Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de mestrado

**Estudo do efeito do colesterol como um modulador da
atividade da fosfatase alcalina incorporada em sistemas
miméticos de vesículas da matriz.**

Bruno Zoccaratto Favarin

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2014

Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação de mestrado

**Estudo do efeito do colesterol como um modulador da
atividade da fosfatase alcalina incorporada em sistemas
miméticos de vesículas da matriz.**

Bruno Zoccaratto Favarin

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

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

(Corrigido)

RIBEIRÃO PRETO – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Favarin, Bruno Zoccaratto

Estudo do efeito do Chol como um modulador da atividade da fosfatase Alcalina em sistemas miméticos de vesículas da matriz. Ribeirão Preto, 2014.p. 57

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

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1.Fosfatase Alcalina 2.Lipossomos 3.Colesterol 4.Proteolipossomos 5.Cinética enzimática

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas	i
Lista de Tabelas	ii
Lista de Figuras	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. Introdução	01
2. Objetivos específicos	10
3. Material e Métodos	11
3.1 Obtenção e cultura de células de medula óssea de ratos.....	10
3.2 Obtenção das frações de membrana de osteoblastos	12
3.3 Dosagem de proteína	12
3.4 Determinação da atividade pNFFase	12
3.5 Solubilização da fração de membrana	13
3.6 Remoção do excesso de detergente	13
3.7 Preparação dos lipossomos	14
3.8 Incorporação da fosfatase alcalina em lipossomos.....	15
3.9 Determinação do diâmetro médio dos sistemas vesiculares.....	15
3.10 Determinação dos dados cinéticos.....	16
3.11 Uso do β -ciclodextrina (bmCD) para remoção do colesterol.....	17
3.12 Quantificação do Colesterol.....	17
3.13 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	18
3.14 Ensaios de Mineralização	18
4. Resultados e Discussão	20
4.1 Caracterização cinética da TNAP em sistemas de DPPC:CHOL	21
4.2 Caracterização cinética da TNAP em sistemas de DOPC:CHOL	29
4.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da TNAP após tratamento com bmCD	37
4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da TNAP e lipossomos constituídos por DPPC e Colestenona (Achol).....	41
4.5 Estudo de propagação da biomineralização	44
5. Conclusão	47
6. Referencias Bibliográficas	49

Agradecimentos Especiais

A minha Família!

Se não fosse por vocês, tenho certeza que hoje não teria que escrever esses agradecimentos, porque esta dissertação 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.

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

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

À minha namorada Ana Luisa, que tanto me ajudou com paciência, na minha ausência para a elaboração desta dissertação e dos diversos dias de trabalho durante o mestrado, e sua família que tão bem me acolheu.

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 dissertação eu dedico a vocês!!

Pietro

É de extrema gratificação tê-lo como orientador e mestre durante estes sete 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 durante 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 **A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela Bolsa de Mestrado. (PROCESSO FAPESP N° 2012/01912-0).

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

Ao meu mestre e amigo **Prof. Dr. Pietro Ciancaglini**, por estes 7 anos de convivência, paciência, cumplicidade e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Sistemas Miméticos de Membrana: **Ana, Amanda, Camila, Carol, Dani, Heitor, Juliana, Marcelle, Larissa, Maytê, Thuanny, Simone**. 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 iniciais 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 paciência, pelos relatórios e milhões de dúvidas tiradas contigo.

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.

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 e Ana Maria Sper Simão** pelas correções dos textos em inglês.

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

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

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

Lista de Abreviaturas e Siglas

Achol:	4-Colesten-3-ona
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
bmCD:	β -Metil-ciclodextrina
BSA:	Albumina de soro bovino
Chol:	Colesterol
DLS:	Varredura dinâmica de luz
DOPC:	Dioleoil fosfatidil colina
DPPC:	Dipalmitoil fosfatidil colina
DSC:	Calorimetria Diferencial de Varredura
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 dissociação aparente
$k_{cat}/K_{0,5}$:	Eficiência catalítica
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
PPi:	Pirofosfato inorgânico
PS:	Fosfatidilserina
SCL:	Tampão linfa de cartilagem sintética
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SM:	Esfingomielina
TCA:	Ácido tricloroacético
TNAP:	fosfatase alcalina de tecido não-específico
U:	Unidade de atividade enzimática (nmol/min)
V_m :	Velocidade máxima de hidrólise do Substrato

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tamanho médio de lipossomos e de proteolipossomos preparados com diferentes proporções de DPPC e Chol e porcentagem de incorporação da enzima TNAP, nos mesmo. Pág. 23

Tabela 2: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, ADP e PPi pela fosfatase alcalina reconstituída em lipossomos preparados com diferentes proporções de DPPC e Chol. Pág. 28

Tabela 3: Tamanho médio de lipossomos e de proteolipossomos preparados com diferentes proporções de DOPC e Chol e porcentagem de incorporação da enzima TNAP, nos mesmo. Chol Pág. 31

Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, ADP, PPi pela fosfatase alcalina reconstituída em lipossomos de DOPC com diferentes proporções de Chol. Pág. 36

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP e PPi pela fosfatase alcalina reconstituída em lipossomos DPPC:Chol, após tratamento com bmCD, que reduziu a razão molar de Chol de 36% para 10%. Pág. 40

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, PPi pela fosfatase alcalina reconstituída em lipossomos de DPPC:Achol 36 % . Pág. 43

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura tridimensional da PLAP. Monômero A está representado em azul enquanto monômero B em amarelo. Estão indicados os sítios ativos metálicos (Zn1, Zn2, Mg e Ca) e a localização relativa da âncora GPI na enzima (Millán, 2006). Pág. 3

Figura 2: Esquema do extrusor utilizado na preparação dos lipossomos. Pág. 14

Figura 3: Efeito da concentração de ATP na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do ATP com a enzima. Pág. 24

Figura 4: Efeito da concentração de PPi na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do PPi com a enzima. Pág. 25

Figura 5: Efeito da concentração de ADP na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para interação do ADP com a enzima. Pag. 26

Figura 6: Efeito da concentração de ATP na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do ATP com a enzima. Pág. 32

Figura 7: Efeito da concentração de PPi na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do PPi com a enzima. Pág. 34

Figura 8: Efeito da concentração de ADP na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para interação do ADP com a enzima. Pág. 35

Figura 9: Efeito da concentração de ATP (■) e PPI (●) na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos tratados com bmCD, para maiores detalhes verificar em Materiais e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima. Pág. 38

Figura 10: Estruturas químicas do Chol e da 4-Colesten-3-ona. Pág. 41

Figura 11: Efeito da concentração de ATP (■) e PPI (●) na atividade enzimática da fosfatase alcalina reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC:Achol 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima. Pág. 42

Figura 12: Efeito da presença de protelipossomos contendo TNAP e constituídos de DPPC, DPPC:Chol 36% e DPPC:Achol 36%, na propagação de minerais a partir do nucleador PS-CPLX e ATP, incubados durante 48h, conforme descrito em Materiais e Métodos. Pág. 45

Resumo

Os osteoblastos são responsáveis pelo início do processo de biomineralização óssea mediada pela liberação de vesículas da matriz (MVs). As MVs surgem por brotamento das superfícies laterais dos osteoblastos e são secretadas para a matriz. A membrana das MVs possuem níveis elevados de Fosfatase Alcalina (TNAP), entre outras enzimas/proteínas, bem como de Cholesterol (Chol), em comparação com a membrana plasmática.

O objetivo deste estudo foi a construção de proteolipossomos constituídos por Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) ou Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), com Cholesterol (Chol) em diferentes proporções para a caracterização cinética da TNAP, utilizando os substratos ATP, PP_i e ADP, a fim de se obter um sistema que mimetize as MVs.

O aumento da concentração de Chol dificultou a incorporação da TNAP aos sistemas constituídos com DPPC, e facilitou a sua incorporação aos constituídos por DOPC. A presença do Chol em todos os sistemas miméticos preparados afetou os parâmetros cinéticos de hidrólise da TNAP para todos os substratos estudados. Entretanto, independentemente da presença do Chol, a hidrólise do PP_i apresentou sempre uma maior eficiência (maior $k_{cat}/K_{0.5}$), sugerindo que este substrato provavelmente possa ser hidrolisado preferencialmente.

O tratamento com 2 mM de ciclodextrina (bmCD), resultou na remoção de apenas 70% do Chol de proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol 36% mol. Estudos de calorimetria diferencial (DSC) revelaram que a bmCD fica ligada aos sistemas vesiculares causando interferência para os demais ensaios.

Quando 36% mol de colesteno (Achol), um análogo de Chol, foi empregado na construção dos proteolipossomos de DPPC, foram encontrados comportamentos cinéticos distintos para a TNAP. O ATP foi hidrolisado com uma $V_{máx}$ menor que a dos sistemas constituídos por DPPC:Chol 36% e maior do que para sistemas de DOPC:Chol 36% mol. Os valores de $K_{0.5}$ foram menores para DPPC:Achol 36% mol em comparação aos sistemas análogos. Com relação à hidrólise do PP_i , os parâmetros cinéticos foram similares, em relação aos sistemas estudados contendo DPPC:Chol ou DOPC:Chol.

Por fim, foi avaliada a capacidade de propagação de nódulos de mineralização pelos sistemas vesiculares contendo DPPC, DPPC:Chol e DPPC:Achol (com e sem TNAP incorporada), utilizando o ATP como substrato. A mineralização foi cerca de 16 vezes mais eficiente na presença de proteolipossomos que continham tanto Chol ou colesteno, do que para o sistema somente constituído por DPPC (cerca de 4 vezes), quando comparados com os respectivos sistemas de lipossomos (na ausência de enzima).

Diante destas diferenças apresentadas, tanto no comportamento cinético, quanto na capacidade de mineralização, pode-se sugerir que o microambiente lipídico tem um importante papel das MVs. Uma explicação que pode ser sugerida é que fatores termodinâmicos como: a diminuição da entalpia de transição; perda de pré-transição; presença de cargas superficiais; presença de diferentes substratos; bem como, orientações das ligações de hidrogênio com a molécula de água na superfície dos proteolipossomos, podem acarretar em modificações conformacionais na TNAP.

A relevância dos resultados apresentados pode contribuir no entendimento da função dos lipídios e de suas interações com as proteínas presentes nas MVs no processo de biomineralização.

Abstract

Osteoblasts are responsible for initiating the bone biomineralization process mediated by the release of matrix vesicles (MVs). The MVs arise by budding from the membrane of the osteoblasts and are secreted into the matrix. The MVs membrane has high levels of tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP), among other enzymes/proteins, as well as cholesterol, compared with the plasma membrane. The objective of this study was to build proteoliposomes constituted by Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) or dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), with cholesterol (Chol) in different molar ratios for the kinetic characterization of TNAP, using the substrates ATP, ADP and PPI, in order to obtain systems that mimic the MVs.

The increase in the cholesterol concentration hampered the incorporation of TNAP into the DPPC systems, but favored its incorporation into the DOPC liposomes. The presence of cholesterol in all prepared mimetic systems affected the kinetic parameters of hydrolysis for all substrates studied. Regardless of the presence of cholesterol, PPI hydrolysis always showed greater catalytic efficiency ($k_{cat}/K_{0.5}$), suggesting a preferential hydrolysis of this substrate.

Treatment with 2 mM cyclodextrin (BMCD) resulted in removal of 70% of the cholesterol from the proteoliposome constituted of DPPC:Cholesterol 36% (molar ratio). Differential scanning calorimetry (DSC) studies showed that BMCD was bound to the vesicular systems interfering with the other assays. When 36% of cholestenone (Achol), an analogue of cholesterol, was employed in the construction of DPPC proteoliposomes, a different kinetic behavior was observed for TNAP. The V_{max} for ATP hydrolysis was lower compared with the systems constituted of DPPC:Chol 36% and higher than that obtained for the DOPC:Chol 36% system. The values of $K_{0.5}$ were lower for DPPC:Achol 36% compared to the similar systems. With respect to the hydrolysis of PPI, the kinetic parameters were similar for the systems constituted of DPPC:Chol and DOPC:Chol.

