativas ( )..... **pág 75**

Figura 19. Determinação do pH ótimo de hidrólise do PNFF pela TNAP, de *homo sapiens* (■) x *rattus norvegicus* (●), na faixa de pH entre 6,5 e 10,5, utilizando-se os seguintes tampões: imidazol (pH 6,5-7,5),Tris-HCl (pH 7,0-9,0) e AMPOL (pH 8,5-10,5), como descrito no item 3.20 de Material e Métodos. As atividades foram determinadas em 50 mM do tampão apropriado, contendo $MgCl_2$ 2 mM e PNFF 10 mM, como descrito no item 3.5 de Material e Métodos. Inserção: Análise comparativa do Zeta potencial..... **pág 76**

Figura 20: Porcentagem de atividade em função da concentração de inibidor determinada para TNAP (rattus norvegicus x homo sapiens)..... **pág 78**

Resumo

Os osteoblastos são responsáveis pela biomineralização óssea e o processo é mediado pela liberação de vesículas matriciais (MVs). A membrana da MV possui altos níveis de Fosfatase Alcalina (TNAP), Colesterol (Chol) e Esfingomielina (SM) quando comparada à membrana plasmática. A TNAP é uma fosfomonohidrolase capaz de gerar fosfato inorgânico (Pi) através da hidrólise do ATP e PPi levando ao início da mineralização. Neste estudo, avaliamos a incorporação da TNAP em lipossomos constituídos por variadas proporções de DPPC, DMPC, DOPC, SM, Chol e seus derivados como Colestenona (AChol) e Ergosterol (Ergo). Também foram feitos testes com proteolipossomos compostos por 3 tipos diferentes de lipídeo (ternários) e que apresentam estruturas de membrana similares a "*rafts*". Comparamos as propriedades cinéticas: velocidade máxima de hidrólise ($V_{máx}$), constante de afinidade ($k_{0,5}$), cooperatividade (n) e eficiência catalítica ($k_{cat}/k_{0,5}$) da TNAP para os substratos fisiológicos ATP e PPi, quando TNAP está incorporada nestes diferentes microambientes lipídicos. A TNAP foi incorporada nos diferentes lipossomos por inserção direta. Também foi estudado a capacidade desses proteolipossomos em induzir a biomineralização *in vitro*. Comparando eficiências catalíticas para hidrólise de ATP pela TNAP incorporada em lipossomos compostos por DPPC e DPPC:Chol 64:36 mol%, revelou-se que a presença de colesterol aumenta em aproximadamente 4x os valores de eficiência catalítica. O mesmo comportamento pode ser observado na presença de outros esteróis tais como DPPC:Achol 64:36 mol% e DPPC:Ergo 64:36 mol% (2700-1000$M^{-1}s^{-1}$, respectivamente). Não foram observadas alterações significativas nos valores de eficiência catalítica quando comparados os proteolipossomos DPPC com os proteolipossomos DMPC e DMPC:Chol 64:36 mol%. Para DOPC-Proteolipossomos, a eficiência catalítica encontrada para o TNAP foi cerca de 4 vezes menor em comparação com o DPPC. Também observamos um aumento de aproximadamente 10x nos valores de eficiência catalítica da hidrólise de ATP pela TNAP quando comparamos as vesículas de DOPC com DOPC:CHOL 64:36 mol%. O mesmo comportamento pode ser observado na presença de outros esteróis, como DOPC:Achol 64:36 mol% e DOPC:Ergo 64:36 mol% (8x e 10x, respectivamente). Na presença de SM ou Chol:SM 90:10 (mol%) os proteolipossomos de DPPC não alteraram os valores de eficiência catalítica, para a hidrólise de ATP. No entanto, estes proteolipossomos aumentaram a propagação do mineral em cerca de 4,5 e 8 vezes, respectivamente, em comparação com DPPC puro. O aumento na eficiência catalítica para proteolipossomos contendo DMPC:SM 90:10 e DMPC:Chol:SM 80:10:10 (mol%) foi observado. Com relação à propagação da mineralização *in vitro*, nota-se que proteolipossomos compostos por DOPC apresentaram uma capacidade 2,8x maior que DPPC, evidenciando que lipídios insaturados, na ausência ou presença de esteróis foram mais eficazes em comparação ao DPPC. Os DMPC-proteolipossomos foram mais efetivos na propagação de mineral quando comparados com DPPC-proteolipossomos. No entanto, os ensaios de mineralização para estruturas de membranas similares a "*rafts*" revelaram um aumento de 7,2x e 4x em comparação com os proteolipossomos de DPPC, respectivamente. Concluímos que, avaliando os parâmetros cinéticos e os resultados de mineralização obtidos, é possível afirmar que os proteolipossomos contendo TNAP e possuindo um menor grau de empacotamento lipídico (DMPC, DPPC: Chol e DMPC: CHOL) ou (lipídio+colesterol ou colestenona), assim como proteolipossomos ternários (DPPC:Chol:SM 80:10:10 e DMPC:Chol:SM 80:10:10 (mol%)), possivelmente apresentando compostamento de fase líquida cristalina, são mais efetivos na propagação do mineral.

Abstract

Osteoblasts cells are responsible for bone biomineralization and the process is mediated by the release of matrix vesicles (MVs). MVs membrane has high levels of Alkaline Phosphatase (TNAP), Cholesterol (Chol) and Sphingomyelin (SM) when compared to the plasma membrane. TNAP is a phosphomonohydrolase protein able to generating inorganic phosphate (P_i) through the hydrolysis of ATP and PP_i substrates, promoting to the onset of mineralization. In this study, we have evaluated the incorporation of TNAP into liposomes constituted of various proportions of DPPC, DMPC, DOPC, SM, Chol and its derivatives such as Cholestenone (AChol) and Ergosterol (Ergo). It has also been performed analyzes with proteoliposomes composed of 3 different kinds of lipids (ternary), which show similar membrane structure to **"***rafts*". We compare the kinetic properties: maximum rate of hydrolysis (V_{max}), affinity constant ($k_{0,5}$), cooperativity (n) and catalytic efficiency (k_{cat} / $k_{0,5}$) of TNAP for the physiological substrates ATP and PP_i, when TNAP is incorporated in these different microenvironments lipids. TNAP was incorporated into the different liposomes by direct insertion. The ability of these proteoliposomes to induce *in vitro* biomineralization has also been studied. Comparing the catalytic efficiencies of ATP hydrolysis by TNAP, when incorporated into liposomes composed of DPPC and DPPC: Chol 64:36 (mol%), it is revealed that the presence of chol increases by approximately 4x the catalytic efficiency values. The same behavior can be observed in the presence of other sterols such as DPPC:Achol 64:36 and DPPC:Ergo 64:36 (mol%) (2700-1000$M^{-1}s^{-1}$, respectively). No significant changes were observed in the catalytic efficiency values when comparing the DPPC-proteoliposomes to the DMPC and DMPC:Chol 64:36-proteoliposomes (mol%). The catalytic efficiency for DOPC-proteoliposomes harboring TNAP was about 4-fold lower to DPPC-proteoliposome. We also have observed an approximately 10x increased in the catalytic efficiency values for ATP hydrolysis by TNAP when comparing DOPC with DOPC:Chol 64:36 (mol%) vesicles. The same behavior was observed in the presence of other sterols, such as DOPC:Achol 64:36 and DOPC:Ergo 64:36 (mol%) (8x and 10x, respectively). In the presence of SM or Chol:SM 90:10 (mol%), DPPC-proteoliposomes did not alter the catalytic efficiency values, for the ATP hydrolysis. However, these proteoliposomes increased the mineral propagation by about 4.5 and 8-fold, respectively, compared to neat DPPC. The increase in catalytic efficiency for proteoliposomes containing DMPC:SM 90:10 and DMPC:Chol:SM 80:10:10 (mol%) was observed. Regarding to the propagation of *in vitro* mineralization, it noted that proteoliposomes composed of DOPC showed capacity 2.8x bigger than DPPC, indicating that unsaturated lipids in the presence or absence of sterols were more effective when compared to DPPC. DMPC-proteoliposomes were more effective in mineral propagation when compared to neat DPPC-proteoliposomes. However, the mineralization assays for raft-like membrane structures revealed an increase of 7.2x and 4x when compared to the DPPC proteoliposomes, respectively. In conclusion, taken together the kinetic parameters and mineralization results, it can be said that the proteoliposomes harboring TNAP with a lower degree of lipid packing (DMPC, DPPC:Chol and DMPC:Chol) or (lipids+chol or Achol), as well as ternary proteoliposomes (DPPC:Chol:SM 80:10:10 and DMPC:Chol:SM 80:10:10 (mol%)), possibly in the crystalline liquid phase, are more effective in propagating mineral.

1. Introdução

1.1 Biomineralização.

O processo de biomineralização consiste no acúmulo de mineral, principalmente íons de fosfato e cálcio, que formam um sal de fosfato de cálcio, cuja estrutura se transforma em hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. 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) e que é mediada por condrócitos hipertróficos. Os osteoblastos são os responsáveis pelo início do processo de biomineralização mediada pela liberação de vesículas da matriz (MVs) (Wuthier *et al.*, 1985a; Blumenthal, 1989; Freemont, 1993; Hsu e Anderson, 1995; Millan, 2006; Golub, 2009; Millan, 2013; Millan e Whyte, 2015).

Os eventos bioquímicos e biofísicos responsáveis pela biogênese das MVs ainda não estão perfeitamente elucidados, mas admite-se que eles estejam relacionados com o ciclo de vida das células e, possivelmente, com o seu processo de apoptose (Anderson *et al.*, 1997). Um dos grandes desafios da biologia é a compreensão de como as células se diferenciam se replicam e se dividem, e um dos aspectos importantes desse problema é saber como as células formam as MVs. A nova vesícula deve ser formada com grande precisão e possuir todas as informações necessárias para criar um microambiente selado adequado para a formação e preservação do mineral de hidroxiapatita (Anderson *et al.*, 1997; Ciancaglini *et al.*, 2006; Ciancaglini *et al.*, 2010; Ciancaglini *et al.*, 2012; Millan, 2013).

As vesículas surgem por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos e são secretadas no local específico de 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 (Wuthier *et al.*, 1985a; Anderson *et al.*, 1997; Ciancaglini *et al.*, 2006; Golub, 2009; Ciancaglini *et al.*, 2010). 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* (Wu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2008; Wuthier e Lipscomb, 2011; Millan, 2013; Bolean *et al.*, 2015; Hoylaerts *et al.*, 2015).

MVs produzidas por condrócitos apresentam composições lipídica e protéica distintas das formadas pelos osteoblastos (Anderson *et al.*, 2004). Mas em ambos os sistemas as MVs servem como reservatórios de cálcio e fosfato, criando um microambiente específico para a deposição dos primeiros cristais amorfos de fosfato de cálcio (nucleação) e posterior formação de hidroxiapatita, que se forma na superfície interna das vesículas. Este processo é muito estudado e até o momento não se conhecem todas as moléculas envolvidas.

As principais biomoléculas responsáveis pelo processo de biomineralização descritas até o momento: (i) fosfatase alcalina, também denominada TNAP (fosfatase alcalina de tecido não específico), que apresenta atividade fosfomonohidrolítica, produzindo fosfato (P_i) a partir, principalmente, de PP_i e ATP; (ii) nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NPP1), enzima responsável pela formação de PP_i a partir de nucleosídeos fosforilados; (iii) uma fosfomonohidrolase encontrada especificamente dentro das vesículas, denominada PHOSPHO1, responsável pelo aumento da concentração de P_i intravesicular acoplado à degradação de fosfolipídios, através da hidrólise de fosfocolina e fosfoetanolamina; (iv) fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), Chol (Chol) e (v) anexinas, que são uma grande família de proteínas ácidas que se ligam fortemente ao cálcio e PS (Kirsch e Wuthier, 1994; Millan, 2006; Ciancaglini *et al.*, 2010; Ciancaglini *et al.*, 2012; Millan, 2013; Millan e Whyte, 2015; Simao *et al.*, 2015). Dentre as anexinas, especificamente a Anexina V (proteína de ~35 kDa) é responsável pela formação de canais de cálcio que se formam pela associação desta proteína tanto com a face externa quanto

interna das membranas das MVs e também são responsáveis pela desorganização da membrana celular, que por sua vez resulta no processo de apoptose.

1.2 A Hipofosfatasia

A hipofosfatasia é uma desordem genética caracterizada por um defeito na mineralização dos ossos e dentes devido à deficiência na atividade da enzima fosfatase alcalina no sangue e ossos. A ocorrência desta doença acontece desde recém-nascidos sem a mineralização dos ossos até indivíduos na idade adulta com os sintomas de uma osteopenia média que leva ao desenvolvimento patológico de fraturas nos ossos (Millan e Whyte, 2015).

Há diferentes graus de severidade da doença, por exemplo, a hipofosfatasia perinatal geralmente é fatal, devido a complicações respiratórias causadas por pulmões hipoplásticos e raquíticos e, ainda, por deformidades no peito (Moore *et al.*, 1999). Já na infância, o paciente pode apresentar hipertensão intracraniana, problemas de crescimento, deformidades na formação do esqueleto, fraturas e dores nos ossos (Moore *et al.*, 1999; Mornet, 2008). Na idade adulta, a manifestação da hipofosfatasia é benigna e o primeiro sintoma é dor no pé (Mornet, 2008).

A hipofosfatasia está associada a mutações no gene que codifica a enzima tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) (Millan, 2006). Mutações no gene tnap não só podem reduzir ou eliminar a atividade enzimática de TNAP, como também alterar as propriedades enzimáticas de mutantes de TNAP quando estes ainda apresentam alguma atividade residual (Di Mauro *et al.*, 2002). Cerca de 270 mutações segundo o site http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_hypo.php já foram reportadas para TNAP e uma grande variedade destas são mutações pontuais, fato este que explica a diversidade clínica dos pacientes acometidos com a hipofosfatasia (Whyte *et al.*, 2012).

Normalmente, as mutações reportadas reduzem e/ou eliminam a atividade enzimática da TNAP. A atividade catalítica desta enzima é dependente da sua estrutura quaternária e da presença do motivo

glicofosfatidilinositol responsável por seu ancoramento à membrana plasmática (Lia-Baldini *et al.*, 2008).

1.3 Fosfatases Alcalinas.

Por muitos anos as estruturas cristalográficas da fosfatase alcalina de E. coli (ECAP) eram as únicas fontes de informação estrutural sobre as fosfatases alcalinas (Le Du *et al.*, 2001; Millan, 2006). Com a resolução da estrutura cristalográfica da primeira fosfatase alcalina de mamíferos, a fosfatase alcalina de placenta (PLAP; 1EW2) (Le Du *et al.*, 2001), constatou-se que a predição que se fazia baseada na comparação das sequências das fosfatases de procariotos e eucariotos eram coerentes com a estrutura da PLAP (Le Du *et al.*, 2001).

O núcleo central da PLAP é formado por uma folha-β flanqueada por α-hélices, uma configuração muito semelhante àquela encontrada na estrutura da proteína de E. coli. A resolução da estrutura cristalográfica da PLAP facilitou a modelagem das estruturas das isoenzimas GCAP, da IAP e da TNAP, revelando que todas as características presentes em PLAP são conservadas nas demais isoenzimas humanas (Le Du e Millan, 2002; Millan, 2006).

1.3.1 Diferença entre Fosfatases Alcalinas Rato x Humano

As Fosfatases alcalinas (APs; EC 3.1.3.1) aparecem amplamente na natureza, e são encontradas em muitos organismos, abrangendo as bactérias quanto a humanos (Mccomb e Bowers, 1985). Com poucas exceções, as Fosfatases Alcalinas são enzimas homodiméricas e cada sítio catalítico contém três ions metálicos, isto é, dois Zn e um Mg, necessários para a atividade enzimática.

As enzimas catalisam a hidrólise de monoésteres de ácido fosfórico e também catalisam reação de transfosforilação na presença de grandes concentrações de aceptores de fosfato. Enquanto as principais características do mecanismo de catálise são conservadas comparando enzimas de origem de mamíferos e bacterianas, as Fosfatases Alcalinas de mamíferos têm maior

atividade específica e valores de Km; um pH-ótimo mais alcalino; e exibem menor termo-estabilidade; estão ligados à membrana e são inibidas por L-aminoácidos e peptídeos através de um mecanismo não competitivo.

A Tabela 1 resume a nomenclatura, distribuição em tecidos e algumas das funções das Isoenzimas da Fosfatases Alcalina no homem e no rato. É importante ressaltar que os APs têm homologia para um grande número de outras enzimas e são, portanto, parte de uma superfamília de enzimas com algumas propriedades catalíticas sobrepostas e especificidades do substrato. Para mais informações sobre qualquer aspecto dos AP, incluindo os seus papéis *in vivo*, para compreensão da estrutura e função dos APs de mamíferos (Millan, 2006).

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 já foram identificadas: a da placenta, do intestino e a do fígado-osso-rim (Le Du e Millan, 2002; Kiffer-Moreira *et al.*, 2013; Kiffer-Moreira *et al.*, 2014).

Tabela 1. Resumo da nomenclatura genética, números de acesso, nomes comuns, distribuição e função tecidual, se conhecido, para o humano e camundongo isoenzimas da fosfatase alcalina. Tabela adaptada (Millan, 2006)

.

	Numero de acesso	Nome da Proteína	Nome comum	Tecido onde é encontrado	Função
Gene Humano					
ALPL	NM_000478	TNAP	Tecido não especifico, (Rim, osso, fígado)	Desenvolvimento do sistema nervoso, tecidos esqueléticos, fígado, rim	Mineralização Ossea
ALPP	NM_001632	PLAP	Fosfatase Alcalina de Placenta	Sincitiotrofoblasto, uma variedade de tumores	Desconhecido
Gene de Rato					
Akp2	NM_007431	TNAP	Tecido não especifico, (Rim, osso, fígado)	Desenvolvimento do sistema nervoso, tecidos esqueléticos, fígado, rim	Mineralização Ossea

A Fosfatase alcalina tecido não específico (TNAP) é codificada pela ALPL gene. TNAP é principalmente expressa em ossos, fígado e rim, mas também é encontrado em outros tecidos. No rato, cinco tipos foram identificados, incluindo o Akp5 embrionário específico e os genes AP específicos do intestino (Akp6) e o gene da tecido não específico (Akp2). Um gene TNAP (Alp 1) e dois os genes AP intestinais foram relatados em ratos (Millan, 2006). Histoquímica ou testes enzimáticos realizados na presença de levamisol, um potente inibidor não competitivo da TNAP (Van Belle, 1976), indicaram a presença de TNAP no tecido nervoso de primata e roedor (Narisawa *et al.*, 1997).

Comparando os efeitos em humandos/ratos, alguns pacientes exibindo formas graves de hipofosfatasia com baixo nível sérico de TNAP sofrem de epilepsia (Whyte, 1994). Por outro lado, uma forma de hiperfosfatasia caracterizado por um nível anormalmente alto de TNAP atividade no soro é acompanhada de retardo mental, convulsões e déficits neurológicos (Mabry *et al.*, 1970; Kruse *et al.*, 1988; Thompson, 2010). Curiosamente, sintomas epilépticos também são reproduzidos em ratos Akp2-/- totalmente privado da atividade da TNAP (Waymire *et al.*, 1995; Narisawa *et al.*, 1997). Estudos de comparação entre as isoformas da TNAP tanto em humanos quanto em ratos é de suma importância para compreensão das diferenças e melhor compreensão das doenças ocasionadas pelo excesso e ausência da TNAP.

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 de tecido não específico (TNAP) Figura 1.

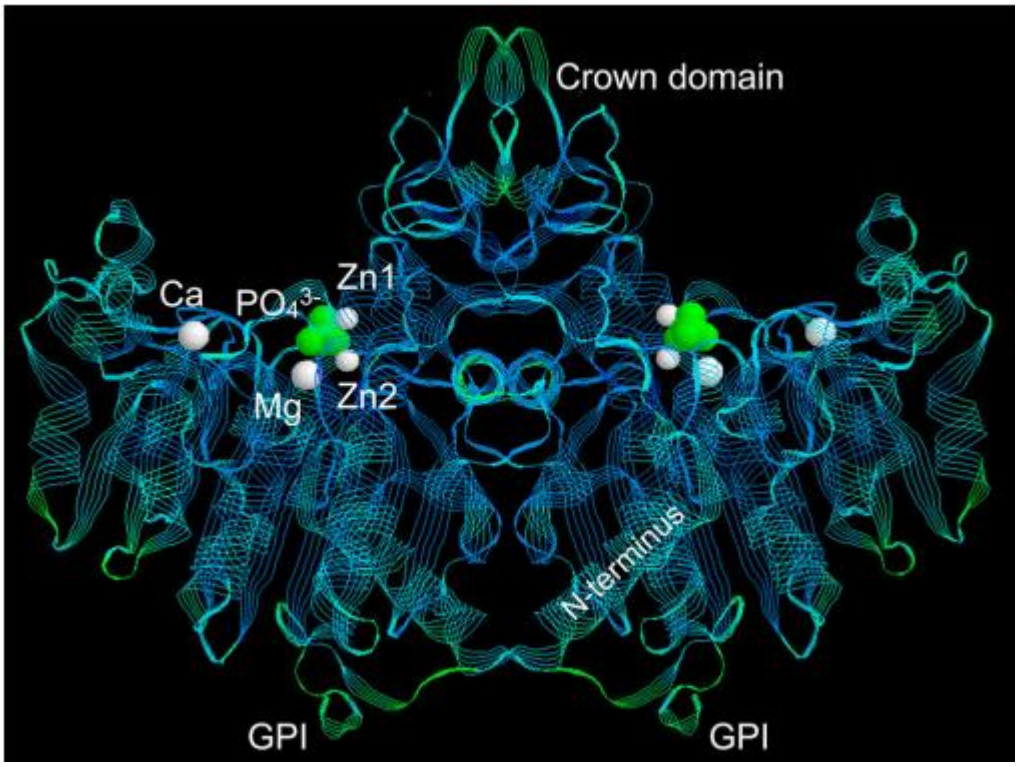


Figura 1: Representação da fita da estrutura 3D da fosfatase alcalina (1EW2). O local do sitio ativo (PO_4^{3-}) ligado a Ser92 durante a catálise é mostrado em verde. Os três metais do sitio ativo, dois $Zn2^+$ (Zn1 e Zn2) e um $Mg2^+$ (Mg), são mostrados em branco, bem como o estrutural $Ca2^+$ ion (Ca). Também são indicados sequência exposta flexível conhecida como "domínio da coroa"; a Hélice N-terminal de uma subunidade que chega perto do local ativo da subunidade contralateral; e a localização onde a âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI) está ligada ao terminal C do enzima adaptado de (Millan, 2006).

Além disso, níveis elevados desta isoforma também têm sido encontrados nas membranas dos osteoblastos durante a mineralização do tecido ósseo (Wuthier *et al.*, 1985a; Hsu e Anderson, 1995). Já foi demonstrado que a TNAP também pode hidrolisar o ATP, liberando o fosfato inorgânico (P_i). A enzima é regulada alostericamente pelo ATP (Pizauro *et al.*, 1993) e inibida competitivamente pelo produto da reação, o P_i (Pizauro *et al.*, 1987), sugerindo que níveis relativos de PP_i, um inibidor da biomineralização, e de P_i, um inibidor da TNAP, 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 os níveis de P_i, derivado da hidrólise do PP_i pela TNAP, atuam como um sinal da indução da expressão da glicoproteína fosforilada osteopontina em osteoblastos (Beck *et al.*, 2000). Em 2005 foi demonstrado que a TNAP pode também contribuir para a geração de PP_i através de sua atividade 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 da TNAP já descritas seja a remoção de PP_i do ambiente de mineralização através de sua atividade fosfomonohidrolase (Rezende *et al.*, 1998).

1.4 Fosfatase Alcalina e Interação Com Membrana

A TNAP exibe Atividade fosfomonohidrolítica, que gera fosfato inorgânico (Pi) a partir de pirofosfato inorgânico (PPi) e adenosina-5-trifosfato (ATP) e tem um papel crucial na calcificação. A TNAP está ligada a membranas de células e MVs através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (Ancorado por GPI), que fornece à enzima mobilidade lateral em relação à membrana (Garcia *et al.*, 2015). Essa mobilidade permite que o TNAP se acumule em microambientes lipídicos específicos associados a microdomínios ricos em esfingolipídios, glicoesfingolipídeos, e colesterol (Chol) (Pizauro *et al.*, 1995; Sakamoto *et al.*, 2013; Mouritsen e Bagatolli, 2015; Bhatia *et al.*, 2016) .

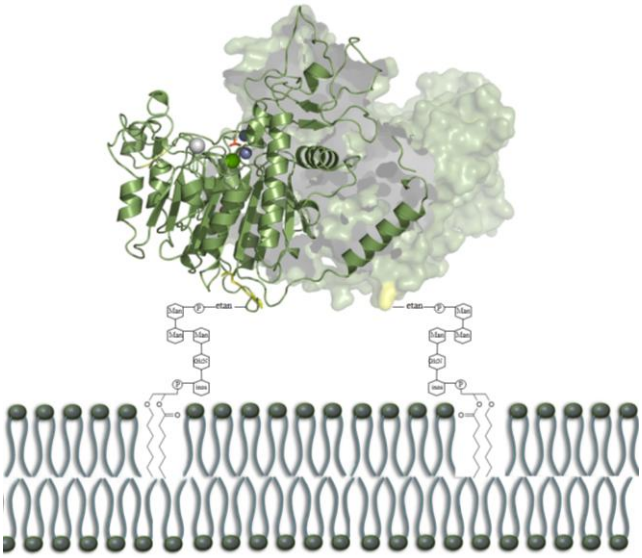


Figura 2: Esquema representativo do modelo homodimérico de TNAP ancorado em uma bicamada lipídica por meio da modificação pós-traducional GPI. Os anéis representados na estrutura do GPI representam os oligossacarídeos presentes, etan: etanolamina; man: manose; GlcN: glucosamina; inos: inositol; P: fosfato. Figura construída a partir do modelo da TNAP gerado no software modeler 9.11, baseado na estrutura da PLAP, código de acesso no PDB: 1EW2. Adaptado de (Le Du *et al.*, 2001)

Evidências de que os lipídios podem estar envolvidos em alguma fase do processo de mineralização já foram obtidas através de estudos histoquímicos. As vesículas da matriz exibem a mesma composição lipídica, com conteúdo mais alto de Chol, esfingomielina e fosfatidilserina, similares aos "*rafts"* quando comparadas à membrana plasmática (Wuthier *et al.*, 1985a; Thouverey *et al.*, 2009).

"*Lipid rafts*" são comumente definidos como microdomínios existentes em membranas, enriquecidos em Chol 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, justificando o nome "*raft*" – jangada (Simons e Ikonen, 1997; Lichtenberg *et al.*, 2005; Lingwood *et al.*, 2010). 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 esfingomielina e glicoesfingolipídios, bem como ligações de hidrogênio entre as porções glicosil adjacentes dos glicoesfingolipídios (Simons e Ikonen, 1997; Lichtenberg *et al.*, 2005; Lingwood *et al.*, 2010).

Além disso, a natural saturação dos lipídios constituintes dos "*rafts*" e a ação dos glicolipídios promovem suas interações com o Chol (Brown e London, 2000). Acredita-se que todas essas interações são responsáveis pela formação de domínios detergente-resistentes formados pela mistura de certos lipídios, particularmente aqueles contendo esfingomielina, Chol, glicoesfingolipídios e fosfolipídios saturados (Dietrich *et al.*, 2001; Lichtenberg *et al.*, 2005; Lingwood *et al.*, 2010).

Recentemente, Thouverey e colaboradores (2009) relataram valores aproximados de 36% de fosfatidiletanolamina (PE), 26,5% de fosfatidilcolina (PC), 3,5% de ácido fosfatídico (PA), 7% de fosfatidilinositol (PI), 16,5% de fosfatidilserina (PS) e 11% de esfingomielina (SM) para a composição de fosfolipídios das MVs. Roberts (Roberts e Redfield, 2004) e colaboradores (2004) também demonstraram que fosfocolina e fosfoetanolamina podem ser hidrolisadas por PHOSPHO 1 (Houston *et al.*, 2004), sugerindo que a geração de P_i em células envolvidas no processo de biomineralização pode estar acoplada à degradação de fosfolipídios.

As MVs são ricas em fosfolipídios e Chol, lipídios em diferentes estados de organização podem influenciar a funcionalidade da membrana e as propriedades das proteínas presentes na membrana. Portanto, o efeito de lipídios saturados (DPPC e DMPC) e insaturados (DOPC) em MVs contendo esteróis merece atenção especial.

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 Chol que funciona como espaçador (Korade e Kenworthy, 2008). Glicoesfingolipídios têm normalmente uma longa cadeia de ácidos graxos, a qual pode interdigitar com a monocamada citoplasmática da bicamada lipídica. Como o Chol está presente em ambas as monocamadas, ele funciona como um espaçador na monocamada citoplasmática, bem como preenchendo vazios criados pela interdigitação das cadeias dos ácidos graxos (Lichtenberg *et al.*, 2005; Korade e Kenworthy, 2008; Lingwood *et al.*, 2010).

O Chol é um componente lipídico essencial da membrana plasmática células animais, o Chol em baixa concentração aparece em certas membranas intracelulares envolvidas na comunicação vesicular com a membrana plasmática (Liscum e Munn, 1999). O colesterol livre predomina na membrana das MVs, representando 31,7% dos lipídios não polares (Wuthier e Lipscomb, 2011) embora o Chol tenha várias funções, uma das suas principais funções é modular as propriedades físicas e organização lateral da bicamada lipídica da membrana plasmática (Simons e Ikonen, 1997; Barenholz, 2002). Estudos anteriores (Bolean *et al.*, 2011) mostraram que, com o aumento das concentrações de Chol causam efeitos nos parâmetros termodinâmicos dos lipossomos: a variação de entalpia na transição de fase (ΔH) dos lipossomos diminui, e o diâmetro médio dos lipossomos compostos por diferentes DPPC/Chol razões molares aumenta em comparação com lipossomos constituídos apenas por DPPC. a presença de Chol em monocamada de fosfolipídios e membranas modelo bicamada é claro a partir do alargamento e a eventual eliminação da cooperatividade de gel para líquido-cristalina na transição de fase e sua substituição por uma fase exibindo grau intermediário de organização (Beattie *et al.*, 2005; Benesch e Mcelhaney, 2014). Acima da

temperatura transição dos lipídios, o Chol organiza suas cadeias acil. Abaixo de temperatura de fusão, o Chol evita que os lípidos se condensem em fases sólidas, intercalando entre os fosfolipídios e reduzindo a flexibilidade das cadeias vizinhas (King e Marsh, 1986). Além disso, a adição de Chol na misturas de lipídeos gera dua fases líquidas coexistentes, o líquido cristalino (Lα) e o fase líquido-ordenado (Lo) (Bennett *et al.*, 1975; Beattie *et al.*, 2005; Stottrup e Keller, 2006; Bagatolli e Mouritsen, 2013). Chol também diminui a área ocupada por molécula em lipossomos na fase de gel, aumentando assim interações lipídicas/lipídicas e elevação de ΔH em sistemas binário e ternário (Bolean *et al.*, 2010; 2011).

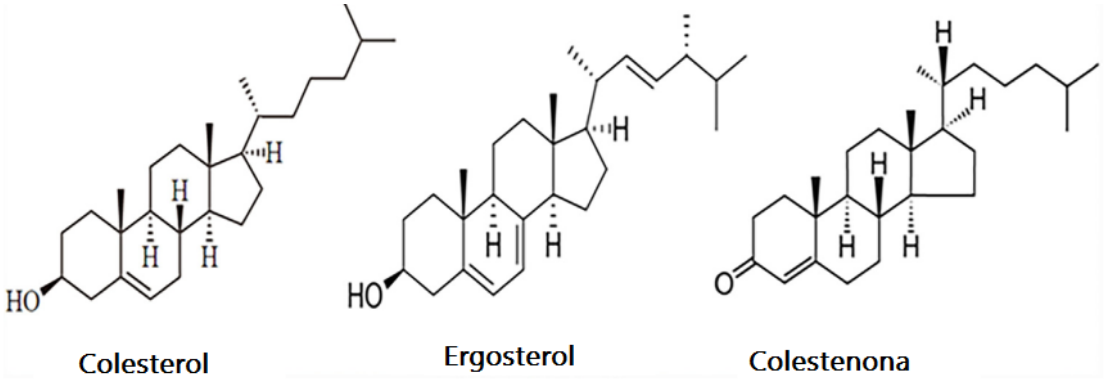


Figura 3: Diferentes estruturas dos esteróis estudados. Adaptado de (Favarin *et al.*, 2017)

O Ergosterol (Ergo) difere de Chol (Fig. 2) por uma dupla ligação adicional no anel B do núcleo esteroide em C7, C8, bem como ligação dupla entre C22, C23 e um grupo metil extra em C24 da cadeia lateral de alquilo (Fig. 1). A ligação dupla adicional e o grupo metilo na cadeia lateral de alquilo de Ergo fornecem este análogo de Chol com uma parte alquilo mais rígida, e o conjugado adicional ligação dupla do núcleo esteróide pode produzir um mais rígido e anel planar B bem como anéis B e C com conformação mais plana (Hsueh *et al.*, 2005).

