



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Perfil da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular em células osteoblásticas

Fernanda Magalhães Correa Muniz

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

2008



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Perfil da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular em células osteoblásticas

Fernanda Magalhães Correa Muniz

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglioni

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

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Muniz, Fernanda Magalhães Correa

Perfil da proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular em células osteoblásticas. Ribeirão Preto, 2008.

p.75

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

Orientador: Ciancaglini, Pietro

1. Fosfatase ácida 2. Proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular 3. Osteoblastos 4. Caracterização cinética

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pela orientação, companheirismo, cumplicidade e amizade.

A todos os amigos do laboratório que colaboraram compartilhando conhecimento e experiências.

Ao Prof Dr. José Mauro Granjeiro do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Faculdade Federal do Rio de Janeiro por fornecer a idéia central deste projeto.

Ao Laboratório de Cultura de Células do Prof. Dr. Luis Adalberto Rosa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto por dar todo suporte fundamental para a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que participaram direta ou indiretamente e contribuíram para a execução deste mestrado.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Lista de abreviaturas e siglas..... | 6 |
| Resumo..... | 7 |
| Abstract..... | 9 |
| 1. Introdução | |
| 1.1 Aspectos gerais..... | 11 |
| 1.2 Patologias..... | 13 |
| 1.3 Proteínas tirosina fosfatases..... | 15 |
| 1.3.1 Estrutura..... | 15 |
| 1.3.2 Mecanismo catalítico..... | 16 |
| 1.3.3 Classificação..... | 17 |
| 1.4 Biomineralização..... | 19 |
| 1.4.1 Tecido ósseo..... | 19 |
| 1.4.2 Características anatômicas de ossos longos..... | 20 |
| 1.4.3 Formação óssea..... | 21 |
| 1.5 Reação de polimerase em cadeia em tempo real..... | 24 |
| 1.6 Superfície de titânio..... | 25 |
| 2. Objetivos..... | 27 |
| 3. Material e Métodos | |
| 3.1 Obtenção e cultura de células de medula óssea de ratos..... | 28 |
| 3.1.1 Isolamento por lavagem..... | 28 |
| 3.1.2 Isolamento por aspiração da medula óssea do rato..... | 28 |

| | | |
|----------------------------------|---|----|
| 3.2 | Cultura de células extraídas da medula óssea de ratos..... | 29 |
| 3.3 | Obtenção da fase solúvel livre de frações de membrana..... | 29 |
| 3.4 | Dosagem de proteína..... | 30 |
| 3.5 | Determinação da atividade da PTP-BMr em células osteoblásticas..... | 30 |
| 3.6 | Tripsinização de células do frasco de cultivo..... | 31 |
| 3.7 | Reação de polimerase em cadeia em tempo real..... | 32 |
| 3.7.1 | Extração do RNAm e síntese do DNA complementar (cDNA)..... | 32 |
| 3.7.2 | Quantificação do RNA mensageiro (RNAm) através de reações de polimerase em cadeia em tempo real..... | 33 |
| 3.8 | Caracterização bioquímica e cinética..... | 35 |
| 3.8.1 | Eletroforese em gel de poliacilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)..... | 35 |
| 3.8.2 | Atividade em gel de poliacrilamida..... | 35 |
| 3.8.3 | Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da amostra extraída do gel de atividade..... | 36 |
| 3.8.4 | Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida..... | 36 |
| 3.8.5 | Análise da inibição relativa..... | 37 |
| 3.8.6 | Determinação de parâmetros cinéticos..... | 37 |
| 3.9 | Determinação da atividade PNFFase da PTP-BMr em superfície de titânio..... | 38 |
| 4. Resultados e Discussão | | |
| 4.1 | Metodologias de extração e cultivo de células..... | 39 |
| 4.1.1 | Cultura de células..... | 39 |
| 4.1.2 | Subculturas..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 4.2 Obtenção de fosfatase ácida (PTP-BMr)..... | 46 |
| 4.3 Reação de polimerase em cadeia em tempo real..... | 47 |
| 4.4 Caracterização bioquímica e cinética..... | 52 |
| 4.4.1 Géis de eletroforese..... | 52 |
| 4.4.2 Estudo do pH ótimo de hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr..... | 54 |
| 4.4.3 Inibição relativa da PTP-BMr..... | 56 |
| 4.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos..... | 58 |
| 5. Titânio..... | 60 |
| 6. Conclusão..... | 65 |
| 7. Bibliografia..... | 66 |

Lista de abreviaturas e siglas

AE: atividade enzimática específica

cDNA: DNA complementar

Ct: cycle threshold

DNA: ácido desoxiribonucléico

EGF: epidermal growth factor

ESO: extrato solúvel de osteoblasto

FAT: fosfatase ácida total

$K_{0,5}$: Constante de Michaelis Menten

Mes: Ácido 2-[N-morfolino]etanosulfônico

n: Coeficiente de Hill

MTS: meio total suplementado

PAP: prostatic acid phosphatase

PBS: buffer sodium phosphate

PCR: reação de polimerase em cadeia

PDGF: platelet derived growth factor

p-HMB: p-hidroximercuribenzoato

p-NFF: p-nitrofenilfosfato

PTK: proteína tirosina quinase

PTP: proteína tirosina fosfatase

PTP-BMr: proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular

PTP-LMW: low molecular weight protein tyrosine phosphatase

PTP-OST: proteína tirosina fosfatase osteotesticular

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RTK: receptor tirosina quinase

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

U: Unidade de atividade enzimática (nmol/min)

Resumo

Eventos como fosforilação e desfosforilação estão presentes nos processos de crescimento e diferenciação celular. As proteínas tirosina fosfatases estão envolvidas nestes processos. Estas enzimas são encontradas em animais, plantas e ocorrem em diversas formas, diferindo no peso molecular, substrato específico e sensibilidade a inibidores.

As enzimas que possuem baixo peso molecular (entre 18-20 KDa), hidrolisam p-nitrofenilfosfato e são sensíveis ao p-hidroximercuribenzoato são chamadas como proteínas tirosina fosfatases de baixo peso molecular relativo (PTP-BMr) ou fosfatases ácidas.

Vários dados sugerem que tipos de células de osso, como osteoblastos, podem expressar esta enzima ativa. Aqui, culturas de osteoblastos derivadas da medula removida do fêmur de rato foram investigadas para padronizar a metodologia de obtenção da PTP-BMr. A expressão e atividade catalítica desta enzima em diferentes estágios de crescimento de osteoblastos também foram verificadas. Foi observado que são necessários de 16-19 dias de cultura para obter maiores níveis de atividade da PTP-BMr em extrato citoplasmático.

O nível de expressão do gene da PTP-BMr foi determinado por PCR em tempo real e uma maior quantificação de RNAm foi obtida em 16 dias de crescimento de osteoblasto.

A caracterização bioquímica parcial confirma uma banda de atividade em gel de poliacrilamida com peso molecular de 17,6 KDa, e pH ótimo de 5,5. A hidrólise do p-nitrofenilfosfato demonstra uma pequena cooperatividade relativa ($n=1,2$) com $K_{0,5}= 0,12$ e $V_{max}= 3,5U/mg$. Esta atividade foi fortemente inibida (60 a 75%) por molibdato de amônio (10mM); fosfato de sódio (10mM); ortovanadato de sódio (10 μ M) e p-hidroximercuribenzoato de sódio (10mM). Estas propriedades são típicas desta classe.

A interação entre osteoblastos e diferentes superfícies pode ativar ou desativar genes. Este presente projeto investigou se a interação com superfície de titânio pode modificar o perfil de atividade da PTP-BMr.

Quando em presença de uma superfície de titânio há um maior aumento na atividade catalítica do que nos níveis de RNAm da PTP-BMr o que sugere uma estimulação da enzima a qual pode estar auxiliando no processo de formação óssea.

Abstract

Events as phosphorylation and desphosphorylation are experienced in cell growth and differentiation processes. Tyrosine phosphatases proteins are involved in these processes. These enzymes are found in animals, plants and occur in multiple forms, differing in relative molecular weight, substrate specificity and sensitivity to inhibitors.

The enzymes that have low molecular weight (between 18-20KDa), hydrolyze p-nitrophenylphosphate and are sensible to p-hydroximercuribenzoate are known as low molecular weight relative tyrosine phosphatase proteins (PTP-LMWr) or acid phosphatase.

Several data suggest that bone cell types, such as osteoblasts, may express this enzyme activity. Here, osteoblast cultures derived from medulla removed from rat femur were investigated to standardize the methodology of PTP-LMW obtainment. The expression and the catalytic activity of this protein in different stages of osteoblast growth were checked as well. It was observed that 16-19 culture days are necessary to obtain greater levels of activity of PTP-LMW in the cytoplasmatic extracts.

The gene expression level of PTP-LMW was determined by quantitative real-time PCR, and a greater quantity of mRNA was observed within sixteen days of osteoblast growth.

The partial biochemistry characterization confirms a single active band in polyacrilamide gel with molecular weight of about 17.6KDa, and a pH-optimum around 5.5. p-nitrophenylphosphate hydrolysis shows a small cooperative behavior ($n=1.2$) with $K_{0.5}=0.12\text{mM}$ and $V_{\text{max}}=3.5\text{U/mg}$. This activity was strongly inhibited (about 60-95%) by ammonium molybdate (10mM); sodium phosphate (10mM); sodium orthovanadate (10 μM) and sodium p-hydroximercuribenzoate (10mM). These properties are typical for this enzyme class.

The interaction between osteoblast and different surfaces can activate or deactivate genes. This present project investigated if the interactions with titanium surface can modify the profile of the PTPs-LMW's activity.

Experiments demonstrated growth in both enzymatic activity and gene expression level of PTP-LMW. Therefore, the presence of the titanium surface stimulated the production of the PTP-LMW and helped in the process of bone formation.

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais

Muitas vias de sinalização são reguladas por fosforilação e desfosforilação de proteínas. A adição ou remoção de um radical fosfato, a uma proteína resulta na alteração da sua conformação espacial (estrutura terciária). Logo, a adição desta carga eletronegativa promove a modificação da função da proteína, podendo, ativá-la ou desativá-la (Queiroz, 2000).

As proteínas tirosina quinases (PTKs) e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são mediadores essenciais da regulação celular, mantendo um nível estável de proteínas fosforiladas em tirosina, influenciando, deste modo, o estado funcional da célula (Morrison et al., 2000).

As PTKs catalisam a fosforilação de resíduos de tirosina, enquanto as PTPs são hidrolases que utilizam como substrato fosfomonoésteres. O balanço entre fosforilação e desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares como hormônios, mitógenos, carcinógeno, citocinas, neurotransmissores, substâncias ou metabólitos tóxicos ou por sistemas de mensageiro secundário (Aoyama et al., 2003).

A regulação dinâmica do controle da proliferação celular necessita de um efeito recíproco entre PTKs e PTPs específicas para que se estabeleça o equilíbrio na atividade destas duas enzimas através de suas ações opostas (Chengalvala et al., 2001).

A adição ou remoção de um grupamento fosfato de uma proteína pode gerar um reconhecimento para interação proteína-proteína e, o mais importante, modular a atividade de enzimas (Aoyama et al., 2003).

Nas vias de sinalização reguladas por fosforilação e desfosforilação de proteínas, PTKs, PTPs e seus substratos correspondentes, são integrados em vias de sinalização de processos de transdução de sinal que são essenciais para a regulação do crescimento celular, diferenciação, metabolismo, ciclo

celular, comunicação célula-célula, migração celular, transcrição de gene, atividade de canal iônico e resposta imune (Zhang, 2001).

Portanto, as proteínas tirosina quinases (PTKs) e as proteínas tirosina fosfatases (PTPs) são mediadores essenciais da regulação celular, mantendo um nível estável de proteínas fosforiladas em tirosina, influenciando, deste modo, o estado funcional da célula e participando do controle da ativação, proliferação e diferenciação celular (Krebs, 1996; Mauro et al., 1996; Hunter, 1998; Morrison e Mauro, 2000; Chiarugi et al., 2005).

1.2 Patologias

Defeitos ou alterações das vias de sinalização que envolvem PTPs e PTKs levam à fosforilação inapropriada o que contribui para o desenvolvimento de muitas doenças, incluindo câncer, diabetes, inflamação e doenças neurodegenerativas (Zhang, 2001, 2002; Zhang et al., 2002; Cheng et al., 2002; Van Huijsduijnen et al., 2002; Chiarugi et al., 2004; Malentacchi et al., 2005; Maccari et al., 2007; Pandey et al., 2007).

A desregulação no balanço da fosforilação leva à transformação celular. A PTEN (uma PTP) tem sido identificada como uma proteína supressora de tumores, ela atua inibindo a fosforilação de quinases ativadas por fatores de crescimento (Hlobilková et al., 2003).

Em uma transformação oncogênica ou estimulação de fatores de crescimento o nível de proteínas fosforiladas em tirosina aumenta de 1 a 2% (Aoyama et al., 2003). Algumas PTP-BMr são marcadores tumorais, macromoléculas presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, cujo aparecimento e/ou alterações em suas concentrações estão relacionados com a gênese e o crescimento de tumores. A fosfatase ácida prostática (PAP) foi o primeiro marcador tumoral a ser utilizado no câncer de próstata. Os níveis sanguíneos da PAP são normais nos tumores localizados e tendem a se elevar quando a doença está fora dos limites da próstata (metástase) (Almeida et al., 2007).

O receptor de insulina pertence a uma família de receptores de fatores de crescimento que têm atividade tirosina intrínseca. Após a ligação da insulina, o receptor sofre autofosforilação em múltiplos resíduos de tirosina. Isto resulta na ativação do receptor da quinase e conseqüentemente fosforilação em tirosina de uma família de substratos do receptor de insulina. De forma similar a outros fatores de crescimento, a insulina usa a fosforilação e interações proteína-proteína como ferramenta essencial para transmitir o sinal do receptor em direção ao efeito celular final, tais como translocação de vesículas contendo transportadores de glicose do “pool” celular para a membrana plasmática,

ativação da síntese de glicogênio e de proteínas, e transcrição de genes específicos (Carvalho et al., 2002; Bottini et al., 2002).