Finally, we evaluated the ability of the vesicular systems containing DPPC, DPPC:Chol and DPPC:Achol (with and without TNAP incorporated) to propagate mineralization nodules, using ATP as substrate. The mineralization was about 16 times more efficient in the presence of proteoliposomes containing Chol or Achol than for the system constituted of DPPC only (about 4 times more efficient) compared with the corresponding liposome (in the absence of enzyme).

Given the differences observed for both the kinetic behavior and the mineralization ability of the different systems, we suggest that the lipid microenvironment plays an important role in MVs function. A possible explanation for these differences is that thermodynamic factors such as the decrease in the enthalpy of transition and the loss of pre-transition, as well as the presence of surface charges, the presence of different substrates, and the orientation of hydrogen bonds with the water molecule on the surface of the proteoliposomes, may cause conformational changes in TNAP molecule.

These relevant results can contribute for the understanding of the role of lipids and their interactions with proteins present in MVs in the biomineralization process.

1. Introdução

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 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. 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., 1985; Blumenthal, 1989; Freemont, 1993; Hsu e Anderson, 1995; Millán, 2006, 2012; Golub, 2009).

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, 1995). 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, 1995; Ciancaglini et al., 2006, 2010; Millán, 2006, 2012).

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., 1985; Anderson, 1995, 2003; Sela et al., 2000; Ciancaglini et al., 2006, 2010; Golub, 2009). Além disso, tem sido proposto que o interior das vesículas também serve como um microambiente selado, que protege o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino (mais solúvel), antes de se converter em um cristal de hidroxiapatita. Tem sido verificado ainda que as vesículas isoladas também possuem a capacidade de depositar sais de cálcio *in vitro* (Hsu e Anderson, 1986, 1995; Garimella et al., 2006; Millán, 2006, 2012; Golub, 2009).

MVs produzidas por condrócitos apresentam composições lipídica e protéica distintas das formadas pelos osteoblastos (Boyan et al., 1989; 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 (Roberts et al., 2004); (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 et al., 1994; Millán, 2006, 2012; Ciancaglini et al., 2010; Simão et al., 2010a, 2010b). 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.

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 (Lowe et al., 1990; Le Du e Millán, 2002; Kiffer-Moreira et al., 2014). 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) Figura1.

Figura 1: Estrutura tridimensional da PLAP. Monômero A está representado em azul enquanto monômero B em amarelo. Estão indicados nos sítios ativos metais (Zn1, Zn2, Mg, Ca e PO_4^{3-}) e a localização relativa da âncora GPI na enzima (Adaptado de Millán, 2006).

Além disso, níveis elevados desta isoforma também têm sido encontrados nas membranas dos osteoblastos durante a mineralização do tecido ósseo (Wuthier et al., 1985; Nakamura et al., 1988; Anderson, 1995; 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).

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., 1985; Thouverey et al., 2009). 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 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.

“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 e Simons, 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 esfingomiéline e glicosfingolípídios, bem como ligações de hidrogênio entre as porções glicosil adjacentes dos glicosfingolípídios (Simons e Ikonen, 1997; Lichtenberg et al., 2005; Lingwood e Simons, 2010).

Além disso, a natural saturação dos lípidios constituintes dos “rafts” e a ação dos glicolípídios promovem suas interações com o Chol (Brown, 1998).

Acredita-se que todas essas interações são responsáveis pela formação de domínios detergente-resistentes formados pela mistura de certos lípidios, particularmente aqueles contendo esfingomiéline, Chol, glicosfingolípídios e fosfolípídios saturados (Dietrich et al., 2001; Lichtenberg et al., 2005; Lingwood e Simons, 2010).

Interações lípidio-lípido são de fundamental importância na formação dos “lipid rafts”, com o Chol desempenhando um papel especial como uma “cola” que mantém esses domínios unidos (Barenholz, 2002; Zeljka e Kenworthy, 2008). No modelo proposto por Simons e Ikonen (1997), esfingolípídios associam-se lateralmente um com o outro, provavelmente através de interações fracas entre os carboidratos presentes nos grupos cabeça de glicosfingolípídios.

Os grupos cabeça dos esfingolípídios ocupam grandes áreas de exclusão no plano da camada exoplasmática em comparação com suas cadeias hidrocarbônicas, predominantemente saturadas. As associações entre esfingolípídios são evitadas pelo preenchimento com Chol que funciona como espaçador (Zeljka e Kenworthy, 2008). Glicosfingolípídios 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; Zeljka e Kenworthy, 2008; Lingwood e Simons, 2010).

O Chol é um importante e essencial componente lipídico de membranas plasmáticas em células de animais e também encontrado em concentrações mais baixas em determinadas membranas intracelulares servindo como comunicação vesicular com a membrana plasmática (Nes e McKean, 1977;

Yeagle, 1988; Liscum e Munn, 1999). Embora o Chol tenha diferentes funções em células animais, uma das suas principais funções é ser um modulador das propriedades físicas e organização lateral da bicamada lipídica da membrana plasmática.

Assim, muitos estudos sobre a interação do Chol com monocamada de fosfolípidios e modelos de membranas de bicamada foram realizados, utilizando uma grande variedade de técnicas (Demel e De Kruffy, 1976; Yeagle, 1988; Vist e Davis, 1990; Finegold, 1993; McMullen e McElhaney, 1996), na sequência dos estudos de DSC pioneiros de Chapman (Ladbrooke et al., 1968) e de Sturtevant (Sturtevant e Hinz, 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 (Brown, 1998; 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 fosfolípidios, glicolipídios, Chol e algumas proteínas integrais de membrana. A importância da SM, tanto estruturalmente como funcionalmente (Barenholz e Gatt, 1999).

Já os Gangliosídeos (GM1) funcionam como receptores na superfície da célula, bem como participam do crescimento, diferenciação e transformação da célula. Apesar de suas múltiplas funções, é relativamente pouco conhecido sobre sua estrutura e propriedades físicas em sistemas de membrana. Foi descrito sua presença em domínios detergente-resistentes em biomembranas, ricos em glicoesfingolipídios e Chol (Brown e Rose, 1992; Lingwood e Simons, 2010).

Várias proteínas da superfície de células eucarióticas tem a porção C-terminal modificada com glicosilfosfatidilinositol (GPI), que serve como uma âncora para proteínas da membrana. Proteínas GPI-ancoradas apresentam diversificadas funções biológicas incluindo atividade de hidrólise enzimática,

sinalização transmembrana e interações de adesão celular (Low, 1989; Ferguson, 1999). A TNAP é um exemplo deste tipo de proteína (Pizauro et al., 1994, 1995; Ciancaglini et al., 2006; Simão 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 ($L\alpha$) e fase líquido-ordenada (L_o) rica em Chol, esfingosina e glicolipídios não carregados. Deste modo, nosso grupo de pesquisa (Bolean et al., 2010, 2011) padronizou uma metodologia para obtenção desistemas 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 e 2011). Em adição Milhiet e 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). Assim a TNAP pode ser um marcador eficiente de “lipid rafts”.

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 e Hailer, 1985). 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., 1985; Boyan et al., 1989; Balcerzak et al., 2003; Blandford et al., 2003).

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 (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 (Camolezi et al., 2002; Ierardi et al., 2002; Simão et al., 2010a, 2010b, 2013; Bolean et al., 2010, 2011; Ciancaglini et al., 2012), 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*.

Como pode ser observado, os estudos realizados até o momento não permitem correlacionar a atividade da TNAP e microdomínios 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 dissertação teve como principais objetivos a construção de sistemas de lipossomos utilizando em sua composição os lipídios DPPC, DOPC e Chol, 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.

2. Objetivos específicos:

1. Obtenção de frações de membrana de osteoblastos a partir de cultura de células de medula óssea de ratos.
2. Produzir sistema de lipossomos constituídos de diferentes composições lipídicas (DPPC, DOPC e Chol).
3. Incorporar a TNAP em sistema de lipossomos constituídos de diferentes composições lipídicas.
4. Determinar os parâmetros cinéticos de sistemas vesiculares contendo TNAP, com diferentes concentrações de Chol.
5. Correlacionar a atividade ATPase e PPIase da TNAP incorporada em lipossomos com diferentes proporções de Chol.
6. Determinar os parâmetros cinéticos dos sistemas de DPPC:Chol tratados com β -metil-Ciclodextrina.
7. Determinar os parâmetros cinéticos dos sistemas de lipossomos contendo TNAP na presença de colesteno.
8. Avaliar a capacidade de propagação de nódulos de mineralização por sistemas vesiculares contendo DPPC, DPPC:Chol e DPPC:Achol.

3. Material e Métodos

3.1 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 (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 barriga, 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 fungizona 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 auxílio 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 μ g/mL de gentamicina, 0,3 μ g/mL de fungizona, 10^{-7} M de dexametazona, 5 μ g/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 cm² contendo meio de cultura, por cerca de 14 dias, sempre mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada 3 ou 4 dias.

3.2 Obtenção das frações de membrana de osteoblastos.

As frações de membrana ricas em TNAP foram extraídas das culturas osteoblásticas, conforme descrito por Simão e colaboradores (2007). As células que cresceram durante aproximadamente 14 dias em frasco plástico de cultura de 75 cm² foram lavadas com tampão de estoque Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, raspadas com espátula plástica e ressuspensas em 40 mL de tampão de choque osmótico Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgSO₄ 10 mM e NaCl 0,8 M. O material ressuspenso foi homogeneizado empregando-se um homogeneizador do tipo “potter” e, em seguida, ultracentrifugado a 100.000xg por 1 hora, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet, com a 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 -20°C.

3.3 Dosagem de proteína

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

3.4 Determinação da atividade pNFFase

A atividade p-nitrofenilfosfatase (pNFFase) da TNAP foi determinada descontinuamente, a 37°C, empregando-se um espectrofotômetro, através da formação do íon p-nitrofenolato (PNF⁻) ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, pH 13), em 410 nm. As condições de ensaio foram tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo MgCl₂ 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 MgCl₂ 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 fosfomono-hidrolase foram determinadas descontinuamente através da dosagem do P_i liberado, de acordo com o procedimento descrito por Pizauro e colaboradores (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 $P \leq 0,05$.

3.5 Solubilização da fração de membrana

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

Amostras da enzima solubilizada foram analisadas quanto à atividade pNFFase

3.6 Remoção do excesso de detergente

A TNAP solubilizada com polidocanol foi incubada sob agitação constante, durante 2 horas, a 4°C, com a resina Calbiosorb na proporção de 200 mg/mL (peso úmido), previamente tratada com metanol e equilibrada com

tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl_2 2 mM, conforme descrito por Camolezi e colaboradores (2002).

3.7 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 a 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 60°C por 1 hora, com agitações constantes em vortex a cada 10 minutos. Um mini extrusor (Liposofast da Sigma-Aldrich) foi montado com duas seringas de 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 et al. (2010; 2011): lipossomos de DPPC, DOPC e lipossomos mistos constituídos de DPPC:CHOL e DOPC:CHOL em proporção molar de 0, 10, 25 e 35 % de Chol. Também foram preparados lipossomos contendo DPPC:ACHOL em proporção de 36%.

Figura 2: Esquema do extrusor utilizado na preparação dos lipossomos.