Simulações de dinâmica molecular sugerem que o Ergo ocupa um volume molecular efetivo consideravelmente menor em bicamadas de DPPC (Cournia *et al.*, 2007) no estado Lo (Smondyrev e Berkowitz, 2001a; b), provavelmente porque a mobilidade fora do axial do núcleo esteróide e da cadeia lateral alquila em Ergo são menores em comparação com Chol, e

porque Ergo exerce maior condensação efeito na bicamada fosfolipídica do hospedeiro (Nes *et al.*, 1978; Bloch, 1991).

O terceiro análogo é a Cholestenona (Achol), difere do Chol e Ergo por substituição do grupo OH por um grupo ceto (Fig. 1). A existência de uma ligação dupla no anel A e de um grupo ceto resulta em um arranjo conjugado em Achol (Beattie *et al.*, 2005). Estes esteróis (Chol, Ergo e Achol) diferem na natureza e estereoquímica do grupo de cabeça polar e na (s) posição (ões) de a ligação dupla (s) (Benesch e Mcelhaney, 2014).

Análogos de colesterol têm sido frequentemente utilizados para avaliar como os grupos funcionais nestas moléculas podem interagir com lípidos na interface da membrana. Neste contexto, este estudo concentra-se nas diferenças estruturais e nas interações que esteróis e lipídios podem estabelecer e que conseqüentemente afetam atividade do TNAP (Favarin *et al.*, 2017).

Assim, muitos estudos sobre a interação do Chol com monocamada de fosfolipídios e modelos de membranas de bicamada foram realizados, utilizando uma grande variedade de técnicas (Demel e De Kruyff, 1976; Vist e Davis, 1990; Mcmullen e Mcelhaney, 1996; Mcmullen *et al.*, 1996), na sequência dos estudos de DSC pioneiros de Chapman (Ladbrooke *et al.*, 1968) e de Sturtevant (Hinz e Sturtevant, 1972).

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). Estudos na literatura mostram uma substancial organização lateral desses dois lipídios e proteínas na membrana biológica (Simons e Ikonen, 1997; Brown e London, 2000; Lichtenberg *et al.*, 2005; Lingwood e Simons, 2010). Esfingolipídios, incluindo SM, juntamente com Chol 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, Chol e algumas proteínas integrais de membrana. A importância da SM, tanto estruturalmente como funcionalmente (Barenholz, 2002).

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. Proteinas GPI-ancoradas apresentam diversificadas funções biológicas incluindo atividade de hidrólise enzimática, sinalização transmembrana e interações de adesão celular (Low, 1989; Ferguson, 1999). A TNAP é um exemplo deste tipo de proteína (Pizauro *et al.*, 1994; 1995; Ciancaglini *et al.*, 2006; Simao *et al.*, 2007). Além disso, é importante ressaltar que a atividade da TNAP pode ser afetada quando embebida em micelas reversas (Chang e Shiao, 1994). Assim, acredita-se que a organização da membrana biológica em micro domínios tem um papel chave em vários processos celulares semelhantes à repectores protéicos (proteínas alvo) e a transdução de sinal.

A existência de microdomínios tem sido explicada pela separação das membranas lipídicas em duas fases: fase líquido-cristalina (Lα) e fase líquido-ordenada (Lo) rica em Chol, esfingosina e glicolipídios não carregados. Deste modo, nosso grupo de pesquisa (Bolean *et al.*, 2010; 2011) padronizou uma metodologia para obtenção de sistemas vesiculares na presença de microdomínio lipídios e a reconstituição da TNAP a estes sistemas possibilitando assim estudos bioquímicos e biofísicos dos sistemas vesiculares formados (Bolean *et al.*, 2010; 2011). Em adição Milhiet e (Milhiet *et al.*, 2002) colaboradores (2002) demonstraram, por microscopia de força atômica, a inserção espontânea da TNAP, via GPI em micro domínios de fase ordenada e na presença de Chol. Resultados anteriores também tinham mostrado a dependência do Chol na reconstituição da TNAP em sistemas de lipossomos (Nosjean e Roux, 1999; Morandat *et al.*, 2002; Sesana *et al.*, 2008; Bolean *et al.*, 2017b). Assim a TNAP pode ser um marcador eficiente de “lipid *rafts*”.

Em um trabalho recente, Garcia 2015 (Garcia *et al.*, 2015), relata a importância de se obter mais informações fisiológicas e estruturais sobre TNAP, quando ancorada através da GPI em um ambiente de bicamada lipídica. Foi concluído que a TNAP está provavelmente próxima da superfície da membrana e que esta proximidade pode estar relacionada à modulação da atividade catalítica pela composição lipídica como anteriormente relatados (Bolean *et al.*, 2011; Favarin *et al.*, 2017). Entretanto, mais estudos são necessários para se entender completamente as implicações do mecanismo de

ancoragem que resulta em efeitos na estrutura e função da TNAP e na organização da membrana em vesículas da matriz.

Outro aspecto que precisa ser destacado é uma característica de fosfolipídios ácidos que apresentam grande afinidade por cálcio, principalmente a fosfatidilserina, também encontrados nas membranas das vesículas extracelulares (Boyan *et al.*, 1989) e que são capazes de promover a formação de hidroxiapatita *in vitro*, mesmo na ausência de TNAP (Eanes, 1970). Este fato sugere uma possível associação dos fosfolipídios com o processo de mineralização. Além disso, estes fosfolipídios podem atuar no controle da biomineralização 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 (Wuthier *et al.*, 1985b; Balcerzak *et al.*, 2003; Blandford *et al.*, 2003; Wuthier e Lipscomb, 2011).

Assim, alterações que podem ocorrer nas funções das vesículas podem representar um mecanismo de regulação da formação do mineral. 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 frequentemente de vários dias para a obtenção significativa de mineral. Além disso, outro fator que dificulta estes estudos são os baixos níveis de íons minerais e/ou pH nas soluções metaestáveis de fosfato de cálcio, geralmente usadas nestes estudos.

Em síntese, para entender acerca da importância dos complexos lipídicos na mineralização mediada por MVs, é necessário a realização 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 das MVs ou no fluido extracelular nativo. Ciancaglini e colaboradores (Ciancaglini *et al.*, 2006) demonstraram que as propriedades catalíticas da TNAP variam dependendo do microambiente onde a enzima se encontra. Assim, diferentes formas da enzima (associada à membrana, solubilizada com detergente ou tratada com PIPLC) apresentaram diferentes especificidades para os diversos substratos estudados, provando que a cinética da enzima é grandemente afetada pela presença tanto da âncora de GPI quanto de outros componentes da membrana celular.

Empregando-se os sistemas vesiculares de lipossomos, cuja metodologia de obtenção foi padronizada em nosso laboratório (Bolean *et al.*, 2010; 2011; Ciancaglini *et al.*, 2012; Simao *et al.*, 2013; Bolean *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2015; Bolean *et al.*, 2017a; Bolean *et al.*, 2017b; Favarin *et al.*, 2017), o envolvimento da enzima e dos lipídios durante o processo de mineralização foi mais fácil de ser estudado, pois estes sistemas podem mimetizar a função das vesículas tanto em sistemas *in vitro* bem como *in vivo*.

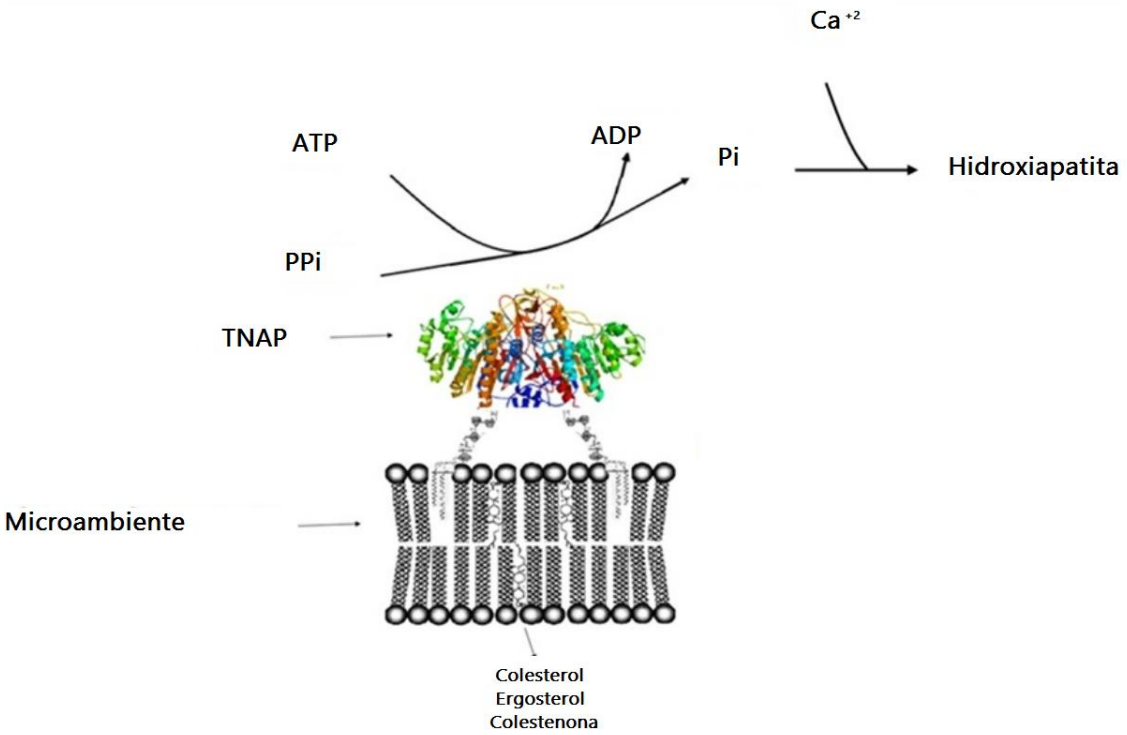


Figura 4: Influência do Microambiente lipídico na Atividade da Fosfatase Alcalina (TNAP) na presença do Fosfolipidio (DPPC, DMPC ou DOPC) e de um Esterol (colesterol, Ergosterol ou Colestenona). (Adaptado de Favarin e colaboradores, 2017 (Favarin *et al.*, 2017)).

Como pode ser observado, os estudos realizados até o momento não permitem correlacionar a atividade da TNAP e microdominios lipídicos (similares a MVs), especialmente empregando-se fosfo-substratos fisiológicos como ATP e PP_i. Com este enfoque pode-se correlacionar os mecanismos de controle da atividade desta enzima com a organização intermolecular e o estado de fase dos lipídeos da membrana. Deste modo, estes estudos poderão trazer um significativo avanço do conhecimento tanto do papel da enzima quanto do processo de biomineralização.

Neste sentido, esta Tese teve como principais objetivos a construção de

sistemas de lipossomos utilizando em sua composição os lipídios DPPC, DMPC, DOPC e Chol (bem como análogos), em diferentes proporções, e assim reconstituir a TNAP aos sistemas vesiculares formando assim os proteolipossomos. A TNAP incorporada nos diferentes sistemas de proteolipossomos, nos permitiu estudar a dependência da atividade ATPase, ADPase e PPiase, bem como estudos de mineralização em pH fisiológico.

1.5 Técnicas Bioquímicas e Biofísicas

1.5.1 Cinética Enzimática.

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que determina a velocidade de reação de hidrólise de uma determinada enzima e como ela se modifica em resposta ás mudanças nos parâmetros experimentais, como por exemplo, concentração de enzima, concentração de ligantes (inibidores, ativadores e substrato), Força iônica, pH e temperatura (Cuppoletti e Segel, 1975).

A metodologia utilizada em cinética do estado estacionário para se determinar a interação entre ligantes e a enzima consiste em variar a concentração de um ligante e mantendo a concentração dos outros reagentes. A comparação dos parâmetros cinéticos ($V_{máx}$, $K_{0.5}$, n, k_{cat} entre outros) é complexa e requer metodologias com rígidos controles e condições ótimas de pH, tampão, presença de íons. Porém os parâmetros cinéticos podem ser utilizados para comparar a atividade de enzimas. (Pizauro *et al.*, 1992; Leone *et al.*, 1997; Simao *et al.*, 2013; Hoylaerts *et al.*, 2015; Favarin *et al.*, 2017).

A constante $K_{0.5}$ é uma constante dinâmica que expressa a relação entre as concentrações reais no estado estacionário ao invés de concentrações no equilíbrio, para enzimas não Michaelianas. Representa uam constante importante que relaciona a velocidade de reação enzimática com a concentração de substrato, sendo uma medidade aproximada de afinidade da enzima pelo substrato. O substrato com $K_{0.5}$ mais baixo apresenta maior afinidade pela enzima. O parâmetro k_{cat} ou numero de renovação é equivalente ao numero de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de

tempo, por uma única molécula de enzima quando saturada com substrato. Os parâmetros $K_{0.5}$ e k_{cat} são uteis para estudar e comparar enzimas diferentes, quer sejam os mecanismos de reação simples ou complexo. Do ponto de vista experimental, o $K_{0.5}$ de uma enzima tende a ser similar á concentração de substrato presente na célula (Cuppoletti e Segel, 1975) A melhor maneira de comparar as eficiências catalíticas entre enzimas diferentes, ou numero de vezes que diferentes substratos são catalisados por uma mesma enzima, é comparar a relação $k_{cat}/K_{0.5}$ chamada de constante de especificidade ou eficiência catalítica (Hoylaerts *et al.*, 1997; Hoylaerts *et al.*, 2006).

Enzimas que possuem múltiplos sítios ativos, porém independentes, isto é, a ligação de uma molécula de substrato não afeta as constantes de dissociação intrínseca dos sítios vazios, apresentam curvas hiperbólicas normais. Entretanto, se a ligação de uma molécula de substrato induz mudanças estruturais ou eletrônicas que provoquem alterações nas afinidades dos sítios vazios, a enzima é classificada como alostérica. Os sítios de ligação de múltiplos substratos em enzimas alostéricas situam-se em subunidades proteicas diferentes, como no caso da TNAP (Hoylaerts *et al.*, 1997) e, geralmente, este grupo de enzimas fornecem curvas de velocidade sigmoidais. Quando a ligação de uma molécula de substrato facilita a ligação da próxima molécula de substrato pelo aumento de afinidades dos sítios de ligação vazios, tem-se o fenômeno chamado de “ligação cooperativa” ou “cooperatividade positiva” em relação á ligação do substrato, ou “resposta homotrópica positiva”. As interações entre ligantes diferentes, como por exemplo, substrato e ativador/inibidor ou ativador e inibidor, são chamadas de respostas heterotrópicas e podem ser tanto positivas quanto negativas. Os dados experimentais de velocidade podem ser analisados em termos da equação de Hill na forma logarítmica, obtendo uma forma linear da equação de Hill onde a inclinação da reta é igual a n. Quando n=1, não são observados efeitos cooperativos entre os sítios ativos da enzima. Quando os valores de n são positivos tem-se efeitos de cooperatividade positivos e para valores negativos de n, efeitos de cooperatividade negativos (Cuppoletti e Segel, 1975).

1.5.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) é uma ferramenta analítica de grande importância para a caracterização das propriedades termotrópicas, interação lipídio-lipídio e lipídio-proteína. 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 (Demetzos, 2008).

Os lipídios podem adotar diferentes estados lamelares chamados de fase gel ou liquido-cristalino. Os parâmetros determinados são comportamento físico-químico da membrana (Tc) temperatura critica, a temperatura de transição de estado gel para o estado fluido cristalino. Os lipídios empacotados estão no estado ordenado, fase gel, entretanto acima dessa temperatura Tc eles são desordenados em estado fluido (Mannock *et al.*, 2006).

No esquema abaixo (Figura 5) utilizaram-se lipossomos constituídos por DPPC (10 mg/mL) para observação dos parâmetros termodinâmicos que podem ser extraídos de uma curva de DSC.

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

Neste esquema (abaixo) pode-se observar a temperatura crítica de transição (Tc), temperatura na qual a amostra apresenta máxima capacidade calorífica pontuando a transição da fase gel á fase liquido cristalino. A entalpia (ΔH) é um parâmetro representado pela área total do pico, o qual está relacionado com a estabilidade do sistema analisado. A cooperatividade das moléculas durante o processo de transição apresenta grande importância em relação ao comportamento termotrópico da amostra e pode ser definido como largura que corresponde a meia altura do pico de transição ($\Delta t_{1/2}$).

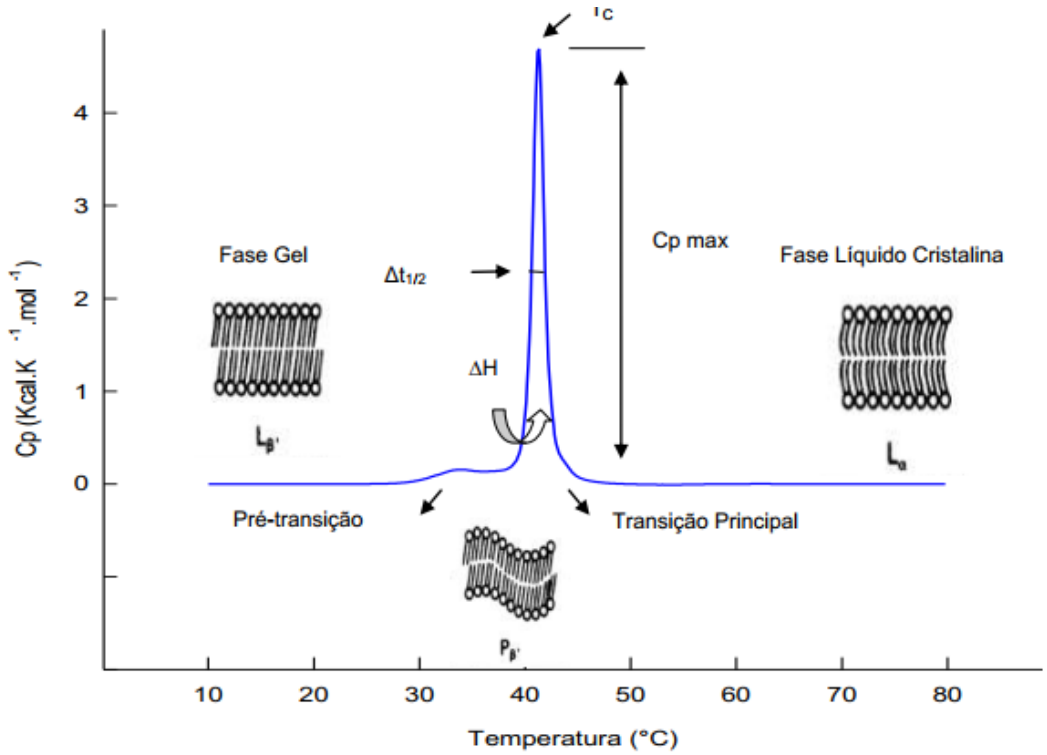


Figura 5: Características dos parâmetros termodinâmicos de uma curva de DSC, utilizando no esquema lipossomos constituídos de DPPC com concentração igual a 10 mg/mL. Figura adaptada de (Demetzos, 2008).

Na transição de fase do DPPC pode ser observado o aparecimento de um pico agudo e bem definido, devido ás favoráveis interações de van der Waals entre as cadeias hidrocarbônicas do lipídio, resultando em uma alta cooperatividade das moléculas. Neste esquema podemos observar dois picos de transição: o primeiro ao redor de 33ºC que corresponde á pré-transição de fase e o segundo pico que corresponde á transição principal em 41ºC (Demetzos, 2008).

1.5.3 Análise do Formato da Gota do Eixo Simétrico

A tensão superficial (γ) de líquidos ou soluções puras podem ser medidas por muitas abordagens experimentais. O método da gota pendente baseia-se na análise da forma da gota assimétrica (ADSA) de medida γ na interface líquido-ar ou líquido-líquido. Como o ADSA usa microlitros de amostra, essa técnica é muito útil quando há apenas uma pequena quantidade da amostra disponível (Rotenberg *et al.*, 1983; Berry *et al.*, 2015). Os métodos tradicionais aplicados para determinar γ geralmente necessitam do uso de uma

placa ou capilar em contato com a superfície, causando uma perturbação na interface. No entanto, usando o ADSA, é possível fazer uma medição de γ com base na forma da gota, sem qualquer interferência externa. Como mostrado na Figura 6.

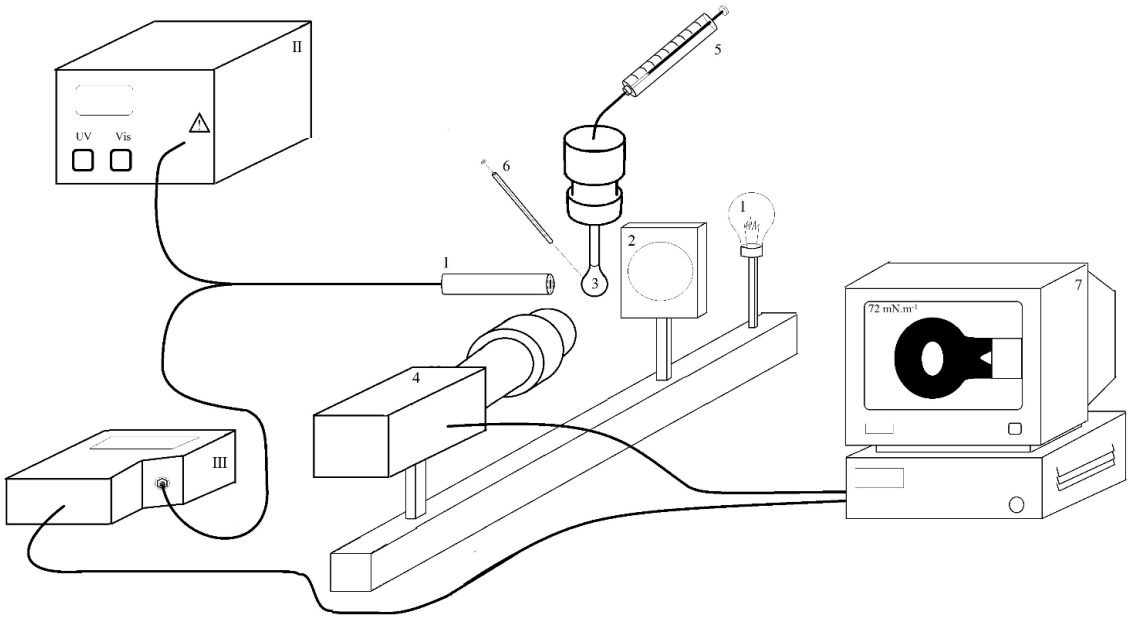


Figura 6: Diagrama esquemático da tensão superficial ADSA [(1) Luz; (2) Difusor; (3) Gota pendente; (4) CCD câmera; (5) Seringa; (6) Deposição da amostra; (7) Computador com *frame grabber*] e UV-Vis Espectrofotometria c [(I) Difusor da amostra; (II) Luz de deuterium/halogenia ; (III) Espectrômetro] analisador retirado de Andrade e colaboradores (Andrade *et al.*, 2016).

A etapa de espalhamento é crucial para a formação de uma monocamada na superfície da gota (Wege *et al.*, 1999; Caseli *et al.*, 2006): γ depende da quantidade de surfactante adsorvido na superfície, portanto, essa etapa fornecerá valores específicos γ ou π em determinada concentração. Por sua vez, π corresponde à diminuição em γ da solução aquosa pura (γ_0) na presença do surfactante:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

Além de possibilitar a determinação de γ, o uso de volumes de amostra reduzidos também é interessante para outros tipos de análises, especialmente quando não se tem uma concentração grande de analito disponivel. O ambiente de uma gota de microlitro pendente requer baixas quantidades da amostra porque os volumes das gotas são da ordem de dúzias de microlitros. A

gota pode atuar como um micro-reator no qual técnicas refinadas auxiliam no monitoramento de reações químicas.

O DRUV-ADSA permite o monitoramento da cinética enzimática, a formação do produto ou do consumo de reagentes é a forma tradicional de realizar a análise da atividade enzimática. Esse monitoramento pode ser descontínuo, interrompendo a reação após um intervalo de tempo, ou contínuo, seguindo a reação em tempo real.

A banda de absorção foi localizada entre 380 e 450 nm, com um máximo a 410 nm, como uma função do tempo evidenciando um aumento na concentração de PNP^- após injeção no TNAP. O espectro obtido por Druv-ADSA assemelha-se ao espectro realizado pelos tradicional métodos de UV-vis (inserida na Figura 6). A intensidade da banda em 410 nm variou como uma função linear em relação tempo.

Enzimas ligadas à bicamada lipídica da membrana celular através de uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) apresentam atividade superficial (Ronzon *et al.*, 2002; Caseli *et al.*, 2008a): GPI fornece uma porção hidrofóbica, enquanto a cadeia polipeptídica corresponde à parte hidrofílica. Como essas enzimas atuam como surfactantes, é possível verificar como sua interação com as monocamadas lipídicas (Brockman, 1999) afeta sua atividade. Uma das vantagens do método DRUV-ADSA é que ele emprega quantidades reduzidas de reagentes caros, como proteínas e fosfolipídios. Além disso, esta técnica permite o monitoramento simultâneo das alterações UV-vis e π ou γ em um aumento.

2 Objetivos gerais

Assim, esta tese teve como objetivo principal a expansão de nossa *expertise* na metodologia de construção de proteolipossomos (lipossomos com composições diferentes), associados a TNAP, pois esta enzima têm importante papel no processo de biomineralização. Além disso, foi estudada tanto a dependência da atividade da TNAP (ATP e PPi como substrato) quanto a formação de cristais de hidroxiapatita em soluções metaestáveis de íons cálcio e de substrato ATP.

2.4 Objetivos específicos:

2.4.1 Produzir vesículas binários e ternários de lipossomos, constituídos de diferentes composições de lipídeos (DPPC, Esfingomielina e Colesterol), mimetizando microdominios lipídicos.

2.4.2 Produzir lipossomos contendo DMPC no lugar de DPPC, para avaliar efeitos de mudanças de fluidez.

2.4.3 Incorporar a fosfatase alcalina (TNAP) em lipossomos constituídos de diferentes composições de lipídeos.

2.4.4 Caracterizações biofísicas das vesículas produzidas empregando-se DSC.

2.4.5 Correlacionar a atividade ATPase e PPiase da TNAP incorporada nos diferentes proteolipossomos.

2.4.6 Avaliar a capacidade de formação de nódulos de mineralização na superfície externa dos lipossomos e proteolipossomos.

2.4.7 Comparação das características biofísicas e cinéticas da TNAP obtida de cultivo de célula primária de Rato (rattus norvegicus) com a TNAP Humano (homo sapiens) expressa em células CHO.

3 Materiais e Métodos:

3.4 Obtenção e cultura de células de medula óssea de ratos

As células de medula óssea de ratos foram obtidas e cultivadas conforme descrito por Simão e colaboradores (Simao *et al.*, 2007). A medula óssea foi obtida de ratos machos, jovens, adultos, da linhagem Wistar, pesando 110-120 g. Para realização da cirurgia foi utilizado anti-séptico, campo cirúrgico e instrumental estéril. Antes da cirurgia o animal foi anestesiado (0,4 mL de Ketamina Agener 10% e 0,4 mL de Dopaser para cada 100g de animal). Em seguida foi feita a antisepsia da região abdominal, pernas e rabo com álcool iodado 1% para a retirada local da pele do animal. Após a retirada da pele foi feita a assepsia do local com o uso de clorexidina 2,5%. O fêmur foi separado da tíbia com cortes no tendão do joelho e em seguida os tecidos foram retirados para obtenção do fêmur com cortes de tesoura nas articulações próximas à bacia.

Os fêmures retirados assepticamente foram colocados em meio de transporte (meio essencial mínimo, contendo como antifúngico o fungisona e como antibiótico a gentamicina) e transportados até o laboratório para realização da extração de medula óssea dentro de uma capela de fluxo laminar. Para a extração da medula óssea foram realizadas três passagens em meio de transporte. Cada passagem levou no mínimo 30 minutos, onde foram retirados os restos de tecidos presos ao fêmur com o auxilio de um bisturi. As epífises foram removidas e a medula extraída com jato de 20 mL de meio de cultura (meio essencial mínimo-α (α-MEM), suplementado com 15% de soro fetal bovino, 50 µg/mL de gentamicina, 0,3 µg/mL de fungizona, 10^{-7} M de dexametazona, 5 µg/mL de ácido ascórbico e 7 mM de β-glicerofosfato) esguichado por uma seringa com agulha.

Fez-se assim uma lavagem interna do fêmur com meio de cultura, extraindo toda a medula óssea. As células liberadas foram cultivadas em frascos de 75 cm^2 contendo meio de cultura, por cerca de 14 dias, sempre mantidas a 37ºC e atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada 3 ou 4 dias.

3.5 Obtenções das frações de membrana de osteoblastos de Rato.

As frações de membrana ricas em TNAP foram extraídas das culturas osteoblásticas, conforme descrito por Simão e colaboradores (Simao *et al.*, 2007). As células que cresceram durante aproximadamente 14 dias em frasco plástico de cultura de 75 cm^2 foram lavadas com tampão de estoque Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM, raspadas com espátula plástica e ressuspensas em 40 mL de tampão de choque osmótico Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgSO_4$ 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 4ºC. O sobrenadante foi descartado e o pellet, com à fração de membrana de células osteoblásticas rica em TNAP, foi ressuspenso em 5 mL de tampão de estoque. Este material foi fracionado em alíquotas de 1 mL, rapidamente congelado e armazenado a –20ºC.

3.6 Obtenção da Fosfatase Alcalina Humana

O cDNA da TNAP humana de 2,5 kb foi clonado no vetor pCMV-Script (Stratagene, La Jolla, CA) para expressar a forma nativa de TNAP. Foi construído anteriormente um vetor para expressão no pCMVScript para produzir PLAP humano, que originalmente continha uma sequência peptídica sinal no terminal N e uma sequência de ancoragem GPI perto do C terminal. Um fragmento de DNA de 4,9 kb que representa o sinal da região de Peptídeo sinal de ancoragem da GPI-vetor da PLAP-pCMV foi amplificado por PCR a partir do vetor PLAPpCMV-Script por polimerase pfx (Invitrogen) com 5-primer (5-CTG GCG CCC CCC GCC GGC AC-3) e 3-primer (5-AAC TGG GAT GAT GCC CAG GGA GAG C-3). A expressão das céulas TNAP- CHO-K1 (ovario de hamster chines, CCL-61) foi tripsinizada e suspensa em 1,0 10^7 células em 800 µL de solução salina tamponada com HEPES, contendo 10 µL de plasmideo de cDNA de TNAP humano no vetor pCMV-Script. A suspensão de células foi colocada numa cubeta de eletroporação (parede de 4 mm) e electroporada a 400 mV, 250 microfaradais utilizando Gene Pulser (Bio-Rad). Após incubação em gelo durante 20 min, a suspensão de celula eletroporada foi diluída 250

vezes com meio de crescimento (10% de soro fetal de bovino, meio de Eagle´s modificado por Dulbecco) e cultivada em placas de 15 cm. Vinte e quatro horas depois, o meio foi substituído por meio de seleção contendo 800 g/ml de G418 e o meio de seleção foi renovado a cada três dias. Duas semanas depois, as células resistentes a G418 foram recolhidas para a preparação de amostras de membrana para TNAP, segundo o mesmo protocolo descrito para proteínas obtidas de rato e descrito por (Favarin *et al.*, 2017),

3.7 Dosagem de proteína

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

3.8 Determinação da atividade da fosfatase alcalina.

A atividade p-nitrofenilfosfatase (pNFFase) da TNAP foi determinada descontinuamente, a 37ºC, empregando-se um espectrofotômetro, através da formação do íon p-nitrofenolato (PNF^-) (ε = 17.600 $M^{-1}.cm^{-1}$, pH 13), em 410 nm. As condições de ensaio foram tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo $MgCl_2$ 2 mM e p-nitrofenilfosfato (pNFF) 10 mM, em um volume final de 0,5 mL. Para estudos realizados no pH ótimo de hidrólise da enzima, as condições de ensaio foram tampão AMPOL (2-amino-2-metil-1-propanol) 50 mM, pH 9,8, contendo $MgCl_2$ 2 mM e p-NFF 10 mM, em um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima e interrompida com 0,5 mL de NaOH 1 M em intervalos de tempo apropriados (Camolezi *et al.*, 2002).