A ação da insulina é atenuada por proteínas tirosina fosfatases que catalisam a rápida desfosforilação do receptor de insulina e de seus substratos o que leva a um “*feedback*” negativo na sinalização insulínica e podem provocar resistência à insulina (Carvalho et al., 2002; Bottini et al., 2002). A fosforilação em tirosina é crítica para a absorção de glicose e para o metabolismo em tecidos sensíveis à insulina (Nystrom e Quon, 1999; Cheng et al., 2002; Johnson et al., 2002; Van Huijsduijnen et al., 2002; Pandey et al., 2007).

Nos linfócitos, as proteínas fosfatases têm auxiliado na elucidação de vários eventos celulares dependentes de fosforilação e desfosforilação como a ativação destas células provocadas por diversos efetores extracelulares. Os leucócitos expressam uma grande variedade de proteínas fosfatases citosólicas e transmembranares. Os linfócitos apresentam duas importantes proteínas fosfatases que participam de respostas imunes que são a CD45 (antígeno comum leucocitário) e a PP2B (calcineurina), importantes na ativação linfocitária. Elas participam da transdução de sinal que culmina com a produção de IL-2 que é uma importante citocina na proliferação dos linfócitos (Brito et al., 2005; Bottini et al., 2002).

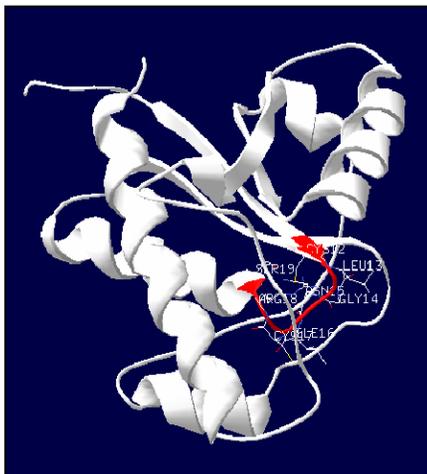
Estudos recentes sobre o mal de Alzheimer tem demonstrado relações com fosforilações inapropriadas devidas alteração na atividade de PTPs e/ou PTKs. Eles sugerem que a redução na atividade da PTP-BMr pode estar relacionada com o fosforilação aberrante no paciente com mal de Alzheimer (Shimohama, 2004).

As PTPs representam um novo alvo molecular para o desenvolvimento de medicamentos. A inibição de PTPs específicas pode ser usada na medicina para o tratamento e cura de doenças (Zhang, 2001).

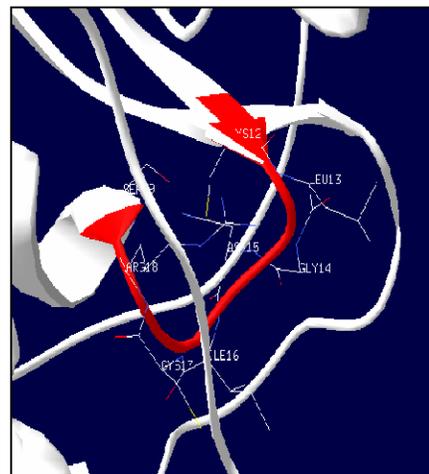
1.3 Proteínas tirosina fosfatases (PTPs)

1.3.1 Estrutura

As Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) constituem uma superfamília composta por mais de 70 enzimas que, apesar de apresentarem pouca homologia entre seus membros (Fauman e Saper 1996; Zabell et al., 2006), compartilham uma seqüência padrão de aminoácidos no sítio ativo constituída por uma cisteína e uma arginina, separadas por cinco resíduos de aminoácidos e abreviadas como CX₅R, onde X pode ser qualquer aminoácido. Todas as PTPs possuem mecanismo catalítico idêntico (Chiarugi et al., 2000), com resíduos de aminoácidos do sítio ativo localizado no fundo de uma bolsa, circundado pelos diferentes resíduos de aminoácidos que são responsáveis por suas propriedades cinéticas características e especificidade por seus diferentes substratos (Jia et al., 1995; Granjeiro et al., 2002).



a



b

a)-sítio ativo HPTP- B, uma PTP-BMr humana b)-seqüência de aminoácidos característica (Zabell et al., 2005).

1.3.2 Mecanismo catalítico

Estudos cinéticos, mutação sítio dirigida e identificação das estruturas das PTPs permitiram identificar a cisteína, arginina e a asparagina como resíduos extremamente importantes para a catálise. A cisteína atua como nucleófilo na formação de um intermediário tiofosforil. O resíduo de arginina tem a função de se ligar ao substrato, estabilizando o estado de transição. Tanto a etapa de formação do complexo fosfoenzima, quanto a sua hidrólise são auxiliadas pelo ácido aspártico presente no sítio ativo (Zabell et al., 2006; Aoyama et al., 2003).

A presença da cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das PTPs que é de serem inibidas pelo pervanadato, p-hidroximercuribenzoato e outros agentes oxidantes. A oxidação reversível da PTP é um mecanismo de regulação da atividade desta enzima. A primeira oxidação produz ácido sulfênico, novas oxidações deste produto levam à produção dos ácidos sulfínico e sulfônicos que são produtos de oxidações irreversíveis (Ayoama et al., 2003).

O resíduo de cisteína presente no sítio catalítico também pode participar de outro mecanismo de regulação reversível que é a formação de pontes dissulfeto. A oxidação tem sido identificada como um regulador negativo. Após a estimulação de vários receptores tirosina quinase (RTKs) incluindo os receptores para fatores de crescimento de plaquetas, epidermal, insulina e fator de crescimento de fibroblasto (Ayoama et al., 2003).

Foi demonstrado por estudos *in vivo* que a proteína tirosina fosfatase de baixo peso molecular (PTP-BMr) é inativada por H_2O_2 via oxidação das Cys 12 e 17, essenciais para a catálise, formando uma ponte dissulfeto. Experimentos de espectroscopia por fluorescência sugerem que a estrutura tridimensional da enzima é modificada durante a oxidação por H_2O_2 . Pelo fato da concentração fisiológica de H_2O_2 produzir inativação da PTP-BMr, considerando que a atividade é restaurada pela redução com tióis de baixo peso molecular, propõe-se que condições de estresse oxidativo e outros processos que produzem

peróxido de hidrogênio regulam a PTP-BMr na célula (Caselli et al., 1998; Xing et al., 2007)).

Em resposta a estímulos do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), através de reações redox reversíveis, há o controle da atividade das PTPs-BMr.

Fiaschi e colaboradores (2001) sugerem que a atividade PTP-BMr seja modulada por ação de PDGFs, já que a PTP-BMr sai do seu estado reduzido para o oxidado após estímulo por este fator de crescimento (Raugei et al., 2002).

1.3.3 Classificação

As PTPs, baseando-se nas suas funções, estrutura e seqüência, podem ser classificadas em quatro classes principais:

1. Proteínas tirosina fosfatases específicas;
2. PTPs duais;
3. PTPs Cdc25;
4. PTPs de baixa massa molecular relativa;

As proteínas tirosina fosfatase específicas hidrolisam resíduos de tirosina e apresentam alta massa molecular relativa. Todas apresentam um domínio catalítico de aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos, sendo 71 dos quais são altamente conservados. Esta família é subdividida em dois grupos, do tipo receptor e do tipo citoplasmático. As estruturas cristalinas relatadas deste grupo apresentam 7 β folhas e 8 α hélices. O alto grau de similaridade entre estas diferentes PTPs sugerem que os membros deste subgrupo sejam muito parecidos (Ayoama et al., 2003).

As proteínas tirosina fosfatase com dupla especificidade (duais) são capazes de hidrolisar monoésteres de peptídeos contendo fosfotirosina e fosfoserina/treonina, possuindo mais afinidade pela fosfotirosina. Esta

capacidade dual parece estar associada à menor profundidade do sítio ativo quando comparada para as PTPs específicas (Ayoama et al., 2003).

As Cdc25 são PTPs duais relacionadas com o controle do ciclo celular. Encontram-se associadas com ciclinas e são fase-específicas durante o ciclo celular (Fauman e Saper, 1996).

A classe de PTPs que compreende enzimas caracterizadas pela massa molecular reduzida apresentando peso aproximado de 18-20 KDa (Granjeiro et al., 1997a; Chiarugi et al., 2000), anteriormente conhecidas como fosfatases ácidas não lisossomais de baixa massa molecular (Buzalaf et al., 1998, Taga e Van Etten, 1982), hoje são denominadas proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular (PTP-BMr) e estão onipresentes na natureza.

O papel biológico das PTP-BMr e fosfatases ácidas era completamente desconhecido até 1985, quando Chernoff e Li (1985) relataram que a fosfatase ácida de baixo peso molecular apresentava atividade fosfotirosina. O primeiro relato acerca dos possíveis substratos fisiológicos da PTP-BMr ocorreu em 1989, quando Ramponi e colaboradores (1989) observaram que a PTP-BMr do fígado bovino desfosforilava eficientemente *in vitro* o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFr). A PTP-BMr também está envolvida no controle da via de sinalização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). São estruturalmente diversas incluindo a tipo citoplasmática e a tipo receptor com capacidade de transmitir sinais controlando diversos processos celulares (Fauman e Saper, 1996).

Elas não compartilham nenhuma homologia de seqüência com qualquer outra PTP, exceto pelo padrão do sítio ativo e mesmo mecanismo catalítico (Fauman e Saper, 1996).

Um importante membro das PTPs-BMr é a PTP osteotesticular (PTP-OST). Originalmente isolada de osteoblasto de ratos recém-nascidos, esta proteína exibe uma alta expressão em ossos, testículos e ovários (Morrison e Mauro, 2000).

1.4 Biomineralização

1.4.1 Tecido ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea (Junqueira e Carneiro, 2004).

As células são os osteócitos que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz. São importantes para a manutenção da matriz e sua morte é seguida de reabsorção óssea. Prolongamentos dos osteócitos vizinhos permitem contato através de junções e o fluxo intercelular de íons e moléculas pequenas (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os osteoclastos são células móveis gigantes e ramificadas. Elas secretam ácidos, colagenase e outras enzimas que atacam a matriz óssea e liberam Ca^{2+} . Eles também participam da eliminação dos restos de tecidos ósseos que se formam durante a reabsorção do osso (Junqueira e Carneiro, 2004).

Os osteoblastos são células que sintetizam a parte orgânica da célula (colágeno tipo I, proteoglicanas, e glicoproteínas) da matriz óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz (Ducy et al., 2000; Kogianni e Noble, 2007).

O processo de biomineralização consiste no acúmulo de mineral constituído principalmente por íons de fosfato e cálcio que formam um sal de fosfato de cálcio, cuja estrutura possui uma forma muito semelhante a da hidroxiapatita (Glimcher, 1987).

Portanto, a parte inorgânica do osso, que corresponde a 50% da matriz óssea contém principalmente os íons fosfato e cálcio que formam cristais (Glimcher, 1987).

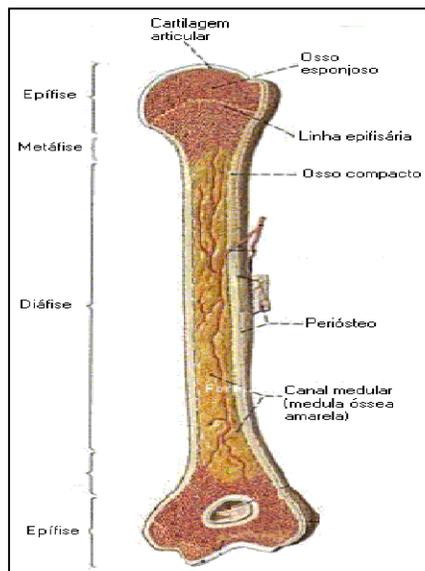
A parte orgânica da matriz que é formada por fibras colágenas e substâncias amorfas que contém proteoglicanas e glicoproteínas (Ducy et al., 2000; Kogianni e Noble, 2007).

1.4.2 Características anatômicas de ossos longos

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo que formam o endóstio e o perióstio. Este revestimento é essencial para a manutenção do tecido ósseo, pois áreas de reabsorção óssea aparecem nos locais que perderam o revestimento (Carano e Filvaroff, 2003).

Para atender às condições diferentes há variedades de tecido ósseo. Nos ossos longos, as extremidades ou epífises são formadas por osso esponjoso com uma camada superficial compacta. A diáfise (parte cilíndrica) é quase totalmente compacta, com pequena quantidade de osso esponjoso em sua parte profunda.

As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea (Junqueira e Carneiro, 2004).



Características anatômicas de ossos longos (www.afh.bio.br)

1.4.3 Formação óssea

Existem dois tipos de tecidos ósseos, o imaturo ou primário, e o maduro ou secundário. O tecido primário é formado e substituído gradualmente pelo secundário que é organizado com fibras colágenas dispostas em lamelas.

O tecido ósseo é formado por um processo chamado de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior da membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral. A ossificação endocondral tem início com uma peça de cartilagem que sofre modificações. Hipertrofia dos condrócitos, diminuição da matriz cartilaginosa, finas lacunas, mineralização e morte dos condrócitos. Pode ocorrer outra forma com a invasão de cavidades ocupadas por condrócitos por capilares sanguíneos e células osteogênicas que se diferenciam em osteoblastos que depositam matriz óssea sobre lacunas de cartilagem calcificada (Loveridge e Farquharson, 1993; Gerber e Ferrara, 2000; Farquharson e Jefferies, 2000).

Na ossificação intramembranosa o processo tem início pela diferenciação de células mesenquimais que se transformam em grupos de osteoblastos. Estas sintetizam osteóide (matriz ainda não-mineralizada) que se mineraliza englobando osteoblastos que se transformam em osteócitos. Como vários desses grupos surgem quase simultaneamente no centro de ossificação, há confluência das traves ósseas, dando ao osso um aspecto esponjoso. Entre as traves formam-se cavidades que são penetradas por vasos sanguíneos. Com esses vasos penetram células mesenquimatosas que irão dar origem a medula óssea (Freemont, 1993).