3.8 Incorporação da -TNAP em lipossomos

Amostras de lipossomos e TNAP (em torno de 35 µg/mL) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM, foram misturadas e incubadas a 25°C durante 1 hora, na proporção 1:10000 proteína:lipídio (razão molar). Em seguida, a solução foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 hora, a 4°C, e o pellet foi ressuspensão no mesmo tampão acima descrito. A atividade pNFFase total antes da incorporação, antes da ultracentrifugação e a atividade presente no sobrenadante e no pellet ressuspensão foram determinadas para calcular a porcentagem de incorporação.

3.9 Determinação do diâmetro médio dos sistemas vesiculares

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. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

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

(Equação 1)

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

D é o coeficiente de difusão das partículas,

q é o módulo do vetor de espalhamento, dado por:

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

onde λ é o comprimento de onda da radiação e θ é o ângulo da luz espalhada, em relação ao feixe incidente.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Browniano das vesículas que se difundem resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado (Santos e Castanho, 1996).

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

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

onde K_B é a constante de Boltzmann

T é a temperatura (Kelvin)

η é a viscosidade do solvente

R_H é o raio hidrodinâmico,

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

3.10 Determinação dos dados cinéticos

Os parâmetros cinéticos de hidrólise dos substratos, obtidos nas diferentes condições experimentais: $K_{0,5}$ (constante de dissociação aparente), n (coeficiente de Hill) e $V_{\text{máx}}$ foram calculados empregando-se o programa SigrafW desenvolvido por 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 $P \leq 0,05$.

3.11 Uso do β -ciclodextrina (bmCD) para remoção do Chol

Os proteolipossomos constituídos por DPPC:CHOL 36% foram tratados com bmCD na tentativa de remoção do Chol. Para este procedimento, os proteolipossomos foram misturados e incubados a 25°C durante 2 horas com β -metil-ciclodextrina 1 mM sob agitação. Após a incubação, a solução foi ultracentrifugada a 100.000 x g por 1 hora, a 4°C, e o pellet obtido foi ressuspenso no tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo $MgCl_2$ 2 mM.

Os Proteolipossomos tratados com bmCD foram analisados quanto ao teor de Chol e proteína, bem como por DLS e DSC. Além disso, foi acompanhada a hidrólise de ATP e PP_i , para ser comparada os sistemas antes do tratamento.

3.12 Quantificação do Chol

O Chol presente nos sistemas vesiculares foi determinado segundo o método descrito por Higgins (1987) modificado para um volume de reagentes quatro vezes menor, utilizando como padrão a solução de Chol 0,01% (0,258 mM) em ácido acético glacial na faixa de concentração de 0 a 0,05 mg de Chol.

Uma alíquota de proteolipossomo foi extraída em clorofórmio:metanol 1:1 (v/v) deixada por aproximadamente 5 min. e a fase orgânica foi separada e seca em fluxo de nitrogênio. Adicionou-se 1,5 mL de ácido acético glacial e a solução foi bem homogeneizada para dissolver o filme. Finalmente, adicionou-se 0,5 mL do reagente A (diluído 12,5 vezes com ácido sulfúrico concentrado), homogeneizou-se novamente e após 10 min. foi feita a leitura no espectrofotômetro em 550 nm. O reagente A é constituído de uma solução de cloreto de ferro hexa-hidratado (2.5% p/v) em ácido ortofosfórico (85% p/v).

3.13 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

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

A amostra de proteína e a referência (tampão) foram inicialmente deaeradas e aplicadas no calorímetro (300 µL de cada). Foi realizada uma varredura de temperatura de 10°C a 90°C, com velocidade de aquecimento de 0,5°C/min e uma varredura de 90°C a 10°C com velocidade de resfriamento de 0,5°C/min. Esse ciclo foi repetido por pelo menos mais uma vez.

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

Para proteínas, um pico de absorção de calor é frequentemente observado no varrimento de temperatura referente a desnaturação, esse gráfico é denominado termograma. Após a correção da linha de base e a normalização da concentração de proteína, a curva pode ser integrada fornecendo o valor da variação de entalpia para o processo (ΔH) (equação 4). A temperatura de transição (*melting*) (T_m) também é determinada.

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT. \quad (\text{Equação 4})$$

A análise dos dados foi feita pelo software CpCalc fornecido pela CSC (Calorimetry Sciences Corporation).

3.14 Ensaios de Mineralização

A síntese de PS-CPLX, como nucleador, foi realizada de acordo com o método descrito por Wuthier et al. (1985) e Genge et al. (2007).

Uma emulsão de fosfatidilserina (PS) foi preparada secando-se 1,25 mg do lipídeo em clorofórmio, sob atmosfera de nitrogênio, para formar uma película fina no fundo de um tubo de ensaio. O filme foi dissolvido em 2 mL de tampão fosfato (ICP) constituído por: K^+ 106,7 mM, Na^+ 45,1 mM, Mg^{2+} 1,5 mM, Cl^- 115,7 mM, Pi 23,0 mM, HCO_3^- 10 mM, SO_4^{2-} 1,5 mM e N_3^- 3,1 mM em pH de 7,2, sonificado por 2 min. a 25°C para formar uma emulsão translúcida homogênea de vesículas unilamelares pequenas.

Em seguida, foi feito o nucleador (PS-CPLX) misturando 1 mL da emulsão de PS, previamente preparada, 17,5 μ L de $CaCl_2$ 100 mM e 1,6 mL de tampão ICP. Esta solução foi homogeneizada e centrifugada durante 5 min a 15.000 x g. O pellet formado foi ressuspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 16,5 mM, pH 8, sonificado por 30 segundos para se obter suspensões uniformes.

Em paralelo foi preparado outro tampão (SCL) que será usado no experimento a seguir contendo: Ca^{2+} 2 mM e substrato 1 mM (ATP) como fonte de Pi , Na^+ 104,5 mM, Cl^- 133,5 mM, sacarose 63,5 mM, Tris 16,5 mM, K^+ 12,7 mM, glicose 5,55 mM, HCO_3^- 1,83 mM e Mg^{2+} 0,57 mM.

Finalmente, os ensaios de nucleação foram feitos em um volume final de 280 μ L (nos poços de uma microplaca de 96 poços) onde os diferentes lipossomos/proteolipossomos (14 μ L) foram incubados com 140 μ L de tampão SCL, 21 μ L de suspensão de PS-CPLX e 14 μ L de tampão Tris-HCl 16,5 mM, pH 8 e homogeneizados por 10 segundos.

A propagação do mineral foi medida por turbidez (absorbância em 340 nm) empregando-se um sistema de ensaio em microplacas com multi-poços, após 48 h de incubação a 37°C, utilizando um leitor de microplacas Molecular Devices M3.

Cada amostra foi feita em sextuplicatas e os lipossomos foram utilizados como controle.

4 Resultados e Discussão

Para se obter um sistema eficiente que mimetize as MVs, é essencial estudar as condições necessárias para otimizar a incorporação da TNAP em lipossomos, de modo a se obter um máximo de incorporação da enzima às vesículas, com mínima perda de atividade. Isso envolve conhecimento dos lipídios ou mistura de lipídios mais adequados para a reconstituição em termos do tipo do grupo cabeça polar, carga, comprimento de cadeia hidrocarbônica bem como tamanho das vesículas formadas (Ciancaglini et al., 2012).

Os estudos iniciais para a obtenção de proteolipossomos foram realizados com fosfatidilcolina (PC), que é um fosfolipídio comumente utilizado para a reconstituição de TNAP de diferentes origens, bem como outras proteínas de membrana, em lipossomos (Angrand et al., 1997; Nosjean et al., 1999; Camolezi et al., 2002; Morandt et al., 2002; Daghastanli et al., 2004; Ronzon et al., 2004; De Lima Santos et al., 2005; Giocondi et al., 2007) e é frequentemente empregado em estudos modelos de biomembranas (López Cascales et al., 2006; Ciancaglini et al., 2006; Giocondi et al., 2007). Camolezi e colaboradores (2002) mostraram que dentre os PC estudados, o DPPC revelou ser um sistema que incorpora mais eficientemente a TNAP e Simão e colaboradores (2010) observaram que o microambiente constituído por diferentes lipídios pode afetar a atividade da enzima reconstituída. Entretanto, até o momento, para a reconstituição da TNAP não foram estudados sistemas com diferentes porcentagens de Chol que tem um papel chave na estrutura e função das biomembranas (Angrand et al., 1997; Nosjean et al., 1999; Camolezi et al., 2002; Morandt et al., 2002; Daghastanli et al., 2004; Ronzon et al., 2004; De Lima Santos et al., 2005; López Cascales et al., 2006; Ciancaglini et al., 2006; Giocondi et al., 2007).

McMullen et al. (1993) e Meyer et al. (1984) descreveram os efeitos do Chol sobre as propriedades estruturais e dinâmicas de membranas naturais e revelaram que, mesmo pequenas quantidades deste esterol pode afetar a dinâmica da membrana. Porém estudos cinéticos de uma enzima de membrana, em sistemas com diferentes proporções de Chol estão ausentes na literatura.

4.1 Caracterização cinética da TNAP em sistemas de DPPC:CHOL.

Estudos anteriores em nosso laboratório mostraram os efeitos do aumento da concentração de Chol nos parâmetros termodinâmicos dos lipossomos, levando, por exemplo, a um aumento no diâmetro médio dos lipossomos constituídos por DPPC:Chol (diferentes concentrações), quando comparado a lipossomos constituídos somente por DPPC. Há um pequeno aumento na T_m dos lipossomos com crescentes concentrações de Chol. A adição desse esteroide Chol provoca um aumento na área ocupada por molécula na monocamada da fase gel, aumentando assim as interações lipídio/lipídio, o que resulta no aumento da T_m do sistema binário. Além disso, o DPPC tem uma geometria cilíndrica e, devido ao seu raio de curvatura, os lipossomos de DPPC apresentam uma vesícula de forma esférica (Bolean et al., 2010).

Quando a concentração de Chol foi restringida a 10% em mol, foi observado um ligeiro aumento na cooperatividade da transição de fase ($\Delta t_{1/2}$), mostrando um decréscimo nos valores de $\Delta t_{1/2}$ (largura da meia altura do pico de transição), sugerindo que, em baixas concentrações, o Chol é capaz de estabilizar as vesículas, devido à sua geometria cônica, que é apropriada para a sua interação com bicamadas lipídicas.

Para concentrações acima de 10 % em mol, os valores de $\Delta t_{1/2}$ aumentaram significativamente, indicando uma diminuição na cooperatividade da transição de fase, com o aumento da concentração desse esteroide nos sistemas vesiculares. O aumento gradual de Chol em lipossomos resultou no alargamento do pico de transição de fase e a formação de microdomínios (Lange et al., 1989).

Na tabela 1 podem ser observados os valores de incorporação da TNAP, incorporada aos lipossomos constituídos por DPPC ou por DPPC:Chol em diferentes proporções. Na padronização das condições ótimas para a reconstituição da TNAP em lipossomos, encontram-se os melhores resultados empregando apenas DPPC, que proporcionou máxima incorporação da atividade pNFFase da enzima (cerca de 85%) e concentração de proteína incorporada (12 $\mu\text{g/mL}$).

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 et al. (2002) na reconstituição da TNAP de placas ósseas em lipossomos constituídos por DPPC, e por Bolean et al. (2010) na reconstituição da TNAP obtida de cultivos de osteoblastos em lipossomos de DPPC e Chol.

Os diâmetros médios dos sistemas vesiculares formados pelos lipossomos e proteolipossomos foram avaliados empregando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico. Os resultados obtidos estão também expressos na Tabela 1 e revelaram vesículas com diâmetro médio entre 160 e 180 nm condizentes com o esperado para sistemas de DPPC e DPPC:Chol obtidos pela técnica de extrusão. Cabe destacar aqui que os sistemas apresentaram dimensões similares aos descrito por 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 dos sistemas vesiculares pode influenciar na incorporação da TNAP (Sesana et al., 2008; Bolean et al., 2010).