Para outros substratos fosforilados utilizados, como ATP, ADP, PP_i em pH 7,4 as condições padrão foram as mesmas descritas acima, mas as atividades de fosfomonohidrolase foram determinadas descontinuamente através da dosagem do P_i liberado, de acordo com o procedimento descrito por Pizauro e colaboradores (Pizauro *et al.*, 1995), ajustando-se o meio de ensaio para um volume final de 0,5 mL. A reação foi iniciada pela adição da enzima,

interrompida com 0,25 mL de TCA 30% gelado em intervalos de tempo apropriados e a mistura reacional foi centrifugada a 4.000xg por 10 min antes da quantificação de fosfato. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas e as velocidades iniciais são esperadas ser constantes por no mínimo 90 min, já que menos que 5% do substrato foi hidrolisado. Controles sem a adição de enzima foram incluídos em cada experimento para se estimar a hidrólise não-enzimática do substrato. Uma unidade de enzima (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1,0 nmol de substrato por minuto, a 37°C, por mL ou mg de proteína. Os dados foram descritos como a média de determinações em triplicatas de 3 preparações enzimáticas diferentes, as quais foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

3.9 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 25ºC. A enzima foi então armazenada em detergente a 10 ºC, evitando assim uma possível agregação.

Amostras da enzima solubilizada foram analisadas quanto à atividade pNFFase.

3.10 Remoção do excesso de detergente

A TNAP solubilizada com polidocanol foi incubada sob agitação constante, durante 2 horas, a 4ºC, 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 $MgCl_2$ 2 mM, conforme descrito por Camolezi e colaboradores (Camolezi *et al.*, 2002).

3.11 Preparação dos lipossomos

Lipossomos com concentração de 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 o vácuo por 1 hora, para garantir a completa do meio. Em seguida, o filme lipídico foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM a fim de formar uma solução de concentração final de 10 mg/mL. Esta mistura foi incubada a 60ºC 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 1,00 mL e a solução de lipídeos transferida de uma seringa para outra por 21 vezes, passando através de uma membrana de policarbonato (100 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 conforme descrito por Bolean e Colaboradores. (Bolean *et al.*, 2010; 2011) : lipossomos de DPPC, DOPC, DMPC e lipossomos mistos constituídos de DPPC:CHOL, DOPC:CHOL, DMPC:CHOL em proporção molar de 0, 90:10, 75:25 e 64:36 mol% de Chol. Também foram preparados lipossomos contendo Colestenona e Ergosterol em proporção de (64:36) mol%.

Amostras de lipossomos e TNAP (em torno de 35 µg/mL) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM, foram misturadas e incubadas a 25ºC 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 4ºC, e o pellet foi ressuspenso no mesmo tampão acima descrito. A atividade pNFFase total antes da incorporação, antes da ultracentrifugação e a atividade presente no sobrenadante e no pellet ressuspenso foram determinadas para calcular a porcentagem de incorporação.

3.12 Determinação do diâmetro médio das vesículas

O diâmetro médio das vesículas foi determinado 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 µm) 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.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Brawniano 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 (Santos e Castanho, 1996).

A estabilidade dos lipossomos, bem como dos proteolipossomos preparados, foi acompanhada através de medidas de espalhamento de luz dinâmico, por um período de até 10 dias.

3.13 Determinação dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos de hidrólise dos substratos pela TNAP, obtidos nas diferentes condições experimentais: $K_{0,5}$ (constante de dissociação aparente), n (coeficiente de Hill) e $V_{máx}$ foram calculados empregando-se o programa SigrafW desenvolvido por Leone e colaboradores (Leone *et al.*, 2005). Os resultados foram apresentados como a média de determinações em triplicata, de 3 preparações diferentes, as quais foram consideradas estatisticamente significativas quando $P \leq 0,05$.

3.14 Ensaios de Mineralização.

O ensaio de mineralização foi realizado como descrito previamente por Genge (Genge *et al.*, 2007) e adaptado por Simão (Simao *et al.*, 2013).

Resumidamente, a solução de fosfatidilserina (PS) foi preparada por secagem de 1,25 mg do lipídio em clorofórmio, sob uma atmosfera de Nitrogênio para formar um filme, sobre a parte inferior de um tubo de ensaio. O filme foi dissolvido em 2 mL de tampão fosfato intracelular (ICP) composto por: 106,7 mM de K^+, Na^+ 45,1 mM, 1,5 mM de Mg^{2+}, Cl^- 115,7 mM, 23,0 mM de Pi, HCO_3 10 mM, SO_4^{2-} 1,5 mM e 3,1 mM N_3^-, pH 7,2, sonicadas durante 2 minutos a 25°C para formar uma emulsão homogênea de vesículas unilamelares. A Propagação da formação mineral foi avaliada na presença de complexos de nucleação sintéticos feitas tanto de fosfato de cálcio amorfo (ACP) sozinho ou combinado com PS (PS-CPLX). Foi feita a mistura de 1 mL da solução preparada anteriormente com PS com 17,5 µL de $CaCl_2$ 100 mM e 1,6 mL de tampão de ICP. Esta solução foi homogeneizada e centrifugada durante 5 minutos a 15.000 x g. O sedimento foi ressuspenso em 1 ml de tampão Tris 16,5 mM HCl, pH 8, sonicadas durante 30 segundos para obter a suspensão uniforme. Ao mesmo tempo, outro tampão foi preparado, cartilagem sintética linfa Tampão recipiente (SCL) contendo Ca^{2+} mM e ATP 1 mM, como uma fonte de substrato, 104,5 mM de Na^+, Cl^- 133,5 mM, sacarose 63,5 mM, 16,5 mM Tris, 12,7 mM de K^+, a glucose 5,55 mM, 1,83 mM de HCO3 e 0,57 mM de Mg^{2+}. Finalmente, os ensaios de mineralização foram realizados num volume final de 280 µL (em microplaca de 96 poços), onde os diferentes lipossomos/proteolipossomos (14 µL) foram incubados com 140 tampão µL de SCL, 21 µL de suspensão de PS-CPLX e 14 µL de tampão 16,5 mM Tris-HCl, pH 8 e homogeneizados durante 10 segundos. A propagação do mineral foi quantificação pela turbidez (absorbância a 340 nm) após 48 h de incubação a 37 °C utilizando um Molecular Devices leitor de Microplacas M3. Cada amostra foi realizada em triplicata e os lipossomos foram utilizados como controles. Os resultados foram normalizados com concentração de proteína de proteolipossomos de cada amostra, pois obteve-se valores diferentes para a incorporação TNAP em cada tipo de proteolipossomos.

3.15 Espectrofotometria ultravioleta-visível acoplado a análise de tensão superficial

A técnica foi padronizada segundo (Andrade *et al.*, 2016). Primeiramente foram feitos testes com a técnica como podem ser observados nas Figuras 6 (gota pendente), os resultados são referentes aos valores de absorbância utilizados para determinar a atividade específica da enzima TNAP por Druv-ADSA.

O experimento de espectrofotometria ultravioleta-visível acoplado a análise de tensão superficial (γ) e associado fibra óptica reflexão (Ocean Optics) estava concentrada próximo (cerca de 2-3 mm) da a superfície lateral de uma gota pendente (Volumes entre 10 e 12 µl) com o auxílio de um tensiômetro automático OCA-20 (DATAPHYSICS). A fibra foi acoplada a uma fonte de luz de deutério/halogêneo (DH-2000-Bal Oceano Óptica®) e um espectrômetro (Ocean Optics RH 2000). Os espectros foram registrados através da análise ultravioleta-visível de reflectância difusa (Druv) e os valores (γ) foram obtidos através da análise da forma da gota assimétrico (ADSA).

Para a análise de cinética enzimática, as gotas foram formadas utilizando uma solução aquosa 70 mM de Ampol, pH 10,0, 10 mM de pNPP, e 2 mM de $MgCl^2$. A atividade enzimática foi monitorada através das mudanças na intensidade da banda de absorção UV-vis em torno de 410 nm, atribuído à formação de p-nitrofenolato.

A atividade enzimática específica foi determinada usando um fator de correção correspondente à inclinação dos valores linear de absorvância como uma função dependente da concentração de PNP^- (DRUV). Para este fim, o meio de reação contendo pNPP foi incubado numa cubeta com comprimento óptico de 1 cm contendo 0,528 ug de TNAP. Os espectros de UV-Vis do produto (PNP^-) foram calculados em função de tempo. Após 5 minutos, esta mesma solução foi transferida para o aparelho Druv-ADSA, e os espectros também foram registrados. A lei de Lambert-Beer aplicado à abordagem tradicional forneceu as concentrações de íons p-nitrofenolato, em seguida, uma relação com os valores de absorbância da medição de reflectância difusa. A atividade específica foi expressa como uma unidade (U= nmol de PNP por minuto) por massa (mg) de TNAP.

A atividade enzimática e γ foram determinadas simultaneamente após a injeção de 0,5 μL da TNAP ug.mL^{-1} solução de 26,4 μL (na ausência de polidocanol) na gota. A atividade enzimática foi determinada também na presença de fosfolipídios como descrito a seguir. As monocamadas foram formadas por injeção de alguns microlitros de uma solução de clorofórmico (concentração final de 1 mM tensoativo) dentro da gota. Em seguida, 0,2 μL de uma solução 42,7 µg.mL-1 TNAP foi injetado no interior da gota, e mudanças no UV-vis espectros foram registrados simultaneamente com as mudanças na γ. Os dados são os ± médios relatados como S.D. de triplicar as medições de diferentes preparações da gota.

3.16 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

Os estudos de calorimetria foram realizados empregando-se os equipamento N-DSC II: Differential Scanning Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation). As amostras e a referencia (tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2mM) foram previamente deaeradas antes de serem submetidos á analise (300 µL de cada). Realizaram-se varreduras de temperatura de 10 ºC a 90 ºC, com velocidade de aquecimento de 0,5 ºC/min, bem como varreduras de 10ºC a 90ºC, com velocidade de resfriamento de 0,5 ºC/min.

Durante a transição, a temperatura da amostra permanece constante, enquanto que a da referencia continua aumentado. O calorímetro registra uma variação de temperatura que é convertida em diferencia de potencia (ΔP). os dados de potencia (µW) são transformados em capacidade calorífica molar, possibilitando a determinação dos valores de temperatura critica de transição (Tc), cooperatividade ($\Delta t_{1/2}$) e variação de entalpia (ΔH). as análises de deconvolução, realizadas para se obter uma melhor resolução de picos distintos que podem aparecer em uma mesma corrida, foram realizados utilizando-se o programa Origin, versão 8.0 (Bolean *et al.*, 2010; 2011).

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterização biofísica por DSC de lipossomos e proteolipossomos

Realizamos estudos de lipossomos e proteolipossomos constituídos por diferentes misturas lipídicas representadas sempre em mol%, a saber: DPPC, DPPC:Chol (90:10), DPPC:SM (90:10), DPPC:Chol:SM (80:10:10), DMPC, DMPC:Chol (90:10), DMPC:SM (90:10), DMPC:Chol:SM (80:10:10). Estes foram avaliados por DSC e os termogramas resultantes são apresentados na figura 5. Faremos primeiro uma abordagem das características dos lipossomos e na sequencia dos proteolipossomos. Todos os termogramas foram analisados por deconvolução para melhor resolução dos picos distintos existentes em cada caso.

Os diâmetros médios são consistentes com a membrana usada no método de extrusão (~100 nm) e baixos valores de IP foram obtidos para todas as amostras de lipossomos e proteolipossomos analisados (Tabela 3).

Como mostrado na Figura 7, os lipossomos de DPPC:Chol (90:10) mol% sofrem segregação de fase lateral, com a formação de domínios ricos em colesterol (Tc =41,3 °C) e domínios pobres em colesterol (~Tc = 40,0 °C) na membrana, de acordo com estudos anteriores (Bolean *et al.*, 2010), o mesmo comportamento pode ser observado quando substituímos o DPPC por DMPC, a presença do colesterol.

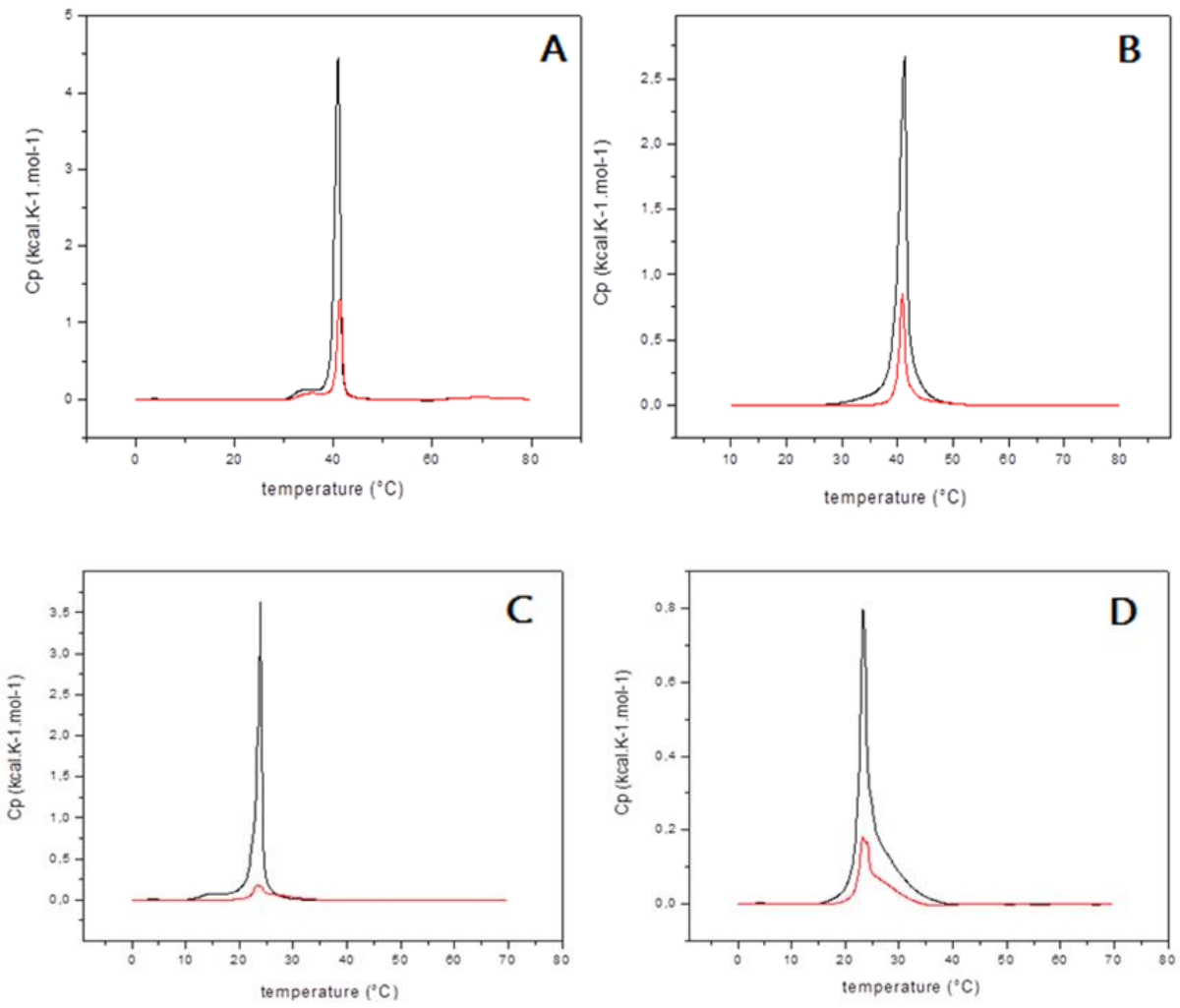


Figura 7: Termogramas, para determinação da capacidade calorífica, Cp (kcal.K-1.mol-1) em função da temperatura (°C) das vesículas (10 mg/mL): lipossomo (Preto) e proteolipossomo (Vermelho) composições (A): DPPC; (B): DPPC:Chol (90:10) mol%; (C): DMPC e (D): DMPC:Chol (90:10) mol%.

Quando comparamos a estrutura dos fosfolipídios DPPC e DMPC podem observar que a única diferença é o comprimento da cadeia acila, 16 e 14 carbonos, respectivamente (Bayerl *et al.*, 1989). Observar-se que esta diferença causa uma diminuição significativa de Tc (DPPC, 40,9 para DMPC 23,8 ºC) (Castillo *et al.*, 2013) como pode ser observado nos dados apresentados na Tabela X. Este aumento tende a melhorar o empacotamento lateral de moléculas dentro da membrana devido ao maior número de interações de van der Waals entre os carbonos das cadeias (Morini *et al.*, 2015).

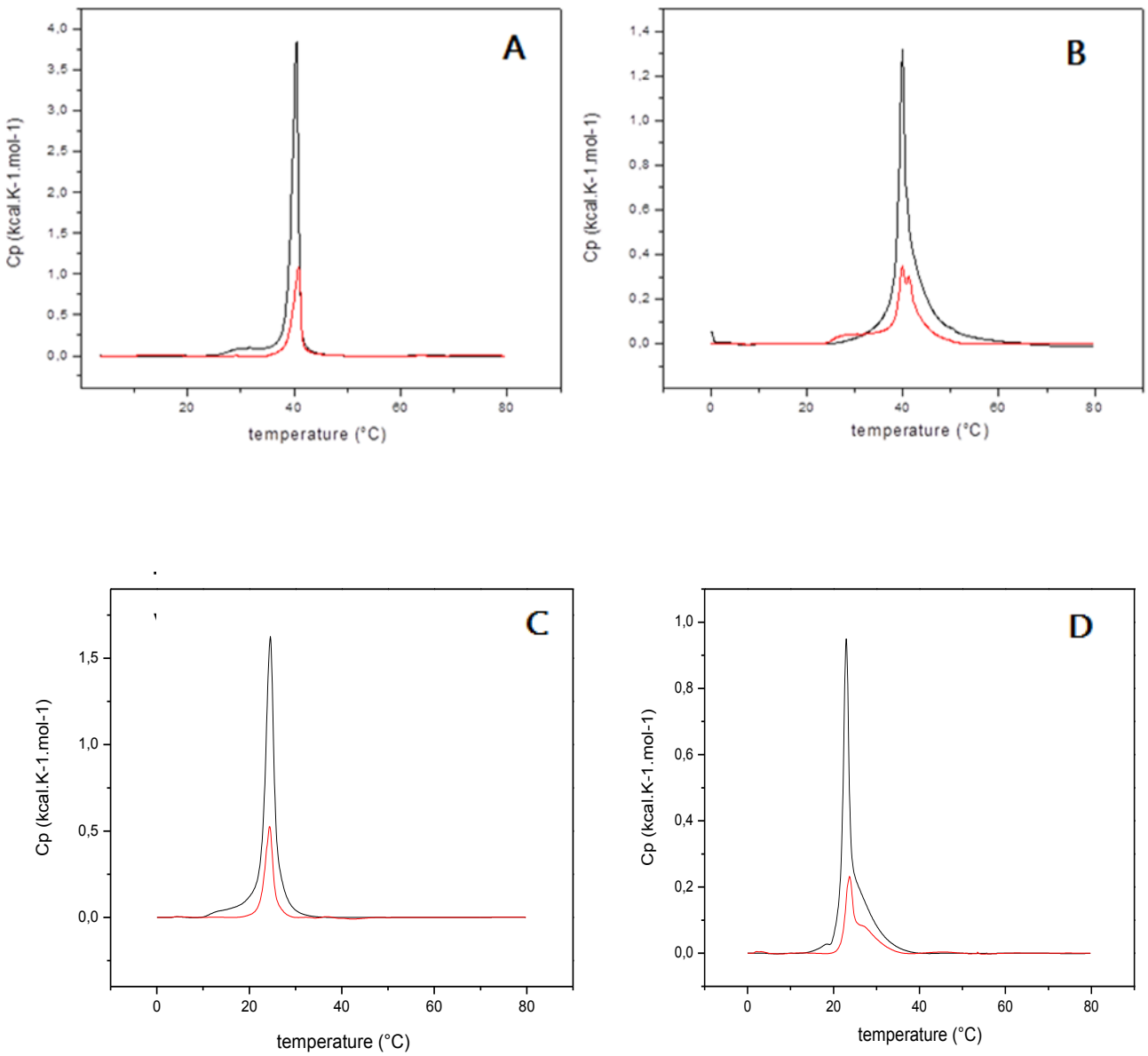


Figura 8: Termogramas, para determinação da capacidade calorífica, Cp (kcal.K-1.mol-1) em função da temperatura (°C) das vesículas (10 mg/mL): lipossomo (Preto) e proteolipossomo (Vermelho) composições (A): DPPC:SM (90:10); (B): DPPC:Chol:SM (80:10:10); (C): DMPC:SM (90:10) e (D): DMPC:Chol:SM (80:10:10) mol% .

A inserção da Esfingomielina (SM) nas misturas com DPPC:Chol proporcionou um considerável alargamento dos picos, como mostrado na Figura 8, aumentando os valores $\Delta t_{1/2}$ (Tabela 2), evidenciando uma diminuição na cooperatividade de transição de fase. Além disso, no termograma podemos observar que o pico principal é o correspondente ao Tc, possivelmente relacionado à pré-transição do SM ou do DPPC. A entalpia total (8,30 kcal.mol^{-1}) da formulação DPPC:Chol:SM (90:10:10) mol% aumentou em relação ao DPPC:Chol (90:10) mol% (6.76 kcal.mol^{-1}). Este efeito pode ser

explicado pela geometria da molécula de SM, capaz de estabilizar a membrana através das pontes de hidrogênio e interações entre as cadeias de hidrocarbonetos, afetando o comportamento da membrana (Snyder e Freire, 1980; Needham e Nunn, 1990; Li *et al.*, 2001). A compressibilidade das membranas contendo SM/Chol foi de fato muito maior do que nas membranas constituídas por DPPC com igual concentração de colesterol (Snyder e Freire, 1980; Needham e Nunn, 1990). Além disso, a permeabilidade à água foi menor em SM/Chol do que em DPPC/Chol, indicando a formação de um agrupamento mais resistente.

A membrana natural contém SM, normalmente é constituída por uma mistura de hidrocarbonetos com larguras e comprimento diferentes (podendo haver 16 a 24 carbonos), devido a sua estrutura de esfingosina, um ácido graxo é ligado via ligação amida e ocupa uma área maior do que em fosfolipídios (Barenholz, 2002). A composição da cadeia de hidrocarbonetos da SM varia entre os tecidos, no entanto, a presença de cadeias excepcionalmente longas é comum, dando à molécula uma assimetria natural. PCs normalmente têm cadeias de hidrocarbonetos moderadamente longas (14 e 16 carbonos, miristoil e palmitoil, respectivamente) (Merrill *et al.*, 1997).

A TNAP foi incorporada aos lipossomos formando os proteolipossomos com misturas de lipídios (binário e ternário). No termograma o proteolipossomo constituído por DPPC:Chol (90:10) mol% (Figura 7) pode ser notada a segregação da fase lateral. Este mesmo perfil foi detectado para lipossomos com a mesma composição, prova que a enzima não é capaz de influenciar o perfil calorimétrico desta composição lipídica; entretanto, os parâmetros termodinâmicos são significativamente alterados. Comparando os valores dos lipossomos (termogramas em preto) com os parâmetros dos proteolipossomos (termogramas em vermelho) da Tabela 2, Há uma diminuição no ΔH pode a ser observado, demonstrando o quanto a enzima pode fluidificar o microambiente lipídico.

Os valores de Tc não foram alterados significativamente. Em relação à cooperatividade (Tabela 2), pode-se notar que o primeiro pico centrado a 40 °C se torna um pouco mais amplo, no entanto, o segundo pico centrado a 42 °C torna-se um pouco mais cooperativo. O mesmo comportamento pode ser observado para lipossomos compostos por DMPC, no qual a temperatura de

transição apresentou o pico centrado em de 23 ºC, porém em torno de 19 ºC se encontra o primeiro pico mais amplo. A reconstituição da TNAP em lipossomos constituídos de DPPC:Chol (90:10) mol% e DMPC:Chol (90:10) mol% resultaram em uma incorporação de 61,2% e 89,5 da atividade catalítica, respectivamente.

Na Figura 8 os perfis de termogramas para os proteolipossomos ternários constituídos por DPPC:Chol:SM (80:10:10) mol% e DMPC:Chol:SM (80:10:10) mol%, respectivamente, podem ser observados.No primeiro caso (misturas com DPPC), vemos que, na presença da enzima, o pico referente à pré-transição é eliminado. No segundo caso (misturas com DMPC), o perfil permanece muito semelhante quando comparado ao lipossomo de mesma composição, no entanto, a distinção de pico é mais evidente quando a enzima está presente.

Comparando os parâmetros termodinâmicos, podemos inferir que a presença da enzima fluidifica a membrana lipídica, pois há um decréscimo nos valores de ΔH dos proteolipossomos em comparação com os lipossomos.

A reconstituição de TNAP em lipossomos DPPC:Chol:SM (80:10:10) mol% originou uma incorporação de cerca de ~50% da atividade enzimática, demonstrando que a presença de SM dificulta a incorporação da enzima quando comparado ao valores obtidos para os proteolipossomos na presença de colesterol (Milhiet *et al.*, 2002).

Tabela 2: Parâmetros termodinâmicos de lipossomos (10 mg/mL) constituídos por DPPC, DMPC, Chol, SM com diferentes proporções molares.

Parametros Termodinâmicos	Composição							
	DPPC	DPPC:Chol	DPPC:SM	DPPC:Chol :SM	DMPC	DMPC:Chol	DMPC:SM	DMPC:Chol: SM
Mol%		(90:10)	(90:10)	(80:10:10)		(90:10)	(90:10)	(80:10:10)
ΔH (Kcal.mol^{-1})	8,33±0,1	6,76±0,2	8,3±0,2	5,51±0,1	5,48±0,3	2,68±0,1	5,07±0,1	3,09±0,2
TC (°C)	40,9±0,4	41,3±0,1	40,5±0,3	39,8±0,2	23,8±0,2	23,3±0,3	24,6±0,1	23,5±0,4
T1/2 (°C)	1,08±0,1	1,62±0,3	1,24±0,1	2,89±0,4	0,98±0,1	2,04±0,2	2,03±0,3	1,83±0,2
ΔH (Kcal.mol^{-1})	2,67±0,2	1,76±0,1	2,05±0,1	2,21±0,1	0,87±0,1	0,86±0,1	1,4 ±0,1	1,1±0,1
TC (°C)	41,3±0,2	40,8±0,1	40,9±0,3	39,9±0,4	23,3±0,1	23,3±0,1	24,4±0,2	23,7±0,1
T1/2 (°C)	1,12±0,1	1,18±0,3	1,46±0,5	4,48±0,3	3,22±0,4	3,1±0,3	1,82±0,4	2,91±0,2

4.2 Caracterizações biofísicas da TNAP incorporada em lipossomos.

Na reconstituição da TNAP em lipossomos estudados (ver Tabela 3), os melhores resultados de incorporação foram obtidos empregando apenas DPPC, como único componente. Este lipídeo proporcionou incorporação de cerca de 85% da atividade enzimática e a concentração de proteína incorporada foi de 0,149 µg/mL. Para a incorporação em lipossomos contendo DOPC, os lipossomos constituídos de DOPC:Chol (64:36) mol% proporcionaram máxima incorporação da atividade da enzima (cerca de 58%) que representa uma incorporação de 0,102 µg/mL de proteína. De todos os proteolipossomos a composição DMPC:SM (90:10) mol% foi a que obteve melhor porcentagem de incorporação cerca de 98% da atividade PNPPase.

É importante salientar que para o a incorporação da proteína em lipossomos compostos por DOPC e DMPC foram mantidas as mesmas proporções já padronizadas para lipossomos constituídos por DPPC.

O processo de incorporação da TNAP é tempo dependente e tem uma velocidade de inserção grande no início até aproximadamente 40 minutos, atingindo aproximadamente 70%, seguindo uma curva do tipo hiperbólica. Resultados semelhantes de incorporação foram obtidos por Camolezi e colaboradores (Camolezi *et al.*, 2002) na reconstituição da TNAP de placas ósseas em lipossomos constituídos por DPPC, e por Bolean e colaboradores, (Bolean *et al.*, 2010) na reconstituição da TNAP obtida de cultivos de osteoblastos em lipossomos constituídos de DPPC e Chol.

A caracterização biofísica e cinética dos proteolipossomos constituídos por DPPC, DOPC com diferentes esteróis foram publicados no artigo Favarin e colaboradores (Favarin *et al.*, 2017).

Os diâmetros médios de vesículas formadas pelos lipossomos e proteolipossomos foram avaliados empregando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico.

Tabela 3: Diâmetro médio dos lipossomos e proteolipossomos preparados com diferentes proporções de lipídeos e porcentagem de incorporação da TNAP.

Composição de Lipossomo (% mol)	Lipossomo Diametro (nm)	Proteolipossomo Diametro (nm)	Proteolipossomo Proteina (µg/mL)	Proteolipossomo Incorporação (%)
DPPC*	148,5 ± 0,2	164,3 ± 0,1	0,149 ± 0,001	84,8
DPPC:Chol (90:10) *	141.3 ± 0,3	166,1 ± 0,8	0,108 ± 0,002	61,2
DPPC:Chol (75:25) *	152,4 ± 0,1	175,4 ± 0,1	0,101 ± 0,002	57,3
DPPC:Chol (64:36) *	154,3 ± 0,2	175,3 ± 0,3	0,087 ± 0,003	49,4
DPPC:AChol (64:36) *	122,2 ± 0,1	160,3 ± 0,1	0,074 ± 0,002	42,0
DPPC:Ergo (64:36) *	151,5 ± 0,2	162,0 ± 0,3	0,072 ± 0,001	40,0
DPPC:SM (90:10)	144,6 ± 0,4	150,4 ± 0,8	0,100 ± 0,005	57,4
DPPC:Chol:SM (80:10:10)	140,9 ± 0,2	154,5 ± 0,7	0,071 ± 0,003	40,7
DOPC*	192,5 ± 0,1	214,3 ± 0,1	0,078 ± 0,001	44,5
DOPC:Chol (90:10) *	161,3 ± 0,2	188,1 ± 0,2	0,058 ± 0,002	33,1
DOPC:Chol (75:25) *	184,3 ± 0,1	199,4 ± 0,1	0,072 ± 0,002	41,1
DOPC:Chol (64:36) *	174,3 ± 0,3	274,3 ± 0,3	0,102 ± 0,003	58,1
DOPC:AChol (64:36) *	131,6 ± 0,1	142,1 ± 0,2	0,090 ± 0,001	51,2
DOPC:Ergo (64:36) *	183,4 ± 0,2	198,2 ± 0,2	0,073 ± 0,002	41,5
DMPC	135,8 ± 0,2	145,3 ± 0,2	0,114 ± 0,001	65,3
DMPC:Chol (90:10)	139,5 ± 0,3	167,5 ± 0,3	0,156 ± 0,003	89,5
DMPC:Chol (75:25)	141,4 ± 0,4	154,3 ± 0,7	0,107 ± 0,006	61,6
DMPC:Chol (64:36)	143,3 ± 0,2	149,4 ± 0,8	0,100 ± 0,001	57,1
DMPC:AChol (64:36)	149,1 ± 0,7	163,2 ± 0,9	0,085 ± 0,003	48,3
DMPC:Ergo (64:36)	155,2 ± 0,2	166,4 ± 0,2	0,056 ± 0,004	41,9
DMPC:SM (90:10)	134,2 ± 0,4	138,6 ± 0,1	0,172 ± 0,002	98,6
DMPC:Chol:SM (80:10:10)	145,2 ± 0,5	150,6 ± 0,7	0,134 ± 0,004	76,8

*Dados Publicados por Favarin e colaboradores. (Favarin *et al.*, 2017)

Os resultados obtidos estão também expressos na Tabela 3 e revelaram vesículas com diâmetro médio entre 160 e 180 nm condizentes com o esperado para o DPPC e DPPC:Chol obtidos pela técnica de extrusão. Cabe destacar aqui que os sistemas apresentaram dimensões similares aos descrito por Bolean e colaboradores. (Bolean *et al.*, 2010)

Uma observação importante a ser documentada é um pequeno aumento do diâmetro médio dos lipossomos (148,5 a 154,3 nm) com o aumento da concentração de Chol que ocorre concomitante com a diminuição na incorporação da TNAP (0,149 para 0,087 µg/mL). No entanto, não é possível

afirmar se apenas a curvatura das vesículas pode influenciar na incorporação da TNAP, ou o próprio colesterol é o responsável pela diminuição da incorporação (Sesana *et al.*, 2008; Bolean *et al.*, 2010).