O processo de ossificação mediado por osteoblastos (na formação dos ossos chatos) ou por odontoblastos (na formação do dente) é claramente distinto daquele que ocorre na calcificação da cartilagem epifisária (a partir de um modelo cartilaginoso), que é mediada por condrócitos hipertróficos. A natureza das células da matriz protéica e da interação entre a deposição de mineral e matriz protéica são claramente diferentes. Não obstante, em todos esses sistemas existe um fator comum que é a viabilização do processo de

mineralização (Boskey, 1981; Wuthier, 1982, 1986; Watt, 1986; Blumenthal, 1989; Poole et al., 1989; Koboki et al., 1989; Freemont, 1993; Pizauro et al., 2002; Anderson et al., 2005).

Durante a proliferação e diferenciação de osteoblastos em cultura há uma expressão ordenada de genes que caracterizam o processo em três estágios: proliferação, maturação e mineralização (Chengalvala et al., 2001).

Os osteoblastos derivados de calvária de ratos recém-nascidos proliferam ativamente em cultura durante os primeiros dias devido à alta expressão de ciclo celular e a genes reguladores do crescimento celular. Durante a maturação, as células expressam proteínas que definem o fenótipo da célula óssea, incluindo fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina. As células, então, progridem para o estágio de mineralização, ocorrendo a deposição de minerais, resultando na formação de nódulos mineralizados (Chengalvala et al., 2001, Owen, 2001).

A progressão do crescimento e diferenciação de osteoblastos em cultura é fortemente regulada, mas pode ser modificado por vários hormônios e fatores de crescimento, o que transforma este sistema celular em um modelo particularmente adequado para o estudo da mineralização biológica.

Vários fatores de crescimento, quando se ligam aos receptores, ativam uma cascata de eventos envolvendo fosforilação de resíduos de tirosina de receptor e de outros substratos, esses sinais são, portanto, dependentes de fosforilação e desfosforilação para o controle (Fiaschi et al., 2001). As PTPs regulam a proliferação celular, diferenciação, transformação e integridade do citoesqueleto em resposta à estímulos externos (Chengalvala et al., 2001).

A PTP osteotesticular (PTP-OST) participa do processo de diferenciação celular. Originalmente isolada de osteoblasto de rato recém-nascido, esta proteína exibe uma alta expressão em ossos, testículos e ovários. Recentes estudos têm demonstrado que genes da PTP-OST são altamente regulados em ossos durante os processos de diferenciação celular e formação da matriz mineralizada. Durante a proliferação o RNAm é baixo, aumentando durante a diferenciação e retornando a níveis baixos após a mineralização. Isto demonstra

a importância desta PTP-BMr para regulação de vias de sinalização durante o processo de diferenciação celular e formação óssea (Morrison e Mauro, 2000).

Portanto, é pertinente estabelecer a hipótese de que a expressão e atividade das PTPs-BMr sejam moduladas durante o ciclo celular de osteoblastos, bem como durante seu processo de diferenciação que culmina com a mineralização biológica. As avaliações dessas hipóteses foram os principais objetivos deste trabalho.

1.5 Reação de polimerase em cadeia em tempo real

A tecnologia da reação de polimerização em cadeia em tempo real (PCR em tempo real) possibilita a detecção de um produto de amplificação à medida que vai sendo formado. Este método realiza reações de amplificação e quantificação do DNA complementar extraído a partir do RNA mensageiro (Higuchi et al., 1993).

Um sinal fluorescente é detectado em proporção ao aumento da quantidade do produto de amplificação.

Essa fluorescência é emitida por compostos fluoróforos, que podem estar ligados a sondas (Taqman) ou intercalados na dupla fita do DNA amplificado (SYBR Green) (Dallan et al., 2004).

No computador que está acoplado ao termociclador no qual ocorre a PCR, a fluorescência, emitida em resposta à síntese do produto de amplificação, é detectada em tempo real. O aumento desse produto nos ciclos iniciais é pouco significativo. Com o progresso da reação, pode-se observar um aumento do sinal emitido (fase exponencial) (Barros et al., 2008).

Quando esse aumento da fluorescência passa a ser estatisticamente significativo, atinge-se o ciclo "*threshold*" (Ct).

A quantificação pode ser realizada por comparação direta dos valores de fluorescência detectada no Ct, ou por comparação do número de cópias utilizando-se uma curva padrão (método da curva padrão) (Barros et al., 2008).

O PCR em tempo real possui vantagens em relação à reação de polimerase em cadeia tradicional, as principais vantagens estão na possibilidade de execução de estudos quantitativos e não apenas qualitativos e na eliminação do risco de contaminação, pois esta reação ocorre em um sistema tubular fechado, não havendo também a necessidade de eletroforese para visualização das amplificações (Gandra et al., 2008).

1.60 Superfície de titânio

Os estudos sobre implantes bucais se expandiram rapidamente nas últimas três décadas. A base para este grande número de estudos tem sido o reconhecimento de que a implantodontia pode alcançar altos índices de sucesso clínico (Gebran e Wassal, 2006).

Está claro desde os estudos de Branemark e colaboradores (1969,1977); Schroeder e colaboradores (1991) que um entendimento da fisiologia do tecido ósseo propiciou a colocação de implantes sob condições que minimizaram a produção de calor e permitiram uma fase cicatricial na qual a mobilidade foi também minimizada favorecendo a osseointegração. Além disso, com o uso de materiais biocompatíveis, clínicos e pesquisadores prontamente perceberam o potencial da implantodontia para reabilitar algumas áreas que no passado ficariam em situações menos funcionais e estéticas.

As ligas de titânio com alumínio e vanádio (Ti-Al6-V4) e o titânio comercialmente puro são os materiais mais utilizados na confecção de implantes dentais, visto a sua propriedade biomecânica, possibilidade de tratamento, acabamento do implante e pela facilidade no processo de esterilização (Gebran e Wassal, 2007).

A característica primordial do titânio é que este reage em contato com o ar formando uma camada de óxido de titânio de forma imediata (10^{-9} segundos) com a espessura de 2 a 10 nm, fornecendo resistência à corrosão. Sendo esta camada superficial de óxido a fornecedora da base de biocompatibilidade (Gebran e Wassal, 2007).

A biocompatibilidade do titânio, contudo, não é garantida apenas pela resistência à corrosão, mas também, pela sua inatividade biológica, denominada de “indiferença biológica” devido ao fato de que os sinais da presença do metal não influenciam os tecidos (Williams, 1981).

Eventos moleculares e celulares que podem no final determinar o destino biológico do implante ocorrem durante os estágios iniciais de cicatrização, as

condições de superfície de implantes e sua relação com eventos biológicos subsequentes precisam ser mais bem estudados.

2. Objetivos

O objetivo do trabalho foi a padronização da metodologia de extração da PTP-BMr a partir de culturas de células osteoblásticas provenientes de medula de rato para caracterização parcial bioquímica e cinética e determinar *in vitro* o perfil de expressão e atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (PTP-BMr).

Levando-se em consideração a biocompatibilidade do titânio, como um material de implante e que diversos comportamentos celulares como adesão, alteração morfológica, alteração funcional, proliferação e diferenciação são fortemente afetadas pelas propriedades físico-químicas da superfície do Ti, incluindo composição, rugosidade, hidrofobicidade, textura e morfologia da camada de óxido sobre o Ti (Willians, 1981; Lim et al., 2001) analisamos também *in vitro* o perfil de expressão e atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (PTP-BMr) em cultura de células osteoblásticas sobre superfície de titânio.

3. Material e métodos

3.1 Obtenção de células de medula óssea de ratos

3.1.1 Isolamento por lavagem

As células foram preparadas e cultivadas de acordo com o método de Maniatopoulos et al. (1988). A medula óssea foi obtida de ratos machos jovens adultos da linhagem Wistar, pesando 110-120 g. O fêmur foi retirado assepticamente, limpo, e lavado quatro vezes por um período de 15 minutos, em meio de transporte (meio de cultura descrito em 3.2 com 10 vezes a concentração usual de antibióticos). As epífeses foram removidas e a medula foi lavada com jato de 20 mL de meio de cultura (descrito em 3.2) utilizando uma seringa com agulha de 20 gauges. As células liberadas foram coletadas num frasco plástico de cultura de 75 cm² contendo 10 mL de meio de cultura.

3.1.2 Isolamento por aspiração da medula óssea de rato

Esse método consiste em inserir diretamente uma agulha no canal medular do rato e, por aspiração, extrair a medula. Para realizar a extração esterilizou-se com álcool-iodado os membros inferiores do rato e o ventre. Umideceu-se, o interior de uma seringa de 5 mL com heparina, um anti-coagulante, e aproximadamente 1 mL do meio de transporte (meio de cultura descrito em 3.2 com 10 vezes a concentração usual de antibióticos), foi aspirado e deixado na seringa. Fez-se um pequeno corte com um bisturi na altura no joelho para se visualizar a epífese do fêmur e com uma agulha de aço inoxidável para aspiração com mandril, perfurou-se a epífese até o canal da medula onde se conectou a seringa com o meio na agulha para aspirar a medula. A amostra foi coletada em um tubo de centrífuga já contendo 5mL de meio de transporte; o mesmo procedimento foi feito para todos os fêmures. Por último, centrifugou-se

a amostra e o “pellet” foi ressuspenso em 2 mL de MTS (meio total suplementado) 15%, meio de cultura descrito em 3.2 suplementado com 15% de soro fetal bovino, e transferido para as garrafas de cultivo já contendo 20 mL de meio de cultura.

3.2 Cultura de células extraídas da medula óssea de rato

As células extraídas da medula de rato em 3.1.1 ou o pellet ressuspenso em 2 ml de MTS 15% em 3.1.2 foram transferidos para garrafas plásticas de 75 cm² contendo 10 ml de meio de cultura composto por 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 (para diferenciação celular), 12 mg/L de ácido ascórbico e 5,4 g/L de β -glicerofosfato. As células foram cultivadas por 13 a 21 dias a 37°C, numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar, e o meio foi trocado a cada 72 horas.

3.3 Obtenção da fase solúvel livre de frações de membrana

As células que cresceram durante os períodos testados nos frascos plásticos 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 5 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 utilizando-se um homogeneizador do tipo “potter” e em seguida ultracentrifugado a 100.000 x g por 1 hora, a 4°C. O sobrenadante, que contém a proteína de interesse, foi fracionado em alíquotas de 1 mL e rapidamente congelado para armazenamento a -20°C.

3.4 Dosagem de proteína

As concentrações de proteína foram determinadas de acordo com o ensaio do Qubit Fluorometer, da Invitrogen. Para cada dosagem foram utilizados 3 μL de amostra diluídas em 200 μL de solução de trabalho (1 μL de reagente Quant-iT + 199 μL de tampão Quant-iT) de acordo com as instruções do fabricante. O aparelho foi calibrado utilizando os padrões fornecidos pelo fabricante, diluindo 10 μL de solução de calibração em 200 μL de tampão de trabalho.

3.5 Determinação da atividade da PTP-BMr em células osteoblásticas

A atividade específica (AE) da fosfatase ácida total (FAT) foi determinada como descrito por Granjeiro et al. (1997a, b), com os volumes adaptados por Declercq et al. (2004). Para um volume final de 2 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio de reação, com o volume final de 1 mL contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5 mM do substrato p-NFF. Para a dosagem da PTP-BMr, adicionou-se 10 mM do inibidor p-hidroximercuribenzoato (p-HMB), responsável pela completa inibição desta enzima (Granjeiro et al., 1997a, b). A determinação da AE no meio de reação contendo p-HMB e 5mM de tartarato permite a determinação da TRAP (fosfatase ácida resistente a tartarato), correspondente à atividade residual. A paralisação da reação ocorreu pela adição de 1 mL de NaOH 1,0 M, após incubação por 60 minutos a 37°C. A medida de absorvância foi realizada a 410 nm, ($\epsilon=17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Em resumo:

- Ausência de inibidores (fosfatase ácida total, FAT);
- Na presença de p-HMB (inibidor específico de PTP-BMr, sendo a atividade PTP-BMr correspondente à fração inibida);
- Na presença de p-HMB e tartarato, inibição das PTP-BMr e de fosfatases ácidas inespecíficas; a atividade residual corresponde à TRAP

(fosfatase ácida resistente a tartarato).

Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto por minuto. A atividade enzimática específica (AE) é expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína ($AE=U/mg$).

3.6 Tripsinização de células do frasco de cultivo

As células foram descoladas do fundo dos frascos de cultivo de 25 cm² por tripsinização. Este procedimento foi feito todo em fluxo laminar e consiste das seguintes etapas: primeiramente os frascos de 25 cm² com as células cultivadas foram lavados com 5 mL de tampão PBS (tampão fosfato de sódio), filtrado para se retirar todas as proteínas do meio de cultivo. Depois foi adicionado em cada frasco 3 mL de solução de tripsina (contendo as proporções de 9 mL de tripsina, 500 µL de EDTA e 500 µL de colagenase). Após a adição, os frascos foram deixados na estufa por 10 min. O fundo do frasco foi raspado cuidadosamente com um raspador de células e todo o material foi transferido para um tubo estéril de 15 mL, contendo 2 mL de MTS para desativar a ação da tripsina, foi centrifugado a 1000 rpms por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi ressuspensão com 2 a 3 mL de MTS, homogeneizado e uma alíquota de 100 µL foi retirada para estimar a concentração de células em uma câmara de Neubauer.

O meio contendo as células foi homogeneizado e estas foram cultivadas em frascos de 75 cm² a partir de concentrações iniciais conhecidas. Diferentes preparações foram feitas com diferentes quantidades.