Cabe destacar que, para todos os sistemas lipídicos estudados pela técnica de espalhamento dinâmico, foram encontrados valores de polidispersão entre 0,055 e 0,094, sugerindo que são preparações bastante homogêneas.

Podemos também estimar a relação molar proteína:lipídio, em torno de ~1:14.000 para os sistemas de DPPC, enquanto que ocorre um diminuição na relação proteína:lipídio chegando a ~ 1:20.000 com o aumento da concentração de Chol (36%).

Tabela 1: Tamanho médio de lipossomos e de proteolipossomos preparados com diferentes proporções de DPPC e Chol e porcentagem de incorporação da enzima TNAP, nos mesmos.

Composição (% mol)	Lipossomos	Proteolipossomos		
	Diâmetro (nm)	Diâmetro (nm)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Incorporação (%)
DPPC	148,5 $\pm$ 0,2	164,3 $\pm$ 0,1	0,149 $\pm$ 0,001	84,8
DPPC:Chol (10)	141,3 $\pm$ 0,3	166,1 $\pm$ 0,8	0,108 $\pm$ 0,002	61,2
DPPC:Chol (25)	152,4 $\pm$ 0,1	175,4 $\pm$ 0,1	0,101 $\pm$ 0,002	57,3
DPPC:Chol (36)	154,3 $\pm$ 0,2	175,3 $\pm$ 0,3	0,087 $\pm$ 0,003	49,4

Uma vez reconstituída a TNAP em sistemas lipídicos formados por DPPC e DPPC:Chol (em diferentes proporções) foram realizados experimentos de cinética enzimática utilizando os substratos ATP, PP_i e ADP no intuito de conhecer os parâmetros cinéticos como padrão de comparação para os demais sistemas estudados.

Estudos têm demonstrado a importância da hidrólise de ATP, PP_i e ADP, pelas fosfatases alcalinas de diferentes tecidos ósseos e cartilagosos. Acredita-se que especialmente a atividade ATPase e PP_i ase 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 et al., 1981; Meyer et al., 1985; Hsu et al., 1986; Leone et al., 1997; Simão et al., 2010a; Millan et al., 2012).

Assim, foi verificado o efeito do microambiente lipídico em pH 7,4 condizente com o pH fisiológico (Simão et al. 2013). Embora as eficiências catalíticas em geral foram maiores em pH alcalino, a hidrólise de PP_i foi maior a pH 8. Indicou também uma preferência por PP_i a pH 8. 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 e ADP, 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.

Figura 3: Efeito da concentração de ATP na atividade enzimática da TNAP reconstituída em sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do ATP com a enzima.

Através da Figura 3 pode-se observar que, independentemente da presença de Chol, o ATP exibe uma única curva de saturação para os sistemas lipídios estudados. 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% (Tabela 2).

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 10% obtivemos uma diminuição para 732,8 U/mg, quando comparado com o sistema contendo apenas DPPC (Tabela 2).

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

A velocidade de hidrólise de PP_i pela enzima reconstituída em lipossomos de DPPC, DPPC:Chol em proporções variando de 10% a 36% é mostrada na Figuras 3. Pode-se observar que o PP_i , assim como o ATP exibe uma única curva de saturação para os sistemas 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 2). 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.

Figura 4: Efeito da concentração de PP_i na atividade enzimática da TNAP reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do PP_i com a enzima.

Os valores de $V_{\text{máx}}$ 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 10% obtivemos uma diminuição (indo para 510,8 U/mg), quando comparado com os sistemas contendo apenas DPPC. Com relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos de DPPC foi obtido valor de $1,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ muito abaixo do que os valores obtidos para proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol 10, 25 e 36% ($1,9 \times 10^3$; $3,5 \times 10^3$ e $3,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente), indicando um aumento de atividade catalítica do PP_i , na presença de Chol.

O produto de hidrólise do ATP pela TNAP é o ADP, e em determinadas situações este substrato também pode ser usado como substrato pela enzima para aumentar ainda mais a concentração de P_i necessário para o processo de biomineralização (Ciancaglini et al., 2006).

Deste modo, o ADP também foi estudado como substrato da TNAP, mesmo que inicialmente isso não tenha sido proposto no projeto. Assim, hidrólise de ADP pela enzima reconstituída em lipossomos de DPPC e DPPC:Chol em proporções variando de 10 a 36% é mostrada na Figura 5.

Figura 5: Efeito da concentração de ADP na atividade enzimática da TNAP reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DPPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para interação do ADP com a enzima.

Na Figura 3 pode-se observar que com o ADP, assim como o ATP e o PP_i , a enzima exibe uma única curva de saturação para os sistemas estudados. O valor de $K_{0.5}$ diminui gradativamente com o aumento da concentração de Chol (até 25%) (Tabela 2). Observa-se também uma diminuição nos valores de cooperatividade que passam de 5,2 para o proteolipossomo constituídos apenas por DPPC, para 2,5 para o proteolipossomo com maiores concentrações de Chol.

Os valores de $V_{\text{máx}}$ aumentaram (de 482,3 para 755,4 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos até 25%. Apenas para os proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol 10% e DPPC:CHOL 36% houve uma diminuição para 312,3 e 741,3 U/mg, quando comparados com os sistema contendo apenas DPPC. Com relação a eficiência catalítica os proteolipossomos constituídos por DPPC mostraram valor de $7,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ muito abaixo dos valores obtidos pelo proteolipossomos constituídos por DPPC:Chol 10; 25 e 36% e $1,6 \times 10^3$, $4,0 \times 10^3$ e $1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente.

Os parâmetros cinéticos obtidos para os diferentes substratos estudados nos sistemas reconstituídos com diferentes composições de Chol estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, ADP e PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos de diferentes proporções de DPPC eChol.

Substrato	Parâmetros cinéticos	Proteolipossomos			
		DPPC	DPPC:Chol 10%	DPPC:Chol 25%	DPPC:Chol 36%
ATP	V _m (U/mg)	910,0	732,8	1405,3	1244,1
	K _{0.5} (mM)	3,18	2,75	1,82	1,38
	n	3,4	1,9	2,5	2,9
	k _{cat} /K _{0.5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	5,7x10 ²	5,3x10 ²	1,54x10 ²	1,8x10 ³
ADP	V _m (U/mg)	482,3	312,3	755,4	741,3
	K _{0.5} (mM)	1,36	0,40	0,38	1,15
	n	5,2	1,1	3,8	2,5
	k _{cat} /K _{0.5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	7,1x10 ²	1,6x10 ³	4,0x10 ³	1,3x10 ³
PP _i	V _m (U/mg)	542,2	510,8	880,1	740,3
	K _{0.5} (mM)	0,71	0,55	0,50	0,45
	n	1,0	1,1	1,2	1,3
	k _{cat} /K _{0.5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	1,5x10 ³	1,9x10 ³	3,5x10 ³	3,3x10 ³

Podemos notar, observando a Tabela 2, que para o substrato PP_i a enzima apresenta um valor de K_{0.5} menor nos lipossomos de DPPC que nos demais substratos estudados, 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 fosfomonoesterase e, conseqüentemente, reduzir a quantidade de fosfato produzido.

Os parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 2 são similares aos relatados por Simão e colaboradores (2010) em relação à proteolipossomos compostos pelos mesmos lipídios.

Cabe ressaltar que a V_m de hidrólise para os substratos ATP, ADP e PP_i foram menores para todos os sistemas de proteolipossomos estudados quando o Chol está presente em uma proporção molar de 10%.

Fatores termodinâmicos como o ligeiro aumento da cooperatividade para proteolipossomos de DPPC:Chol 10%, podem levar a modificações

conformacionais na TNAP podendo modificar a disponibilidade e posicionamento de seus sítios catalíticos. Esta hipótese precisará ser testada empregando-se outras técnicas, como por exemplo FTIR, Ramam entre outras (Engberts e Hoekstra, 1997). Previamente, foram realizados estudos de dicroísmo circular, mas devido à baixa concentração de proteína incorporada aos proteolipossomos e ao espalhamento de luz que os sistemas vesiculares provocam, não obtivemos êxito em detectar as mudanças estruturais na TNAP nessas condições (resultados não mostrados).

Embora o papel da TNAP durante a mineralização envolva a hidrólise de PP_i , não está claro como os microambientes das MVs podem afetar a capacidade de TNAP em hidrolisar os diferentes substratos presentes nos sítios de mineralização (Ciancaglini et al., 2006).

Foram determinadas por Ciancaglini et al. (2006) os parâmetros cinéticos da TNAP hidrolisando diferentes substratos como ATP e PP_i . A cinética enzimática foi estudada utilizando a TNAP isolada ligada à membrana, TNAP solubilizada com polidocanol e também TNAP solubilizada com PIPLC. Quando foram comparados os k_{cat}/K_m das formas de enzima em solução com os sistemas de membrana associados a lipossomos foram encontrados eficiencia catalítica com ordem de grandeza menores ou igual a 2, para todos os substrato usados. Isso pode ser explicado pela maior difusão que a enzima teria em solução do que quando associada à membrana ou aos lipossomos (Sesana et al., 2008; Simão et al., 2010a).

Assim, fica evidente que quando se quer obter informações mais coerentes com a enzima presente na fração de membrana, a estratégia mais apropriada é a utilização de sistemas de proteolipossomos que, dependendo da composição lipídica são capazes de mimetizar apropriadamente as condições do microambiente lipídico, incluindo o pH presente no líquido do fluido da matriz, bem como de outros componentes essenciais ao processo de biomineralização (Ciancaglini et al., 2012).

4.2 Caracterização cinética da TNAP em sistemas de DOPC:Chol.

O DOPC é o principal lipídio encontrado em membranas naturais, e devido à suas características, este requer alguns cuidados adicionais em seu

manuseio diferentemente do DPPC, especialmente no que fiz respeito a sua oxidação.

O DOPC apresenta 1 insaturação entre o carbono C8-C10, e sua T_m é em torno de -18°C (Sanchez et al., 2011), portanto na temperatura utilizada para incorporação da TNAP nos sistemas de protelipossomos (25°C) o lipídio se encontra na fase líquido-cristalina, diferente do DPPC que possui uma T_m em torno de $41,5^{\circ}\text{C}$, e está na fase gel (Milhiet et al., 2002; Bolean et al., 2011).

Neste sentido, avaliamos a incorporação da TNAP em sistemas vesiculares de DOPC mantendo-os, o máximo de tempo possível, em um microambiente inerte de atmosfera de nitrogênio para que não houvesse oxidação das insaturações. Estes sistemas de proteolipossomos constituídos de DOPC foram usados para estudar as características cinéticas da enzima empregando-se os mesmos substratos estudados anteriormente (ATP, PP_i e ADP). Na Tabela 3 podem ser observados os valores de incorporação da TNAP aos lipossomos constituídos por DOPC e DOPC:Chol em diferentes proporções. Assim, na padronização das condições ótimas para a reconstituição da TNAP, os lipossomos de DOPC:Chol 36% proporcionaram máxima incorporação atividade da enzima (cerca de 58%), quando lipossomos compostos apenas por DOPC:Chol 36% e proteína ($12 \mu\text{g/mL}$) foram incubados na proporção de 1:1 (v/v), a 25°C , durante 1 hora. É importante salientar que para a incorporação da proteína nos sistemas lipídicos compostos por DOPC foram mantidas as mesmas proporções já padronizadas para sistemas constituídos por DPPC.