Os proteolipossomos contendo DOPC, apresentaram diâmetros médios para vesículas de DOPC, DOPC:Chol (90:10) mol%, DOPC:Chol (75:25) mol% e DOPC:C (64:36) mol% de 214,3; 188,1; 199,4 e 274,3 nm, respectivamente. Também notamos que com o aumento da concentração de Chol ocorre o aumento na incorporação da TNAP (0,078 para 0,102 µg/mL), diferentemente do que foi constatado quando o DPPC foi empregado (Tabela 3). Este efeito é ocasionado, pois a TNAP aparentemente incorpora mais facilmente em domínios mais compactos e isso no caso do DOPC ocorre quando se adiciona Chol.

Pode-se notar também observando a Tabela 3 que, lipossomos constituídos por AChol e Ergo não apresentaram alteração significante nos diâmetros médios, podendo ser comparados com as formulações com Chol, tanto para DPPC quanto para DOPC como fosfolipídio majoritário.

Com relação ao DMPC, podemos notar que o aumento a concentração de colesterol ocasiona um aumento na incorporação da TNAP, principalmente quando a concentração de colesterol é 10 mol%, já para outras concentrações os valores de incorporação não variam significativamente, com exceção aos diferentes esteróis (Ergosterol e Colestenona).

Cabe destacar que, para todos os sistemas lipídicos estudados pela técnica de espalhamento dinâmico, foram encontrados valores de polidispersão menores que <0,3, sugerindo que são preparações bastante homogêneas.

Podemos também estimar a relação molar proteína:lipídio, em torno de ~1:14.000 para os lipossomos de DPPC, enquanto que ocorre um diminuição na relação proteína:lipídio chegando a ~1:20.000 com o aumento da concentração de Chol (64:36) mol%. Para lipossomos de DOPC foi cerca de 1:21.000 para o DOPC sozinho, e de ~1:17.000 para o sistema de DOPC com 36% de Chol. Com relação ao DMPC estimou-se uma relação de ~1:10.000.

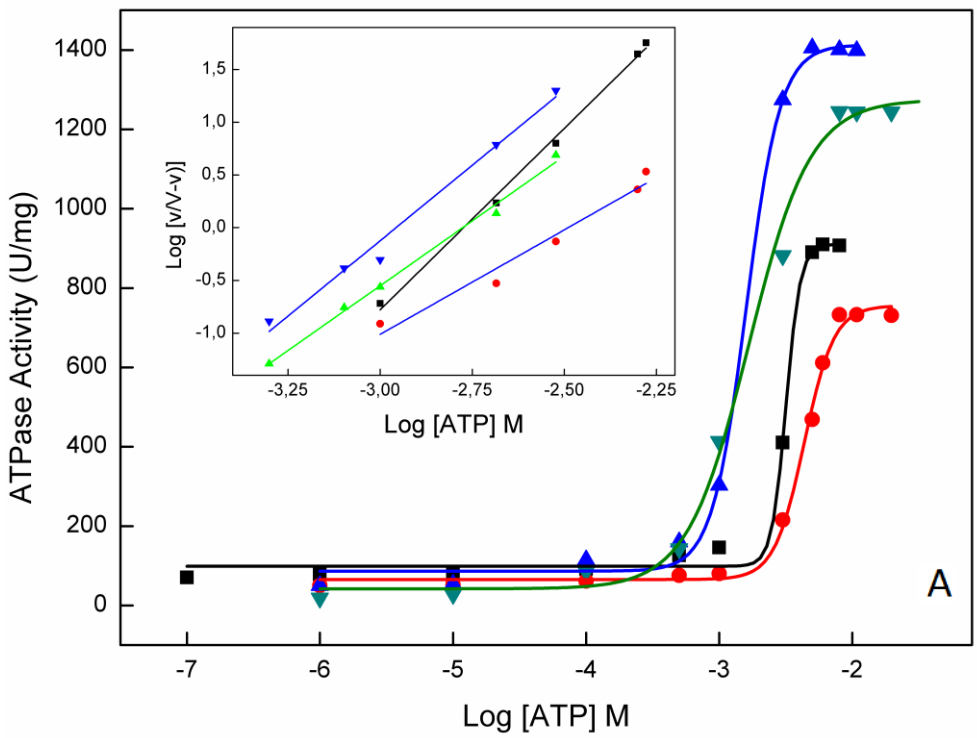
Valores de proporções proteína-lipídeo em diferentes reconstituições de proteínas descritos na literatura são muito amplos, variando de 1:200 até 1:20.000 (Sesana *et al.*, 2008; Bolean *et al.*, 2010; 2011).

4.3 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DPPC e esteróis.

Estudos têm demonstrado a importância da hidrólise de ATP e PP_i, pela fosfatase alcalina de diferentes tecidos ósseos e cartilaginosos. Acredita-se que especialmente a atividade ATPase e PP_iase estejam envolvidas na remoção de inibidores de formação de minerais, fornecendo fosfato para o mineral nascente, bem como mantendo uma relação P_i/PP_i, importante para a regulação do processo de mineralização (Cyboron e Wuthier, 1981; Meyer, 1984; Hsu e Anderson, 1986; Leone *et al.*, 1997; Simao *et al.*, 2010b; Millan, 2013). Segundo (Hoylaerts *et al.*, 1997; Millan, 2006) quando nos referimos as concentrações fisiológicas dos substratos na mineralização podemos citar AMP 0,3 mM, ATP 22 mM e PPi 0,5 mM.

Uma vez reconstituída a TNAP em misturas lipídicas formadas por DPPC e DPPC:Chol (em diferentes proporções) foram realizados experimentos de cinética enzimática utilizando os substratos ATP e PP_i no intuito de conhecer os parâmetros cinéticos como padrão de comparação para os demais formulações estudadas.

Assim, foi verificado o efeito do microambiente lipídico em pH 7,4 condizente com o pH fisiológico (Simao *et al.*, 2013). Embora as eficiências catalíticas em geral foram maiores em pH alcalino, a hidrólise de PP_i foi maior a 8 diferente do ATP.



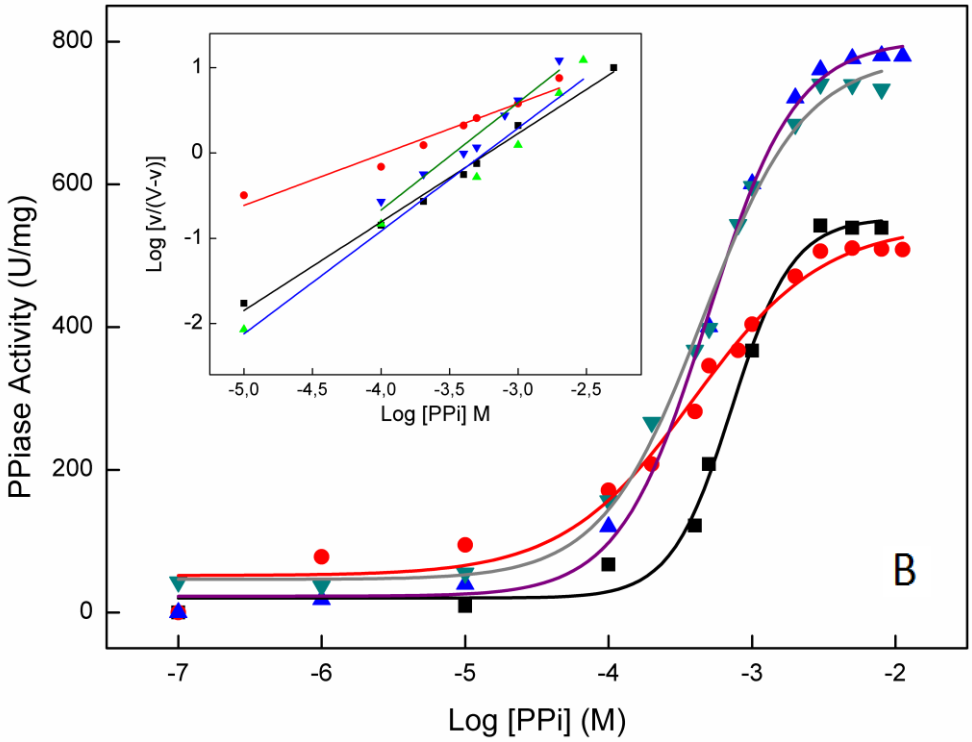


Figura 9: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Através da Figura 9A pode-se observar que, independentemente da presença de Chol, o ATP exibe uma única curva de saturação para as

composições lipídicas estudadas. O valor de $K_{0,5}$ diminui gradativamente com o aumento da concentração de Chol.

Observa-se também uma redução nos valores de cooperatividade quando adicionado Chol ao sistema passando de 3,4 para o proteolipossomo contendo apenas DPPC, para 1,9 para o proteolipossomo com concentração de Chol igual a 10 mol% (Tabela 4).

Os valores de $V_{máx}$ aumentaram (de 910 para 1405,3 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol (90:10) mol% obtivemos uma diminuição para 732,8 U/mg, quando comparado com o sistema contendo apenas DPPC (Tabela 4).

Com relação à eficiência catalítica da TNAP reconstituída em proteolipossomos constituídos de DPPC, foram obtidos valores ($5,7x10^2$ $M^{-1}.s^{-1}$) muito similares aos proteolipossomos compostos por DPPC:Chol 10 e 25 mol% ($5,3x10^2$ e $1,5x10^2$ $M^{-1}.s^{-1}$, respectivamente). Porém, proteolipossomos composto por DPPC:Chol (64:36) mol% tiveram um aumento de 2x em relação ao lipossomo de DPPC obtendo o valor de $1,8x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ (Tabela 2) para a eficiência catalítica.

A velocidade de hidrólise de PP_i da TNAP reconstituída em lipossomos de DPPC, DPPC:Chol em proporções variando de 10 a 36 mol% é mostrada na Figuras 9B. Pode-se observar que o PP_i, assim como o ATP exibe uma única curva de saturação para os proteolipossomos estudados.

O valor de $K_{0.5}$ para proteolipossomos decresce com o aumento da concentração de Chol, indicando que nessa faixa de concentração a afinidade entre a enzima e o substrato aumenta (Tabela 4). Também, observou-se um aumento nos valores de cooperatividade que passam de 1,0 de proteolipossomos de DPPC, para 1,3 para o proteolipossomos com maior concentração de Chol.

Os valores de $V_{máx}$ aumentaram (de 542,2 para 880,1 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol (90:10) mol% obtivemos uma diminuição (indo para 510,8 U/mg), quando comparado com as formulações contendo apenas DPPC.

Com relação à eficiência catalítica da Fosfatase alcalina reconstituída em proteolipossomos de DPPC foi obtido valor de $1,5x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$ muito abaixo do que os valores obtidos para proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol (90:10), (75:25) e (64:36) mol% ($1,9x10^3$; $3,5x10^3$ e $3,3x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$, respectivamente), indicando um aumento de atividade catalítica do PP_i, na presença de Chol.

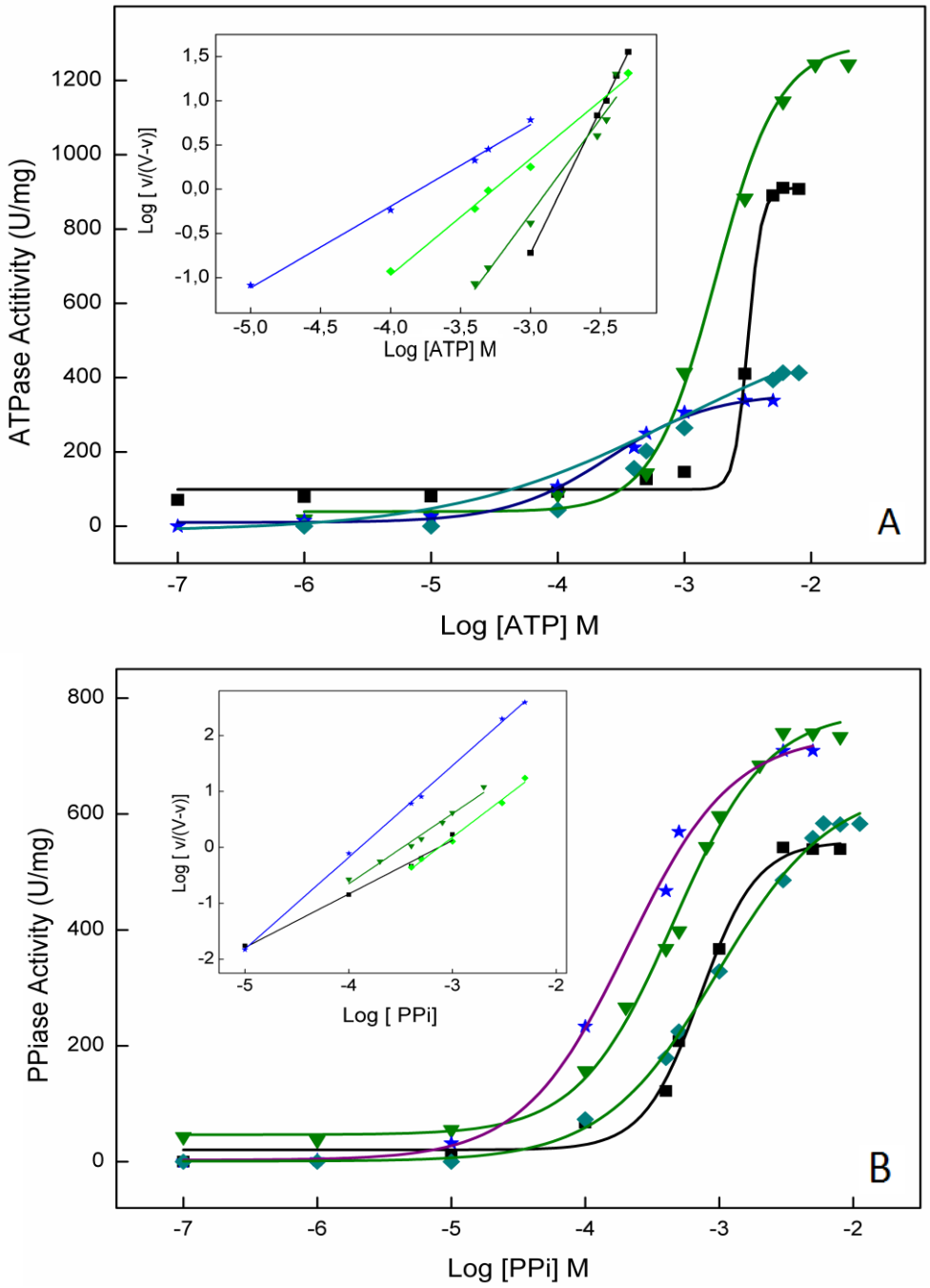


Figura 10: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DPPC e por diferentes esteróis: (■) DPPC puro; (▼) DPPC:Chol (64:36 mol%); (★) DPPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DPPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Para proteolipossomos compostos por DPPC:AChol (64:36) mol%, a hidrólise de ATP (Figura 10A) mostrou um $V_{máx}$ de 338,0 U/mg, menor do que o obtido para o DPPC:Chol (64:36) mol% (1244,1 U/mg), más muito semelhante ao observado para a DPPC:Ergo (64:36) mol% (412,7 U/mg).

O valor $K_{0.5}$ para DPPC:AChol (64:36 mol% foi de 0,25 mM, resultando em uma maior afinidade para o ATP, se comparado a proteolipossomos constituído de DPPC:Chol (64:36) mol% (1,38 mM) e DPPC:Ergo (64:36) mol% (0,84 mM).Com relação a hidrólise de PP_i (Figura 10B), todos os proteoliposomos revelaram valores muito semelhantes $V_{máx}$, $K_{0.5}$ e $k_{cat}/K_{0.5}$.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP ou PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos constituídos de DPPC com diferentes proporções de esteróis.

Substratos		Proteolipossomos					
	Parametros Cinéticos	DPPC	DPPC:Chol 10%	DPPC:Chol 25%	DPPC:Chol 36%	DPPC:AChol 36%	DPPC:Ergo 36%
ATP	$V_{máx}$ (U/mg)	910,0 ± 10,6	732,8 ± 15,3	1405,3 ± 12,0	1244,1 ± 9,7	338 ± 3,4	412,7 ± 5,1
	$K_{0.5}$ (mM)	3,18 ± 0,02	2,75 ± 0,06	1,82 ± 0,04	1,38 ± 0,01	0,25 ± 0,09	0,84 ± 0,01
	N	3,4 ± 0,01	1,9 ± 0,07	2,5 ± 0,01	2,9 ± 0,01	1 ± 0,01	1,3 ± 0,01
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$5,7x10^2$	$5,3x10^2$	$1,54x10^2$	$1,8x10^3$	$2,7x10^3$	$1x10^3$
PPi	$V_{máx}$ (U/mg)	542,2 ± 12,8	510,8 ± 9,1	880,1 ± 7,3	740,3 ± 4,7	709,1 ± 8,9	583,81 ± 5,2
	$K_{0,5}$ (mM)	0,71 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,5 ± 0,08	0,45 ± 0,06	0,2 ± 0,04	0,96 ± 0,01
	N	1 ± 0,06	1,1 ± 0,01	1,2 ± 0,02	1,3 ± 0,04	1,7 ± 0,07	1,4 ± 0,09
	$k_{cat}/K_{0,5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$1,5x10^3$	$1,9x10^3$	$3,5x10^3$	$3,3x10^3$	$6,9x10^3$	$1,2x10^3$

Podemos notar, observando a Tabela 4, que para o substrato PP_i a enzima apresenta um valor de $K_{0,5}$ menor nos proteolipossomos de DPPC do que quando o substrato ATP, sugerindo que o PP_i pode ser hidrolisado preferencialmente quando em um microambiente onde todos os substratos estivessem disponíveis. Mas esta hipótese precisará ser testada, pois um substrato poderia competir com o outro e resultar na inibição da atividade de fosfomonoidrolase e, consequentemente, reduzir a quantidade de fosfato produzido.

Os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 4 são similares aos relatados por Simão e colaboradores (Simao *et al.*, 2010b) em relação à proteolipossomos compostos pelos mesmos lipídios, quando a TNAP obtida de medula óssea de ratos foi usada.

Cabe ressaltar que a $V_{máx}$ de hidrólise para os substratos ATP e PP_i foram menores para todos os proteoliposomos estudados quando o Chol está presente em uma proporção molar de 10%.

Nas condições experimentais (37 °C), o lipossomo de DPPC estava na fase gel (Ronzon *et al.*, 2002). De acordo com o diagrama de fases da mistura binária de DPPC:Chol, DPPC:Chol com frações molares de Chol em torno de 36 mol% são geralmente consideradas na fase liquido ordenada (Lo) (Caseli *et al.*, 2008b; Mills *et al.*, 2008). Ergo também promove a formação da fase Lo (Smondyrev e Berkowitz, 2001b), mas o Achol desencadeia coexistência de transição fase sólida e líquida (Nes *et al.*, 1978; Wu *et al.*, 2002).

A presença de esteróis induziu maior eficiência catalítica da TNAP durante a hidrólise de ATP e de PP_i em comparação com o proteolipossomo DPPC (a exceção foi o proteolipossomo DPPC:Ergo (64:36) mol% para a hidrólise de PP_i). Entre os esteróis, o Achol provocou a coexistência de fases sólido-líquido e maiores eficiências catalíticas para ambos os substratos. Esses resultados sugerem que a transição de fase da monocamada (Caseli *et al.*, 2005a) e da bicamada, no presente trabalho, podem ser determinantes nos parâmetros cinéticos do TNAP.

Na literatura há muitos relatos de proteínas ancoradas pela GPI em lipossomos, a fim de entender efeitos dos diferentes microambientes. (Wuthier *et al.*, 1985b; Camolezi *et al.*, 2002; Genge *et al.*, 2007; Simao *et al.*, 2007; Kiffer-Moreira *et al.*, 2014). Quando o DPPC é utilizado como componente principal nas bicamadas lipídicas a presença de colesterol aumentou a atividade da TNAP.

4.4 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DOPC e esterois.

Após a reconstituição da TNAP em microambientes lipídicos formados por DOPC e DOPC:Chol (em diferentes proporções) foram realizados experimentos com o objetivo de caracterizar a cinética de hidrólise do ATP e do PP_i.

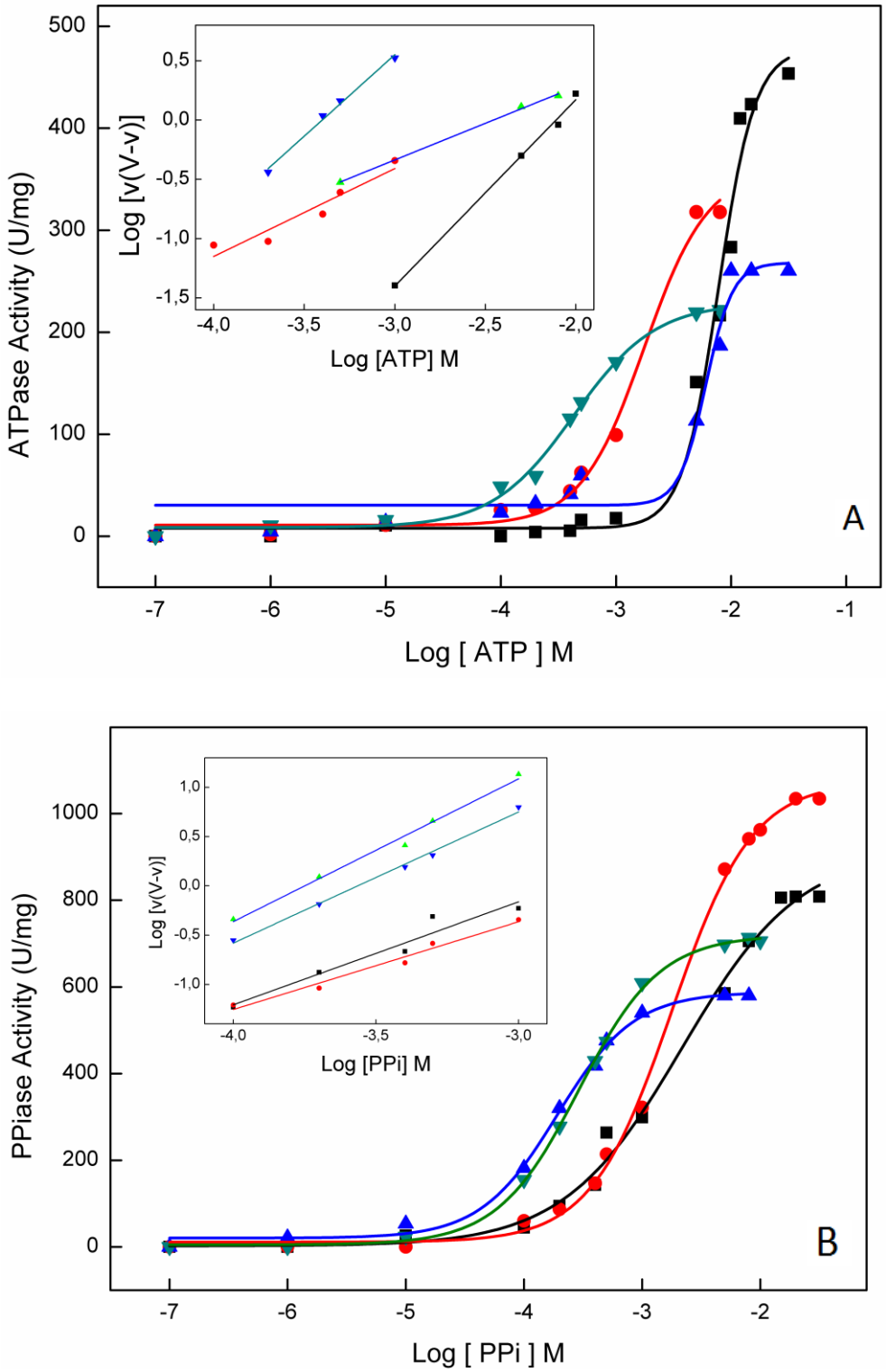


Figura 11: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Pode-se observar que, na presença de Chol, o ATP (Figura 11A) exibe uma única curva de saturação para os proteolipossomos estudados. Os valores de $K_{0.5}$ são menores para vesículas com 10 e 36 mol% de Chol, em relação aos proteolipossomos na ausência de Chol e a presença do Chol na concentração de (75:25 mol%), respectivamente), como apresentado na Tabela 2.

Observa-se também uma redução nos valores de cooperatividade quando adicionado Chol, passando de 1,4 para o proteolipossomo contendo apenas DOPC (Tabela 3), para 0,7 para o proteolipossomo com concentração de Chol de 10 mol%.

Os valores de $V_{máx}$ diminuíram (de 453,5 para 221,75 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DOPC:Chol (90:10) mol% obtivemos uma menor diminuição (para 317,8 U/mg), quando comparado com o sistema que contém apenas DOPC.

Com relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos constituído por DOPC, foram obtidos valores ($1,2x10^2$ $M^{-1}.s^{-1}$) muito parecidos com os valores obtidos para proteolipossomos compostos por DOPC:Chol (75:25)% ($8,6x10^1$ $M^{-1}.s^{-1}$), porém os proteolipossomos compostos por DOPC:Chol (90:10) mol% e DOPC:Chol (64:36) mol% apresentaram um aumento de 3x e 10x (respectivamente) em relação ao lipossomo de DOPC, com o valor de ($3,6x10^2$ e $1,0x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$), respectivamente (Tabela 5).

Os ensaios de hidrólise de PP_i pela enzima reconstituída em lipossomos de DOPC e DOPC:Chol em proporções variando de 10 a 36 mol% estão apresentados na Figura 11B.

Pode-se observar que o PP_i, assim como o ATP, exibe uma única curva de saturação para os proteolipossomos estudados. O valor de $K_{0.5}$ para proteolipossomos decresce com o aumento da concentração de Chol nos sistemas, indicando que nessa faixa de concentração a afinidade entre a enzima e o substrato aumenta (Tabela 5). Também, observou-se uma diminuição nos valores de cooperatividade que passam de 1,4 para proteolipossomos de DOPC, para 0,9 para proteolipossomos com maior concentração de Chol (DOPC:Chol (64:36) mol%).

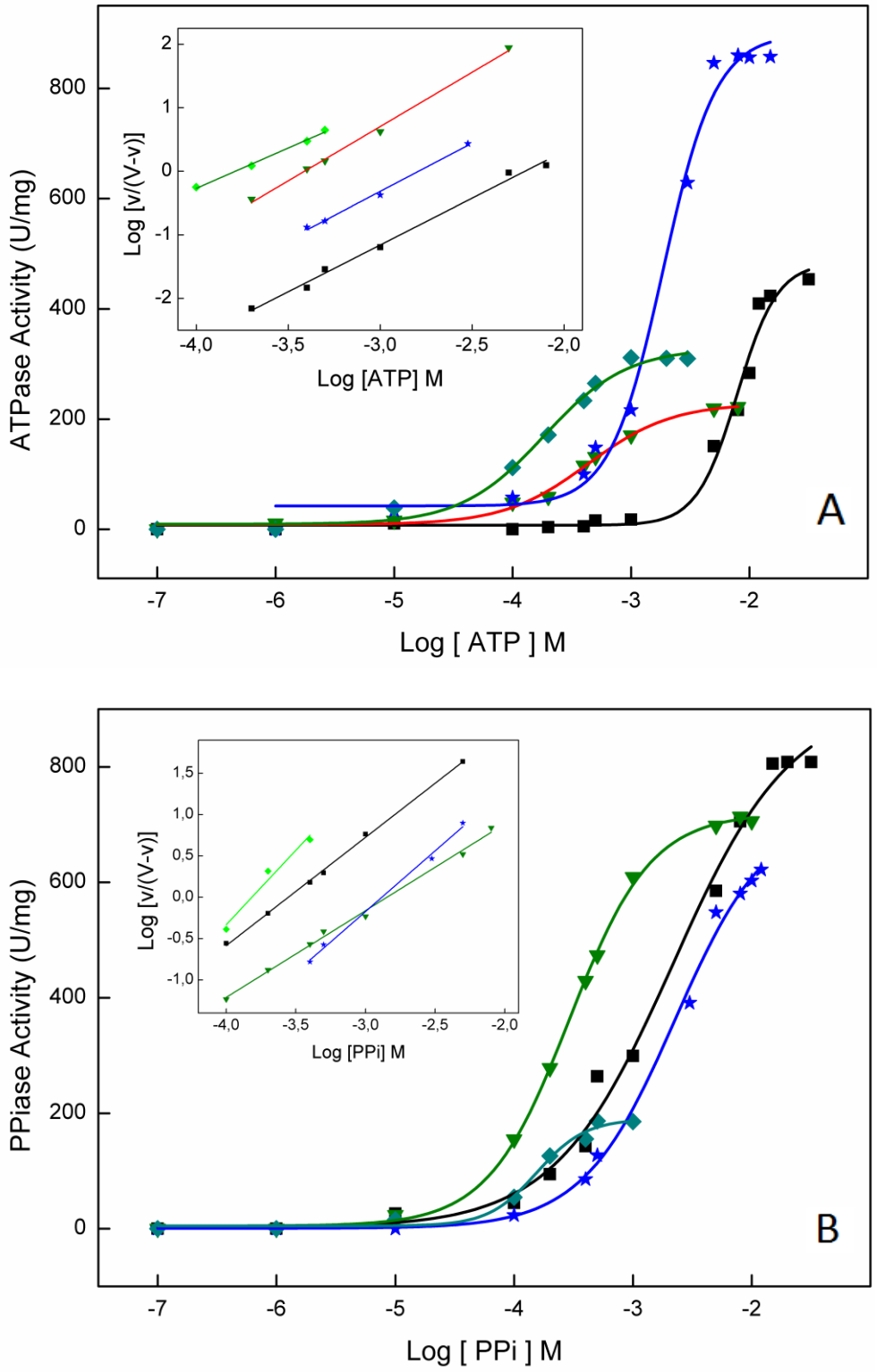


Figura 12: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DOPC e por diferentes esteróis: (■) DOPC puro; (▼) DOPC:Chol (64:36 mol%); (★) DOPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DOPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Os valores de $V_{máx}$ diminuíram (de 808,3 para 713,8 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DOPC:Chol (90:10) mol% obteve-se um aumento para 1034,5 U/mg, quando comparado com os lipossomos contendo apenas DOPC.

Os $V_{máx}$ aumentaram (de 542,2 para 880,1 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para o proteolipossomo constituído de DPPC:Chol (90:10) mol% obtivemos uma diminuição indo para 510,8 U/mg, quando comparado com os proteolipossomos contendo apenas DPPC. Com relação a eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos constituído por DPPC foram obtidos o valor de ($1,5x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$) abaixo dos valores obtidos pelo proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol 10, 25 e 36 mol% de $1,9x10^3$; $3,5x10^3$ e $3,3x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$, respectivamente.

Para DOPC:AChol (64:36) mol%, a hidrólise de ATP (Figura 4A) mostrou um $V_{máx}$ de 860,1 U/mg, maior do que os outros proteolipossomos obtidos, porém os composto por DOPC:Ergo (64:36) mol% apresentou valor semelhante aos compostos de Chol. O valor $K_{0.5}$ para DOPC:AChol (64:36) mol% foi de 1,86 mM, resultando em uma menor afinidade para o ATP, se comparado a proteolipossomos constituído de DOPC:Chol (64:36) mol% (0,43 mM) e DOPC:Ergo (64:36) mol% (0,18 mM).