3.7 Reação de polimerase em cadeia em tempo real

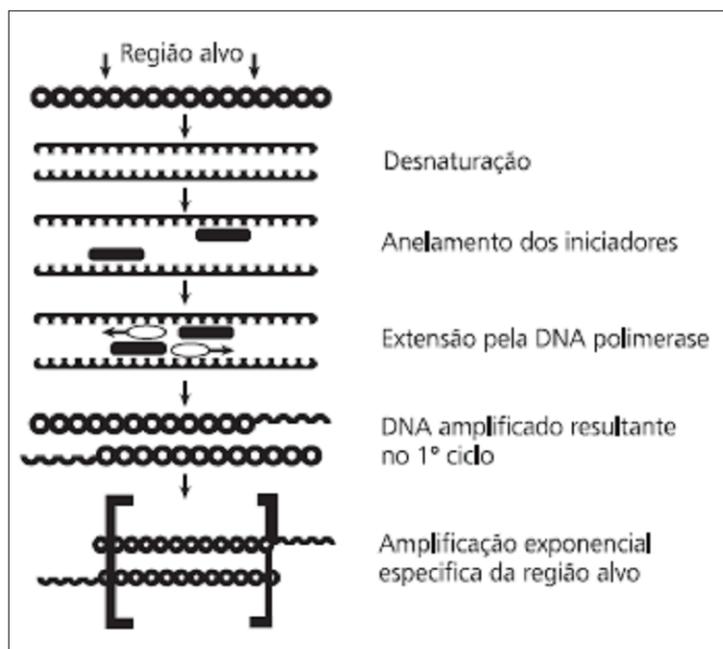
3.7.1 Extração de RNAm e síntese de DNA complementar (cDNA)

A extração do RNA total foi realizada utilizando-se o reagente trizol e o kit para extração de RNA (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para cada amostra, em um tubo tipo *ependorf*, foi adicionado o reagente Trizol (1 mL/mg de tecido), sendo agitado por 30 segundos e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. Para cada 1 mL da suspensão foram adicionados 200 µl de clorofórmio e os tubos centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescentado etanol 95% em proporções iguais à amostra (v/v). A solução amostra/etanol foi agitada delicadamente e transferida para uma coluna de afinidade para RNA. Foram adicionados tampões específicos, intercalados por rápidas centrifugações de 15 segundos a 8000 x g cada. Finalmente, após várias lavagens com estes diferentes tampões, as amostras de RNA foram eluídas da coluna com 30 µl de água deionizada e livre de RNAase, sendo armazenadas a -70° C até a confecção do DNA complementar. Uma alíquota de 5µl foi utilizada para a obtenção da concentração de RNA/µL nas amostras, determinada utilizando-se o aparelho Biomate 3 spectrophotometer Thermospectronic (Rochester, NY, USA).

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado através de uma reação de transcrição reversa e 1 µg de RNA, de acordo com as especificações do fabricante.

3.7.2 Quantificação do RNA mensageiro (RNAm) através de reações de polimerase em cadeia em tempo real (PCR em tempo real)

A expressão quantitativa do RNAm da PTP-BMr foi analisada através de reações de “Real Time PCR”, utilizando-se o sistema SYBR Green e o aparelho ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Warrington, UK). Esse sistema (ABI Prism Software) realiza as reações de amplificação, detecção e quantificação das amostras através de intercalantes fluorogênicos utilizados na reação, sendo a expressão normalizada com base em controles endógenos. *Primers* adequados para tais reações foram criados a partir do programa Primer Express 2 (Applied Biosystems, Warrington, UK), específico para esta tarefa. O DNA complementar (2,5 ng/reação) sintetizado a partir do RNA mensageiro e *primers* específicos (1-2 µg/reação) foram utilizados juntamente com o reagente SYBR Green Master Mix, como determinado pelo fabricante. As reações procederam por 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 56 °C que representam respectivamente a desnaturação do cDNA, anelamento dos iniciadores, alongamento, onde ocorre a extensão do DNA, e amplificação. Um ciclo final de 20 minutos com temperatura crescente de 60 a 95 °C foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para a análise da especificidade de amplificação.



Representação esquemática das reações do PCR em tempo real em diferentes temperaturas. As quatro reações correspondem à desnaturação do cDNA a 50 °C por 2 minutos, anelamento dos iniciadores a 95 °C por 10 minutos, quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C para ocorrer a extensão realizada pela DNA polimerase e 1 minuto a 56 °C finalizando a amplificação (Barros et al., 2008).

As condições de PCR em tempo real para cada *primer* utilizado foram padronizadas de acordo com a concentração do *primer*, ausência de formação de dímeros, eficiência de amplificação dos genes alvos e controle interno (gene constitutivo). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (linha de corte ou “cycle threshold”), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), o que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

Os cálculos para determinação da expressão relativa dos genes alvo foram realizados de acordo com instruções contidas no “User’s Bulletin” (P/N 4303859, Applied Biosystems), normalizando os dados em relação à expressão

constitutiva do GAPDH (um gene constitutivo normalmente usado como controle em ratos) em cada amostra.

Os primers utilizados na reação PCR em tempo real foram os que seguem:

Fosfatase ácida - S: GGCACAAATTGCCTACTCCAA

AS: TAAAGATGGCCACGGTGATG

Com temperatura de *melting* de 81°C, CG = 51%, comprimento do alvo 107 pb.

GAPDH de rato - S: AAATGCTTCTAGGCGGACTG

AS: GGTTTTGTCAAAGAAAGGGTG

Com temperatura de *melting* de 78°C, comprimento do alvo 59 pb.

3.8 Caracterização bioquímica e cinética

3.8.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras, quando necessário, foram concentradas utilizando-se micro-concentradores (MICROCON) e posteriormente aplicadas no gel de poliacrilamida 7%. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Laemmli utilizando-se nitrato de prata para revelar o gel (Blum et al., 1987). Foram utilizados padrões de massa molecular para se estimar o peso molecular da PTP-BMr.

3.8.2 Atividade em gel de poliacrilamida

As amostras foram concentradas utilizando-se micro-concentradores (MICROCON) e posteriormente aplicadas no gel de poliacrilamida 5% em condições não-desnaturantes. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada de acordo com Davis. A atividade fosfohidrolítica no gel foi detectada em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, Fast Blue RR-salt 0,12% (p/v) e β -

naftilfosfato 0,12% (p/v), a 37°C.

3.8.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da amostra extraída do gel de atividade

Para confirmar se a banda do gel de atividade descrito anteriormente referia-se, de fato, à enzima PTP-BMr, realizou-se a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes da amostra extraída do gel de atividade. A banda do gel de atividade foi macerada em gelo seco, nesta amostra foi adicionado 2 ml de tampão desnaturante, e ultracentrifugada por 10 minutos a 10.000 x g. A eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante desta amostra foi realizada de acordo com Laemmli (1970), utilizando-se nitrato de prata para revelar o gel (Blum et al., 1987). Foram utilizados padrões de massa molecular para se estimar o peso molecular da proteína.

3.8.4 Efeito do pH na atividade da fosfatase ácida

O efeito do pH sobre a atividade da fosfatase ácida foi determinado no intervalo de pH compreendido entre 4,0 e 10,5 utilizando-se os tampões acetato de sódio (no intervalo de pH 4,0 a 6,0), MES (no intervalo de 5,0 a 6,0), Bis-Tris (no intervalo de 6,0 a 6,5), Imidazol (no intervalo de pH 6,5-7,5), Tris-HCl (no intervalo de pH 7,0-9,0) e AMPOL (no intervalo de pH 8,5-10,5), todos na concentração final de 100 mM. A atividade PNFFase foi determinada conforme descrito em 3.5.

3.8.5 Análise da inibição relativa

A inibição relativa da atividade do extrato solúvel contendo a enzima de interesse foi avaliada utilizando-se os seguintes inibidores individualmente nas respectivas concentrações:

- 1) Molibdato de amônio 10 mM
- 2) Fosfato de sódio 1mM
- 3) Fosfato de sódio 10mM
- 4) Tiomicina 10mM
- 5) Ortovanadato de sódio 10mM
- 6) p-HMB 10mM

A reação foi iniciada pela adição de 100µL de extrato solúvel ao meio de reação, com o volume final de 1 mL, contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 substrato p-NFF 5 mM e o inibidor. A paralisação da reação ocorreu pela adição de 1 mL de NaOH 1,0 M, após incubação por 60 minutos a 37°C. A medida de absorbância foi realizada a 410 nm, ($\epsilon=17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 nmol de produto por minuto.

Os valores relativos de inibição foram obtidos a partir do valor de atividade do controle sem inibidor.

3.8.6 Determinação de parâmetros cinéticos

O valor de K_m foi obtido fazendo-se um ensaio variando a concentração de substrato e determinando a velocidade da reação em cada ponto.

Utilizaram-se concentrações de substrato p-NFF no intervalo de 1.10^{-6} a 0,01 mM. Os valores de velocidade (atividade em U/ mg) da reação de hidrólise da p-NFF catalisada pela PTP-BMr foram obtidas como descrito em 3.5 com 100 µL de ESO em cada ensaio.

3.9 Determinação da atividade PNFFase da PTP-BMr em superfície de titânio

Para analisar o efeito da presença de uma superfície de titânio na atividade da PTP-BMr foi inserido um disco de titânio no fundo de um poço onde osteoblastos foram cultivados.

Os discos de titânio usinados foram previamente preparados. Eles foram polidos utilizando a lixa com gramatura 300 seguida da lixa de gramatura 600. Após o polimento os discos de titânio (cpTi) foram submetidos a um ciclo de lavagens em ultra-som. Brevemente, os discos foram posicionados em um becker com a face polida voltada para cima e mantidos em ultra-som utilizando as seguintes soluções:

- 1) Solução de sabão neutro (1:50) diluído em água destilada e por 20 minutos.
- 2) Enxágüe abundante com água destilada;
- 3) Álcool a 70% por 30 minutos;
- 4) Enxágüe abundante com água destilada;
- 5) Água destilada por mais 30 minutos.

Ao término do ciclo os discos foram lavados mais uma vez abundantemente em água destilada. A secagem foi feita na estufa e os discos foram embalados e autoclavados. A manipulação dos discos foi realizada com pinças de titânio.

Antes do plaqueamento, ao fundo de cada poço um disco de titânio foi depositado.

A cultura de células foi feita conforme descrito em 3.2, porém, ao invés de serem utilizadas garrafas para cultivo de células, foram utilizadas placas de polietileno, com cada poço contendo 10 ml de meio de cultivo e um disco de titânio no fundo.

O ESO foi obtido conforme 3.3 e o valor da atividade conforme 3.5.

Foi feito um controle, uma cultura de osteoblasto, nas mesmas condições, sem a placa de titânio, para comparação dos valores de atividade.

4. Resultados e Discussão

4.1 Metodologias de extração e cultivo de células

4.1.1 Cultura de células

A formação do tecido ósseo durante os processos de desenvolvimento, remodelação e regeneração envolve uma série complexa de eventos que incluem a proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos culminando com a formação de uma matriz extracelular mineralizada. A formação óssea constitui um processo dinâmico, sujeito a mecanismos de controles rigorosos (Pereira et al., 2005). Além da expressão de colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina, altos níveis de fosfatase alcalina também são induzidos durante a diferenciação dos osteoblastos para o processo de mineralização (Cheng et al., 1996; Osyczka e Leboy, 2005; van den Dolder e Jansen, 2007), fornecendo um modelo útil para a investigação das alterações temporais e espaciais na expressão de marcadores osteoblásticos.

Recentes estudos têm demonstrado que genes da PTP-OST, são altamente regulados em ossos durante o processo de diferenciação celular e formação da matriz mineralizada. Durante a proliferação o RNAm é baixo, aumentando durante a diferenciação e retornando a níveis baixos após a mineralização. Isto demonstra a importância desta PTP-BMr para regulação de vias de sinalização durante o processo de diferenciação celular e formação óssea (Morrison e Mauro, 2000).

Assim, as células da medula óssea de rato foram cultivadas por diferentes períodos de tempo, diferenciando-se e aderindo no fundo do frasco de cultura, e a partir de 24 h (Figura 1B) pode ser observado o aumento significativo de células osteoblásticas com o passar do tempo: 10 dias (Figura 1C), 14 dias (Figura 1D) completamente confluentes.