Foi utilizada a técnica de DLS e os resultados obtidos estão também sumarizados na Tabela 3. Ele revelou vesículas de lipossomos com diâmetros médios entre 161,3 e 192,5 nm. Para todos os sistemas lipídicos estudados pela técnica de espelhamento dinâmico foram encontrados valores de polidispersão entre 0,025 e 0,074, sugerindo que são preparações homogêneas.

Os protelipossomos estudados apresentaram diâmetros médios para os sistemas com DOPC, DOPC:Chol 10%, DOPC:Chol 25% e DOPC:Chol 36% de 214,3, 188,1, 199,4 e 274,3 nm, respectivamente, e também notamos que com o aumento da concentração de Chol ocorre o aumento na incorporação da TNAP (0,078 para $0,102 \mu\text{g/mL}$), diferentemente do que foi constatado quando

o DPPC foi empregado (Tabela 1). Podemos também estimar a relação molar proteína:lipídio utilizada, que foi cerca de 1:21.000 para o DOPC sozinho e de ~1:17.000 para o sistema de DOPC com 36% de Chol. Valores de proporções proteína-lipídeos descritos na literatura são muito amplos, variando de 1:200 até 1:20.000 (Sesana, et al., 2008; Bolean et al., 2010, 2011, 2014).

Tabela 3: Tamanhos médios de lipossomos e proteolipossomos preparados com diferentes proporções de DOPC e Chol e porcentagem de incorporação da TNAP, nos mesmos.

Composição (% mol)	Lipossomos	Proteolipossomos		
	Diâmetro (nm)	Diâmetro (nm)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)	Incorporação (%)
DOPC	192,5 $\pm$ 0,1	214,3 $\pm$ 0,1	0,078 $\pm$ 0,001	44,5
DOPC:Chol (10)	161,3 $\pm$ 0,2	188,1 $\pm$ 0,2	0,058 $\pm$ 0,002	33,1
DOPC:Chol (25)	184,3 $\pm$ 0,1	199,4 $\pm$ 0,1	0,072 $\pm$ 0,002	41,1
DOPC:Chol (36)	174,3 $\pm$ 0,3	274,3 $\pm$ 0,3	0,102 $\pm$ 0,003	58,1

Após a reconstituição da TNAP em sistemas lipídicos formados por DOPC e DOPC:Chol (em diferentes proporções) foram realizados experimentos com o objetivo de caracterizar a cinética de hidrólise do ATP, PP_i e ADP. A hidrólise de ATP pela enzima reconstituída em lipossomos de DOPC e DOPC:Chol, em proporções variando de 10 a 36% (em mol) é mostrada na Figura 5. Pode-se observar que, na presença de Chol, o ATP exhibe uma única curva de saturação para os sistemas lipídios estudados. Os valores de $K_{0,5}$ são menores para sistemas com 10 e 36% de Chol (1,75 e 0,43 mM, respectivamente), em relação aos sistemas com a ausência de Chol e a presença do Chol na concentração de 25% (7,77 e 6,04 mM, respectivamente), como apresentado na tabela 4.

Figura 6: Efeito da concentração de ATP na atividade enzimática da TNAP reconstituída em sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do ATP com a enzima.

Observa-se também uma redução nos valores de cooperatividade quando adicionado Chol ao sistema, passando de 1,4 para o proteolipossomo contendo apenas DOPC (tabela 2), para 0,7 para o proteolipossomo com concentração de Chol de 10% (Tabela 4).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ 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 10% obtivemos uma menor diminuição (para 317,8 U/mg), quando comparado com o sistema que contem apenas DOPC.

Com relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos constituído por DOPC, foram obtidos valores ($1,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) muito parecidos com os valores obtidos para proteolipossomos compostos por DOPC:Chol 25% ($8,6 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), porém os proteolipossomos compostos por

DOPC:Chol 10% e DOPC:Chol 36% apresentaram um aumento de 3x e 10x (respectivamente) em relação ao lipossomo de DOPC, com o valor de $(3,6 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$, respectivamente (Tabela 4).

Os ensaios de hidrólise de PP_i pela enzima reconstituída em lipossomos de DOPC e DOPC:Chol em proporções variando de 10% a 36% (em mol) estão apresentados na Figura 7.

Pode-se observar que o PP_i , assim como o ATP, exibe uma única curva de saturação para os sistemas 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 4). 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 36 %).

Os valores de $V_{\text{máx}}$ 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 10% obteve-se um aumento para 1034,5 U/mg, quando comparado com os sistemas contendo apenas DOPC.

Figura 7: Efeito da concentração de PP_i na atividade enzimática da TNAP reconstituída sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do PP_i com a enzima.

Em relação à eficiência catalítica da enzima reconstituída em proteolipossomos constituídos por DOPC, foi obtido o valor de $7,4 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, valores abaixo dos obtidos com proteolipossomos constituídos por DOPC:Chol 10, 25 e 36% (em mol) ($1,2 \times 10^3$; $6,1 \times 10^3$ e $4,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente).

A hidrólise de ADP pela enzima reconstituída em lipossomos de DOPC e DOPC:Chol, em proporções variando de 10 a 36%, é apresentada na Figura 8. Pode-se observar que o ADP, assim como o ATP e o PP_i , exibe uma única curva de saturação para os sistemas estudados.

O valor de $K_{0.5}$ diminui com o aumento da concentração de Chol (Tabela 4). Observa-se também um aumento nos valores de cooperatividade que passam de 0,9 para sistemas lipídicos contendo apenas DOPC, para 1,4 e 1,3 para sistemas constituídos por DOPC:Chol 10 e 25% (em mol) respectivamente. Porém, para os protelipossomos com DOPC:Chol 36 %, o valor de cooperatividade foi igual aos sistemas contendo apenas DOPC.

Figura 8: Efeito da concentração de ADP na atividade enzimática da TNAP reconstituída em sistemas de lipossomos constituídos de DOPC em diferentes concentrações de Chol: (■) 0; (●) 10%; (▲) 25% e (▼) 36%. Inserção: Representação de Hill para interação do ADP com a enzima.

Os valores de $V_{\text{máx}}$ diminuíram (de 248,0 para 157,46 U/mg) com o incremento da concentração de Chol presente nos proteolipossomos. Em relação à eficiência catalítica para os proteolipossomos constituídos por DOPC, foi obtido o valor de $1,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, abaixo dos valores obtidos pelo proteolipossomos constituídos por DOPC:Chol 10; 25 e 36% ($1,0 \times 10^3$, $4,4 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente).

Os parâmetros cinéticos obtidos para os diferentes substratos estudados nos sistemas reconstituídos com diferentes composições de Chol e DOPC estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, ADP, PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos de DOPC com diferentes proporções de Chol.

Substrato	Parâmetros cinéticos	Proteolipossomos			
		DOPC	DOPC:Chol 10%	DOPC:Chol 25%	DOPC:Chol 36%
ATP	V _m (U/mg)	453,5	317,8	260,2	221,7
	K _{0,5} (mM)	7,77	1,75	6,04	0,43
	n	1,4	0,7	0,6	1,7
	k _{cat} /K _{0,5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	1,2x10 ²	3,6 x10 ²	8,6 x10 ¹	1,0 x10 ³
ADP	V _m (U/mg)	248,0	205,7	232,6	157,4
	K _{0,5} (mM)	4,16	0,39	1,04	1,50
	n	0,9	1,4	1,3	0,9
	k _{cat} /K _{0,5} (M ⁻¹ .s ⁻¹)	1,2 x10 ²	1,0 x10 ³	4,4 x10 ²	2,1 x10 ²
PP _i	V _m (U/mg)	808,3	1034,5	580,2	713,8
	K _{0,5} (mM)	2,17	1,77	0,19	0,29
	n	1,4	1,3	1,0	0,9
	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

Podemos observar na Tabela 4 que o substrato PP_i apresenta valor de K_{0,5} menor em relação aos demais substratos estudados. Esta característica foi observada também em sistemas constituídos por DPPC e DPPC:Chol em diferentes concentrações (Tabela 2), sugerindo que o PP_i possa ser hidrolisado preferencialmente quando em um microambiente onde todos os substratos estivessem disponíveis. Mas esta hipótese novamente precisará ser testada, pois um substrato poderia competir com o outro e isso resultar na inibição da atividade de fosfomondrolase e, conseqüentemente, redução na quantidade de fosfato produzido.

Cabe destacar que as V_{máx} de hidrólise para o substrato PP_i foram maiores em todos os sistemas de proteolipossomos estudados, independente da concentração de Chol utilizada. A maior V_{máx} de hidrólise foi observada na proporção molar de 10% de Chol. Para sistemas que hidrolisaram ATP e ADP, o aumento da concentração de Chol nos proteolipossomos causou uma diminuição nos valores de V_{máx}.

Assim como nos sistemas compostos por DPPC e DPPC:Chol, nos sistemas constituídos por DOPC e DOPC:Chol, com o aumento da concentração de Chol ocorre uma diminuição da entalpia de transição de fase. Isto é observado para a cadeia principal na transição de fase líquido-cristalino, e a pré-transição desaparece completamente quando a composição dos sistemas lipídicos atinge 50 % (em 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 % em mol (Bolean et al., 2010).

Além da diminuição da entalpia, os lipossomos constituídos por DOPC exibem uma variação considerável ($\sim 5^{\circ}\text{C}$) na T_m quando há um aumento da concentração de Chol (Bolean et al. 2010; Fritzsching et al., 2013).

Estes parâmetros termodinâmicos observados em proteolipossomos compostos por DOPC e DOPC:Chol (em diferentes concentrações) assim como DPPC e DPPC:CHOL (em diferentes concentrações) podem acarretar modificações conformacionais na TNAP, podendo modificar a disponibilidade e posicionamento de seus sítios catalíticos, devido á diferente posicionamento da glicana presente entre a cadeia peptídica e a âncora de GPI. Esta hipótese precisará ser investigada empregando-se outras técnicas, mas cabe destacar que dicroísmo circular já foi testado. Devido a baixa concentração de proteína incorporada e ao espalhamento de luz provocado pelos sistemas vesiculares, não obtivemos êxito na obtenção dos espectros.

4.3 Determinação dos parâmetros cinéticos da TNAP após tratamento com bmCD

As Metil- β -ciclodextrinas (bmCDs) são moléculas amplamente utilizadas para remoção Chol, a partir de membranas artificiais ou naturais. Estudos indicam que bmCDs podem remover Chol preferencialmente a partir da fase líquido-cristalina, ou seja, acima da temperatura de transição de fase. O processo de remoção é seletivo, quando bmCD é utilizada em torno de 800 μM . Já em concentrações elevadas (acima de 2 mM), as bmCD também podem remover fosfolipídios (Sanchez et al., 2011).

Dentro desta estratégia, os sistemas constituídos por DPPC:Chol 36% foram tratados com bmCDs para a retirada do Chol e, após o tratamento, foram feitas estudos cinéticos empregando-se os diferentes substratos fisiológicos.

O tratamento da amostra resultou na remoção de ~70% do Chol presente nos sistemas de proteolipossomos, permanecendo então 30% que correspondem a 10% (em mol) de Chol remanescente nos sistemas contendo DPPC. Isso mostra que o uso da bmCD para este sistema constituído por DPPC não foi eficaz para a total retirada de Chol. Este rendimento pode estar correlacionado com o estado de fase dos lipídios durante a remoção do Cholesterol (Stella e He, 2008). Um fator importante a ser comentado é que após o tratamento da amostra, foi observada a manutenção dos diâmetros médios dos proteolipossomos, que variaram de 175,3 para 166,3 nm sugerindo a sua estabilidade durante o tratamento.