A eficiência catalítica das vesículas compostas por DOPC:AChol (64:36) mol% representaram o menor valor de eficiência se comparado com os proteolipossomos contendo 36 mol% da concentração de esterol.

Com relação a hidrólise de PP_i (Figura 12B), para o sistema DOPC:AChol (64:36) mol% mostrou um $V_{máx}$ de 622,0 U/mg, maior do que os outros. O proteolipossomo composto por DOPC:Ergo (64:36) mol% apresentou valor semelhante aos compostos por Chol. O valor $K_{0.5}$ para DOPC:AChol (64:36) mol% foi de 2,26 mM, resultando em uma menor afinidade para o PP_i, se comparado a proteolipossomos constituído de DOPC:Chol (64:36) mol% (0,29 mM) e DOPC:Ergo (64:36) mol% (0,15 mM). Por fim com relação a eficiência catalítica o proteolipossomo contendo DOPC:AChol (64:36) mol% apresentou uma menor eficiência em comparação com 36 mol% de Chol e Ergo, respectivamente.

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP ou PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos constituídos de DOPC com diferentes proporções de esteróis.

Substratos	Parâmetros Cinéticos	Proteoliposomos					
Mol%		DOPC	DOPC:Chol (90:10)	DOPC:Chol (75:25)	DOPC:Chol (64:36)	DOPC:AChol (64:36)	DOPC:Ergo (64:36)
ATP	$V_{máx}$ (U/mg)	453,5 ± 9,8	317,8 ± 11,4	260,2 ± 10,3	221,7 ± 11,0	860,09 ± 8,8	309,74 ± 7,9
	$K_{0.5}$ (mM)	7,77 ± 0,05	1,75 ± 0,01	6,04 ± 0,03	0,43 ± 0,08	1,86 ± 0,09	0,18 ± 0,02
	N	1,4 ± 0,01	0,7 ± 0,06	0,6 ± 0,03	1,7 ± 0,09	1,4 ± 0,05	1,3 ± 0,02
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$1,2x10^2$	$3,6\ x10^2$	$8,6\ x10^1$	$1,0\ x10^3$	$9,2x10^2$	$3,4x10^3$
PP_i	$V_{máx}$ (U/mg)	808,3 ± 12,8	1034,5 ± 12,8	580,2 ± 12,8	713,8 ± 12,8	622,01 ± 12,8	186,81 ± 12,8
	$K_{0.5}$ (mM)	2,17 ± 0,07	1,77 ± 0,05	0,19 ± 0,08	0,29 ± 0,02	2,26 ± 0,01	0,15 ± 0,07
	N	1,4 ± 0,02	1,3 ± 0,04	1,0 ± 0,06	0,9 ± 0,09	1,4 ± 0,08	1,8 ± 0,04
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$7,4\ x10^2$	$1,2\ x10^3$	$6,1\ x10^3$	$4,9\ x10^3$	$5,5x10^2$	$2,4x10^3$

Podemos observar na Tabela X, que a hidrolise do substrato PP_i pela TNAP apresentou valor de $K_{0,5}$ menor em relação aos demais estudados, esta característica foi observada também em vesículas constituídas por DPPC e DPPC:Chol (diferentes proporções), isto sugere que o PP_i possa ser hidrolisado preferencialmente quando todos os substratos poderiam estar disponíveis. Mas esta hipótese novamente precisará se testada, pois um substrato poderia competir com o outro e resultar na inibição da atividade de fosfomonohidrolase e consequentemente reduzir a quantidade de fosfato produzido.

Cabe destacar especialmente que a velocidade máxima de hidrolise para o substrato PP_i foram maiores do que todos os proteoliposomos estudados, e independente da concentração de Chol, a maior velocidade média de hidrólise foi quando estava presente uma proporção molar de 10 mol% de Chol. Assim, o aumento da concentração de Chol nos proteolipossomos mostrou uma diminuição nos valores de $V_{máx}$, para a horolise de ATP.

Assim como as lipossomos e proteolipossomos de DPPC e DPPC:Chol com o aumento da concentração de Chol ocorre uma diminuição da entalpia, isto é observado para a cadeia principal na transição de fase, líquido cristalino e a pré transição some completamente quando a composição lipídica atinge 50 mol% de Chol (Fritzsching *et al.*, 2013). A bicamada de DPPC também exibe

uma pré-transição, que desaparece completamente quando o conteúdo é Chol > 10 mol% (Bolean *et al.*, 2010).

Quando procurado na literatura o efeito causado pelo aumento de concentração de colesterol em lipossomos de DOPC podemos observar uma diminuição da entalpia, porém exibem um aumento da temperatura de transição de aproximadamente (~5°C), efeito contrário quando comparado com DPPC por possuir cadeias acila saturadas (Fritzsching *et al.*, 2013).

Os proteolipossomos contendo fosfolípidios insaturados (proteolipossomos de DOPC) proporcionaram uma eficiência catalítica quatro vezes maior na hidrólise de ATP quando comparados aos proteolipossomos de DPPC. Os proteolipossomos DOPC propagaram a mineralização mais eficientemente que o proteolipossomo DPPC (membrana na fase gel). Este comportamento pode ser explicado pela presença do lipídeo insaturado nos proteolipossomos DOPC, que possui uma temperatura de transição de cerca de -18 °C, e pela temperatura na qual os experimentos foram conduzidos (37 °C). Sob todas as condições aqui estudadas, as membranas DOPC estavam sempre na fase liquido Cristalino (Lα), o que proporcionou aos lipídios e ao TNAP maior mobilidade (Eanes, 1970; Wuthier e Lipscomb, 2011) na membrana, impulsionando tanto a catálise quanto o processo de propagação. Quanto à presença de esteróis, a eficiência catalítica do proteolipossomo DOPC:Chol (64:36) mol% na hidrólise do ATP foi dez vezes maior que a eficiência catalítica do proteolipossomo DOPC (de 1000 e 120 $M^{-1}s^{-1}$, respectivamente). O mesmo comportamento foi evidente no caso dos proteolipossomos DOPC:AChol (64:36) mol% e DOPC:Ergo (64:36) mol% (oito e dez vezes mais eficiência catalítica que o proteolipossomo DOPC, respectivamente). Além disso, mudanças no pH do microambiente lipídico em torno do TNAP afetaram a atividade catalítica e o processo de mineralização (Simao *et al.*, 2013). Assim, a composição lipídica, a presença de esteróis, fatores termodinâmicos como diminuição da entalpia de transição, perda de pré-transição, a presença de cargas superficiais das cabeças polares dos fosfolipídios e o pH podem interferir na orientação/posicionamento dos sítios catalíticos da TNAP, impactando no seu comportamento cinético e eficiência catalítica.

4.5 Caracterizações Cinéticas da TNAP em lipossomos contendo DMPC e esteróis.

Uma vez reconstituída a TNAP em bicamadas lipídicas formadas por DMPC e DMPC:Chol (em diferentes proporções) foram realizados experimentos de cinética enzimática utilizando os substratos ATP e PP_i no intuito de conhecer os parâmetros cinéticos como padrão de comparação para os demais estudados (Cyboron e Wuthier, 1981; Meyer, 1984; Hsu e Anderson, 1986; Leone *et al.*, 1997; Simao *et al.*, 2010a; Millan, 2013).

Nesta linha de raciocínio, foi investigado o efeito do microambiente lipídico na hidrólise destes substratos.

Na Figura 13A pode-se observar que, independentemente da presença de Chol, o ATP e PP_i exibem uma única curva de saturação para os lipídios estudados. A afinidade catalítica diminui para protelipossomos compostos por 10 e 25 mol% de colesterol, porém quando foi usado 36 mol% de colesterol os valores retornam ao valor inicial observado para DMPC puro.

Observa-se também pequena variação nos valores de cooperatividade quando adicionado Chol ao sistema variando de 1,2 para o proteolipossomo contendo apenas DMPC, e 1,0 para proteolipossomo com concentração de Chol igual a 36 mol% (Tabela 6).

Os valores de $V_{máx}$ aumentaram (de 833,4 para 1102,3 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DMPC:Chol (90:10) mol% obtivemos uma diminuição para 644,9 U/mg, quando comparado com proteolipossomos de DMPC puro (Tabela 6).

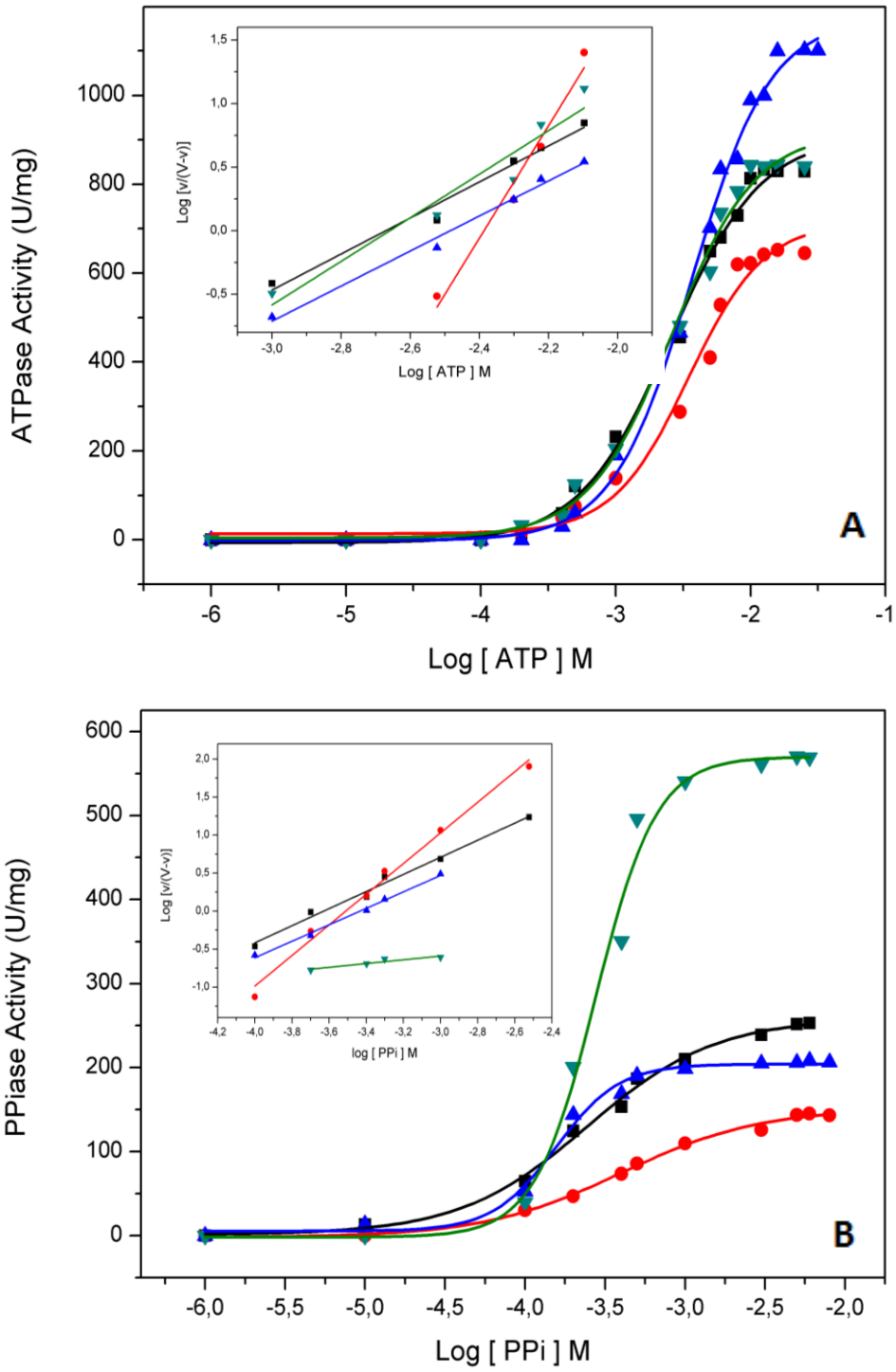


Figura 13: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DMPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10; (▲) e 25 (▼) 36 mol%. Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Com relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos constituídos de DMPC, foi foram obtidos valores ($6{,}5 \times 10^{2}$ $M^{-1}.s^{-1}$) muito similares com os proteolipossomos compostos por DPPC:Chol

(75:25) mol% e (64:36) mol% ($6,0x10^2$ e $6,5x10^2$ $M^{-1}.s^{-1}$, respectivamente). Porém, proteolipossomos composto por DMPC:Chol (90:10) mol% tiveram uma diminuição de 2x em relação ao lipossomo de DMPC obtendo o valor de $3,7x10^2$ $M^{-1}.s^{-1}$ (Tabela 6) para a eficiência catalítica.

A velocidade de hidrólise de PP_i (Figura 1B) pela enzima reconstituída em lipossomos de DMPC, DMPC:Chol em proporções variando de 10 a 36 mol% é mostrada na Figuras 12B.

O valor de $K_{0.5}$ para proteolipossomos decresce com o aumento da concentração de Chol, indicando que nessa faixa de concentração a afinidade entre a enzima e o substrato aumenta (Tabela 6). Também, observou-se um aumento nos valores de cooperatividade que passam de 1,0 de proteolipossomos de DMPC, para 1,7 para o proteolipossomos com maior concentração de Chol, valendo destacar que para protelipossomos com 10 mol% de colesterol o valor foi de 4,4 muito acima dos outros.

Os valores de $V_{máx}$ aumentaram (de 252,9 para 570,3 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DMPC:Chol (90:10) e (75:25) mol% obtivemos uma diminuição (indo para 145,4 e 208,2 U/mg, respectivamente), quando comparado com os lipossomos contendo apenas DMPC.

Com relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos de DMPC foi obtido valor de $2,1x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$, os valores obtidos para proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol (75:25) e (64:36) mol% ($2,7x10^3$ e $4,1x10^3$ $M^{-1}.s^{-1}$, respectivamente), indicando um aumento de atividade catalítica do PP_i, na presença de Chol.

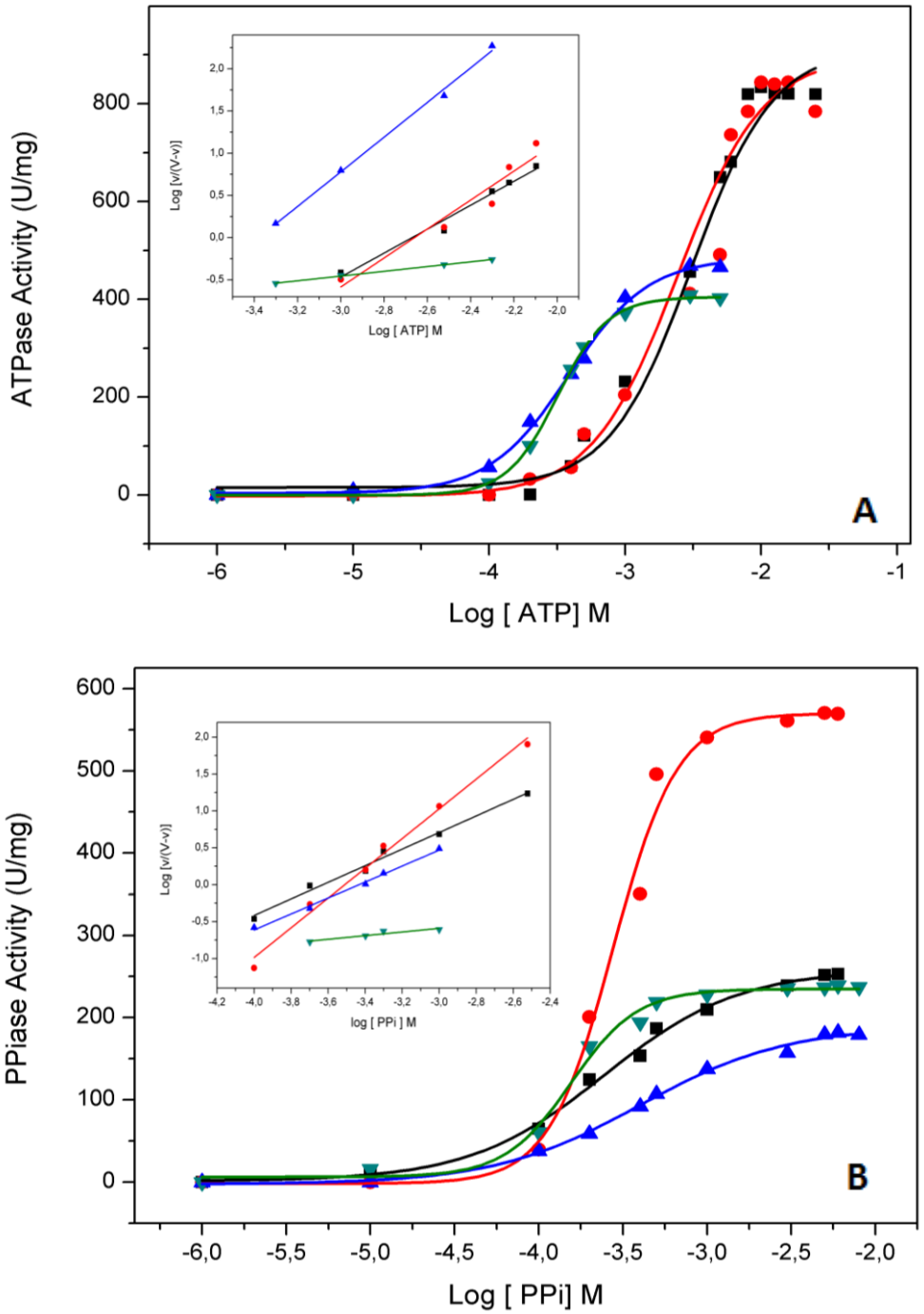


Figura 14: Efeito da concentração de ATP (A) e o PP_i (B) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em lipossomos compostos de DMPC e por diferentes esteróis: (■) DMPC puro; (▼) DMPC:Chol (64:36 mol%); (★) DMPC:AChol (64:36 mol%) e (♦) DMPC:Ergo (64:36 mol%). Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

Para vesículas compostas por DMPC:AChol (64:36) mol%, a hidrólise de ATP (Figura 2A) mostrou um $V_{máx}$ de 468,5 U/mg, menor do que o obtido para o DMPC:Chol (64:36) mol%, (840,1 U/mg), más muito semelhante ao observado para a DMPC:Ergo (64:36) mol%, (408,5 U/mg).

O valor $K_{0.5}$ para DMPC:AChol (64:36) mol% foi de 0,3 mM, resultando em uma maior afinidade para o ATP, se comparado a proteolipossomos constituído de DMPC:Chol (64:36) mol% (2,5 mM) e DMPC:Ergo (64:36) mol% (0,3 mM).

Com relação à eficiência catalítica da TNAP reconstituída em proteolipossomos, na presença da Colestenona e do Ergosterol os valores foram superiores ao protelipossomos compostos por DMPC (4 e 5 vezes, respectivamente).

Com relação a hidrólise de PP_i (Figura 2B), todos os proteoliposomos revelaram valores muito semelhantes $V_{máx}$, $K_{0.5}$. Porém quando observado os valores de eficiência catalítica podemos observar que comparados ao DMPC, a presença da Colestenona acarretou uma diminuição no valor, de 2100 para 910 $M^{-1}.s^{-1}$.

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP e o PP_i TNAP reconstituído em lipossomos de diferentes proporções de DMPC e esteróis.

Substratos	Parametro Cinéticos	Proteolipossomos					
		DMPC	DPMC:Chol 10%	DMPC:Chol 25%	DMPC:Chol 36%	DMPC:AChol 36%	DMPC:Ergo 36%
ATP	$V_{máx}$ (U/mg)	833,4 ± 3.2	644,9 ± 5.5	1102,3 ± 4.2	840,1 ± 8.1	468,5 ± 6.9	408,5 ± 2.2
	$K_{0.5}$ (mM)	2,5 ± 0.01	3,5 ± 0.04	3,6 ± 0.05	2,5 ± 0.01	0,3 ± 0.02	0,3 ± 0.04
	N	1,2 ± 0.01	0,9 ± 0.04	1,7 ± 0.08	2,0 ± 0.04	1,0 ± 0.03	0,2 ± 0.04
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	6,5x10²	3,7 x10²	6,0 x10²	6,5 x10²	2,4 x10³	2,6 x10³
PP_i	$V_{máx}$ (U/mg)	252,9 ± 3.2	145,4 ± 3.2	208,2 ± 3.2	570,3 ± 3.2	181,7 ± 3.2	239,3 ± 3.2
	$K_{0.5}$ (mM)	0,2 ± 0.02	0,4 ± 0.01	0,2 ± 0.08	0,3 ± 0.03	0,4 ± 0.04	0,2 ± 0.02
	N	1,4 ± 0.04	4,4 ± 0.02	1,3 ± 0.03	1,7 ± 0.06	2,0 ± 0.04	0,2 ± 0.03
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	2,1 x10³	7,3 x10²	2,7 x10³	4,1 x10³	9,1 x10²	3,1 x10³

Podemos notar, observando a Tabela 6, que para o substrato PP_i a enzima apresenta um valor de $K_{0,5}$ menor nos lipossomos de DMPC que no substrato ATP, sugerindo que o PP_i pode ser hidrolisado preferencialmente quando em um microambiente onde todos os substratos estivessem disponíveis. Mas esta hipótese precisará se testada, pois um substrato poderia competir com o outro e resultar na inibição da atividade de fosfomonoidrolase e, consequentemente, reduzir a quantidade de fosfato produzido.

Os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 6 são similares aos relatados por Favarin e colaboradores (Favarin *et al.*, 2017) em relação à proteolipossomos compostos pelos mesmos lipídios.

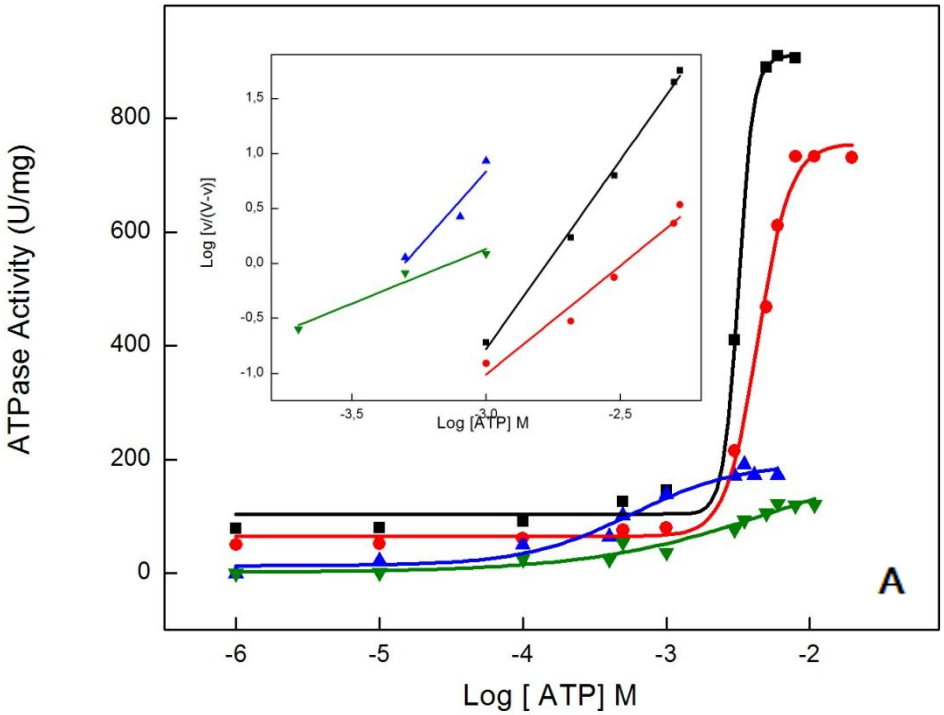
Cabe ressaltar que a $V_{máx}$ de hidrólise para os substratos ATP e PP_i foram menores para todos os proteoliposomos estudados quando o Chol está presente em uma proporção de 10 mol%.

4.6 Estudo cinético de proteolipossomos contendo "*rafts*".

A existência de microdomínios é explicada principalmente pela separação de fase lipídica na membrana, uma fase líquida cristalina fluida (Lα) e fase líquido ordenada (Lo) rica principalmente em colesterol e esfingolipídios (Simons e Ikonen, 1997; Brown e London, 2000; Sezgin *et al.*, 2017). Essas interações podem explicar a existência de certas composições lipídicas resistentes à solubilização por detergentes, particularmente aqueles que contêm esfingomielina, colesterol, glicoesfingolipídeos e fosfolipídios (Dietrich *et al.*, 2001).

As MVs apresentam grandes concentrações de Chol, SM (Wuthier e Gore, 1977; Balcerzak *et al.*, 2003) e ácidos graxos de cadeia mais longas (Abdallah *et al.*, 2014). Os condrócitos e osteoblastos podem conter domínios de "*rafts*", este podem atuar como marcadores proteicos (Foster *et al.*, 2003), sugerindo que a composição lipídica é tão importante quanto a composição de proteínas no papel das MVs e subsequentemente no processo de mineralização (Bolean *et al.*, 2010; 2011). Portanto, foram realizados experimentos para entender melhor o papel dos lipídios presentes nos "*rafts"* e suas interações com TNAP usando DPPC, DMPC, Chol e SM como mostrado anteriormente por calorimetria (Bolean *et al.*, 2010) e agora também a cinética enzimática.

A TNAP foi reconstituída em lipossomos constituídos por DPPC puro, DPPC:Chol (90:10), DPPC:SM (90:10), DPPC:Chol:SM (80:10:10), DMPC puro, DMPC:Chol (90:10), DMPC:SM (90:10) e DMPC:Chol: SM (80:10:10) mol% empregando-se a metodologia descrita anteriormente por Favarin (Favarin *et al.*, 2017).



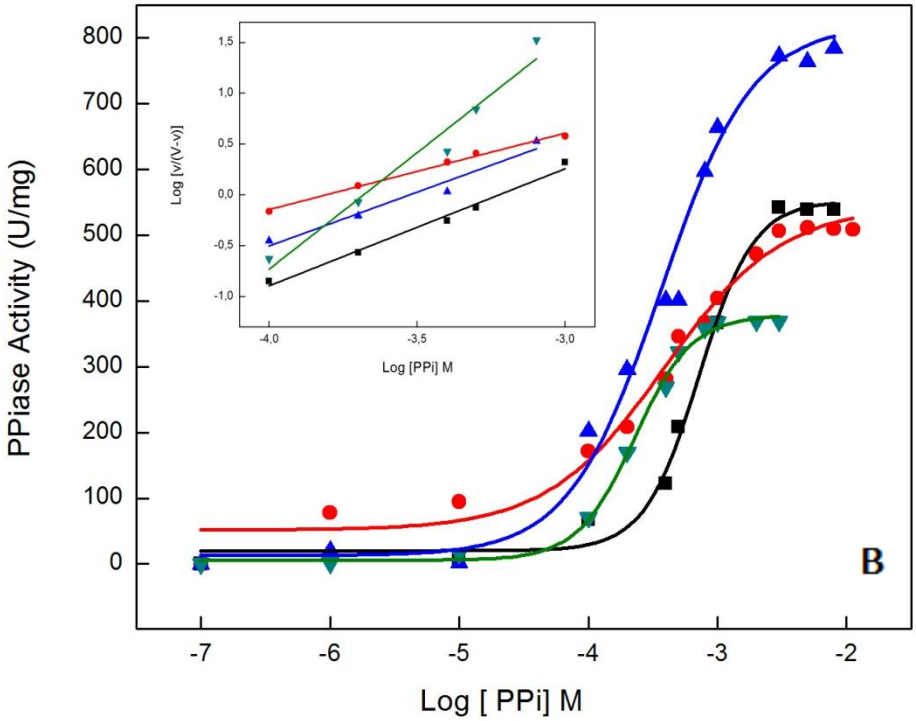


Figura 15: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática de TNAP reconstituída em lipossomos compostos de: (■) DPPC sozinho; (●) de DPPC:Chol (90:10); (▲) DPPC:SM (90:10) e (▼) DPPC:Chol:SM (80:10:10) mol% . Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

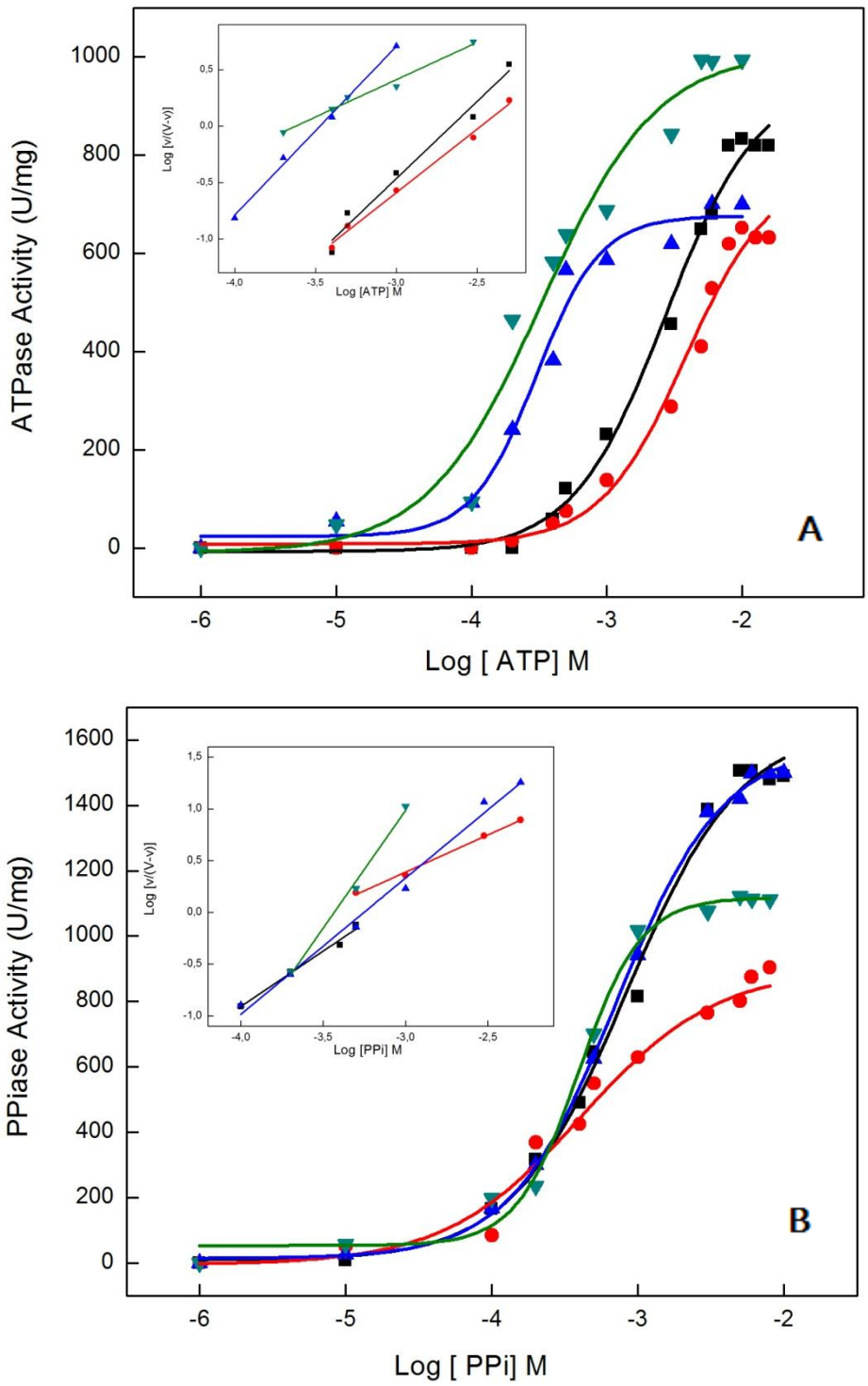


Figura 16: Efeito da concentração de ATP (A) e do PP_i (B) na atividade enzimática de TNAP reconstituída em lipossomos compostos de (■) DMPC sozinho; (●) de DMPC:Chol (90:10); (▲) DMPC:SM (90:10) e (▼) DMPC:Chol:SM (80:10:10) mol% . Inserção: Representação de Hill para a interação de ATP e PP_i com a enzima, respectivamente.