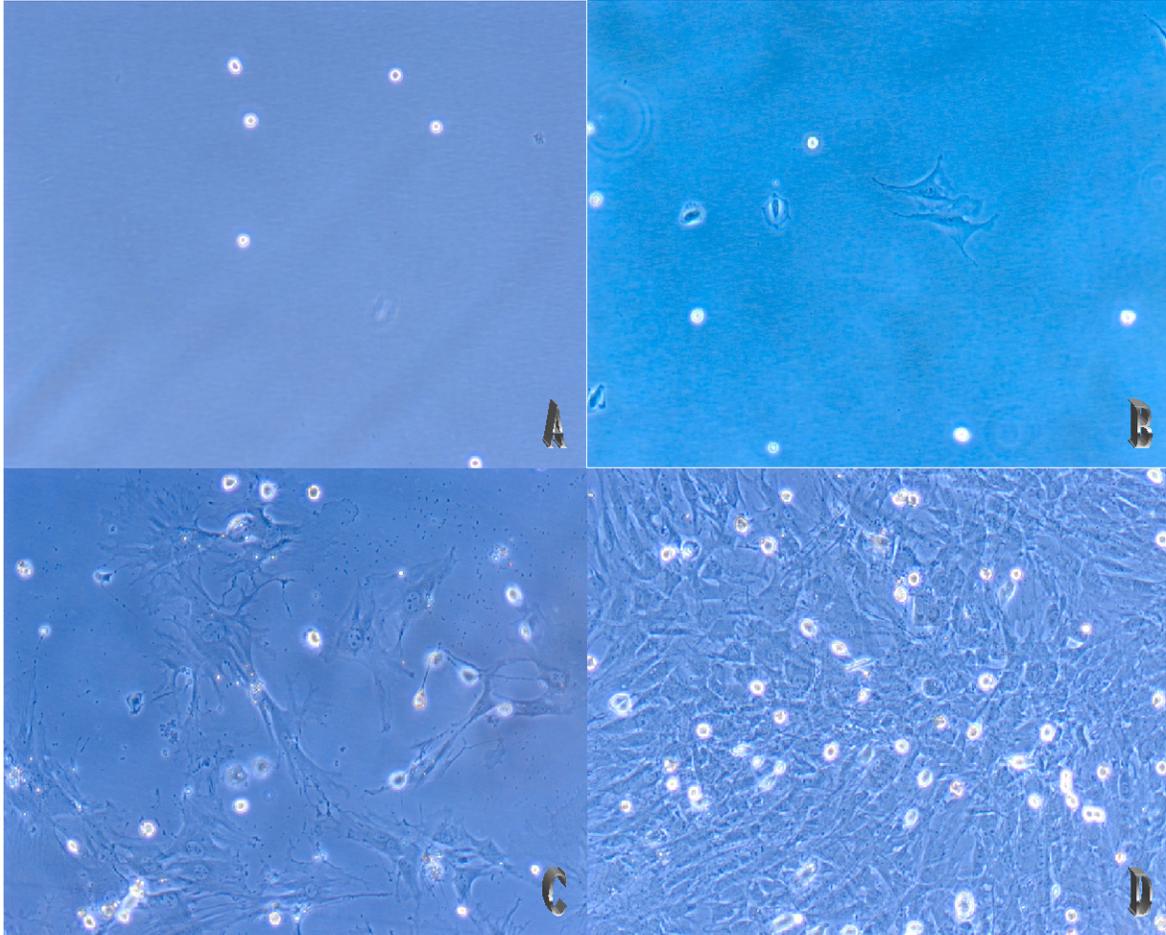


Figura 1. Estágios de crescimento e ocupação de um frasco de cultivo por osteoblastos. A: Osteoblastos que foram tripsinizados (Materiais e Métodos 3.6) e passados para um segundo frasco (subcultura), ainda não aderidos ao frasco de cultivo -0 dias. B: Um dia após a passagem, já apresentando células aderidas e proliferação. C: Células com 10 dias de cultivo, evidenciando os processos celulares. D: Frasco já completamente confluyente 14 dias. Microscopia por contraste de fases: aumento de 200 vezes.

Ao longo do desenvolvimento destas células *in vivo* e *in vitro*, diferentes proteínas são expressas em diferentes momentos, com atuações muitas vezes pontuais. Isso significa que determinadas proteínas serão expressas e estarão presentes nas células em apenas um curto período ao longo do processo de diferenciação e maturação destas. Portanto, faz-se necessário testar se a proteína de interesse tem um padrão de atividade contínuo ao longo do tempo de cultivo das células ou se ela possui um pico de atividade em um determinado momento do cultivo.

Para otimizar o método de obtenção da PTP-BMr a partir de culturas de osteoblasto, visando a extração para demais análises, métodos de obtenção das células e formas de cultivo foram testados, comparando-se a atividade obtida da PTP-BMr (Material e Métodos 3.5) em relação ao tempo de cultivo em dias, como descrito por Granjeiro et al. (1997a, b).

Inicialmente utilizou-se o método da extração total do fêmur. As primeiras preparações foram feitas separando a medula de cada fêmur das demais em diferentes tubos de centrífuga e colocando-as diretamente no frasco plástico de cultura de 75 cm². Essa preocupação se justificava devido à possibilidade de ocorrerem reações imunológicas entre as células dos diferentes animais, mas os ratos Wistar são isogênicos e testes realizados no Laboratório de Cultura de Células da FORP-USP (não mostrados) indicaram que células de um “pool” de diferentes animais crescem igualmente às células de um único animal.

Visando obter maior equidade entre os frascos de cada preparação, estas passaram a serem feitas a partir de um “pool” único das medulas de três ratos, dividido em cinco frascos de cultivo. Tal procedimento permite afirmar com mais segurança que as diferentes atividades encontradas entre as amostras de cada frasco são devido aos diferentes dias de cultivo das células e não há fatores intrínsecos a cada rato ou à quantidade de células obtida em cada medula. As culturas realizadas deste modo, a partir de um “pool” único de células e homogeneizado por agitação, mostraram uma grande variação do perfil da atividade da PTP-BMr em relação ao tempo de cultivo, já observada para a atividade da fosfatase alcalina (Camolezi et al., 2002).

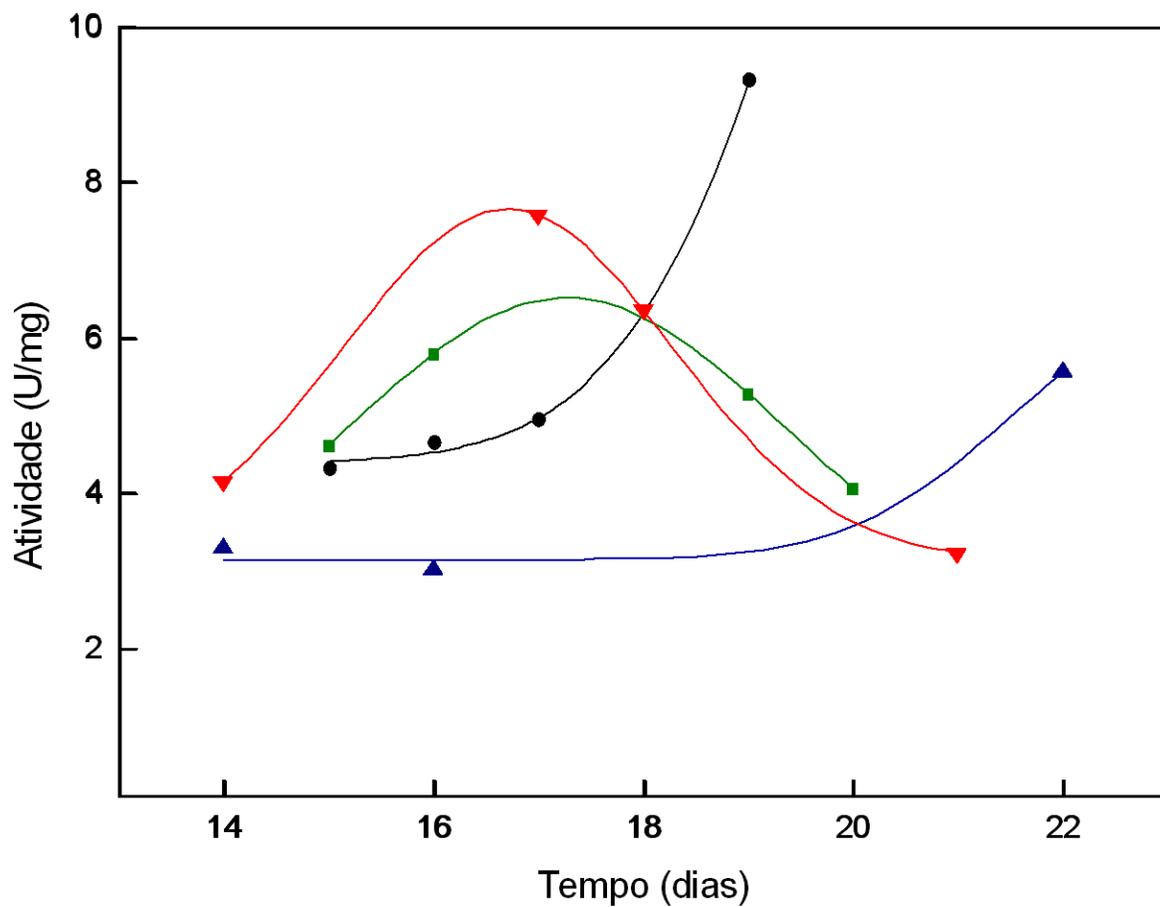


Figura 2. Atividade obtida da PTP-BMr (conforme Material e Métodos 3.5) em relação ao tempo de cultivo em dias de células osteoblásticas obtidas da medula óssea de rato. Cada curva demonstra os resultados de atividade PNFFase em diferentes preparações.

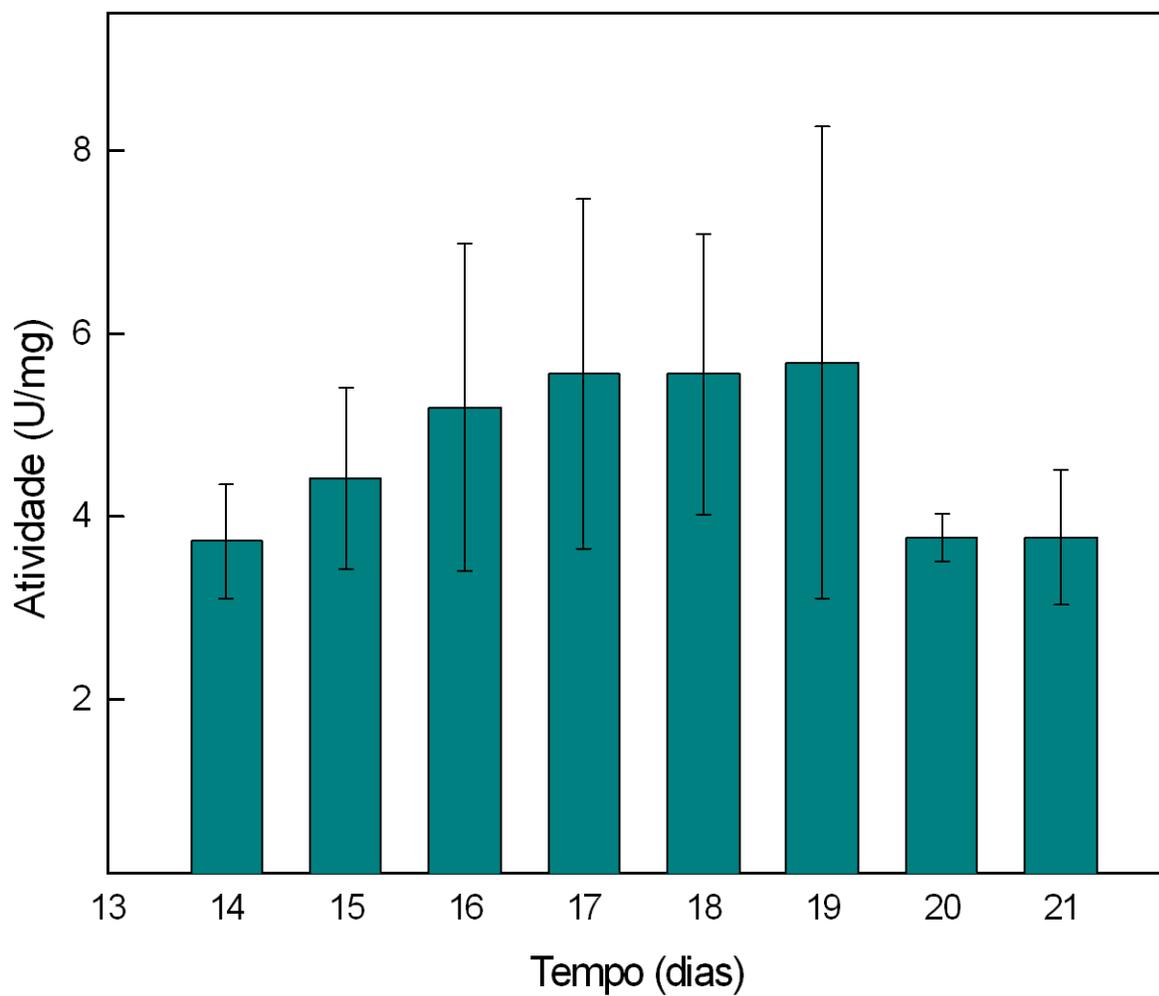


Figura 3. Atividade da PTP-BMr obtida das médias dos valores do gráfico 2 em diferentes dias de cultivo de células osteoblásticas. Esta figura indica que o tempo ótimo de cultivo para extração da PTP-BMr varia entre 16 e 18 dias.

A Figura 3 evidencia que o tempo ótimo para extração da PTP-BMr varia em torno de 16 e 18 dias de cultivo. O grande desvio presente provavelmente é resultado da falta de homogeneidade entre as culturas, sendo que diferentes quantidades de células podem ser obtidas a cada preparação.

Foi observado que os maiores valores de atividade eram obtidos até três dias depois de as culturas atingirem a confluência, concomitantemente com o aparecimento dos primeiros nódulos de mineralização.

Entretanto, todos os pontos do gráfico apresentam desvio padrão muito grande. Provavelmente, esse desvio é resultante da falta de homogeneidade entre as culturas, diferentes concentrações de células foram cultivadas por preparação. Além disso, a qualidade de cada material não pode ser avaliada e provavelmente não é a mesma.

4.1.2 Subculturas

Foi testado um segundo método de preparação, que utiliza subculturas, com o objetivo de padronizar o rendimento das culturas, obter culturas com número de células próximos.

Para isso, foram obtidas medulas de ratos pelo método da aspiração da medula óssea (conforme Material e Métodos 3.1.2) e as células foram cultivadas em um frasco de plástico de 25 cm² até a confluência. As medulas de cada rato foram obtidas isoladamente, sendo que para cada rato foi preparado um frasco. O tempo de cultivo dessas células até a confluência variou entre 9 a 13 dias. Em seguida, as células foram tripsinizadas (conforme Material e Métodos 3.6) e suspensas para avaliar a concentração de células/mL de meio.

A estimativa do número de células foi feita em uma câmara de Neubauer. Foram feitas três preparações variando-se o número total de células, como apresentado na Figura 4.