De forma oposta à aparente manutenção dos sistemas vesiculares, a concentração da TNAP passou de 0,087 $\mu\text{g/mL}$, antes do tratamento, para 0,006 $\mu\text{g/mL}$ após o tratamento com bmCD. Associado a este fato, a avaliação do termograma do lipídio após o tratamento com bmCD, revelou um pico muito alargado e cheio de ruído (resultados não mostrados), sugerindo fortemente uma interação irreversível da bmCD com os proteolipossomos, que pode, inclusive, ser um interferente para os testes de quantificação de proteína. Deste modo, a diminuição da quantidade de proteína nos proteolipossomos tratados deve ser mais bem avaliada, bem como na interpretação dos parâmetros cinéticos da enzima, posteriormente ao uso da bmCD.

De um modo geral, as ciclo dextrinas (CDs) são usadas na extração de Chol em sistemas miméticos de monocamadas (Ohvo e Slotte, 1996), em vesículas unilamelares gigantes GUVs (Veatch e Keller, 2003, Sanches et al. 2011) e em membrana naturais (Serna et al., 2005, Domingues et al. 2009,2010). Porém, em nenhum trabalho encontrado na literatura houve uma preocupação em avaliar a interação das CDs com o sistema lipídico, tanto para membranas naturais quanto em sistemas miméticos.

As curvas de cinética de hidrólise de ATP e PP_i pela enzima reconstituída em lipossomos de DPPC:Chol tratados com bmCD é mostrada na Figura 9 e revelaram uma única curva de saturação, como nos sistemas de proteolipossomos não tratados.

Figura 9: Efeito da concentração de ATP (■) e PP_i (●) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em sistemas de lipossomos tratados com bmCD. Para maiores detalhes verificar em Materiais e Métodos. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

Os parâmetros cinéticos obtidos pela hidrólise dos substrato ATP e PP_i (Tabela 5) para proteolipossomos tratados com bmCD foram correlacionados com os valores obtidos para os protelipossomos constituídos de DPPC:Chol 10%, uma vez que o tratamento só removeu 70% do Chol existente.

O ATP apresentou valor de $V_{\text{máx}}$ (251,1 U/mg) menor quando comparado com proteolipossomo sem tratamento (732,8 U/mg). Também podemos verificar que o valor de $K_{0,5}$ (0,18 mM) foi significativamente menor em relação ao sistema não tratado (2,75 mM), nos indicando que a depleção de Chol aparentemente fez aumentar a afinidade da enzima pelo substrato. Em relação à cooperatividade, o sistema tratado com bmCD apresentou uma

cooperatividade positiva (3,0), maior que a do sistema de DPPC:Chol 10%, que se mostrou também positiva (1,9) porém menor (Tabela 2 e 5).

A remoção do Chol resultou em uma eficiência catalítica maior (cerca de 5 vezes) para os sistemas tratados em relação aos sistemas não tratados ($2,8 \times 10^3$ e $5,3 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), respectivamente.

Quando o PP_i foi estudado como substrato, os parâmetros cinéticos não seguiram o mesmo comportamento descrito para o ATP. De fato, o valor obtido para $V_{\text{máx}}$ (1368,6 U/mg) foi maior quando comparado aos proteolipossomos sem tratamento (510,8 U/mg).

Também podemos verificar que o $K_{0,5}$ (0,29 mM) foi menor em relação ao sistema não tratado (0,55 mM) e a cooperatividade aumentou de 1,1 para 3,6 (Tabela 2 e 5).

Os valores de eficiência catalítica para os sistemas tratados foram maiores (~5 vezes) em relação aos sistemas não tratados ($9,4 \times 10^3$ para $1,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), respectivamente (Tabela 5 e 2). É importante lembrar que esses resultados devem ser vistos com cuidado pois, se a bmCD permanece associada aos lipídeos e/ou interfere na quantificação da proteína, o aumento na eficiência catalítica observado para estes substratos depois do tratamento podem ser artefato (Sanchez et al., 2011).

Tabela 5: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP e PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos de DPPC:Chol, após tratamento com bmCD, que reduziu a razão molar de Chol de 36% para 10%.

Substratos	Parâmetros cinéticos	Proteolipossomos Após tratamento com bmCD
ATP	V_m (U/mg)	251,0
	$K_{0,5}$ (mM)	0,18
	n	3,0
	$k_{\text{cat}}/K_{0,5} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$2,8 \times 10^3$
PP_i	V_m (U/mg)	1368,6
	$K_{0,5}$ (mM)	0,29
	n	3,6
	$k_{\text{cat}}/K_{0,5} (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$	$9,44 \times 10^3$

Por fim, os parâmetros cinéticos dos proteolipossomos tratados com bmCD não voltaram a ser semelhantes aos parâmetros cinéticos obtidos para os sistemas DPPC:CHOL 10% ou mesmo para o sistema de DPPCChol.

Desta forma, não foi possível confirmar se o efeito causado na enzima poderia ser oriundo exclusivamente devido à presença do Chol.

Neste sentido foi planejado o estudo empregando-se um análogo estrutural do Chol para melhor compreendermos a influência destes esteróis sobre o microambiente lipídico (Ohvo e Slotte, 1996; Veatch e Keller, 2003; Serna et al., 2004).

4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos da TNAP em lipossomos constituídos por DPPC e Colestenona (Achol).

Um composto análogo ao Chol é a Colestenona (4-Cholesten-3-one), este composto se difere do Chol apenas pela substituição do grupo –OH por um grupo =O no anel A. A coexistência de uma dupla ligação no anel A e um grupo ceto resulta em um arranjo conjugado que está ausente no Chol (Figura 10).

Figura 10: Estruturas químicas do Chol e da 4-Colesten-3-ona

É importante destacar que os sistemas binários de DPPC:Achol (Benesh et al., 2014) e DPPC:Chol (Bolean et al., 2010) apresentaram comportamentos termodinâmicos muito similares, sugerindo que a troca da hidroxila pela cetona não afeta significativamente o comportamento termotrópico do lipídio majoritário na mistura (DPPC).

Avaliamos então a incorporação da TNAP em sistemas vesiculares de DPPC:Achol 36%, mantendo-os em um microambiente inerte de atmosfera de nitrogênio, para garantir a preservação e consequentemente as propriedades físico-químicas dos mesmos. Estes sistemas de proteolipossomos constituídos de DPPC:Achol 36% foram usados para os estudos das características cinéticas da enzima empregando-se os mesmos substratos estudados anteriormente.

Os diâmetros médios obtidos revelaram vesículas de 122,2 nm, relativamente menores que os sistemas de DPPC:Chol 36% (154,3 nm). Houve também uma pequena diminuição na concentração da TNAP incorporada, em relação ao sistema contendo Chol, que variou de 0,074 $\mu\text{g/mL}$ em DPPC:Achol 36%, para 0,087 $\mu\text{g/mL}$ em DPPC:Chol 36%.

Figura 11: Efeito da concentração de ATP (■) e PP_i (●) na atividade enzimática da TNAP reconstituída em sistemas de lipossomos constituídos de DPPC:Achol 36%. Inserção: Representação de Hill para a interação do substrato com a enzima.

A hidrólise de ATP e PP_i pela enzima reconstituída em lipossomos de DPPC:Achol 36% mol é mostrada na Figura 11 e, independentemente do substrato empregado, exibe uma única curva de saturação, como nos sistemas Cholcom Chol. Os parâmetros cinéticos obtidos estão resumidos na Tabela 6.

Os parâmetros cinéticos obtidos para proteolipossomos constituídos por DPPC:Achol 36 % mol, foram correlacionados com os valores obtidos para os sistemas de DPPC:Chol 36% (tabela 2) e DOPC:Chol 36% (tabela 4).

Nos protelipossomos estudados com o substrato ATP, a enzima revelou uma $V_{máx}$ de 453,5 U/mg que é menor que a obtida para os sistemas de DPPC:Chol 36% (1244,1 U/mg), porém maior que para DOPC:Chol 36% (221,1 U/mg).

Os valor de $K_{0,5}$ obtido foi de 0,19 mM, revelando uma afinidade maior para o ATP nos sistemas constituídos de DPPC:Achol 36 % mol do que para os sistemas análogos constituídos por DPPC:Chol (2,9 mM) e DOPC:Chol (1,7 mM).

O sistema se mostrou cooperativo (2,0), com comportamento similar aos sistemas constituídos por DPPC:Chol 36% (2,9) e DOPC:Chol 36% (1,7).

A eficiência catalítica, dos proteolipossomos constituído por DPPC:Achol 36% foi de $4,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para o substrato ATP, resultando em valores similares aos sistemas de comparação (Tabelas 2, 4 e 6).

Tabela 6: Parâmetros cinéticos obtidos para a hidrólise de ATP, PP_i pela TNAP reconstituída em lipossomos de DPPC:Achol 36 % .

Substrato	Parâmetros cinéticos	Proteolipossomos
		DPPC:Achol 36%
ATP	V_m (U/mg)	453,5
	$K_{0,5}$ (mM)	0,19
	n	2,0
	$k_{cat}/K_{0,5}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$4,8 \times 10^3$
PPi	V_m (U/mg)	808,3
	$K_{0,5}$ (mM)	0,16
	n	2,7
	$k_{cat}/K_{0,5}$ ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	$1,0 \times 10^4$

Em relação aos parâmetros cinéticos obtidos a partir da hidrólise do substrato PP_i , a enzima reconstituída nos sistemas com Achol apresentou valores de $V_{m\acute{a}x}$, $K_{0.5}$ e $k_{cat}/K_{0.5}$ muito similares aos sistemas contendo DPPC:Chol ou DOPC:Chol. Entretanto, a cooperatividade foi maior (Tabelas 2,4 e 6).

A presença de um grupo ceto e a dupla ligação na cadeia A, podem afetar o comportamento da membrana e consequentemente da enzima. Segundo Disalvo e colaboradores (2013), o conjunto de interações fracas menos específicas que envolvem ambos os grupos ceto na colestenoína e da hidroxila no Chol, podem se propagar para as cadeias alquílicas de lipídios e aumentar a desordem conformacional do sistema lipídico. Assim, muito provavelmente, podem afetar o comportamento da enzima através de mudanças na orientação de ligações de hidrogênio entre moléculas de água as quais podem resultar em impedimentos estéricos e/ou interferências esteroquímicas. Isso pode resultar em mudanças conformacionais na proteína que explicam as significativas mudanças nos parâmetros cinéticos obtidos. Entretanto, esta hipótese deverá ainda ser comprovada empregando-se outras técnicas tais como FTIR ou EPR (Disalvo et al., 2013).

Fatores termodinâmicos como diminuição da entalpia de transição, perda de pré-transição, presença de cargas superficiais das cabeças polares dos fosfolipídios, também podem acarretar em modificações conformacionais na TNAP, resultando em diferentes posicionamentos/aceso a seus sítios catalíticos, conforme já descrito por vários autores na literatura (Letho et al., 2002; Simão et al., 2010a; Bolean et al., 2010, 2011, 2014; Ciancaglini et al., 2012).

4.5 Estudo de propagação da biomineralização

Estudos realizados no final dos anos 1960 revelaram nanoestruturas extracelulares, chamadas de vesículas da matriz (MVs) as quais apresentam a finalidade de nucleação dos íons que formarão os cristais de hidroxiapatita, proteção dos primeiros cristais amorfos formados e direcionamento do local

específico de início da mineralização. Entretanto, até hoje existem algumas lacunas no entendimento de como as MVs apresentam esta função (Bonucci, 1967, 1970; Anderson, et al., 1995; Wuthier and Lipscomb, 2011; Mackee et al., 2013).

Os estudos aqui relatados tiveram como objetivo determinar a capacidade de protelipossomos contendo TNAP, na presença de ATP como fonte de P_i , em propagar o processo de mineralização, cuja nucleação foi iniciada utilizando-se um complexo nucleador de PS-CPLX.