A presença de SM ou Chol:SM em proteolipossomos de DPPC alterou significativamente os valores $V_{máx}$ diminuindo cerca de 4 vezes em comparação

com DPPC puro, pela TNAP quando hidrolisou ATP, porém para proteolipossomos de DMPC não houve variação significativa deste parâmetro.

Tabela 7: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de ATP e de PP_i pela TNAP reconstituído em lipossomos de diferentes composições.

Substratos	Parâmetros Cinéticos	Proteolipossomos			
		DPPC	DPPC:Chol (90:10)	DPPC:SM (90:10)	DPPC:Chol:SM (80:10:10)
ATP	$V_{máx}$ (U/mg)	910,0 ± 10,6	732,8 ± 15,3	191,21± 12,3	122,77± 10,3
	$K_{0.5}$ (mM)	3,18 ± 0,02	2,75 ± 0,06	0,31 ± 0,01	2,21± 0,04
	n	3,4 ± 0,01	1,9 ± 0,07	2,74 ± 0,02	0,99 ± 0,09
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$5,7x10^{2}$	$5,3x10^{2}$	$3,5x10^{2}$	$1,1x10^{1}$
PPi	$V_{máx}$ (U/mg)	542,2 ± 12,8	510,8 ± 9,1	772,3± 3,1	368,8± 7,1
	$K_{0.5}$ (mM)	0,71 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,53± 0,04	0,36± 0,01
	n	1,0 ± 0,06	1,1 ± 0,01	3,7± 0,09	2,2± 0,08
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$1,5x10^{3}$	$1,9x10^{3}$	$2,9x10^{3}$	$2,0x10^{3}$

Substratos	Parâmetros Cinéticos	Proteolipossomos			
		DMPC	DMPC:Chol (90:10)	DMPC:SM (90:10)	DMPC:Chol:SM (80:10:10)
ATP	$V_{máx}$ (U/mg)	833,2 ± 13,4	652,3± 11,2	701,3± 13,2	993,8± 12,5
	$K_{0.5}$ (mM)	2,70 ± 0,02	3,79 ± 0,03	0,29 ± 0,07	0,33 ± 0,08
	n	1,3 ± 0,02	1,1± 0,08	1,4 ± 0,06	0,6 ± 0,09
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$6,2 x10^{2}$	$3,4 x10^{2}$	$4,7 x10^{3}$	$6,0 x10^{3}$
PPi	$V_{máx}$ (U/mg)	1504,6± 08,6	904,1 ± 14,3	1497,8 ± 15,9	1120,6 ± 18,3
	$K_{0.5}$ (mM)	0,22 ± 0,04	0,40 ± 0,07	0,71 ± 0,03	0,39 ± 0,09
	n	1,0 ± 0,02	0,7 ± 0,05	1,3 ± 0,01	2,2 ± 0,06
	$k_{cat}/K_{0.5}$ ($M^{-1}.s^{-1}$)	$1,3 x10^{2}$	$4,4 x10^{3}$	$4,2 x10^{3}$	$5,7 x10^{3}$

Com relação a eficiência catalítica da TNAP para a hidrólise de ATP e PP_i, os proteolipossomos na presença de SM e Chol:SM sofreram aumento dos valores, independente do substrato hidrolisado.

A compreensão do papel dos microdomínios que podem ocupar até 50% da superfície da membrana, e ligeiramente mais espessa, mais ordenada (menos fluida) do que os micros domínios ricos em apenas fosfolipídios (Marguet *et al.*, 2006). Os microdomínios presentes nas membranas não são estritamente separados e as proteínas movem-se em uma escala de tempo de segundos. No entanto, em uma escala de tempo de microssegundos (mais relevante para muitos processos bioquímicos mediados por enzimas e membranas), muitas proteínas residem preferencialmente nos "*rafts*" (Yeagle,

2016). Assim, estudos com essas composições são essenciais para compreender os mecanismos de ação do TNAP nas interfaces lipídicas.

4.7 Ensaio de Atividade catalítica *simultânea a pressão de exclusão* γ.

Para investigar a atividade fosfohidrolitica da TNAP em monocamada, construímos sistemas miméticos com fosfatidilcolina saturada e insaturada (e na presença da enzima, contendo GPI ancorada) numa gota pendente (Mannock *et al.*, 2006). Investigamos a tensão superficial e a atividade fosfohidrolíticas simultaneamente empregando a técnica ADSA acoplada à espectrofotometria DRUV (Mannock *et al.*, 2006) e monitorando a liberação de p-nitrofenolato (pNP-) em pH alcalino.

A Tabela 8 mostra que a atividade fosfohidrolica da TNAP na presença de diferentes composições lipídicas. Conduzimos os experimentos a uma pressão superficial constante de 30 mN/m, que se assemelhou às pressões encontradas nas biomembranas naturais (Seelig, 1987).

Tabela 8 - Atividade p-NPPase da TNAP quando presentes em interface compostos por DPPC, DOPC e esteróis com pressão de 30 mN/m.

Lipídio	Atividade/(30 mN/m)U/mg	π excl. (mN/m)
DPPC*	3092,1 ± 21,1	34,6 ± 0,1
DPPC:Chol (64:36) mol% *	3157,3 ± 24,1	45,0 ± 0,5
DPPC:AChol (64:36) mol% *	4661,8 ± 54,1	44,6 ± 0,5
DPPC:Ergo (64:36) mol% *	3605,7 ± 32,1	39,3 ± 0,1
DOPC*	2208,7 ± 12,1	28,8 ± 1,4
DOPC:Chol (64:36) mol%*	3460,4 ± 34,1	34,1 ± 1,7
DOPC:AChol (64:36) mol%*	5315,6 ± 12,1	35,5 ± 1,8
DOPC:Ergo (64:36) mol%*	2853,0 ± 11,1	35,8 ± 1,8

* Publicado em Favarin et al. (Favarin *et al.*, 2017)

Para a monocamada de DPPC e DOPC puros, os valores médios da atividade da TNAP foram de 3000 e 2200 U/mg, respectivamente (Tabela X). A presença de esteróis aumentou a atividade da p-NPPase do TNAP, que foi cerca de 50 e 150% superior na presença de 36 mol% de AChol, em

comparação com as monocamadas de DPPC e DOPC puro, respectivamente (Tabela 8).

Claramente, todos os esteróis aumentaram a atividade fosfohidrolítica da TNAP na monocamada, e o AChol foi o esterol que causou maior aumento. Este feito pode ser explico segundo suas propriedades biofísicas, Ergo e Chol foram classificados como promotores porque promovem a formação de uma segunda fase líquida, Lo (Rahim *et al.*, 1997) as vesículas contendo Ergo induzem a coexistência de fases líquida abaixo da transição de fase, exatamente como o Chol. Porém, o Achol é considerado um inibidor, pois o esterol AChol exibe na transição de fase a coexistência de fases sólida e líquida não favorecendo a formação de Lo (Caseli *et al.*, 2005a; Caseli *et al.*, 2005b; Hsueh *et al.*, 2005; Marsh, 2010). Entre as monocamadas que contêm os esteróis aqui estudados, as monocamadas na fase Lα aumentaram a atividade da p-NPPase da TNAP numa extensão maior em comparação com monocamadas na fase Lo.

As monocamadas de DPPC proporcionaram uma maior pressão de exclusão (π_{exc}) em comparação com as monocamadas de DOPC, sugerindo que a TNAP tinha maior afinidade para a monocamada lipídica saturada. Valores de π_{exc} em torno de 13 e 22 mN/m foram relatados para bicamadas de DPPC (Bolean *et al.*, 2011) e DOPC (Fritzsching *et al.*, 2013) construídas em tampões de alta força iônica induzida por NaCl com volumes 103 vezes maiores, respectivamente, o que justifica a discrepância em relação aos valores obtido aqui (Tabela 8). Ocorreu um aumento no π_{exc} para as monocamadas contendo um dos esteróis (Chol, AChol e Ergo) em comparação com as monocamadas compostas de fosfolípidos puros, DPPC ou DOPC (Tabela 8).

O parâmetro π_{exc} indica a pressão superficial máxima na qual a proteína é capaz de penetrar a monocamada lipídica. Maiores π_{exc} indicam maior penetração do TNAP na monocamada (Mannock *et al.*, 2006). A presença de esteróis na composição das monocamadas aumentou a penetração do TNAP (indicado pelo maior π_{exc}) e sua atividade p-NPPase. Esta maior penetração do TNAP nas monocamadas contendo esterol foi provavelmente devida à interação entre as cadeias acil dos lipídios que constituem as monocamadas e os esteróis (Korade e Kenworthy, 2008), que aumentaram a inserção da porção

GPI. O aumento da tensão superficial e atividade catalítica do TNAP foram relacionados à orientação desta enzima na monocamada na presença de um esterol. Caseli e Wilker (Caseli *et al.*, 2006; Wilke *et al.*, 2010) mostraram que a orientação da TNAP depende da composição das monocamadas, que determina a atividade fosfohidrolítica dessa enzima nos filmes de Langmuir-Blodgett.

4.8 Estudo da propagação da biomineralização

Uma das características importantes das MVs é a presença de um Nódulo de nucleação (Wu *et al.*, 1997), que consiste em um complexo formado entre fosfato de cálcio amorfo (ACP) e PS, para dar complexos PS-Ca^{2+}-P_i (PS-CPLX) que podem gerar minerais após a incubação com linfa de cartilagem sintética (SCL) (Boskey e Posner, 1976; Genge *et al.*, 2007).

ACP é um mineral cineticamente instável que se origina somente quando ambos Ca^{2+} e Pi estão presentes em altas concentrações (mM) (Eanes, 1970). Embora PS-CPLXs contendo Pi possam induzir a formação de HA, *in vivo* muitos fatores parecem regular sua produção e atividade (Wuthier e Lipscomb, 2011). PS-CPLXs estão presentes nos estágios iniciais de quase todos os tecidos calcificantes, incluindo cartilagem (Wuthier, 1968), osso (Boskey e Posner, 1976) e MVs (Wuthier e Gore, 1977)

Estudos anteriores sobre a formação de minerais mostraram que a atividade de nucleação de MVs é eficaz apenas dentro de uma faixa de pH muito estreita, entre 7,4-7,8 (Valhmu *et al.*, 1990). Acima ou abaixo dessa faixa, a capacidade das MVs de formar minerais e promover a nucleação são significativamente menores. No entanto, Wu e colaboradores (Wu *et al.*, 2008) relataram que os minerais podem se originar dentro de um pH mais amplo (pH 7,4-8,0). Relatos anteriores são consistentes com nossos dados (Kouzayha e Besson) mostrando que proteolipossomos que contem TNAP induzem a mineralização mais eficientemente a pH 7,5 e 8 em comparação com pH 9, embora TNAP exiba atividade mais alta em pH alcalino (Simao *et al.*, 2013). Isso pode acontecer porque a hidrólise dos substratos ocorre em um microambiente lipídico, enquanto o processo de nucleação/mineralização ocorre no lúmen das MVs. Assim, o pH ótimo para a hidrólise do substrato

pode ser diferente do pH ótimo para a mineralização, que depende das propriedades biofísicas dos complexos de fosfato de cálcio e de sua estabilidade, que são dependentes do pH (Bennett *et al.*, 1975). Os lipossomos sintéticos contendo proteínas e enzimas envolvidas na mineralização podem imitar esses diferentes microambientes.

A propagação da mineralização foi significativamente mais eficiente em pH 7,5 e 8 do que a pH 9. Quando houve uma ligeira elevação do pH 7,4 para 8 foi promovida uma maior hidrólise de ATP, esta pequena alteração do pH facilita a mineralização, especialmente através da via reguladora da hidrólise de PP_i por ambas proteínas NPP1 e TNAP, elevando ainda mais a relação P_i/ PP_i, aumentando assim a mineralização óssea. Nesta linha de raciocínio, é por isso que foi investigado o efeito do microambiente lipídico na hidrólise destes substratos e também na mineralização.

Foi estudada a capacidade dos proteolipossomos na presença da TNAP, influenciar a mineralização, utilizando fosfatidilserina (PS) mais fosfato amorfo (ACP) (PS-CPLX) como complexo nucleador na presença de ATP, como uma fonte de Pi. Este protocolo diferente dos descrito na literatura (Wuthier *et al.*, 1985b) é um diferencial pois não são fornecidas as condições de Ca e Pi para a mineralização, mas a enzima que está presente nos proteolipossomos que deverá hidrolisar o substrato e produzir o Pi necessários para a mineralização. Diferente dos estudos que nós realizamos anteriormente, nesta etapa do trabalho forma realizados os ensaios normalizando-se todas as variáveis: mesma quantidade de proteína em todos os ensaios, (quantidade de TNAP) e além disso, todos os ensaios foram feitos na $V_{máx}$ de hidrólise do substrato empregado (isto é condição saturante de substrato).

Quando comparados com DPPC puro, a presença de proteolipossomos contendo DPPC:Chol e DPPC:AChol promoveu um aumento na mineralização (Figura 9). Um aumento de 1,3 vezes na mineralização *in vitro* foi observado para proteolipossomos de DOPC enquanto que para DPPC:Chol e DPPC:AChol houve um aumento de 4 e 5 vezes, respectivamente. No entanto, a presença de Ergo não o alterou de forma significativa ($p < 0,05$), quando comparado com apenas proteolipossomos DPPC.

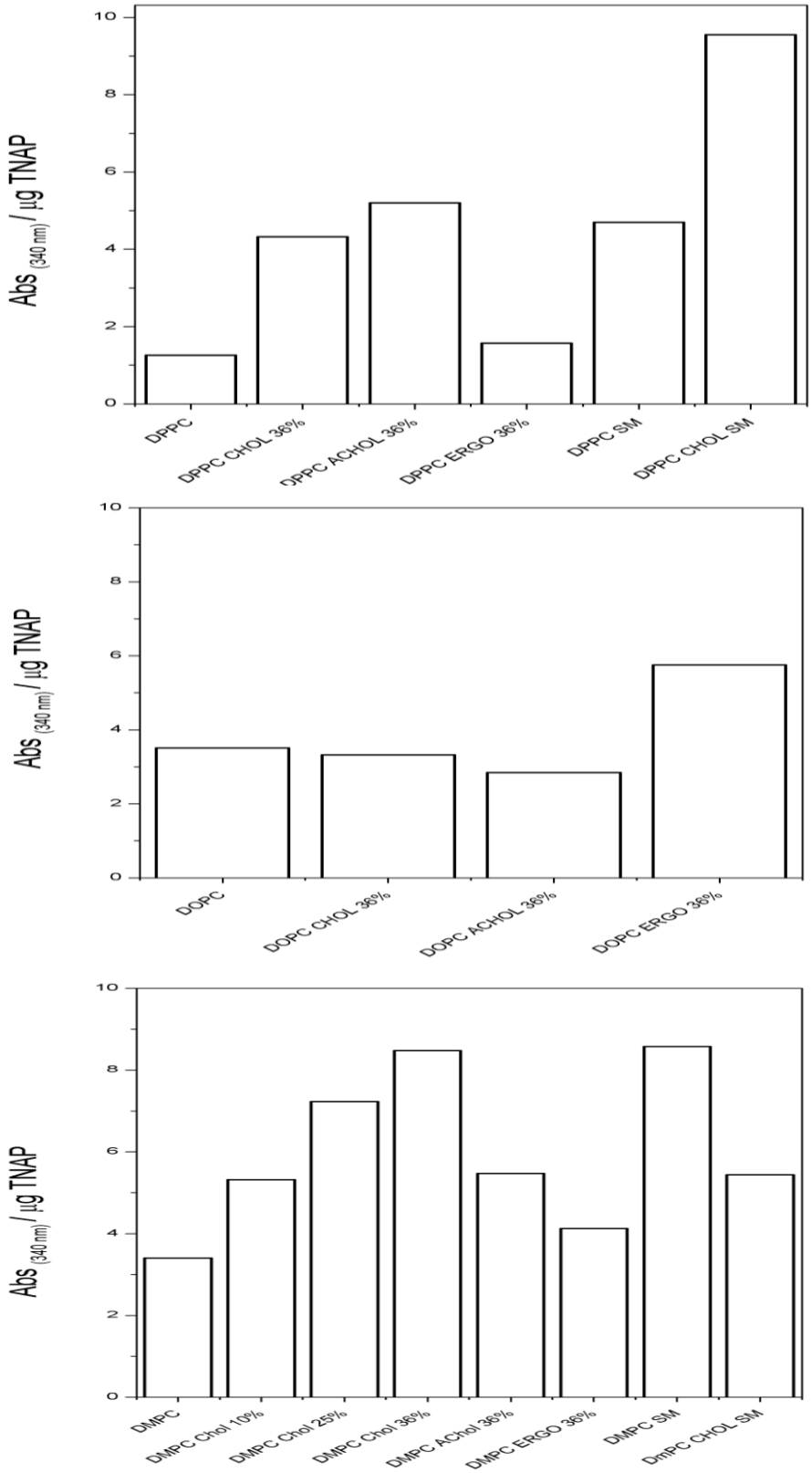


Figura 17: Efeito dos proteolipossomos contendo a TNAP e compostos por DPPC e esteróis* (A), DOPC e esteróis* (B) DMPC e esteróis (C), responsável pela propagação mineral na presença do nucleador PS-CPLX- e SCL, na presença de ATP acima da $V_{máx}$ de hidrolises, após 48 h de incubação em 37°C. Lipossomos vazios incorporados sem enzimas foram utilizadas como controle e as barras mostram o incremento na absorvâncias após 48 h. *Adaptado de Favarin et al. (Favarin *et al.*, 2017).

Proteolipossomos compostos por lipídios insaturados (DOPC) favoreceram o processo de mineralização (cerca de 3 vezes), quando comparado com proteolipossomos compostos por lipídios saturados (DPPC) (Figura 9). Valores semelhantes para vesículas foram observados com Chol e AChol, enquanto a presença de Ergo resultou num aumento de 1,6 vezes na mineralização comparação com vesículas de DPPC. Vale ressaltar que vesículas de DPPC:AChol mostraram mesma capacidade de propagação mineralização em comparação com vesículas de DOPC:Ergo (Figura 9).

A fim de entendermos a importância do microambiente lipídico, utilizamos proteolipossomos compostos por fosfolipídios saturados porém com temperatura de transição abaixo da temperatura ambiente (37 ºC), utilizamos o DMPC (22 ºC), para estes proteolipossomos obtivemos valores maiores de propagação, comparado com DPPC, obtivemos valor 3x maior para DMPC.

Quando comparamos proteolipossomos com colesterol a diferença é mais significativa, no qual protelipossomos de DMPC:Chol (64:36) mol% apresentam valores em torno de 9x maiores em relação ao DPPC.

A presença de Chol em proteoliposomos DPPC aumentou cerca de 4 vezes os valores de eficiência catalítica (Tabela 4), para hidrólise de ATP. Além disso, esses proteolipossomos contendo Chol aumentaram a propagação do mineral em torno de 3,4 vezes. Não foram observadas alterações significativas nos valores de eficiência catalítica (Tabela 5), quando se compararam os proteolipossomos de DPPC com DMPC e DMPC:Chol 64:36 mol%. No entanto, os ensaios *in vitro* de mineralização revelaram um aumento de 2,7 e 6,7 vezes em comparação com os proteolipossomos DPPC, respectivamente. Esta melhoria de propagação mineral pode ser correlacionada com as propriedades termodinâmicas dos proteolipossomos conforme anteriormente descrito (Bolean *et al.*, 2010; 2011).

A presença de Chol pode aumentar a espessura e resistência mecânica, diminuindo assim a permeabilidade da bicamada lipídica quando na fase líquida cristalina, como observado para os lipossomos ou proteolipossomos de DPPC (Bolean *et al.*, 2011). Por outro lado, quando Chol está presente em vesículas com maior grau de desordem e menos empacotado como observado para DMPC, o esterol pode modificar a permeabilidade da

membrana, atuando como um modulador das propriedades físicas e organização lateral do lipídio da membrana (Simons e Ikonen, 1997; Barenholz, 2002; Korade e Kenworthy, 2008). Esses efeitos são consistentes com nossos dados atuais e os dados experimentais com anteriormente relatados (Bolean *et al.*, 2010).

Sob as condições estudadas, as membranas DMPC apresentam maior fluidez que o DPPC, porém menor que DOPC. Quando comparados, este comportamento está refletindo na posição dos sítios catalíticos da TNAP ligada pela âncora na membrana GPI (Eanes, 1970; Wuthier e Lipscomb, 2011), o que provavelmente é muito importante para ambos processos de catálise e a propagação do mineral. Além disso, tal como descrito por Simão et al. (Simao *et al.*, 2013), mudanças de pH no microambiente lipídico na região da TNAP ancorada são importantes para a atividade catalítica e o processo de mineralização. Assim, a composição lipídica, presença de esteróis e pH pode interferir com a orientação/posicionamento dos sítios catalíticos de TNAP que afetam o seu comportamento cinético e consequentemente a eficiência catalítica.

Assim, no que se refere à propagação da mineralização *in vitro*, os proteolipossomos DMPC foram mais eficazes quando comparados aos proteolipossomos contendo DPPC puro. Correlacionando os parâmetros cinéticos e os resultados da mineralização *in vitro*, é possível observar que os proteolipossomos contendo TNAP com menor grau de empacotamento lipídico (por exemplo constituídos de DMPC, DPPC:Chol (90:10) mol% ou DMPC:Chol (90:10) mol% são mais eficientes na propagação mineral. Entretanto mais estudos ainda são necessários para confirmar esta hipótese definitivamente.

4.9 TNAP Rato (*rattus norvegicus*) x Humano (*homo sapiens*)

A fosfatase alcalina catalisa as reações de hidrólise de vários compostos contendo compostos em pHs alcalinos e ocorre em ampla variedade de espécies. Hoje está bem estabelecido que existam pelo menos três tipos de isoenzimas para ALPs humanas, ALP de fígado, osso e rim (ALP tecido-inespecífica), intestinal, placentária (Stigbrand, 1984). Por outro lado, em várias espécies animais, exceto em primatas superiores e humanos, foi demonstrado

que existem apenas dois tipos de isoenzimas (ALPs não específicas de tecido e intestinais) que não são placentárias (Fishman e Sie, 1970), porque ALPs presentes em placentas dessas espécies animais apresentam características de ALP teciduais inespecíficas.

Alinhamento Clustal Omega TNAP

```
rattusnorvegicus MILPFLVLAIGTCLTNSFVPEKEKDPSYWRQQAQETLKNALKLQKLNTNVAKNIIMFLGD   60
homosapiens      MISPFLVLAIGTCLTNSLVPEKEKDPKYWRDQAQETLKYALELQKLNTNVAKNVIMFLGD   60
                 ** **************:********.***:******* **:************:******

rattusnorvegicus GMGVSTVTAARILKGQLHHNTGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCG   120
homosapiens      GMGVSTVTAARILKGQLHHNPGEETRLEMDKFPFVALSKTYNTNAQVPDSAGTATAYLCG   120
                 ******************* ***************************************

rattusnorvegicus VKANEGTVGVSAATERTRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAH   180
homosapiens      VKANEGTVGVSAATERSRCNTTQGNEVTSILRWAKDAGKSVGIVTTTRVNHATPSAAYAH   180
                 ****************:**********************************************

rattusnorvegicus SADRDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIKDIDVIMGGGRKYMYPKNRTDVEYELDE   240
homosapiens      SADRDWYSDNEMPPEALSQGCKDIAYQLMHNIRDIDVIMGGGRKYMYPKNKTDVEYESDE   240
                 *********************************:*****************:****** **

rattusnorvegicus KARGTRLDGLDLISIWKSFKPRHKHSHYVWNRTELLALDPSRVDYLLGLFEPGDMQYELN   300
homosapiens      KARGTRLDGLDLVDTWKSFKPRHKHSHFIWNRTELLTLDPHNVDYLLGLFEPGDMQYELN   300
                 *************:. ************::*******:*** .******************

rattusnorvegicus RNNLTDPSLSEMVEVALRILTKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDEAIG   360
homosapiens      RNNVTDPSLSEMVVVAIQILRKNPKGFFLLVEGGRIDHGHHEGKAKQALHEAVEMDRAIG   360
                 ***:********* **::** ************************************.***

rattusnorvegicus KAGTMTSQKDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMVSDTDKKPFTAILYGNGPG   420
homosapiens      QAGSLTSSEDTLTVVTADHSHVFTFGGYTPRGNSIFGLAPMLSDTDKKPFTAILYGNGPG   420
                 :**::**.:*********************************:******************

rattusnorvegicus YKVVDGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFAKGPMAHLLHGVHEQNYI   480
homosapiens      YKVVGGERENVSMVDYAHNNYQAQSAVPLRHETHGGEDVAVFSKGPMAHLLHGVHEQNYV   480
                 ****.**************************************:****************:

rattusnorvegicus PHVMAYASCIGANLDHCAWASSASSPSPGALLLPLALFPLRTLF      524
homosapiens      PHVMAYAACIGANLGHCAPASSAGSLAAGPLLLALALYPLSVLF      524
                 *******:******.*** ****.* : * *** ***:** .**
```

Figura 18. Alinhamento de sequências de fosfatase alcalina humana (*Homo sapiens*) em comparação com rato (rattus norvegicus). Código de cores de propriedades de resíduos de aminoácidos: Vermelho – resíduos com pequenas cadeias laterais ou aromáticos ; Azul – resíduos com propriedades ácidas; azul – resíduos com propriedades básicas; Verde – resíduos com grupos hidroxilo, sulfihidrilo e amina; Amarelo – resíduos de amino/iminoácidos incomuns. Abaixo de cada sítio (i.e., posição) do alinhamento da sequência proteica é uma chave que denota sítios conservados (*), sítios com substituições conservativas (:), sítios com substituições semi-conservativas (.), e sítios com substituições não-conservativas ( ).

Portanto, parece provável que cada uma das isoenzimas da ALP tenha se diferenciado de uma ALP ancestral nos processos evolutivos das espécies animais. No entanto, nós temos conhecimento limitado sobre as isoenzimas da ALP, porque tem havido poucos relatos sobre isso. As isoenzimas devem podem ser classificadas pelas suas sequências de aminoácidos, que podem ser utilizados para distinguir as isoenzimas umas das

outras como esta descrtio abaixo na figura X no qual fizemos a comparação da *Rattus norvegicus* com a de *homo sapiens*.

Quando comparamos a sequencia de nucleotídeos e de aminoácidos de *rattus norvegicus* com homo sapiens revelaram que apresentam uma similaridade muito alta de aminoácidos (97,98%). Apesar das pequenas variações, há evidências que a maioria das trocas de nucleotídeos não leva a mudanças no aminoácido especificado (substituições sinônimas).

Para averiguar se estas diferenças de Aminoácidos são importantes com relação a atividade em diferentes pH, fizemos testes de pH ótimo e Zeta potencial, como apresentado abaixo na Figura 19.

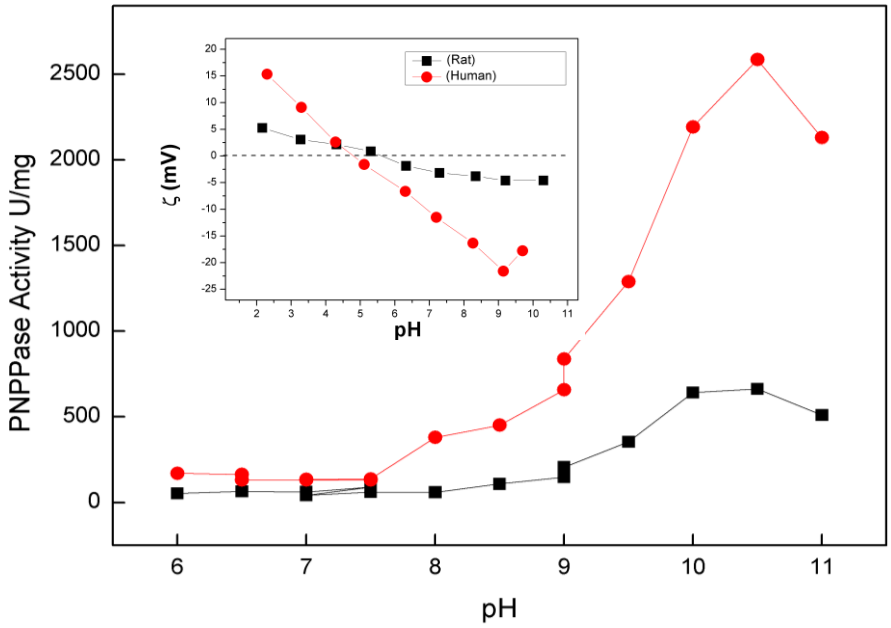


Figura 19. Determinação do pH ótimo de hidrólise do PNFF pela TNAP, de *homo sapiens* (■) x *rattus norvegicus* (●), na faixa de pH entre 6,5 e 10,5, utilizando-se os seguintes tampões: imidazol (pH 6,5-7,5),Tris-HCl (pH 7,0-9,0) e AMPOL (pH 8,5-10,5), como descrito no item 3.20 de Material e Métodos. As atividades foram determinadas em 50 mM do tampão apropriado, contendo $MgCl_2$ 2 mM e PNFF 10 mM, como descrito no item 3.5 de Material e Métodos. Inserção: Análise comparativa do Zeta potencial.

Assim inicialmente foi verificado comparativamente o pH ótimo de hidrólise das diferentes isoformas da TNAP hidrolisando o Substrato PNFF (Figura 19). Podemos observar que a característica da curva de hidrólise se mantêm similar com aumento do pH e atingindo o Vmáx com pH 10, mantendo portanto as características já descritas na literatura (Simao *et al.*, 2007). Porém quando comparamos a TNAP obtida de *Homo sapiens* observamos uma

diminuição na Vmáx de aproximadamente de 5x em comparação com *rattus norvegicus*.

Após a determinação de pH ótimo, foram feitos estudos de estabilidade das enzimas através da técnica pelo equipamento de DLS, conhecida como Zeta Potencial (Inserção da Figura 19). A TNAP *homo sapiens* tinham um potencial zeta de -20 mV em tampão Ampol (pH 10) e um valor de -5 mV para *rattus norvegicus* quando comparados no mesmo pH.

Tabela 9: Variação na pressão superficial após a adição da enzima TNAP.

TNAP	Δπ (mN m^{-1})	Proteína (μg/mL)
Rato	4,7 ± 0,6	67,7 ± 0,6
Humano	5,6 ± 0,8	175,2 ± 0,6

Foram feitos testes de gota pendente (na ausência de lipídeos na interface) e observamos que, para uma mesma variação Δπ, foi necessária maior concentração de TNAP humana para que ocorra a orientação da ancora de GPI na interface liquido-ar quando comparamos com a TNAP obtida de cultivo de medula primária de rato (Tabela 9). Este comportamento pode ocorrer possivelmente porque a enzima obtida de cultura primária de rato possui maiores valores de potencial zeta (Inserção da Figura 19) que indicam uma maior solubilidade na tampão de trabalho. Comportamentos similares foram obtidos por Caseli (Caseli *et al.*, 2005a) que trabalharam com TNAP com e sem GPI em diferentes interfaces.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise de p-NPP pela TNAP (*rattus norvegicus x homo sapiens*).