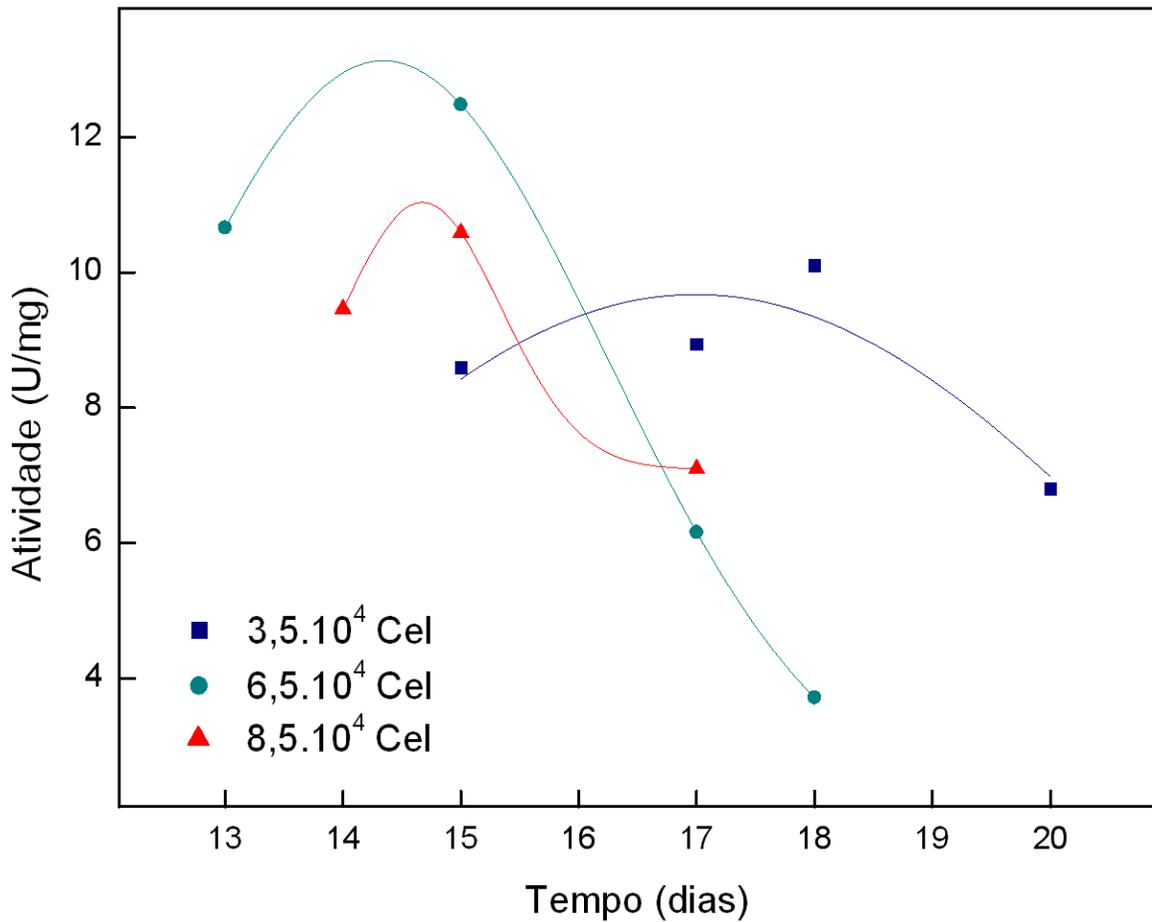


Figura 4. Perfil de três curvas de atividade da PTP-BMr em diferentes dias de cultivo de células osteoblásticas. As culturas foram feitas a partir de quantidades diferentes de células: $3,5 \cdot 10^4$, $6,5 \cdot 10^4$ e $8,5 \cdot 10^4$, como ilustrado no gráfico. Elas foram cultivadas em frascos para cultivo de 25 cm^2 até a confluência (entre 9 e 13 dias), tripsinizadas (conforme Materiais e Métodos 3.6), contadas em um microscópio de contraste de fases, utilizando-se uma câmara Neubauer, e cultivadas novamente em um frasco de 75 cm^2 .

A Figura 4 evidencia um padrão diferente nos perfis de atividade quando comparado com as figuras 2 e 3 o que representa um indício de que a quantidade de partida de células influencia nos perfis de atividade. As preparações que tiveram maior concentração celular no material de partida apresentaram curvas com picos e decaimento de atividade mais precoce.

Pode ainda ser observado que a média da atividade da fosfatase ácida obtida nas preparações foi maior utilizando-se subculturas, ao invés de culturas primárias. É possível que tal aumento da atividade tenha ocorrido em virtude da maior homogeneidade na distribuição celular no interior da garrafa de cultivo. Em culturas primárias, as células podem se acumular em determinadas regiões do frasco e, assim, pode ocorrer um acúmulo de sinalizadores celulares que induzem as células a permanecerem em diferentes estágios de diferenciação e, conseqüentemente, diminuir a homogeneidade da cultura. Sendo assim, a distribuição espacial mais homogênea das culturas secundárias pode contribuir para que estas sejam mais sincrônicas.

A partir destes resultados, conclui-se que é necessário não somente obter a medula, mas sim quantificá-la em número de células para o subsequente cultivo para que se tenha um padrão de referência na obtenção das células osteoblásticas.

4.2 Obtenção da Fosfatase Ácida (PTP-BMr)

As células obtidas no tempo de confluência foram processadas conforme descrito no item 3.3 de Material e Métodos para obtenção da fração solúvel rica em PTP-BMR.

Na Tabela 1 pode ser observada a atividade específica da PTP-BMr obtida do material de partida (lisado celular total), bem como do extrato solúvel livre de frações de membrana e demais organelas celulares.

Tabela 1: Atividade PNFFase das amostras protéicas obtidas durante o isolamento da PTP-BMr. As atividades foram realizadas na ausência de inibidor e na presença de pHMB e pHMB + TART. A atividade de PTP-BMr foi determinada pela subtração da atividade específica encontrada na ausência de inibidor e na presença de PHMB, conforme descrito em Material e Métodos 3.5.

| | Proteína (mg/mL) | Atividade Específica (U/mg) | | | (*PTP-BMr) | (%) |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------|---------|--------|------------|-----|
| | | s/inibidor | c/ PHMB | c/TART | | |
| Lisado total | 0,38 | 17,4 | 5,2 | 3,2 | 12,2 | 100 |
| Fração solúvel | 0,51 | 10,9 | 3,1 | 0,7 | 7,9 | 64 |

A atividade na presença de tartarato (TART) é muito pequena, pois este composto inibe todas as fosfatases ácidas, sugerindo que, neste extrato celular, a atividade dependente de pHMB é devida somente à presença das PTP-BMr. Resultados similares já foram descritos por Granjeiro et al. (1997 a e b).

4.3 Reação de polimerase em cadeia em tempo real

O RNAm específico da PTP-BMr foi quantificado pela técnica de reação de polimerase em cadeia em tempo real (Figura 5 e 6), usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgent, 2001). Assumimos que a eficiência de cada amplificação do alvo é praticamente máxima, assim, os valores de ΔCt em várias diluições do material de partida permaneceriam invariáveis.

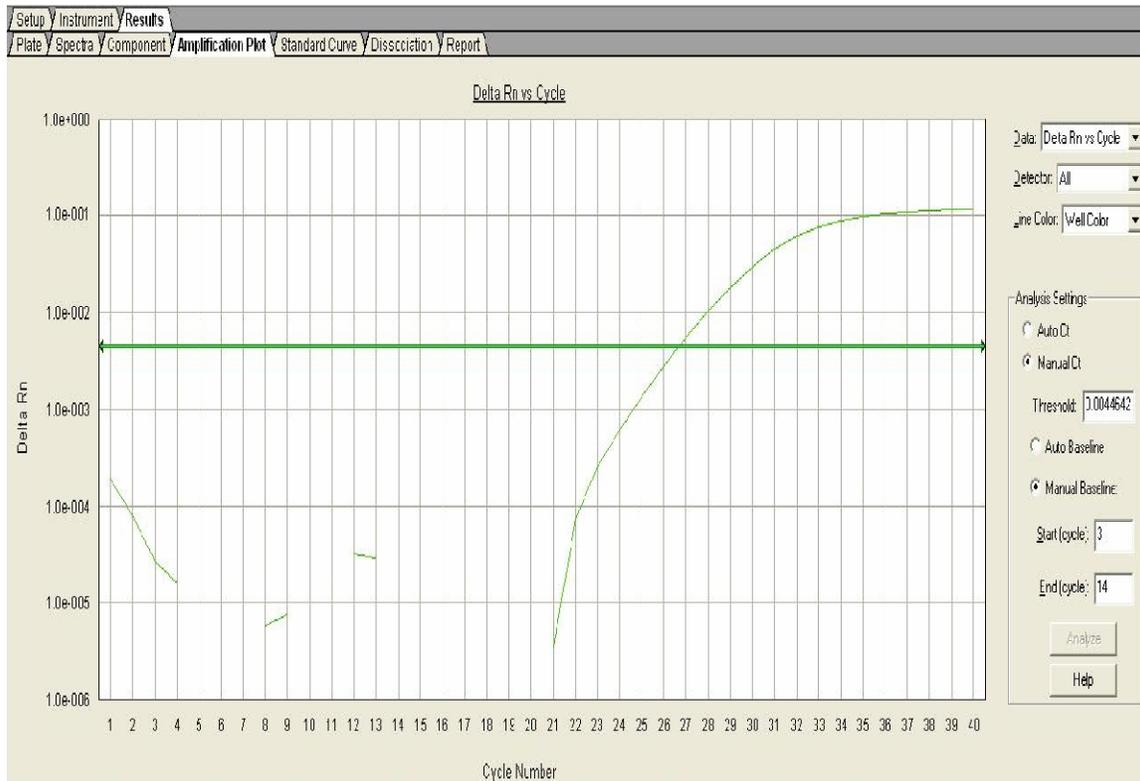


Figura 5. Curva de amplificação da PTP-BMr. Pode-se observar a curva de amplificação da PTP-BMr de uma das amostras corridas no aparelho e a linha de corte, posicionada na fase exponencial, que fornece o valor de Ct.

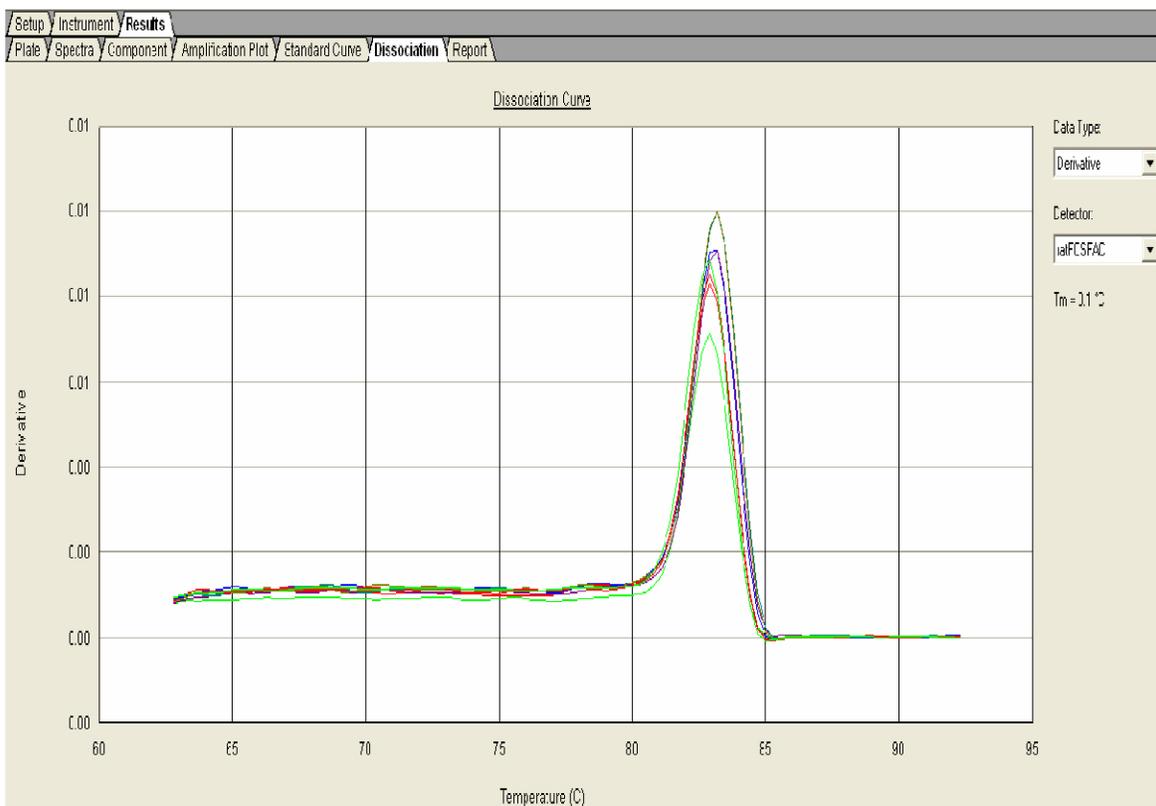


Figura 6. Curva de dissociação da PTP-BMr de todas as amostras corridas no aparelho. Essa figura mostra a curva de dissociação de todas as amostras (feitas em triplicata), que tiveram temperaturas de dissociação iguais, evidenciando a especificidade da reação e ausência de ampliações inespecíficas.

A partir dos dados de quantificação relativa, foi possível relacionar a expressão deste RNAm com a variação da atividade da PTP-BMr do extrato solúvel de osteoblastos.

Para se fazer tal correlação, os frascos de cultivo que serviriam para se obter os valores de atividade e quantificação do RNAm foram feitos a partir do mesmo “pool” de células. As medulas de seis fêmures foram extraídas (Material e Métodos 3.1.1) e misturadas, para então serem divididas em quatro frascos de cultivo de 75 cm² e outros quatro frascos de 25 cm², com volumes de material proporcionais à área. As células dos frascos maiores foram tratadas conforme Material e Métodos 3.3 para obtenção do ESO. Foram determinados os valores de atividade (Material e Métodos 3.5), após 15, 16, 19 e 20 dias de cultivo, e as células dos frascos menores foram tratadas para a quantificação do RNAm específico (Materiais e Métodos 3.7), com os mesmos dias de cultivo. Estes dias foram escolhidos com base em dados de atividades previamente realizadas (resultados não mostrados). O gráfico da Figura 7 demonstra os valores de atividade juntamente com os valores relativos de RNA.