Os protelipossomos utilizados foram constituídos por DPPC, DPPC:Chol 36% e DPPC:ACHol 36%.

Figura 12: Efeito da presença de protelipossomos contendo TNAP e constituídos de DPPC, DPPC:Chol 36% e DPPC:Achol 36%, na propagação de minerais a partir do nucleador PS-CPLX e ATP, incubados durante 48h, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Como se pode observar na Figura 12, a propagação dos cristais provou ser muito mais eficaz na presença de protelipossomos que continham um esterol (Chol ou Coestenona) para a formação de mineral, quando comparados com os respectivos sistemas de lipossomos.

Se correlacionarmos os parâmetros cinéticos dos sistemas utilizados com a formação de mineral, quando o ATP foi usado como fonte de P_i , podemos concluir que: a eficiência catalítica dos protelipossomos contendo Chol ($1,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) e Colestenona ($4,8 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), foi relativamente maior do que em sistemas constituídos apenas por DPPC ($5,7 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Logo, quanto maior for a eficiência catalítica espera-se uma maior produção de P_i , consequentemente, maior formação de mineral. Deste modo, os resultados obtidos para a mineralização vão de encontro aos dados obtidos por cinética.

5. Conclusão

Os sistemas constituídos por DPPC, DOPC, DPPC:Chol e DOPC:Chol mostraram similaridade em relação à hidrólise do substrato PP_i . Apresentaram maior afinidade, se comparados com os outros substratos, sugerindo que o PP_i pode ser hidrolisado preferencialmente em um microambiente onde estejam presentes todos os substratos concomitantemente. Porém, esta hipótese precisa ser comprovada já que um substrato pode competir com outro, resultando em inibição, e assim consequentemente, reduzir a formação de fosfato inorgânico produzido.

Quanto aos sistemas compostos por DPPC e Chol, podemos destacar que os sistemas constituídos com 10% de Chol, revelaram menores valores de $V_{máx}$ de hidrólise para os substratos ATP, ADP e PP_i em relação aos demais sistemas de mesma composição (mesmo contendo diferentes proporções de Chol).

Após terem sido feitos estudos cinéticos sobre a influência do Chol em sistemas miméticos, foram feitas tentativas para a retirada do Chol destes sistemas utilizando a bmCD. Porém este tratamento resultou na remoção de apenas ~70% do Chol presente nos sistemas de proteolipossomos. A permanência de 30% de Chol (em relação à quantidade inicial) corresponde a 10% em mol de Chol nos sistemas contendo DPPC. Além disso, foi constatado por DSC que provavelmente, parte da bmCD liga-se irreversivelmente aos sistemas vesiculares e isso resulta na interferência das características cinéticas encontradas após o tratamento.

Assim, como os parâmetros cinéticos, após o tratamento não voltaram a ser similares aos sistemas obtidos, tanto para DPPC:CHOL 10% quanto na ausência de Chol, não foi possível confirmar se o efeito causado na enzima poderia ser oriundo exclusivamente devido à presença do Chol.

Neste sentido, foi realizado o estudo empregando um análogo de estrutura do Chol para melhor compreendermos a influencia destes compostos sobre microambiente lipídico. A TNAP reconstituída em DPPC:Achol 36% molar, hidrolisou o ATP com uma $V_{máx}$ menor que a os sistemas constituídos por DPPC:Chol 36%, e maior do que para sistemas de DOPC:Chol 36% mol.

Os valores de $K_{0.5}$ foram menores para DPPC:Chol 36 % mol, em comparação aos sistemas análogos. Com relação à hidrólise do PP_i , os parâmetros cinéticos foram similares, em relação aos sistemas estudados contendo DPPC:Chol ou DOPC:Chol. Diante destas diferenças apresentadas uma explicação pode ser sugerida com base a presença de um grupo ceto e a dupla ligação na cadeia da colestenoína. Assim, os parâmetros termodinâmicos como a diminuição da entalpia de transição, perda de pré-transição, presença de cargas superficiais, bem como orientações das ligações de hidrogênio com a molécula de água, podem acarretar modificações conformacionais na TNAP.

A mineralização foi ~4 vezes mais eficaz na presença de protelipossomos que continham Chol ou colestenoína, do que para o sistema somente constituído por DPPC, e 16 vezes mais eficientes do que seus respectivos sistemas de lipossomos (ausência de enzima).

Esta abordagem de reconstituição da TNAP em lipossomos e estudos cinéticos é inédita e de difícil comparação, devido à falta de estudos similares na literatura. Estes dados confirmam a importância do microambiente lipídico na interação da proteína com a membrana, mesmo para proteínas que não são integrais e que apresentam âncora de GPI.

A relevância dos resultados aqui apresentados nos incentiva à continuidade de tais estudos, aumentando a complexidade da membrana dos sistemas, que possam mimetizar com mais similaridade as MVs, contribuindo assim no entendimento da função dos lipídios e suas interações com as proteínas presentes no processo de biomineralização.

6- Referências Bibliográficas:

- Anderson, H.C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 314: 266-280.
- Anderson, H.C.; Sipe, J.B.; Hesse, L.; Dharmamraju, R.; Atti, E.; Camacho, N.P. and Millán, J.L. (2004) Impaired calcification around matrix vesicles of growth plate and bone in alkaline phosphatase-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 164: 841-847.
- Angrand, M.; Briolay, A.; Ronzon, F. and Roux, B. (1997) Detergent-mediated reconstitution of a glycosyl-phosphatidylinositol-protein into liposomes. *Eur. J. Biochem.* 250: 168-176.
- Balcerzak, M.; Hamade, E.; Zhang, L.; Pikula, S.; Azzar, G.; Radisson, J.; Bendorowicz-Pikula, J.; Buchet, R. (2003) The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta. Biochim. Pol.* 50(4): 1019-1038.
- Barenholz, Y. and Gatt, S. (Eds.) (1999) Sphingomyelin: Chemistry, Biophysics, Metabolism, Genetics and Signalling, *Chem. Phys. Lipids.* 102, 102(1-2): 29-34.
- Barenholz, Y. (2002) Cholesterol and other membrane active sterols: from membrane evolution to "rafts". *Prog. Lipid. Res.* 41: 1-5.
- Beck, G.R.; Zerler, B. and Moran, E. (2000) Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 8352-8357.
- Benesh, G.K.M.; Mannock, D.A.; Lewis, N.A.H.R.; McElhaney, N. R. (2014) A DSC and FTIR spectroscopic study of the effects of the epimeric 4-cholesten-3-ols and 4-cholesten-3-one on the thermotropic phase behaviour and organization of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer membranes: Comparison with their 5-cholesten analogues. *Chem. Phys. Lip.* 177: 71– 90.
- Blandford, N.R.; Sauer, G.R.; Genge, B.R.; Wu, L.N.; Wuthier, R.E. (2003) Modeling of matrix vesicle biomineralization using large unilamellar vesicles. *J. Inorg. Biochem.* 94(1-2): 14-27.
- Blumenthal, N.C. (1989) Mechanism of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 247: 279- 289.

- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Favarin, B.Z.; Millán, J.L.; Ciancaglini, P. (2010) The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes. *Biophys. Chem.* 152: 74-79.
- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Favarin, B.Z.; Millán, J.L.; Ciancaglini, P. (2011) Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase, *Biophys. Chem.* 158: 111-118.
- Bolean, M.; Simão, A.M.S.; Kiffer-Moreira, T.; Hoylaerts, M.; Millan, J.L.; Itri, R.; Ciancaglini, P. (2014) Proteoliposomes harboring Annexin V and Alkaline Phosphatase with the ability to transport Ca^{2+} into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface, *J. Phys. Chem.* (submetido).
- Bonucci, E. (1967) Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20(1): 33-50.
- Bonucci, E.; Ascenzi, A.; Vittur, F.; Pugliarello, M.C.; De Bernard, B. (1970) Density of osteoid tissue and osteones at different degree of calcification. *Calcif. Tissue Res.* 5(2): 100-107.
- Boyan, B.D.; Schwartz, Z.; Swain, L.D. and Khare, A. (1989) Role of lipids in calcification of cartilage. *Anat. Rec.* 224: 211-219.
- Brown, R.E. (1998) Sphingolipid organization in biomembranes: What physical studies of model membranes reveal. *J. Cell Sci.* 111: 1-9.
- Brown, D.A. and London, E. (2000) Structure and Function of Sphingolipid- and Cholesterol-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
- Brown, D.A. and Rose, J.K. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544.
- Camolezi, F.L.; Daghastanli, K.P.R.; Magalhães, P.P.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1282: 1-11.
- Chang, G.G and Shiao, S.L. (1994) Possible kinetic mechanism of human placental alkaline phosphatase in vivo as implemented in reverse micelles. *Eur. J. Biochem.* 220: 861-870.
- Ciancaglini P.; Simão, A.M.S.; Camolezi, F.L.; Millán, J.L. and Pizauro, J.M. (2006) Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39(5): 603-610.

- Ciancaglini, P.; Yadav, M. C.; Simão, A. M. S.; Narisawa, S.; Pizauro, J. M.; Farquharson, C.; Hoylaerts, M.F. and Millán, J.L. (2010) Kinetic Analysis of Substrate Utilization by Native and TNAP-, NPP1- or PHOSPHO1-Deficient Matrix Vesicles. *J. Bone Miner. Res.* pp. 1-37.
- Ciancaglini, P.; Simão, A.M.S.; Bolean, M.; Millán, J.L.; Rigos, C.F.; Yoneda, J. S.; Colhone, M.C.; Stabeli, R. G. (2012). Proteoliposomes in nanobiotechnology. *Biophys. Review*, 4: 67-81.
- Cyboron, G.W. and Wuthier, R.E. (1981) Purification and initial characterization of intrinsic membrane-bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 256: 7262-7268.
- Daghastanli, K.R.; Ferreira, R.B.; Thedei, G.Jr.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2004) Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 36: 127-137.
- de Lima Santos, H.; Lopes, M.L.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2005) Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 41: 239-248.
- Demel, R.A.; De Kruffy, B. (1976) The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 457(2): 109-132.
- Dietrich, C.; Bagatolli, L.A.; Volovyk, Z.N.; Thompson, N.L.; Levi, M.; Jacobson, K. and Gratton, E. (2001) Lipid Rafts Reconstituted in Model Membranes. *Biophys. J.* 8: 1417-1428.
- Disalvo, E.A.; Hollmann, A.; Semorile, L.; Martini, M.F.; (2013) Evaluation of the Defay-Prigogine model for the membrane interphase in relation to biological response in membrane-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1828(8): 1834-1839.
- Eanes, E.D. and Hailer, A.W. (1985) Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif. Tissue Int.* 37: 390-394.
- Engberts, J.B.; Hoekstra, D.; van der Woude, I.; Wagenaar, A.; Meekel, A.A.; ter Beest, M.B.; Ruiters, M.H.; (1997) Novel pyridinium surfactants for efficient, nontoxic in vitro gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(4): 1160-1165.
- Ferguson MA. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contribution of trypanosome research. *J. Cell. Sci.* 112: 2799–2809.