TNAP	Parâmetros Cinéticos	Concentração de SBI-425 (μM)				IC $_{50}$ μM
			0,01	0,015	0,02	
Humano	$V_{máx}$ (U/mg)	46494,6 ± 17,1	13160,7 ± 16,6	11240,0 ± 15,6	1071,4± 23,1	0,006 ± 0,0003
	$k_{0,5\ mM}$	0,42 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,09 ± 0,01	
	n	1,35± 0,02	0,88 ± 0,01	1,22 ± 0,09	0,70 ± 0,02	
	Kcat/k0,5	1,10E+05	7,10E+04	5,30E+04	1,10E+04	
Rato	$V_{máx}$ (U/mg)	80747,1 ± 13,2	22129,3 ± 11,3	18939,4 ± 25,4	10313,9 ± 22,7	0,005 ± 0,0004
	$k_{0,5\ mM}$	0,36 ± 0,02	0,24 ± 0,03	0,33 ± 0,08	0,09 ± 0,02	
	n	0,92 ± 0,01	0,78 ± 0,02	0,91 ± 0,07	0,43 ± 0,03	
	Kcat/k0,5	2,30E+05	9,10E+04	5,70E+04	1,10E+05	

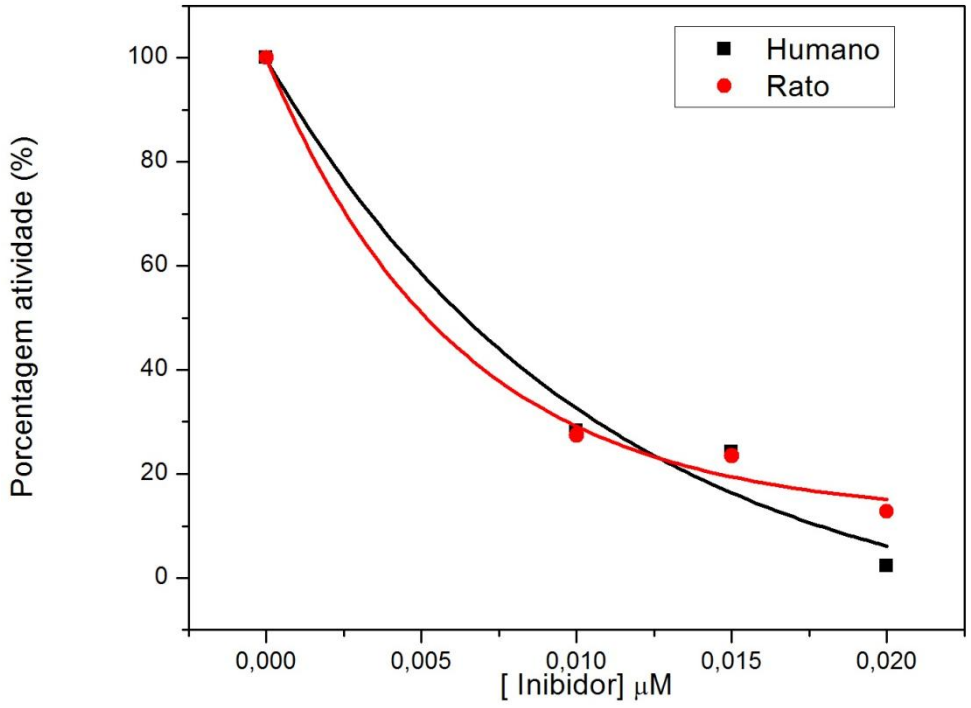


Figura 20: Porcentagem de atividade em função da concentração de inibidor determinada para TNAP (rattus norvegicus x homo sapiens).

Foram feitos teste de inibição da atividade PNPPase empregando-se um inibidor específico SBI-425, desenvolvido pelo grupo do Prof. Millán (Pinkerton *et al.*, 2018), os quais trabalham com inibidores sintéticos da TNAP que impedem, além da atividade da TNAP o processos de calcificação através do aumento de PPi no organismo. O SBI-425 conhecido com o nome de 5-((5-cloro-2-metoxifenil)sulfonamido)nicotinamida, é um potente e seletivo composto inibidor da forma nativa da TNAP já empregado em tratamento de hipermineralização, via oral, atuando para manter a proporção correta de P_i e PPi permitindo a calcificação esquelética e dentária dentro dos parâmetros normais (Pinkerton *et al.*, 2018).

Realizamos ensaios cinéticos empregando as duas enzimas e através das curvas de V x [substrato] e foi observado que, independentemente da concentração de inibidor empregada, a hidrólise de PNPP exibiu uma única curva de saturação (não mostrados).

Na Tabela 10 são agrupados os parâmetro cinéticos e foram observados maiores variações na $V_{máx}$ do que nos valores de $k_{0.5}$, porém quando comparamos na presença do inibidor, temos um comportamento semelhante

das enzimas. Conforme pode ser observado na Figura 20, temos IC_{50} muito similar entre as duas enzimas.

Diante dos resultados apresentados, as duas enzimas possuem sequencias de aminoácidos elevada (97,98%), as características tanto de pH ótimo e de cinética (inibição do SBI-425) bastante semelhante, entretanto as diferenças no potencial Zeta poderiam ser justificadas por troca de aminoácidos específicos importantes para estrutura que resulta numa distribuição de carga diferentes. Essa abordagem ainda deverá ser feita para que se possa explicar as diferenças encontradas.

5 Conclusão:

Um dos principais papéis dos esteróis é modular as propriedades e organização lateral da membrana lipídica. No entanto, estes compostos também podem modular o comportamento cinético da TNAP reconstituída em lipossomos compostos por DPPC, DOPC, DMPC e na presença de esteróis, catalisa a hidrólise do ATP mais eficientemente. Esses microambientes lipídicos produzem mais P_i em função do tempo, consequentemente promovendo maior biomineralização.

A maior afinidade do TNAP pela monocamada lipídica saturada reflete na sua maior incorporação em lipossomos DPPC. A presença de colesterol em monocamada resulta em maior pressão de exclusão (π_{exc}) em comparação com a monocamada de DPPC ou DOPC pura, indicando que GPI-TNAP penetra na monocamada lipídica saturada para uma maior extensão. A presença de diferentes esteróis afeta o comportamento da membrana e, consequentemente, a inserção da GPI e a atividade da enzima.

As membranas de DMPC apresentam lipídios com maior fluidez em relação ao DPPC, porém menor que DOPC. Quando comparados, este comportamento refletiu na posição da TNAP ligada pela âncora na membrana GPI (Eanes, 1970; Wuthier e Lipscomb, 2011), o que provavelmente é muito importante para ambos processos de catálise e a propagação do mineral. Além disso, tal como descrito por Simão et al. (Simao *et al.*, 2013), mudanças de pH no microambiente lipídico na região da TNAP ancorada são importantes para a atividade catalítica e o processo de mineralização. Assim, a composição lipídica, presença de esteróis e pH pode interferir com a orientação/posicionamento dos sítios catalíticos de TNAP que afetam o seu comportamento cinético e consequentemente a eficiência catalítica

O comportamento da membrana na fase lipídica e a estrutura dos esteróis (Chol, Achol e Ergo) influenciou a eficiência catalítica da TNAP nas bicamadas, membranas na Lα fase (AChol) proporcionam melhores parâmetros cinéticos em comparação com membranas na fase Lo (Chol e Ergo).

Assim, no que se refere à propagação da mineralização *in vitro*, os proteolipossomos DMPC foram mais eficazes quando comparados aos proteolipossomos contendo DPPC puro. Correlacionando os parâmetros cinéticos e os resultados da mineralização *in vitro*, é possível observar que os

proteolipossomos contendo TNAP com menor grau de empacotamento lipídico (por exemplo constituídos de DMPC, DPPC:CHOL ou DMPC:CHOL) são mais eficientes na propagação mineral. Entretanto mais estudos ainda são necessários para confirmar esta hipótese definitivamente.

Finalmente, os proteolipossomos na presença do DMPC como lipídio principal e DPPC:esterol (sterol = Chol, AChol) propagam os minerais de forma mais eficaz em comparação com o DOPC: proteolipossomos de esterol (sterol = Chol ou AChol). A mobilidade e o grau de empacotamento do lipídio são claramente vitais para a propagação de minerais mediados pelas atividades de PP_iase e ATPase de TNAP durante a biomineralização.

Diante dos resultados apresentados, as duas enzimas possuem sequencias de aminoácidos elevada (97,98%), as características tanto de pH ótimo e de cinética (inibição do SBI-425) bastante semelhante, entretanto as diferenças no potencial Zeta poderiam ser justificadas por troca de aminoácidos específicos importantes para estrutura que resulta numa distribuição de carga diferentes. Essa abordagem ainda deverá ser feita para que se possa explicar as diferenças encontradas.

6 Referências Bibliográficas:

ABDALLAH, D.; HAMADE, E.; ABOU MERHI, R.; BADRAN, B.; BUCHET, R.; MEBAREK, S. Fatty acid composition in matrix vesicles and in microvilli from femurs of chicken embryos revealed selective recruitment of fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 446, n. 4, p. 1161-1164, Apr 18 2014. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000335367900057 >.

ANDERSON, H. C.; HSU, H. H.; MORRIS, D. C.; FEDDE, K. N.; WHYTE, M. P. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. **Am J Pathol.,** v. 151, n. 6, p. 1555-61., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403706 >.

ANDERSON, H. C.; SIPE, J. B.; HESSLE, L.; DHANYAMRAJU, R.; ATTI, E.; CAMACHO, N. P.; MILLAN, J. L.; DHAMYAMRAJU, R. Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. **Am J Pathol.,** v. 164, n. 3, p. 841-7., 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14982838 >.

ANDRADE, M. A.; FAVARIN, B.; DERRADI, R.; BOLEAN, M.; SIMAO, A. M.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Pendant-drop method coupled to ultraviolet-visible spectroscopy: A useful tool to investigate interfacial phenomena. **Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.,** v. 504, p. 305-311. doi: 10.1016/j.colsurfa.2016.05.085. Epub 2016 May 27., 2016. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28190931 >.

BAGATOLLI, L. A.; MOURITSEN, O. G. Is the fluid mosaic (and the accompanying raft hypothesis) a suitable model to describe fundamental features of biological membranes? What may be missing? **Front Plant Sci.,** v. 4, p. 457. doi: 10.3389/fpls.2013.00457., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24312108 >.

BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta Biochim Pol.,** v. 50(4):1019-38., n. doi, p. 0350041019., 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739992 >.

BARENHOLZ, Y. Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". **Prog Lipid Res.,** v. 41, n. 1, p. 1-5., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694266 >.

BAYERL, T. M.; WERNER, G. D.; SACKMANN, E. Solubilization of DMPC and DPPC vesicles by detergents below their critical micellization concentration: high-sensitivity differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy and freeze-fracture electron microscopy reveal two interaction sites of detergents in vesicles. **Biochim Biophys Acta.,** v. 984, n. 2, p. 214-24., 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765550 >.

BEATTIE, M. E.; VEATCH, S. L.; STOTTRUP, B. L.; KELLER, S. L. Sterol structure determines miscibility versus melting transitions in lipid vesicles. **Biophys J.,** v. 89, n. 3, p. 1760-8. doi: 10.1529/biophysj.104.049635. Epub 2005 Jun 10., 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951379 >.

BECK, G. R., JR.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 97, n. 15, p. 8352-7. doi: 10.1073/pnas.140021997., 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10890885 >.

BENESCH, M. G.; MCELHANEY, R. N. A comparative calorimetric study of the effects of cholesterol and the plant sterols campesterol and brassicasterol on the thermotropic phase behavior of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1838, n. 7, p. 1941-9. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.03.019. Epub 2014 Apr 3., 2014. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704414 >.

BENNETT, R. M.; LEHR, J. R.; MCCARTY, D. J. Factors affecting the solubility of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. **J Clin Invest.,** v. 56, n. 6, p. 1571-9., 1975. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/423 >.

BERRY, J. D.; NEESON, M. J.; DAGASTINE, R. R.; CHAN, D. Y. C.; TABOR, R. F. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 454, p. 226-237, Sep 15 2015. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000356996700026 >.

BHATIA, T.; CORNELIUS, F.; BREWER, J.; BAGATOLLI, L. A.; SIMONSEN, A. C.; IPSEN, J. H.; MOURITSEN, O. G. Spatial distribution and activity of Na(+)/K(+)-ATPase in lipid bilayer membranes with phase boundaries. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1858, n. 6, p. 1390-9. doi: 10.1016/j.bbamem.2016.03.015. Epub 2016 Mar 16., 2016. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26994932 >.

BLANDFORD, N. R.; SAUER, G. R.; GENGE, B. R.; WU, L. N.; WUTHIER, R. E. Modeling of matrix vesicle biomineralization using large unilamellar vesicles. **J Inorg Biochem.,** v. 94, n. 1-2, p. 14-27., 2003. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620669 >.

BLOCH, K. The Sterol Molecule - Biosynthesis, Structure, and Function. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society,** v. 202, p. 12-Hist, Aug 25 1991. ISSN 0065-7727. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1991HG08001953 >.

BLUMENTHAL, N. C. Mechanisms of inhibition of calcification. **Clin Orthop Relat Res.**, n. 247, p. 279-89., 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2676300 >.

BOLEAN, M.; BORIN, I. A.; SIMAO, A. M. S.; BOTTINI, M.; BAGATOLLI, L. A.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Topographic analysis by atomic force microscopy of proteoliposomes matrix vesicle mimetics harboring TNAP and AnxA5. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1859, n. 10, p. 1911-1920. doi: 10.1016/j.bbamem.2017.05.010. Epub 2017 May 23., 2017a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28549727 >.

BOLEAN, M.; SIMAO, A. M.; FAVARIN, B. Z.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes. **Biophys Chem.,** v. 152, n. 1-3, p. 74-9. doi: 10.1016/j.bpc.2010.08.002. Epub 2010 Aug 14., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20810204 >.

_____. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. **Biophys Chem.,** v. 158, n. 2-3, p. 111-8. doi: 10.1016/j.bpc.2011.05.019. Epub 2011 May 27., 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21676530 >.

BOLEAN, M.; SIMAO, A. M.; KIFFER-MOREIRA, T.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; ITRI, R.; CIANCAGLINI, P. Proteoliposomes with the ability to transport Ca(2+) into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface. **Arch Biochem Biophys.,** v. 584, p. 79-89. doi: 10.1016/j.abb.2015.08.018. Epub 2015 Aug 29., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26325078 >.

BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; BARIONI, M. B.; FAVARIN, B. Z.; SEBINELLI, H. G.; VESCHI, E. A.; JANKU, T. A. B.; BOTTINI, M.; HOYLAERTS, M. F.; ITRI, R.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Biophysical aspects of biomineralization. **Biophys Rev.,** v. 9, n. 5, p. 747-760. doi: 10.1007/s12551-017-0315-1. Epub 2017 Aug 29., 2017b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28852989 >.

BOSKEY, A. L.; POSNER, A. S. Extraction of a calcium-phospholipid-phosphate complex from bone. **Calcif Tissue Res.,** v. 19, n. 4, p. 273-83., 1976. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3268 >.

BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z.; SWAIN, L. D.; KHARE, A. Role of lipids in calcification of cartilage. **Anat Rec.,** v. 224, n. 2, p. 211-9. doi: 10.1002/ar.1092240210., 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2672885 >.

BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Curr Opin Struct Biol.,** v. 9, n. 4, p. 438-43., 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10449364 >.

BROWN, D. A.; LONDON, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. **J Biol Chem.,** v. 275, n. 23, p. 17221-4., 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770957 >.

CAMOLEZI, F. L.; DAGHASTANLI, K. R.; MAGALHAES, P. P.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. **Int J Biochem Cell Biol.,** v. 34, n. 9, p. 1091-101., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12009304 >.

CASELI, L.; CRESPILHO, F. N.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O. N., JR. Using phospholipid Langmuir and Langmuir-Blodgett films as matrix for urease immobilization. **J Colloid Interface Sci.,** v. 319, n. 1, p. 100-8. Epub 2007 Dec 14., 2008a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18093610 >.

CASELI, L.; DOS SANTOS, D. S., JR.; FOSCHINI, M.; GONCALVES, D.; OLIVEIRA, O. N., JR. The effect of the layer structure on the activity of immobilized enzymes in ultrathin films. **J Colloid Interface Sci.,** v. 303, n. 1, p. 326-31. Epub 2006 Jul 11., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876814 >.

CASELI, L.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P.; LEONE, F. A.; ZANIQUELLI, M. E. Incorporation conditions guiding the aggregation of a glycosylphosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein in Langmuir monolayers. **Colloids Surf B Biointerfaces.,** v. 46, n. 4, p. 248-54. Epub 2005 Dec 13., 2005a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16356698 >.

CASELI, L.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P.; LEONE, F. A.; ZANIQUELLI, M. E.; ORBULESCU, J.; LEBLANC, R. M. Rat osseous plate alkaline phosphatase as Langmuir monolayer--an infrared study at the air-water interface. **J Colloid Interface Sci.,** v. 320, n. 2, p. 476-82. doi: 10.1016/j.jcis.2008.01.043. Epub 2008 Feb 2., 2008b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18280491 >.

CASELI, L.; OLIVEIRA, R. G.; MASUI, D. C.; FURRIEL, R. P.; LEONE, F. A.; MAGGIO, B.; ZANIQUELLI, M. E. Effect of molecular surface packing on the enzymatic activity modulation of an anchored protein on phospholipid Langmuir monolayers. **Langmuir.,** v. 21, n. 9, p. 4090-5., 2005b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15835979 >.

CASTILLO, N.; MONTICELLI, L.; BARNOUD, J.; TIELEMAN, D. P. Free energy of WALP23 dimer association in DMPC, DPPC, and DOPC bilayers. **Chem Phys Lipids.,** v. 169, p. 95-105. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.02.001. Epub 2013 Feb 13., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415670 >.

CHANG, G. G.; SHIAO, S. L. Possible kinetic mechanism of human placental alkaline phosphatase in vivo as implemented in reverse micelles. **Eur J Biochem.,** v. 220, n. 3, p. 861-70., 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8143740 >.

CIANCAGLINI, P.; SIMAO, A. M.; CAMOLEZI, F. L.; MILLAN, J. L.; PIZAURO, J. M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz J Med Biol Res.,** v. 39, n. 5, p. 603-10. Epub 2006 Apr 20., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16648897 >.

CIANCAGLINI, P.; SIMAO, A. M. S.; BOLEAN, M.; MILLAN, J. L.; RIGOS, C. F.; YONEDA, J. S.; COLHONE, M. C.; STABELI, R. G. Proteoliposomes in nanobiotechnology. **Biophys Rev.,** v. 4, n. 1, p. 67-81. doi: 10.1007/s12551-011-0065-4. Epub 2012 Jan 18., 2012. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28510001 >.

CIANCAGLINI, P.; YADAV, M. C.; SIMAO, A. M.; NARISAWA, S.; PIZAURO, J. M.; FARQUHARSON, C.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Kinetic analysis of substrate utilization by native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-deficient matrix vesicles. **J Bone Miner Res.,** v. 25, n. 4, p. 716-23. doi: 10.1359/jbmr.091023., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874193 >.

COURNIA, Z.; ULLMANN, G. M.; SMITH, J. C. Differential effects of cholesterol, ergosterol and lanosterol on a dipalmitoyl phosphatidylcholine membrane: A molecular dynamics simulation study. **Journal of Physical Chemistry B,** v. 111, n. 7, p. 1786-1801, Feb 22 2007. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000244225100039 >.

CUPPOLETTI, J.; SEGEL, I. H. Kinetics of sulfate transport by Penicillium notatum. Interactions of sulfate, protons, and calcium. **Biochemistry.,** v. 14, n. 21, p. 4712-8., 1975. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/241386 >.

CYBORON, G. W.; WUTHIER, R. E. Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. **J Biol Chem.,** v. 256, n. 14, p. 7262-8., 1981. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7251597 >.

DEMEL, R. A.; DE KRUYFF, B. The function of sterols in membranes. **Biochim Biophys Acta.,** v. 457, n. 2, p. 109-32., 1976. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/184844 >.

DEMETZOS, C. Differential Scanning Calorimetry (DSC): a tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. **J Liposome Res.,** v. 18(3):159-73., n. doi, p. 10.1080/08982100802310261 . 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18770070 >.

DI MAURO, S.; MANES, T.; HESSLE, L.; KOZLENKOV, A.; PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates. **J Bone Miner Res,** v. 17, n. 8, p. 1383-91, Aug 2002. ISSN 0884-0431 (Print)
0884-0431 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12162492 >.

DIETRICH, C.; BAGATOLLI, L. A.; VOLOVYK, Z. N.; THOMPSON, N. L.; LEVI, M.; JACOBSON, K.; GRATTON, E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. **Biophys J.,** v. 80, n. 3, p. 1417-28. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76114-0., 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222302 >.

EANES, E. D. Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate. **Calcif Tissue Res,** v. 5, n. 2, p. 133-45, 1970. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5423622 >.

FAVARIN, B. Z.; ANDRADE, M. A. R.; BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; RAMOS, A. P.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Effect of the presence of cholesterol in the interfacial microenvironment on the modulation of the alkaline phosphatase activity during in vitro mineralization. **Colloids Surf B Biointerfaces.,** v. 155, p. 466-476. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.04.051. Epub 2017 Apr 26., 2017. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472750 >.

FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J Cell Sci.,** v. 112, n. Pt 17, p. 2799-809., 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444375 >.

FISHMAN, W.; SIE, H. G. L-homoarginine; an inhibitor of serum "bone and liver" alkaline phosphatase. **Clin Chim Acta.,** v. 29, n. 2, p. 339-41., 1970. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5493191 >.

FOSTER, L. J.; DE HOOG, C. L.; MANN, M. Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v. 100, n. 10, p. 5813-5818, May 13 2003. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000182939400046 >.

FREEMONT, A. J. Basic bone cell biology. **Int J Exp Pathol.,** v. 74, n. 4, p. 411-6., 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8398815 >.

FRITZSCHING, K. J.; KIM, J.; HOLLAND, G. P. Probing lipid-cholesterol interactions in DOPC/eSM/Chol and DOPC/DPPC/Chol model lipid rafts with DSC and (13)C solid-state NMR. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1828, n. 8, p. 1889-98. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.03.028. Epub 2013 Apr 6., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23567917 >.

GARCIA, A. F.; SIMAO, A. M.; BOLEAN, M.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P.; COSTA-FILHO, A. J. Effects of GPI-anchored TNAP on the dynamic structure of model membranes. **Phys Chem Chem Phys.,** v. 17, n. 39, p. 26295-301. doi: 10.1039/c5cp02377g., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389140 >.

GENGE, B. R.; WU, L. N.; WUTHIER, R. E. In vitro modeling of matrix vesicle nucleation: synergistic stimulation of mineral formation by annexin A5 and phosphatidylserine. **J Biol Chem.,** v. 282, n. 36, p. 26035-45. Epub 2007 Jul 5., 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613532 >.

GOLUB, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1790, n. 12, p. 1592-8. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.09.006. Epub 2009 Sep 26., 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786074 >.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.,** v. 48, n. 2, p. 422-7., 1972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4115981 >.

HESSLE, L.; JOHNSON, K. A.; ANDERSON, H. C.; NARISAWA, S.; SALI, A.; GODING, J. W.; TERKELTAUB, R.; MILLAN, J. L. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 99, n. 14, p. 9445-9. doi: 10.1073/pnas.142063399. Epub 2002 Jun 24., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12082181 >.

HINZ, H. J.; STURTEVANT, J. M. Calorimetric studies of dilute aqueous suspensions of bilayers formed from synthetic L- -lecithins. **J Biol Chem.,** v. 247, n. 19, p. 6071-5., 1972. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4651644 >.

HOUSTON, B.; STEWART, A. J.; FARQUHARSON, C. PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage. **Bone.,** v. 34, n. 4, p. 629-37. doi: 10.1016/j.bone.2003.12.023., 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15050893 >.

HOYLAERTS, M. F.; DING, L.; NARISAWA, S.; VAN KERCKHOVEN, S.; MILLAN, J. L. Mammalian alkaline phosphatase catalysis requires active site structure stabilization via the N-terminal amino acid microenvironment. **Biochemistry.,** v. 45, n. 32, p. 9756-66. doi: 10.1021/bi052471+. 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16893177 >.

HOYLAERTS, M. F.; MANES, T.; MILLAN, J. L. Mammalian alkaline phosphatases are allosteric enzymes. **J Biol Chem.,** v. 272, n. 36, p. 22781-7., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278439 >.

HOYLAERTS, M. F.; VAN KERCKHOVEN, S.; KIFFER-MOREIRA, T.; SHEEN, C.; NARISAWA, S.; MILLAN, J. L. Functional significance of calcium binding to tissue-nonspecific alkaline phosphatase. **PLoS One.,** v. 10, n. 3, p. e0119874. doi: 10.1371/journal.pone.0119874. eCollection 2015., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775211 >.

HSU, H. H.; ANDERSON, H. C. The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. **Int J Biochem,** v. 18, n. 12, p. 1141-6, 1986. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028885 >.

_____. A role for ATPase in the mechanisms of ATP-dependent Ca and phosphate deposition by isolated rachitic matrix vesicles. **Int J Biochem Cell Biol.,** v. 27, n. 12, p. 1349-56., 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8581830 >.

HSUEH, Y. W.; GILBERT, K.; TRANDUM, C.; ZUCKERMANN, M.; THEWALT, J. The effect of ergosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: A deuterium NMR and calorimetric study. **Biophysical Journal,** v. 88, n. 3, p. 1799-1808, Mar 2005. ISSN 0006-3495. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000227494600029 >.

KIFFER-MOREIRA, T.; SHEEN, C. R.; GASQUE, K. C.; BOLEAN, M.; CIANCAGLINI, P.; VAN ELSAS, A.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. **PLoS One.,** v. 9, n. 2, p. e89374. doi: 10.1371/journal.pone.0089374. eCollection 2014., 2014. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24586729 >.

KIFFER-MOREIRA, T.; YADAV, M. C.; ZHU, D.; NARISAWA, S.; SHEEN, C.; STEC, B.; COSFORD, N. D.; DAHL, R.; FARQUHARSON, C.; HOYLAERTS, M. F.; MACRAE, V. E.; MILLAN, J. L. Pharmacological inhibition of PHOSPHO1 suppresses vascular smooth muscle cell calcification. **J Bone Miner Res.,** v. 28, n. 1, p. 81-91. doi: 10.1002/jbmr.1733., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22887744 >.

KING, M. D.; MARSH, D. Free volume model for lipid lateral diffusion coefficients. Assessment of the temperature dependence in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. **Biochim Biophys Acta.,** v. 862, n. 1, p. 231-4., 1986. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3768368 >.

KIRSCH, T.; WUTHIER, R. E. Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. **J Biol Chem.,** v. 269, n. 15, p. 11462-9., 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157677 >.

KORADE, Z.; KENWORTHY, A. K. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. **Neuropharmacology.,** v. 55, n. 8, p. 1265-73. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.02.019. Epub 2008 Mar 14., 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18402986 >.

KOUZAYHA, A.; BESSON, F. GPI-alkaline phosphatase insertion into phosphatidylcholine monolayers: phase behavior and morphology changes. **Biochem Biophys Res Commun.,** v. 333, n. 4, p. 1315-21., 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979580 >.

KRUSE, K.; HANEFELD, F.; KOHLSCHUTTER, A.; ROSSKAMP, R.; GROSS-SELBECK, G. Hyperphosphatasia with mental retardation. **J Pediatr.,** v. 112, n. 3, p. 436-9., 1988. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3346785 >.

LADBROOKE, B. D.; JENKINSON, T. J.; KAMAT, V. B.; CHAPMAN, D. Physical studies of myelin. I. Thermal analysis. **Biochim Biophys Acta.,** v. 164, n. 1, p. 101-9., 1968. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5680287 >.

LE DU, M. H.; MILLAN, J. L. Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. **J Biol Chem.,** v. 277, n. 51, p. 49808-14. doi: 10.1074/jbc.M207394200. Epub 2002 Oct 7., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372831 >.

LE DU, M. H.; STIGBRAND, T.; TAUSSIG, M. J.; MENEZ, A.; STURA, E. A. Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8 A resolution. Implication for a substrate specificity. **J Biol Chem.,** v. 276, n. 12, p. 9158-65. doi: 10.1074/jbc.M009250200. Epub 2000 Dec 20., 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11124260 >.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P.; BORIN, I. A. SigrafW: An easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochem Mol Biol Educ.,** v. 33, n. 6, p. 399-403. doi: 10.1002/bmb.2005.49403306399., 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21638609 >.

LEONE, F. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. **J Inorg Biochem.,** v. 68, n. 2, p. 123-7., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336971 >.

LI, X. M.; MOMSEN, M. M.; SMABY, J. M.; BROCKMAN, H. L.; BROWN, R. E. Cholesterol decreases the interfacial elasticity and detergent solubility of sphingomyelins. **Biochemistry.,** v. 40, n. 20, p. 5954-63., 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11352730 >.

LIA-BALDINI, A. S.; BRUN-HEATH, I.; CARRION, C.; SIMON-BOUY, B.; SERRE, J. L.; NUNES, M. E.; MORNET, E. A new mechanism of dominance in hypophosphatasia: the mutated protein can disturb the cell localization of the wild-type protein. **Hum Genet,** v. 123, n. 4, p. 429-32, May 2008. ISSN 1432-1203 (Electronic) 0340-6717 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18340466 >.

LICHTENBERG, D.; GONI, F. M.; HEERKLOTZ, H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. **Trends Biochem Sci.,** v. 30, n. 8, p. 430-6. doi: 10.1016/j.tibs.2005.06.004., 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15996869 >.

LINGWOOD, C. A.; MANIS, A.; MAHFOUD, R.; KHAN, F.; BINNINGTON, B.; MYLVAGANAM, M. New aspects of the regulation of glycosphingolipid receptor function. **Chem Phys Lipids.,** v. 163, n. 1, p. 27-35. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.09.001., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781539 >.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science.,** v. 327, n. 5961, p. 46-50. doi: 10.1126/science.1174621., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044567 >.

LISCUM, L.; MUNN, N. J. Intracellular cholesterol transport. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1438, n. 1, p. 19-37., 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216277 >.

LOW, M. G. Glycosyl-phosphatidylinositol: a versatile anchor for cell surface proteins. **Faseb J.,** v. 3, n. 5, p. 1600-8., 1989. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2522071 >.

MABRY, C. C.; BAUTISTA, A.; KIRK, R. F.; DUBILIER, L. D.; BRAUNSTEIN, H.; KOEPKE, J. A. Familial hyperphosphatase with mental retardation, seizures, and neurologic deficits. **J Pediatr.,** v. 77, n. 1, p. 74-85., 1970. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5465362 >.

MANNOCK, D. A.; LEWIS, R. N.; MCELHANEY, R. N. 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.,** v. 91, n. 9, p. 3327-40. Epub 2006 Aug 11., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16905603 >.

MARGUET, D.; LENNE, P. F.; RIGNEAULT, H.; HE, H. T. Dynamics in the plasma membrane: how to combine fluidity and order. **Embo J.,** v. 25, n. 15, p. 3446-57. doi: 10.1038/sj.emboj.7601204. Epub 2006 Jun 22., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16900097 >.

MARSH, D. Liquid-ordered phases induced by cholesterol: a compendium of binary phase diagrams. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1798, n. 3, p. 688-99. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.12.027. Epub 2010 Jan 7., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20060378 >.

MCCOMB, R. B.; BOWERS, G. N., JR. Alkaline phosphatase and the International Clinical Enzyme Scale. **Am J Clin Pathol.,** v. 84, n. 1, p. 67-73., 1985. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4014076 >.

MCMULLEN, T. P. W.; MCELHANEY, R. N. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science,** v. 1, n. 1, p. 83-90, Feb 1996. ISSN 1359-0294. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996VE48000014 >.

MCMULLEN, T. P. W.; WONG, B. C. M.; THAM, E. L.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Differential scanning calorimetric study of the interaction of cholesterol with the major lipids of the Acholeplasma laidlawii B membrane. **Biochemistry,** v. 35, n. 51, p. 16789-16798, Dec 24 1996. ISSN 0006-2960. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1996WA60200047 >.

MERRILL, A. H., JR.; SCHMELZ, E. M.; DILLEHAY, D. L.; SPIEGEL, S.; SHAYMAN, J. A.; SCHROEDER, J. J.; RILEY, R. T.; VOSS, K. A.; WANG, E. Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. **Toxicol Appl Pharmacol.,** v. 142, n. 1, p. 208-25. doi: 10.1006/taap.1996.8029., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9007051 >.

MEYER, J. L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? **Arch Biochem Biophys.,** v. 231, n. 1, p. 1-8., 1984. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6326671 >.

MILHIET, P. E.; GIOCONDI, M. C.; LE GRIMELLEC, C. Cholesterol is not crucial for the existence of microdomains in kidney brush-border membrane models. **J Biol Chem.,** v. 277, n. 2, p. 875-8. Epub 2001 Nov 20., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717303 >.

MILLAN, J. L. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signal.,** v. 2, n. 2, p. 335-41. doi: 10.1007/s11302-005-5435-6. Epub 2006 Jun 17., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404473 >.

_____. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcif Tissue Int.,** v. 93, n. 4, p. 299-306. doi: 10.1007/s00223-012-9672-8. Epub 2012 Nov 27., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23183786 >.

MILLAN, J. L.; WHYTE, M. P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. **Calcif Tissue Int,** v. 21, p. 21, 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590809 >.