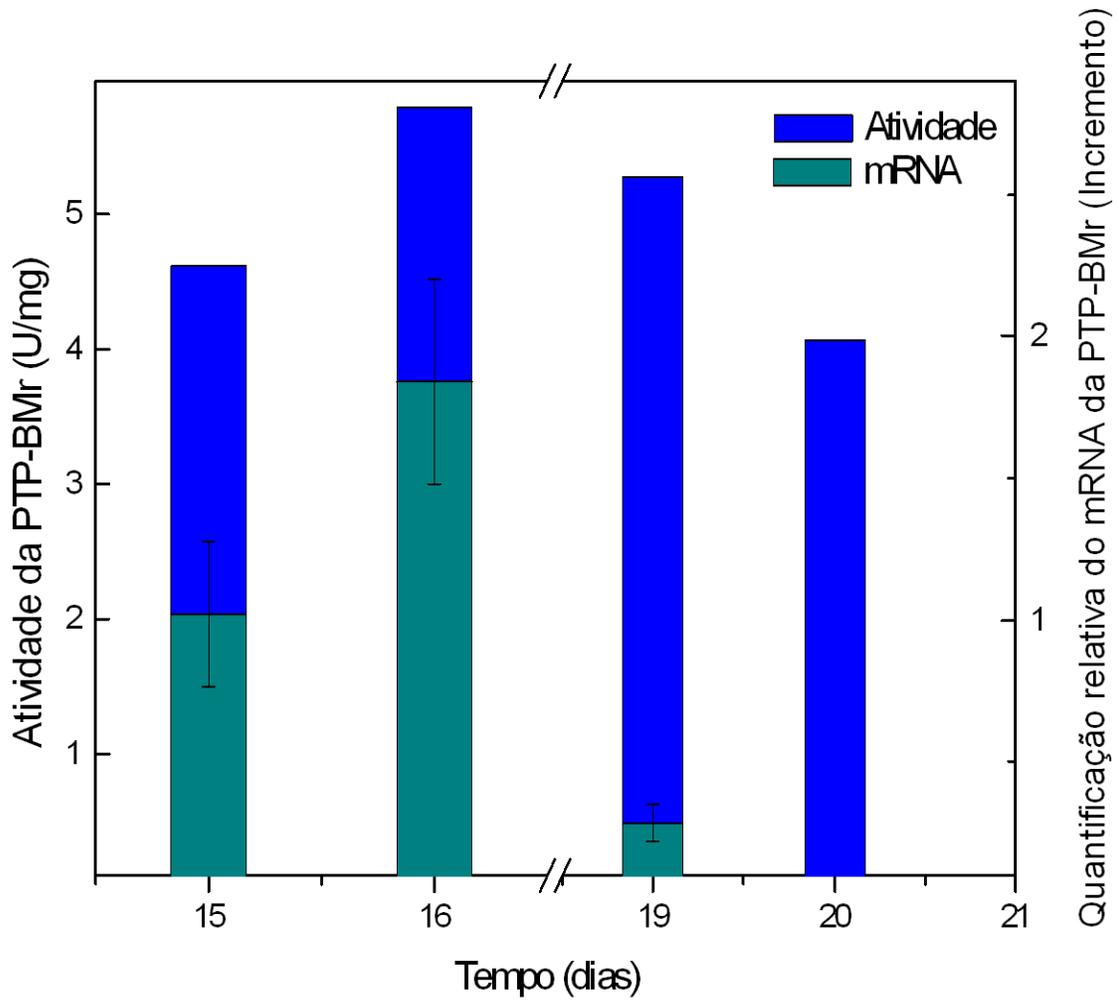


Figura 7. Representação em barras da quantificação relativa do RNAm da PTP-BMr (conforme Material e Métodos 3.7, em verde) e a atividade da PTP-BMr no extrato solúvel de osteoblastos (conforme Material e Métodos 3.5, em azul) em relação aos dias de cultivo das células osteoblásticas extraídas da medula óssea do fêmur de rato.

O aumento da atividade acompanha o grande incremento de expressão e a atividade se mantém com o decaimento da expressão. Com 20 dias praticamente não houve amplificação. A curva de atividade deste gráfico é a curva verde do gráfico da Figura 7.

A atividade da PTP-BMr ocorre principalmente na fase da célula já diferenciada em osteoblasto, sendo esse dado confirmado pelos níveis de transcrito de RNAm.

Pode-se considerar que o aumento da atividade da PTP-BMr é decorrente do aumento da produção desta enzima e não de um sinal de ativação, e que a proteína continua ainda presente e ativa na célula depois da queda da expressão do RNAm.

4.4 Caracterização bioquímica e cinética

4.4.1 Géis de eletroforese

A classe de PTPs compreende enzimas caracterizadas pela massa molecular reduzida, apresentando peso aproximado de 18-20 kDa (Granjeiro et al. 1997a; Chiarugi 2000).

Conforme mostrado no gel de eletroforese (Figura 8A) revelado com prata em condições desnaturantes realizada conforme Material e Métodos 3.8.1, o extrato de proteínas solúveis apresenta uma grande faixa de massa molecular e entre elas uma banda mais intensa de 17,6 kDa.

O gel, quando renaturado, não apresentou nenhuma banda com atividade de fosfomonohidrolase. Entretanto, se a eletroforese for realizada em condição não-desnaturante (Material e Métodos 3.8.2), somente um componente protéico apresenta atividade de fosfomonohidrolase (Figura 8C), empregando-se β -naftilfosfato como substrato.

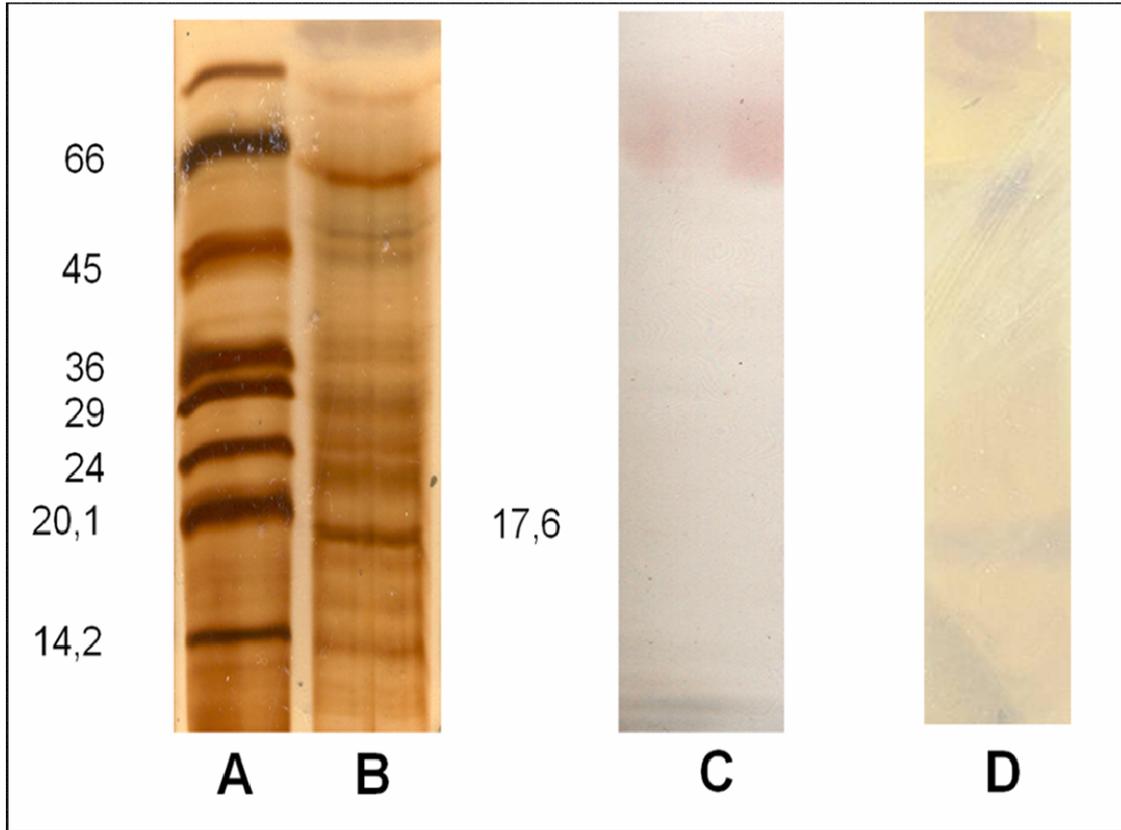


Figura 8. Eletroforese realizada em gel de poliacrilamida 7% em condição desnaturante (A,B e D) e em poliacrilamida 5% em condição não desnaturante (C). **A.** SDS-PAGE do padrão de peso molecular revelado com prata; **B.** SDS-PAGE do extrato solúvel (ESO) revelado com prata; **C.** Eletroforese revelada para atividade fosfohidrolítica: o gel foi incubado em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, Fast Blue RR-salt 0,12% (p/v) e β -naftilfosfato 0,12% (p/v), a 37°C; **D.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 7% da amostra extraída da banda de atividade obtida em C, e revelado com prata.

Quando foi realizada uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida da amostra extraída da banda de atividade do gel C (Material e Métodos 3.8.3), obteve-se uma banda muito próxima do peso molecular de 17,6 KDa o que comprova que a banda obtida no gel de atividade refere-se de fato à PTP-BMr, proteína de interesse.

4.4.2 Estudo do pH ótimo de hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr

Para iniciar a caracterização cinética da enzima, foi realizado um estudo com o objetivo de determinar o pH ótimo de hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr conforme Material e Métodos 3.8.4. Como pode ser observado na Figura 9, a atividade referente a PTP-BMr apresentou um pH ótimo ao redor de 5, característico para este tipo de fosfatase ácida (Granjeiro et al., 1997 a,b; 2002).

Em decorrência da maioria dos trabalhos na literatura utilizar nos estudos das fosfatases ácidas pH 5,0 (Granjeiro e Taga, 1997), e devido também a variação de atividade ter sido muito pequena nos valores próximos deste pH, foi empregado o mesmo pH nos demais estudos de caracterização cinética.

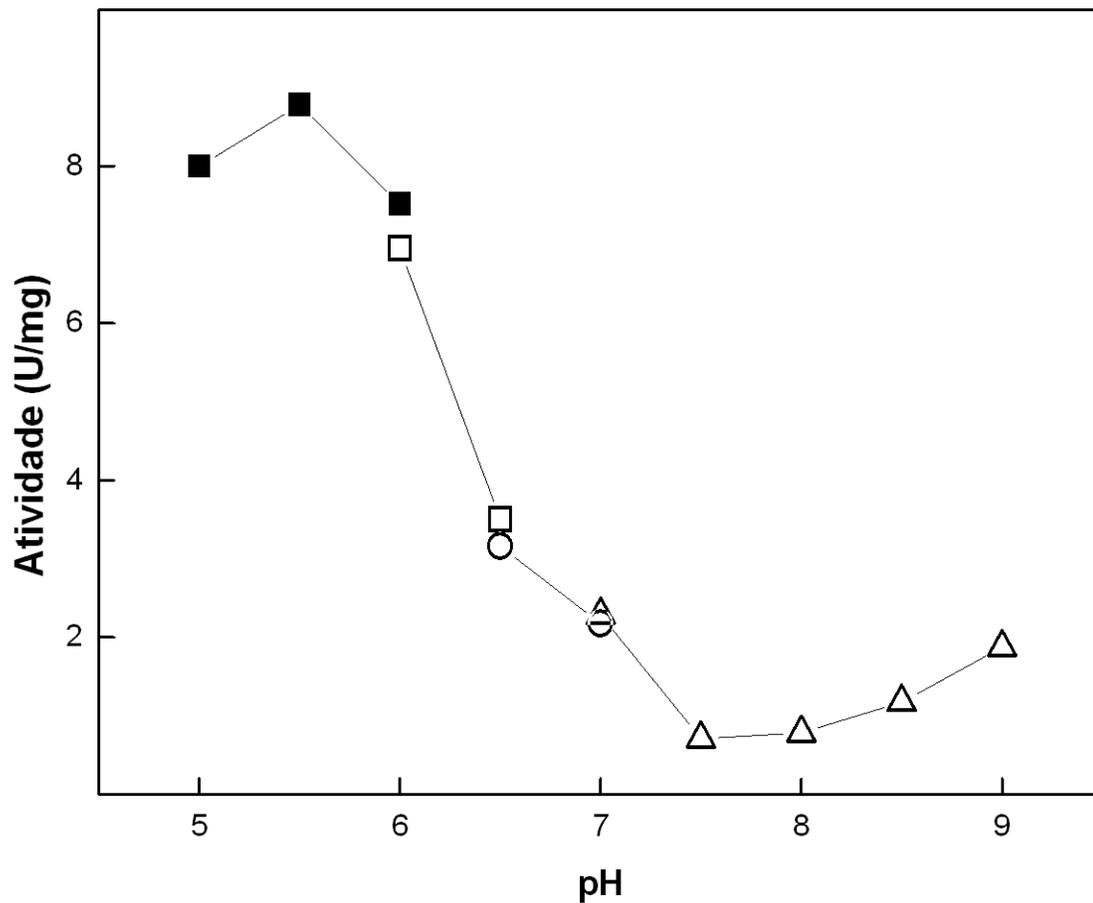


Figura 9. Determinação do pH ótimo de hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr obtida a partir da cultura de osteoblastos por 14 dias, na faixa de pH entre 5,0 e 10,5, utilizando-se os seguintes tampões: (■) MES (pH 5,0 – 6,0), (●) BIS-TRIS (pH 6,0 – 6,5), (▲) Imidazol (pH 6,5 - 7,5), (▼) Tris-HCl (pH 7,0-9,0), como descrito no item 3.8.4 de Material e Métodos. As atividades foram determinadas em 100 mM do tampão apropriado, contendo p-NFF 5 mM, como descrito no item 3.5 de Material e Métodos, utilizando-se 100 μ L de ESO.