- Finegold, S.M.; Jousimies-Somer, H.R.; Wexler, H.M. (1993) Current perspectives on anaerobic infections: diagnostic approaches. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 7(2): 257-75.
- Freemont, A. J. (1993) Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Path.* 74: 411-416.
- Fritzsche, K.J.; Kim, J.; Holland, G.P. (2013) 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* 1828(8): 1889-1898.
- Garimella, R.; Bi, X.; Anderson, H.C.; Camacho, N.P. (2006) Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study. *Bone* 38: 811-817.
- Genge, B.R.; Wu, L.N.; Wuthier, R.E. (2007) In vitro modeling of matrix vesicle nucleation: synergistic stimulation of mineral formation by annexin A5 and phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 282(36): 26035-26045.
- Giocondi, M.C.; Besson, F.; Dosset, P.; Milhiet, P.E. and Grmellec, C.L. (2007) Remodeling of ordered membrane domains by GPI-anchored intestinal alkaline phosphatase. *Langmuir* 23: 9358-9364.
- Golub, E.E. (2009) Role of matrix vesicles in biomineralization, *Biochim. Biophys. Acta* 1790: 1592–1598.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.
- Hessle, L.; Johnson, K.A.; Anderson, H.C.; Narisawa, S.; Sali, A.; Goding, J.W.; Terkeltaub, R. and Millán, J.L. (2002) Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 9445-9449.
- Higgins, G. (1987) *Biological Membranes. Practical approach series* (Findlay J.B.C. and Evans W.H. Editors) IRL Press Oxford - Washington D.C. (W.H. Editors) IRL Press Oxford - Washington D.C. 104-137.
- Houston, B.; Stewart, A.J. Farquharson, C. (2004) PHOSPHO1-A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralization in bone and cartilage. *Bone* 34: 629-637.

- Hsu, H.H.T and Anderson, H.C. (1986) The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *Int. J. Biochem.* 18: 1141-1146.
- Hsu, H.H.T. and Anderson, H.C. (1995) A role for ATPase in the mechanisms of ATPdependent Ca and phosphate deposition by Isolated rachitic matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 27: 1349-1356.
- Ierardi, D.F.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. (2002) Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1567: 183-192.
- Kiffer-Moreira, T.; Sheen, C.R.; Gasque, K.C.; Bolean, M.; Ciancaglini, P.; van Elsas, A.; Hoylaerts, M.F.; Millán, J.L. (2014) Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. *PLoS One*. 9(2):e89374.
- Kirsch, T. and Wuthier, R.E. (1994) Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. *J. Biol. Chem.* 269: 11462-11469.
- Ladbrooke, B.D.; Jenkinson, T.J.; Kamat, V.B.; Chapman, D. (1968) Physical studies of myelin. I. Thermal analysis. *Biochem. Biophys. Acta* 164(1): 101-109.
- Lange, Y.; Swaisgood, M.H.; Ramos, B.V.; Steck, T.L. (1989) Plasma membranes contain half the phospholipid and 90% of the cholesterol and sphingomyelin in cultured human fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 264: 3786–3793.
- Le Du, M.H. and Millán, J.L. (2002) Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J. Biol. Chem.* 277: 49808-49814.
- Leone, F.A.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (1997a) Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. *Trends Compar. Biochem. Physiol.* 3: 57-73.
- Leone, F.A.; Baranauskas J.A.; Furriel R.P.M.; Borin I.A. (2005) SigrafW: An easy-touse program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Mol. Educ.* 33: 399–403.
- Lehto, M.T.; Sharom, F.J.(2002) Proximity of the protein moiety of a GPI-anchored protein to the membrane surface: a FRET study. *Biochem.* 41(26): 8368-8376.

- Lichtenberg, F.R.(2005) Pharmaceutical innovation and the burden of disease in developing and developed countries. *J. Med. Philos.* 30(6): 663-690.
- Lingwood, D.; Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* 327(5961): 46-50.
- Liscum, L.; Munn, N.J. (1999) Intracellular cholesterol transport. *Biochem. Biophys. Acta* 1438(1): 19-37.
- López Cascales, J.J.; Otero, T.F.; Fernandez Romero, A.J.; Camacho, L.(2006) Phase transition of a DPPC bilayer induced by an external surface pressure: from bilayer to monolayer behavior. a molecular dynamics simulation study. *Langmuir* 22(13): 5818-5824.
- Low, M.G. (1989). The glycosyl-phosphatidylinositol anchor of membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 988: 427–454.
- McKee, M.D.; Hoac, B.; Addison, W.N.; Barros, N.M.; Millán, J.L.; Chaussain, C. (2013) Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia. *Periodontol* 2000. 63(1): 102-122.
- Lowe, M.K.; Strauss, A.W.; Alpers, R. and Seetharam, S. (1990) Molecular clone and expression of cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 1037: 170-177.
- McMullen, T.P.; Wong, B.C.; Tham, E.L.; Lewis, R.N.; McElhaney, R.N. (1996) Differential scanning calorimetric study of the interaction of cholesterol with the major lipids of the *Acholeplasma laidlawii* B membrane. *Biochemistry* 35(51): 16789-16798.
- McMullen, T.P.; Lewis, R.N.; McElhaney, R.N. (1993) Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochem.* 32(2): 516-522.
- Meyer, J.L. (1984) Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch. Biochem. Biophys.* 231: 1-8.
- Milhiet, P.E.; Giocondi, M.C.; Baghdadi, O.; Ronzon, F.; Roux, B. and Le Grimellec, C. (2002) Spontaneous insertion and partitioning of alkaline phosphatase into model lipid rafts. *EMBO report* 3: 485-490.

- Millán, J.L. (2006) In: Mammalian Alkaline Phosphatase: From Biology to applications in Medicine and Biotechnology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Millan, J. (2012) The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. *Calcif. Tissue Int.* 93(4): 299-306.
- Morandat, S.; Bortolato, M.; Roux, Bernard (2002) Cholesterol-dependent insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1564: 473-478.
- Nakamura, T.; Nakamura, K. and Stinson, R.A. (1988) Release of alkaline phosphatase from human osteosarcoma cell by phosphatidylinositol phospholipase C: effect of tunicamycin. *Arch. Biochem. Biophys.* 265: 190-196.
- McKean, M.L.; Nes, W.R. (1977) Delayed conversion of squalene to sterols during development of *Pinus pinea* seeds. *Lipids* (4): 382-385.
- Nosjean, O.; Roux, B. (1999) Ectoplasmic insertion of glycosylphosphatidylinositol-anchored protein in glycosphingolipid-and cholesterol-containing phosphatidylcholine vesicles. *Eur. J. Biochem.* 263: 865-870.
- Ohvo, H.; Slotte, J.P. (1996) Cyclodextrin-mediated removal of sterols from monolayers: effects of sterol structure and phospholipids on desorption rate. *Biochemistry* 35(24): 8018-8024.
- Pizauro, J.M.; Curti, C.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1987) Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 921-926.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1993) Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Acta* 1202: 22-28.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone, F.A. (1994) Osseous plate alkaline phosphatase is anchored by GPI. *Braz. J. Med. Res.* 27: 453-456.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1995) Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Molecular and Cel. Biochem.* 152: 121-129.
- Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. and Macari, M. (2002) Tibial Dyschondroplasia : mechanisms of the lesion and control. *Poul. Sci.* 3: 169-185.

- Ramstedt, B. and Slotte J.P. (1999) Comparison of the Biophysical Properties of Racemic and d-Erythro-N-Acyl Sphingomyelins *Biophys. J.* 77: 1498–1506.
- Rezende, A.A.; Pizauro J.M.; Ciancaglini, P. and Leone F.A. (1998) Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cel. Mol. Biol.* 44: 293-302.
- Roberts, S.J.; Stewart, A.J.; Sadler, P.J. and Farquharson, C. (2004) Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities. *Biochem. J.* 382: 59-65.
- Ronzon, F.; Morandat, S.; Roux, B. and Bortolato, M. (2004) Insertion of a glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme into liposomes. *J. Membr. Biol.* 197: 169-177.
- Sanchez, A. S.; Gunther, G.; Tricerri, M. A.; Gratton, E. (2011) Methyl- β -Cyclodextrins Preferentially Remove Cholesterol from the Liquid Disordered Phase in Giant Unilamellar Vesicles. *J. Memb. Biol.* 241: 1–10.
- Santos, N.C.; Castanho, M.A. (1996) Teaching light scattering spectroscopy: the dimension and shape of tobacco mosaic virus. *Biophys. J.* 71(3): 1641-1650.
- Sela, J.; Gross, U.M.; Kohavi, D.; Shani, J.; Dean, D.D.; Boyan, B.D. and Schwartz, Z. (2000) Primary mineralization at the surfaces of implants. *Critical Reviews in Oral Biol. and Med.* 11: 423-436.
- Serna, L.; Di Marino, A.; Mendicuti, F. (2005) Inclusion complexes of a bichromophoric diester containing anthracene and naphthalene groups with α - and β -cyclodextrins: thermodynamics and molecular mechanics. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 61(8): 1945-1954.
- Sesana, S.; RE, F.; Bulbarelli, A.; Salerno, D.; Cazzaniga, E.; Masserini, M. (2008) Membrane features and activity of GPI-anchored enzymes: Alkaline phosphatase reconstituted in model membranes. *Biochem.* 47: 5433-5440.
- Simão, A.M.S.; Beloti, M.M.; Cezarino, R.M.; Rosa, A.L.; Pizauro, J.M. and Ciancaglini, P. (2007) Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146: 679-687.

- Simão, A.M.S.; Yadav, M.C.; Ciancaglini, P.; Millan, J.L. (2010a) Proteoliposomes as matrix vesicles' biomimetics to study the initiation of skeletal mineralization. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43: 234-241.
- Simão, A.M.S.; Yadav, M.C.; Ciancaglini, P.; Narisawa, S.; Bolean, M.; Pizauro, J. M.; Hoylaerts, M. F.; and Millán, J.L. (2010b) Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicles biomimetics *J. Biol. Chem.* 285: 75980-77609.
- Simão, A.M.; Bolean, M.; Hoylaerts, M.F.; Millán, J.L; Ciancaglini P. (2013) Effects of pH on the Production of Phosphate and Pyrophosphate by Matrix Vesicles' Biomimetics. *Calcif. Tissue Int.* 93: 222–232.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Stella, V.J.; He, Q. (2008) Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 36(1): 30-42.
- Hinz, H.J.; Sturtevant, J.M. (1972) Calorimetric investigation of the influence of cholesterol on the transition properties of bilayers formed from synthetic L- - lecithins in aqueous suspension. *J. Biol. Chem.* 247(11): 3697-3700.
- Thouverey, C., Strzelecka-Kiliszek, A.; Belcerzak, M.; Buchet, R. and Pikula, S. (2009) Matrix vesicles originate from apical membrane microvilli of mineralizing osteoblast-like Saos-2 cells. *J. Cel. Biochem.* 106: 127-138.
- Veatch, S.L.; Keller, S.L. (2003) Separation of liquid phases in giant vesicles of ternary mixtures of phospholipids and cholesterol. *Biophys. J.* 85(5): 3074-3083.
- Vist, M.R.; Davis, J.H. (1990) Phase equilibria of cholesterol/ dipalmitoyl-phosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry* 29(2): 451-464.
- Wuthier, R.E.; Lipscomb, G.F. (2011) Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 16: 2812-2902.
- Wuthier, R.E.; Chin, J.E.; Hole, J.E.; Register, T.C.; Laura, Y.H. and Ishikawa, Y. (1985) Isolation and characterization of calcium accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.* 260: 15972-15979.

- Yeagle, P.L.; Young, J.; Rice, D. (1988) Effects of cholesterol on (Na⁺,K⁺)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 27(17): 6449-6452.
- Zeljka, K. and Kenworthy, A.K. (2008) Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *NIH Publicm. Accessm. Neuropharmacology*. 55(8): 1265-1273.
- Zhang, L.; Balcerzak, M.; Radisson, J.; Thouverey, C.; Pikula, S.; Azzar, G. and Buchet, R. (2005) Phosphodiesterase activity of alkaline phosphatase in ATP-initiated Ca²⁺ and phosphate deposition in isolated chicken matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 280: 37289-37296.