MILLS, T. T.; TRISTRAM-NAGLE, S.; HEBERLE, F. A.; MORALES, N. F.; ZHAO, J.; WU, J.; TOOMBES, G. E.; NAGLE, J. F.; FEIGENSON, G. W. Liquid-liquid domains in bilayers detected by wide angle X-ray scattering. **Biophys J.,** v. 95, n. 2, p. 682-90. doi: 10.1529/biophysj.107.127910. Epub 2008 Apr 4., 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390623 >.

MOORE, C. A.; CURRY, C. J.; HENTHORN, P. S.; SMITH, J. A.; SMITH, J. C.; O'LAGUE, P.; COBURN, S. P.; WEAVER, D. D.; WHYTE, M. P. Mild autosomal dominant hypophosphatasia: in utero presentation in two families. **Am J Med Genet,** v. 86, n. 5, p. 410-5, Oct 29 1999. ISSN 0148-7299 (Print) 0148-7299 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508980 >.

MORANDAT, S.; BORTOLATO, M.; ROUX, B. Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1564, n. 2, p. 473-78., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175931 >.

MORINI, M. A.; SIERRA, M. B.; PEDRONI, V. I.; ALARCON, L. M.; APPIGNANESI, G. A.; DISALVO, E. A. Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles. **Colloids Surf B Biointerfaces.,** v. 131, p. 54-8. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.054. Epub 2015 Apr 17., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25950496 >.

MORNET, E. Hypophosphatasia. **Best Pract Res Clin Rheumatol,** v. 22, n. 1, p. 113-27, Mar 2008. ISSN 1521-6942 (Print) 1521-6942 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18328985 >.

MOURITSEN, O. G.; BAGATOLLI, L. A. Lipid domains in model membranes: a brief historical perspective. **Essays Biochem.,** v. 57:1-19., n. doi, p. 10.1042/bse0570001., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658340 >.

NARISAWA, S.; FROHLANDER, N.; MILLAN, J. L. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. **Dev Dyn.,** v. 208, n. 3, p. 432-46. doi: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<432::AID-AJA13>3.0.CO;2-1., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056646 >.

NEEDHAM, D.; NUNN, R. S. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. **Biophys J.,** v. 58, n. 4, p. 997-1009. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82444-9., 1990. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2249000 >.

NES, W. R.; SEKULA, B. C.; NES, W. D.; ADLER, J. H. Functional Importance of Structural Features of Ergosterol in Yeast. **Journal of Biological Chemistry,** v. 253, n. 17, p. 6218-6225, 1978. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1978FP93300058 >.

NOSJEAN, O.; ROUX, B. Ectoplasmic insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid- and cholesterol-containing phosphatidylcholine vesicles. **Eur J Biochem.,** v. 263, n. 3, p. 865-70., 1999. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10469152 >.

PINKERTON, A. B.; SERGIENKO, E.; BRAVO, Y.; DAHL, R.; MA, C. T.; SUN, Q.; JACKSON, M. R.; COSFORD, N. D. P.; MILLAN, J. L. Discovery of 5-((5-chloro-2-methoxyphenyl)sulfonamido)nicotinamide (SBI-425), a potent and orally bioavailable tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) inhibitor. **Bioorg Med Chem Lett.,** v.

28, n. 1, p. 31-34. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.11.024. Epub 2017 Nov 11., 2018. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29174347 >.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Phosphotransferase activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase: a possible role in biomineralization. **Int J Biochem.,** v. 24, n. 9, p. 1391-6., 1992. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330762 >.

_____. Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1202, n. 1, p. 22-8., 1993. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396976 >.

_____. Osseous plate alkaline phosphatase is anchored by GPI. **Braz J Med Biol Res.,** v. 27, n. 2, p. 453-6., 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8081265 >.

_____. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Mol Cell Biochem.,** v. 152, n. 2, p. 121-9., 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8751158 >.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Comp Biochem Physiol B,** v. 87, n. 4, p. 921-6, 1987. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3665437 >.

RAHIM, D. A.; ALI, S. M.; RABBANI, M. G.; RAHMAN, M. A. Analysis of psychiatric morbidity of outpatient children in Mitford Hospital, Dhaka. **Bangladesh Med Res Counc Bull.,** v. 23, n. 2, p. 60-2., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465438 >.

RAMSTEDT, B.; SLOTTE, J. P. Membrane properties of sphingomyelins. **FEBS Lett.,** v. 531, n. 1, p. 33-7., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12401199 >.

REZENDE, L. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; LEONE, F. A. Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** v. 44, n. 2, p. 293-302., 1998. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593580 >.

ROBERTS, M. F.; REDFIELD, A. G. Phospholipid bilayer surface configuration probed quantitatively by (31)P field-cycling NMR. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 101, n. 49, p. 17066-71. doi: 10.1073/pnas.0407565101. Epub 2004 Nov 29., 2004. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15569928 >.

RONZON, F.; DESBAT, B.; CHAUVET, J. P.; ROUX, B. Behavior of a GPI-anchored protein in phospholipid monolayers at the air-water interface. **Biochim Biophys Acta.,** v. 1560, n. 1-2, p. 1-13., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11958771 >.

ROTENBERG, Y.; BORUVKA, L.; NEUMANN, A. W. Determination of Surface-Tension and Contact-Angle from the Shapes of Axisymmetric Fluid Interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science,** v. 93, n. 1, p. 169-183, 1983. ISSN 0021-9797. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1983QM29700020 >.

SAKAMOTO, S.; NAKAHARA, H.; SHIBATA, O. Miscibility behavior of sphingomyelin with phytosterol derivatives by a Langmuir monolayer approach. **J Oleo Sci,** v. 62, n. 10, p. 809-24, 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24088519 >.

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. **Biophys J.,** v. 71, n. 3, p. 1641-50., 1996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8874039 >.

SEELIG, A. Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. **Biochim Biophys Acta.,** v. 899, n. 2, p. 196-204., 1987. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3580365 >.

SESANA, S.; RE, F.; BULBARELLI, A.; SALERNO, D.; CAZZANIGA, E.; MASSERINI, M. Membrane features and activity of GPI-anchored enzymes: alkaline phosphatase reconstituted in model membranes. **Biochemistry.,** v. 47, n. 19, p. 5433-40. doi: 10.1021/bi800005s. Epub 2008 Apr 17., 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18416535 >.

SEZGIN, E.; LEVENTAL, I.; MAYOR, S.; EGGELING, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. **Nat Rev Mol Cell Biol.,** v. 18, n. 6, p. 361-374. doi: 10.1038/nrm.2017.16. Epub 2017 Mar 30., 2017. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28356571 >.

SIMAO, A. M.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.,** v. 146, n. 4, p. 679-87. Epub 2006 May 20., 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16798036 >.

SIMAO, A. M.; BOLEAN, M.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Effects of pH on the production of phosphate and pyrophosphate by matrix vesicles' biomimetics. **Calcif Tissue Int.,** v. 93, n. 3, p. 222-32. doi: 10.1007/s00223-013-9745-3. Epub 2013 May 31., 2013. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23942722 >.

SIMAO, A. M.; YADAV, M. C.; CIANCAGLINI, P.; MILLAN, J. L. Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. **Braz J Med Biol Res.,** v. 43, n. 3, p. 234-41., 2010a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20401430 >.

SIMAO, A. M.; YADAV, M. C.; NARISAWA, S.; BOLEAN, M.; PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CIANCAGLINI, P.; MILLAN, J. L. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicle biomimetics. **J Biol Chem.,** v. 285, n. 10, p. 7598-609. doi: 10.1074/jbc.M109.079830. Epub 2010 Jan 4., 2010b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20048161 >.

SIMAO, A. M. S.; BOLEAN, M.; CURY, T. A. C.; STABELI, R. G.; ITRI, R.; CIANCAGLINI, P. Liposomal systems as carriers for bioactive compounds. **Biophys Rev.,** v. 7, n. 4, p. 391-397. doi: 10.1007/s12551-015-0180-8. Epub 2015 Oct 10., 2015. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28510100 >.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature.,** v. 387, n. 6633, p. 569-72., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177342 >.

SMONDYREV, A. M.; BERKOWITZ, M. L. Effects of oxygenated sterol on phospholipid bilayer properties: a molecular dynamics simulation. **Chem Phys Lipids.,** v. 112, n. 1, p. 31-9., 2001a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518570 >.

_____. Molecular dynamics simulation of the structure of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers with cholesterol, ergosterol, and lanosterol. **Biophys J.,** v. 80, n. 4, p. 1649-58. doi: 10.1016/S0006-3495(01)76137-1., 2001b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259280 >.

SNYDER, B.; FREIRE, E. Compositional domain structure in phosphatidylcholine--cholesterol and sphingomyelin--cholesterol bilayers. **Proc Natl Acad Sci U S A.,** v. 77, n. 7, p. 4055-9., 1980. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6933455 >.

STIGBRAND, T. Human alkaline phosphatases. Introduction and nomenclature. **Prog Clin Biol Res,** v. 166, p. xix-xxiii, 1984. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6504922 >.

STOTTRUP, B. L.; KELLER, S. L. Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs. **Biophys J.,** v. 90, n. 9, p. 3176-83. doi: 10.1529/biophysj.105.072959. Epub 2006 Feb 3., 2006. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461392 >.

THOMPSON, R. Maltreatment and mental health care: focusing on child neglect. **Psychiatr Serv.,** v. 61, n. 1, p. 96. doi: 10.1176/ps.2010.61.1.96., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20044430 >.

THOUVEREY, C.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; BALCERZAK, M.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. **J Cell Biochem.,** v. 106, n. 1, p. 127-38. doi: 10.1002/jcb.21992., 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19009559 >.

VALHMU, W. B.; WU, L. N.; WUTHIER, R. E. Effects of Ca/Pi ratio, Ca2+ x Pi ion product, and pH of incubation fluid on accumulation of 45Ca2+ by matrix vesicles in vitro. **Bone Miner.,** v. 8, n. 3, p. 195-209., 1990. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2157511 >.

VAN BELLE, H. Alkaline phosphatase. I. Kinetics and inhibition by levamisole of purified isoenzymes from humans. **Clin Chem.,** v. 22, n. 7, p. 972-6., 1976. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169 >.

VIST, M. R.; DAVIS, J. H. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. **Biochemistry.,** v. 29, n. 2, p. 451-64., 1990. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2302384 >.

WAYMIRE, K. G.; MAHUREN, J. D.; JAJE, J. M.; GUILARTE, T. R.; COBURN, S. P.; MACGREGOR, G. R. Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. **Nat Genet.,** v. 11, n. 1, p. 45-51. doi: 10.1038/ng0995-45., 1995. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7550313 >.

WEGE, H. A.; HOLGADO-TERRIZA, J. A.; NEUMANN, A. W.; CABRERIZO-VILCHEZ, M. A. Axisymmetric drop shape analysis as penetration film balance applied at liquid-liquid interfaces. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** v. 156, n. 1-3, p. 509-517, Oct 15 1999. ISSN 0927-7757. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000082624200045 >.

WHYTE, M. P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. **Endocr Rev.,** v. 15, n. 4, p. 439-61. doi: 10.1210/edrv-15-4-439., 1994. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7988481 >.

WHYTE, M. P.; GREENBERG, C. R.; SALMAN, N. J.; BOBER, M. B.; MCALISTER, W. H.; WENKERT, D.; VAN SICKLE, B. J.; SIMMONS, J. H.; EDGAR, T. S.; BAUER, M. L.; HAMDAN, M. A.; BISHOP, N.; LUTZ, R. E.; MCGINN, M.; CRAIG, S.; MOORE, J. N.; TAYLOR, J. W.; CLEVELAND, R. H.; CRANLEY, W. R.; LIM, R.; THACHER, T. D.; MAYHEW, J. E.; DOWNS, M.; MILLAN, J. L.; SKRINAR, A. M.; CRINE, P.; LANDY, H. Enzyme-replacement therapy in life-threatening hypophosphatasia. **N Engl J Med,** v. 366, n. 10, p. 904-13, Mar 8 2012. ISSN 1533-4406 (Electronic)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397652 >.

WILKE, N.; VEGA MERCADO, F.; MAGGIO, B. Rheological properties of a two phase lipid monolayer at the air/water interface: effect of the composition of the mixture. **Langmuir.,** v. 26, n. 13, p. 11050-9. doi: 10.1021/la100552j., 2010. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20380451 >.

WU, L. N.; GENGE, B. R.; DUNKELBERGER, D. G.; LEGEROS, R. Z.; CONCANNON, B.; WUTHIER, R. E. Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles. **J Biol Chem.,** v. 272, n. 7, p. 4404-11., 1997. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020163 >.

WU, L. N.; GENGE, B. R.; KANG, M. W.; ARSENAULT, A. L.; WUTHIER, R. E. Changes in phospholipid extractability and composition accompany mineralization of chicken growth plate cartilage matrix vesicles. **J Biol Chem.,** v. 277, n. 7, p. 5126-33. Epub 2001 Nov 19., 2002. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714705 >.

WU, L. N.; GENGE, B. R.; SAUER, G. R.; WUTHIER, R. E. Characterization and reconstitution of the nucleational complex responsible for mineral formation by growth plate cartilage matrix vesicles. **Connect Tissue Res,** v. 35, n. 1-4, p. 309-15, 1996. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084669 >.

WU, L. N.; GENGE, B. R.; WUTHIER, R. E. Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization. **J Biol Chem.,** v. 283, n. 7, p. 3827-38. Epub 2007 Dec 11., 2008. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077457 >.

WUTHIER, R. E. Lipids of mineralizing epiphyseal tissues in the bovine fetus. **J Lipid Res.,** v. 9, n. 1, p. 68-78., 1968. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5637432 >.

WUTHIER, R. E.; CHIN, J. E.; HALE, J. E.; REGISTER, T. C.; HALE, L. V.; ISHIKAWA, Y. Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. **J Biol Chem.,** v. 260, n. 29, p. 15972-9., 1985a. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905800 >.

WUTHIER, R. E.; GORE, S. T. Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane and matrix vesicle fractions: evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes. **Calcif Tissue Res.,** v. 24, n. 2, p. 163-71., 1977. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/597754 >.

WUTHIER, R. E.; LIPSCOMB, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Front Biosci (Landmark Ed).** v. 16, p. 2812-902., 2011. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622210 >.

WUTHIER, R. E.; RICE, G. S.; WALLACE, J. E., JR.; WEAVER, R. L.; LEGEROS, R. Z.; EANES, E. D. In vitro precipitation of calcium phosphate under intracellular conditions: formation of brushite from an amorphous precursor in the absence of ATP. **Calcif Tissue Int.,** v. 37, n. 4, p. 401-10., 1985b. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3930038 >.

YEAGLE, P. **The membranes of cells**. Third edition. 2016. xii, 439 pages ISBN 9780128000472 (hbk).

ZHANG, L.; BALCERZAK, M.; RADISSON, J.; THOUVEREY, C.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; BUCHET, R. Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca(2+) and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. **J Biol Chem.,** v. 280, n. 44, p. 37289-96. Epub 2005 Sep 7., 2005. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16147995 >.

Biophysical Chemistry 152 (2010) 74–79

Contents lists available at ScienceDirect

Biophysical Chemistry

journal homepage: http://www.elsevier.com/locate/biophyschem

The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes

M. Bolean [a], A.M.S Simão [a], B.Z. Favarin [a], J.L. Millán [b], P. Ciancaglini [a,*]

[a] Depto. Química, FFCLRP-USP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil
[b] Sanford Children's Health Research Center, Sanford–Burnham Medical Research Institute, La Jolla, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 May 2010
Received in revised form 28 July 2010
Accepted 6 August 2010
Available online 14 August 2010

Keywords:
Matrix vesicles
GPI-anchored
Alkaline phosphatase
Cholesterol
Biomimetic system
Differential scanning calorimetry

ABSTRACT

Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), present on the surface of chondrocyte- and osteoblast-derived matrix vesicles (MVs), plays key enzymatic functions during endochondral ossification. Many studies have shown that MVs are enriched in TNAP and also in cholesterol compared to the plasma membrane. Here we have studied the influence of cholesterol on the reconstitution of TNAP into dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)-liposomes, monitoring the changes in lipid critical transition temperature (T_c) and enthalpy variation (ΔH) using differential scanning calorimetry (DSC). DPPC-liposomes revealed a T_c of 41.5 °C and ΔH of 7.63 Kcal mol^{-1}. The gradual increase in cholesterol concentration decrease ΔH values, reaching a ΔH of 0.87 Kcal mol^{-1} for DPPC:cholesterol system with 36 mol% of cholesterol. An increase in T_c, up to 47 °C for the DPPC:cholesterol liposomes (36 mol% of Chol), resulted from the increase in the area per molecule in the gel phase. TNAP (0.02 mg/mL) reconstitution was done with protein:lipid 1:10,000 (molar ratio), resulting in 85% of the added enzyme being incorporated. The presence of cholesterol reduced the incorporation of TNAP to 42% of the added enzyme when a lipid composition of 36 mol% of Chol was used. Furthermore, the presence of TNAP in proteoliposomes resulted in a reduction in ΔH. The gradual proportional increase of cholesterol in liposomes results in broadening of the phase transition peak and eventually eliminates the cooperative gel-to-liquid-crystalline phase transition of phospholipids bilayers. Thus, the formation of microdomains may facilitate the clustering of enzymes and transporters known to be functional in MVs during endochondral ossification.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Skeletal mineralization is a tightly regulated process in which specialized tissues, cells and organelles participate in the coordination and regulation of the metabolic events involved in the deposition of hydroxyapatite via the production of inducers and inhibitors of mineralization [1–3].

Chondrocytes and osteoblasts control the composition of the extracellular matrix and also release matrix vesicles (MVs), considered by some investigators to serve as the initial sites of hydroxyapatite (HA) mineral formation [4–7]. MVs are small (20–200 nm) spherical bodies observed in the pre-mineralized matrix of dentin, cartilage and bone. They appear to be bound by a lipid bilayer and are often found associated with small crystals of calcium phosphate mineral [4–6,8].

MVs are enriched in membrane microdomains containing high levels of cholesterol [9], glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored enzymes, e.g., tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) [10–14], metalloproteinases [15], caveolin-1 [16], and contain a number of other enzymes and ion transporters functional during mineralization, including adenosine-5′-triphosphatase (ATPase), adenosine-5′-monophosphatase (AMPase), inorganic pyrophosphatase (PPiase), nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase (NPP1), [17–23], Pi-transporters [9,24], and Anexins [25]. TNAP is localized on the external surface of MVs in direct contact with extracellular cartilage fluid, where it can act on its natural substrates, ATP and PPi, present at nanomolar/micromolar concentrations [10–12,26–28]. The GPI structure is a phosphatidylinositol-glycolipid anchor that is covalently attached to the carboxyl terminus (C-terminus) of TNAP through an amide linkage. This anchor structure results in lateral mobility in the membrane and allows the release of the enzyme from the membrane through the action of phospholipases [10–13,23,28–34].

The organization of biological membranes into microdomains is believed to play a key role in several cellular processes such as protein targeting and signal transduction. The existence of these microdomains, is explained mainly by the lateral phase separation of membrane lipids in a fluid liquid-crystalline phase (L_α) and a liquid ordered phase (Lo) rich in cholesterol and sphingolipids [35,36]. When cholesterol was mixed with lipids containing saturated acyl chains having high T_c such as dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and sphingomyelin (SM) in model membranes, the formation of a phase state similar to gel state, tightly packed and ordered, was observed but the lateral motion was almost as rapid as in the disordered liquid (Lα) state. This cholesterol-containing state was eventually named liquid ordered (Lo) state [37].

Sterols are essential components in the membranes of eukaryotic cells. In mammalian cell membranes, cholesterol is the main sterol. It often constitutes around one third of the total lipid mass of the plasma membrane [38]. Detergent-resistant plasma membranes (DRMs)

* Corresponding author. Depto Química, FFCLRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fax: +55 16 36024838.
E-mail address: pietro@ffclrp.usp.br (P. Ciancaglini).

0301-4622/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bpc.2010.08.002

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 155 (2017) 466–476

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Protocols

Effect of the presence of cholesterol in the interfacial microenvironment on the modulation of the alkaline phosphatase activity during *in vitro* mineralization

B.Z. Favarin[a], M.A.R. Andrade[a], M. Bolean[a], A.M.S. Simão[a], A.P. Ramos[a], M.F. Hoylaerts[b], J.L. Millán[c], P. Ciancaglini[a,*]

[a] Depto. Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[b] Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium
[c] Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 January 2017
Received in revised form 20 April 2017
Accepted 25 April 2017
Available online 26 April 2017

Keywords:
Lipid interface
Biomineralization
Alkaline phosphatase
Monolayer
Proteoliposome
Sterol
Cholesterol

ABSTRACT

Mineralization of the skeleton starts within cell-derived matrix vesicles (MVs); then, minerals propagate to the extracellular collagenous matrix. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) degrades inorganic pyrophosphate (PP_i), a potent inhibitor of mineralization, and contributes P_i (Phosphate) from ATP to initiate mineralization. Compared to the plasma membrane, MVs are rich in Cholesterol (Chol) (~32%) and TNAP, but how Chol influences TNAP activity remains unclear. We have reconstituted TNAP in liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) or dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) combined with Chol or its derivatives Cholestenone (Achol) and Ergosterol (Ergo). DPPC plus 36% sterols in liposome increased the catalytic activity of TNAP toward ATP. The presence of Chol also increased the propagation of minerals by 3.4-fold. The catalytic efficiency of TNAP toward ATP was fourfold lower in DOPC proteoliposomes as compared to DPPC proteoliposomes. DOPC proteoliposomes also increased biomineralization by 2.8-fold as compared to DPPC proteoliposomes. TNAP catalyzed the hydrolysis of ATP more efficiently in the case of the proteoliposome consisting of DOPC with 36% Chol. The same behavior emerged with Achol and Ergo. The organization of the lipid and the structure of the sterol influenced the surface tension (γ), the TNAP phosphohydrolytic activity in the monolayer, and the TNAP catalytic efficiency in the bilayers. Membranes in the Lα phase (Achol) provided better kinetic parameters as compared to membranes in the Lo phase (Chol and Ergo). In conclusion, the physical properties and the lateral organization of lipids in proteoliposomes are crucial to control mineral propagation mediated by TNAP activity during mineralization.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In vertebrates, biomineralization consists in the orderly deposition of minerals composed of phosphate and calcium ions, to form a calcium phosphate salt that resembles hydroxyapatite (HA) ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Chondrocytes and osteoblasts initiate this process by releasing matrix vesicles (MVs) [1,2], which possess various hydrolytic enzymes including tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). TNAP displays phosphomonohydrolytic activity, which generates inorganic phosphate (P_i) from inorganic pyrophosphate (PP_i) and adenosine-5-triphosphate (ATP) and has a crucial role in calcification. TNAP is attached to the cell and MV membranes *via* a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI-anchored), which provides the enzyme with lateral mobility relative to the membrane [3]. This mobility allows TNAP to accumulate in specific lipid microenvironments associated with ordered microdomains that are rich in sphingolipids, glycosphingolipids, and cholesterol (Chol) [4–8].

Ciancaglini et al. [9] have demonstrated that the catalytic properties of TNAP vary depending on the microenvironment around the enzyme. Distinct forms of the enzyme (associated with membranes, solubilized with detergent, or treated with phosphatidylinositol-specific phospholipase C) display different specificities for biological substrates, indicating that the GPI-anchor and the components of the membrane greatly affect enzyme kinetics.

* Corresponding author at: Depto Química, FFCLRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
E-mail addresses: pietro@ffclrp.usp.br, pietro.ciancaglini@gmail.com (P. Ciancaglini).

http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.051
0927-7765/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

HHS Public Access

Author manuscript

Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. Author manuscript; available in PMC 2017 February 08.

Published in final edited form as:

Colloids Surf A Physicochem Eng Asp. 2016 September 5; 504: 305–311. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.05.085.

Pendant-drop method coupled to ultraviolet-visible spectroscopy: A useful tool to investigate interfacial phenomena

Marco A.R. Andrade[a], **Bruno Favarin**[a], **Rafael Derradi**[a], **Mayte Bolean**[a], **Ana Maria S. Simão**[a], **José Luis Millán**[b], **Pietro Ciancaglini**[a], and **Ana P. Ramos**[a]

[a]Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

[b]Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA 92037, USA

Abstract

UV–vis spectroscopy is a powerful tool to investigate surface phenomena. Surface tension measurements coupled to spectroscopic techniques can help to elucidate how the interface organization influences the electronic properties of molecules. However, appreciable sample volumes are usually necessary to achieve strong signals during conduction of experiments. This study reports on the simultaneous acquisition of surface tension data and UV–vis spectra by axisymmetric drop shape analysis (ADSA) coupled to diffuse reflectance (DRUV) spectrophotometry using a pendant microliter-drop that requires small sample volumes and low analyte concentrations. Three example systems gave evidence of the applicability of this technique: (a) disaggregation of an organic dye driven by surfactant as a function of the surface tension and alterations in the UV–vis spectra, (b) activity of a glycosylphosphatidylinositol anchored enzyme estimated from formation of a colored product, and (c) interaction between this enzyme and biomimetic membrane systems consisting of dipalmitoylphosphaditylcholine and cholestenone. Apart from using smaller sample volume, this coupled technique allowed to investigate interfacial organization in the light of electronic spectra obtained *in loco* within a shorter acquisition time. This procedure provided precise interfacial information about static and dynamic systems. This has been the first study describing the kinetic activity of an enzyme in the presence of phospholipid monolayers through simultaneous determination of the surface tension and UV–vis spectra.

Graphical Abstract

Correspondence to: Ana P. Ramos.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 155 (2017) 466–476

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Protocols

Effect of the presence of cholesterol in the interfacial microenvironment on the modulation of the alkaline phosphatase activity during *in vitro* mineralization

B.Z. Favarin[a], M.A.R. Andrade[a], M. Bolean[a], A.M.S. Simão[a], A.P. Ramos[a], M.F. Hoylaerts[b], J.L. Millán[c], P. Ciancaglini[a,*]

[a] Depto. Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP), Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil
[b] Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium
[c] Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 January 2017
Received in revised form 20 April 2017
Accepted 25 April 2017
Available online 26 April 2017

Keywords:
Lipid interface
Biomineralization
Alkaline phosphatase
Monolayer
Proteoliposome
Sterol
Cholesterol

ABSTRACT

Mineralization of the skeleton starts within cell-derived matrix vesicles (MVs); then, minerals propagate to the extracellular collagenous matrix. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) degrades inorganic pyrophosphate (PP_i), a potent inhibitor of mineralization, and contributes P_i (Phosphate) from ATP to initiate mineralization. Compared to the plasma membrane, MVs are rich in Cholesterol (Chol) (~32%) and TNAP, but how Chol influences TNAP activity remains unclear. We have reconstituted TNAP in liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) or dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) combined with Chol or its derivatives Cholestenone (Achol) and Ergosterol (Ergo). DPPC plus 36% sterols in liposome increased the catalytic activity of TNAP toward ATP. The presence of Chol also increased the propagation of minerals by 3.4-fold. The catalytic efficiency of TNAP toward ATP was fourfold lower in DOPC proteoliposomes as compared to DPPC proteoliposomes. DOPC proteoliposomes also increased biomineralization by 2.8-fold as compared to DPPC proteoliposomes. TNAP catalyzed the hydrolysis of ATP more efficiently in the case of the proteoliposome consisting of DOPC with 36% Chol. The same behavior emerged with Achol and Ergo. The organization of the lipid and the structure of the sterol influenced the surface tension (γ), the TNAP phosphohydrolytic activity in the monolayer, and the TNAP catalytic efficiency in the bilayers. Membranes in the Lα phase (Achol) provided better kinetic parameters as compared to membranes in the Lo phase (Chol and Ergo). In conclusion, the physical properties and the lateral organization of lipids in proteoliposomes are crucial to control mineral propagation mediated by TNAP activity during mineralization.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In vertebrates, biomineralization consists in the orderly deposition of minerals composed of phosphate and calcium ions, to form a calcium phosphate salt that resembles hydroxyapatite (HA) ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$). Chondrocytes and osteoblasts initiate this process by releasing matrix vesicles (MVs) [1,2], which possess various hydrolytic enzymes including tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP). TNAP displays phosphomonohydrolytic activity, which generates inorganic phosphate (P_i) from inorganic pyrophosphate (PP_i) and adenosine-5-triphosphate (ATP) and has a crucial role in calcification. TNAP is attached to the cell and MV membranes *via* a glycosylphosphatidylinositol anchor (GPI-anchored), which provides the enzyme with lateral mobility relative to the membrane [3]. This mobility allows TNAP to accumulate in specific lipid microenvironments associated with ordered microdomains that are rich in sphingolipids, glycosphingolipids, and cholesterol (Chol) [4–8].

Ciancaglini et al. [9] have demonstrated that the catalytic properties of TNAP vary depending on the microenvironment around the enzyme. Distinct forms of the enzyme (associated with membranes, solubilized with detergent, or treated with phosphatidylinositol-specific phospholipase C) display different specificities for biological substrates, indicating that the GPI-anchor and the components of the membrane greatly affect enzyme kinetics.

* Corresponding author at: Depto Química, FFCLRP-USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.
E-mail addresses: pietro@ffclrp.usp.br, pietro.ciancaglini@gmail.com (P. Ciancaglini).

http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.04.051
0927-7765/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

Biophys Rev (2017) 9:747–760
DOI 10.1007/s12551-017-0315-1

REVIEW

Biophysical aspects of biomineralization

Maytê Bolean[1] · Ana M. S. Simão[1] · Marina B. Barioni[1] · Bruno Z. Favarin[1] · Heitor G. Sebinelli[1] · Ekeveliny A. Veschi[1] · Tatiane A. B. Janku[1] · Massimo Bottini[2,3] · Marc F. Hoylaerts[4] · Rosangela Itri[5] · José L. Millán[6] · Pietro Ciancaglini[1]

Received: 22 June 2017 / Accepted: 4 August 2017 / Published online: 29 August 2017
© International Union for Pure and Applied Biophysics (IUPAB) and Springer-Verlag GmbH Germany 2017

Abstract During the process of endochondral bone formation, chondrocytes and osteoblasts mineralize their extracellular matrix (ECM) by promoting the synthesis of hydroxyapatite (HA) seed crystals in the sheltered interior of membrane-limited matrix vesicles (MVs). Several lipid and proteins present in the membrane of the MVs mediate the interactions of MVs with the ECM and regulate the initial mineral deposition and posterior propagation. Among the proteins of MV membranes, ion transporters control the availability of phosphate and calcium needed for initial HA deposition. Phosphatases (orphan phosphatase 1, ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 and tissue-nonspecific alkaline phosphatase) play a crucial role in controlling the inorganic pyrophosphate/inorganic phosphate ratio that allows MV-mediated initiation of mineralization. The lipidic microenvironment can help in the nucleation process of first crystals and also plays a crucial physiological role in the function of MV-associated enzymes and transporters (type III sodium-dependent phosphate transporters, annexins and Na^+/K^+ ATPase). The whole process is mediated and regulated by the action of several molecules and steps, which make the process complex and highly regulated. Liposomes and proteoliposomes, as models of biological membranes, facilitate the understanding of lipid–protein interactions with emphasis on the properties of physicochemical and biochemical processes. In this review, we discuss the use of proteoliposomes as multiple protein carrier systems intended to mimic the various functions of MVs during the initiation and propagation of mineral growth in the course of biomineralization. We focus on studies applying biophysical tools to characterize the biomimetic models in order to gain an understanding of the importance of lipid–protein and lipid–lipid interfaces throughout the process.

Keywords Lipid microenvironment · Biomineralization · Matrix vesicles · Liposome · Proteoliposome · Hydroxyapatite

This article is part of a Special Issue on 'Latin America' edited by Pietro Ciancaglini and Rosangela Itri.

✉ Maytê Bolean
maytebolean@usp.br

✉ Pietro Ciancaglini
pietro@ffclrp.usp.br

1 Depto. Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

2 Department of Experimental Medicine and Surgery, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

3 Inflammatory and Infectious Disease Center, Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA

4 Department of Cardiovascular Sciences, Center for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium

5 Depto. Física Aplicada, Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

6 Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute, La Jolla, CA, USA

Mineralization process and the biogenesis of matrix vesicles

Mineralization of cartilage and bone occurs by a series of physicochemical and biochemical processes that together facilitate the deposition of calcium phosphate. The deposited calcium phosphate is subsequently converted into hydroxyapatite (HA) [$Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$] in specific areas of the extracellular matrix (ECM). Various experiments have revealed the presence of HA crystals both inside and outside collagen fibrils in the ECM (McNally et al. 2012) and also within the