4.4.3 Inibição relativa da PTP-BMr

Foi testada a inibição relativa da atividade p-NFFase do extrato solúvel de osteoblastos (ESO) para alguns compostos que atuam como inibidores e os resultados obtidos encontram-se na Figura 10.

Os valores relativos de inibição foram obtidos a partir do valor de atividade do controle sem inibidor. Os dados de inibição da atividade p-NFFase encontrados são muito similares aos descritos por Granjeiro e Taga (1997) e por Fugimoto (1984).

As pequenas diferenças encontradas para os resultados destes autores provavelmente deve-se ao fato de que eles trabalharam com a enzima purificada, e os dados de inibição mostrados na Figura 10 são referentes à inibição de todo o ESO. Isso significa que os inibidores testados devem atuar diferentemente sobre outras enzimas presente no extrato, as quais também possuem a capacidade de hidrolisar p-NFF neste pH.

Como pode ser observado, o p-HMB inibiu 78% da atividade p-NFF do ESO. Isso significa que a atividade total da PTP-BMr corresponde a 78% da atividade de todo o ESO, pois o p-HMB inibe totalmente esta enzima (Granjeiro e Taga, 1997). A atividade residual (22%) corresponde à atividade de outras enzimas que podem ser mais ou menos suscetíveis à presença dos inibidores testados, ou seja, essa atividade residual pode ser insensível ao inibidor testado, ou ser completamente suprimida. Portanto, a porcentagem de inibição da atividade residual pode estar contribuindo para as diferenças encontradas.

O molibdato de amônio inibiu 58% a hidrólise do p-NFF, o fosfato de sódio 1 mM 27%, o fosfato de sódio 10 mM 93%, a tiomicina 17% e o ortovanadato de sódio 58%. Todos esses valores de inibição foram maiores do que os encontrados por Granjeiro e Taga (1997), provavelmente porque esses inibidores têm ação maior sobre a atividade residual comparada à ação sobre a PTP-BMr.

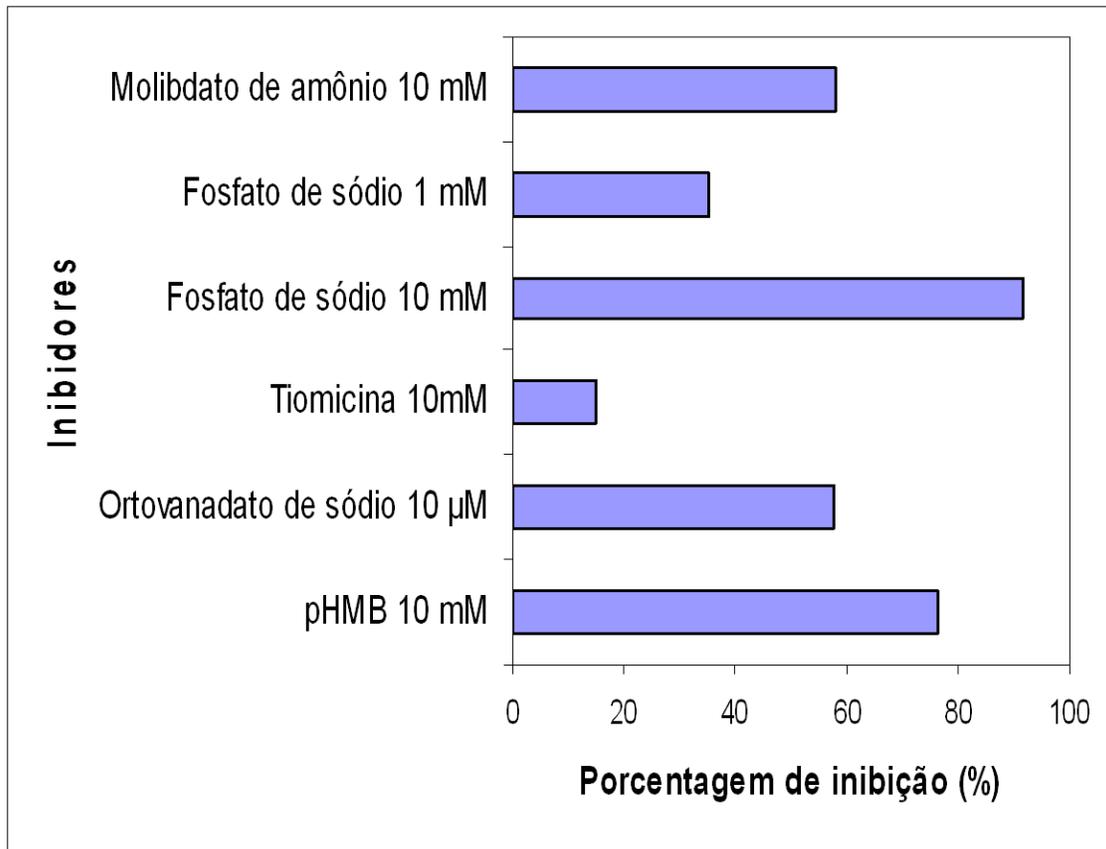


Figura 10. Inibição relativa do extrato solúvel de osteoblastos. As concentrações de inibidores foram deduzidas de Granjeiro e Taga (1997), como ilustrado no gráfico. O ensaio procedeu a 37°C, em meio reacional contendo 5 mM de p-NFF e 100 mM de tampão acetato (pH 5,0), por um período total de 1h de incubação. A atividade do controle, sem inibidores, foi tomada como 100% e as diferenças das demais atividades foram expressas como porcentagens desse valor, mostrado como porcentagem de inibição.

4.4.4 Determinação dos parâmetros cinéticos

O valor de K_m é uma constante para uma dada enzima, ele pode servir de parâmetro de comparação entre enzimas de diferentes organismos ou entre diferentes tecidos ou até mesmo entre estágios de desenvolvimento diferentes. Assim podemos diferenciar, com base também em dados de peso molecular, se duas enzimas de organismos diferentes são iguais ou simplesmente catalisam a mesma reação (Segel, 1979).

O valor de K_m foi obtido fazendo-se um ensaio variando a concentração de substrato e determinando a velocidade da reação em cada ponto. Na Figura 11 demonstra-se a variação da atividade p-NFFase da PTP-BMr em função da concentração de substrato utilizado.

O K_m aparente encontrado para a hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr foi 0,12 mM. Esse valor é muito próximo ao valor de K_m encontrado (0,14 mM) para hidrólise do mesmo substrato por uma fosfatase ácida purificada de rim bovino (Granjeiro e Taga, 1997) e é dez vezes menor que o valor de K_m das fosfatases obtidas do fígado (Taga e Van Etten, 1990) e do coração bovino (Zhang e Van Etter, 1990), da placenta humana (Waheed *et al*, 1988) e de uma isoenzima obtida de hemácias (Dissing e Svensmark, 1990).

O coeficiente de Hill (n), denominado de cooperatividade, foi determinado e representado na inserção da Figura 11, seu valor é de 1,2, o que corresponde a uma pequena cooperatividade positiva.

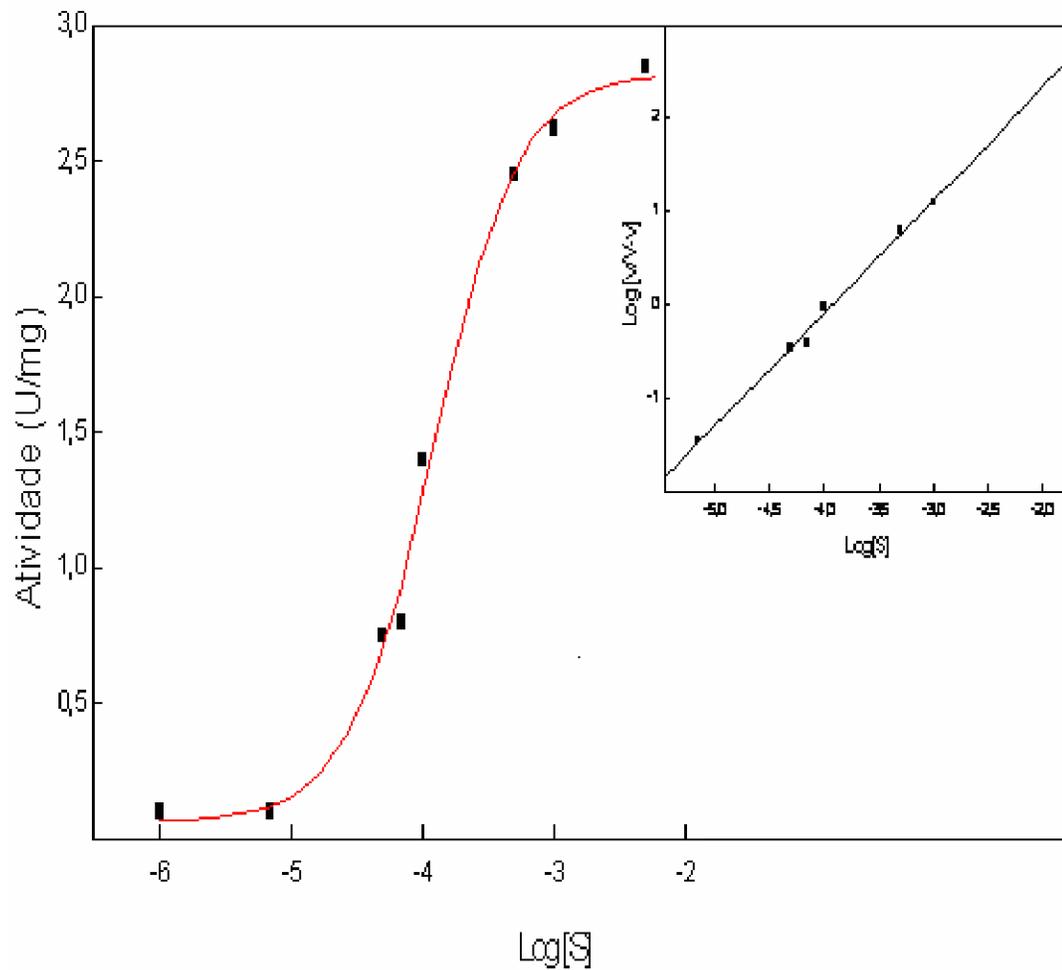


Figura 11. Variação da atividade p-NFFase da PTP-BMr em função da concentração de substrato utilizada. Os valores de velocidade (atividade em U/mg) da reação de hidrólise do p-NFF catalisada pela PTP-BMr foram obtidos como descrito em materiais e métodos 3.8.6. Foi adicionado 100 μ L de ESO em cada tubo. Inserção: Representação de Hill.

5-Titânio

Considerando a biocompatibilidade do titânio como um material de implante, e que diversos comportamentos celulares como adesão, alteração morfológica, alteração funcional, proliferação e diferenciação são fortemente afetadas pelas propriedades físico-químicas da superfície do Ti, incluindo composição, rugosidade, hidrofobicidade, textura e morfologia da camada de óxido sobre o Ti (Willians, 1981; Lim et al., 2001), foi analisado também *in vitro* o perfil de atividade da fosfatase alcalina e da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) em culturas de células osteoblásticas sobre superfícies de titânio.

Conforme 3.9 de Material e Métodos determinou-se a atividade PNFFase do extrato solúvel de osteoblasto (ESO) em superfície de titânio obtidas quando as células atingem a confluência.

Os experimentos demonstraram que a atividade enzimática da PTP-BMr aumentou cerca de 35,5% quando as células osteoblásticas foram cultivadas sobre a superfície de titânio, quando comparada ao controle, células osteoblásticas cultivadas na ausência do disco de titânio, apesar de ter ocorrido uma redução de cerca de 17,5% na quantidade de proteína total presente no extrato solúvel. Os valores obtidos da atividade p-NFFase da fosfatase ácida e quantidade de proteína determinada no extrato solúvel na ausência (controle) e presença de titânio, são mostrados na Tabela 2.

Por outro lado, tanto a atividade p-NFFase da fosfatase alcalina quanto a quantidade de proteína total presentes na fração de membrana reduziram cerca de 59,7% e 49,1%, respectivamente, quando comparadas ao controle.

Assim, a superfície de titânio parece exercer diferentes efeitos sobre as culturas, dependendo da fração e da atividade analisadas.

Tabela 2: Atividade p-NFFase da fosfatase ácida e quantidade de proteína determinada no extrato solúvel na ausência (controle) e presença do disco de titânio, determinados conforme descrito em Material e Métodos 3.9.

| ESO | Proteína (mg/mL) | Atividade Específica (U/mg) | | | |
|-----------------|---------------------|-----------------------------|---------|--------|-----------|
| | | s/inibidor | c/ PHMB | c/TART | (PTP-BMr) |
| controle | 0,252 | 8,6 | 0,19 | 0 | 8,4 |
| titânio | 0,208 | 11,4 | 0 | 0 | 11,4 |

Entre os fatores que influenciam a biocompatibilidade dos materiais em implantes destacam-se as propriedades químicas, mecânicas, elétricas e específicas da sua superfície. A biocompatibilidade dos materiais usados em implantes endoósseos é avaliada principalmente pela relação do implante com o osso (Okumura et al., 2001).

Gerbran e Wassal (2007) relatam que ocorre a produção e a mineralização de uma matriz extracelular após a fixação cirúrgica de implantes de titânio na superfície óssea e que este é um fator fundamental para a biocompatibilidade de materiais de implantes.

Os osteoblastos sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, composta por colágeno tipo I, glicoproteínas e proteoglicanas. Também concentram fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. A atividade da PTP-BMr ocorre principalmente na fase da célula já diferenciada em osteoblasto, sendo esse dado confirmado pelos níveis de transcrito de RNAm.

Estas sugestões foram analisadas também através da quantificação do RNAm em 7, 10 e 14 dias de cultivo das células osteoblásticas.

A quantificação foi feita através de PCR em tempo real conforme descrito em 3.7 de Material e Métodos, mostrada na Figura 12 e 13.

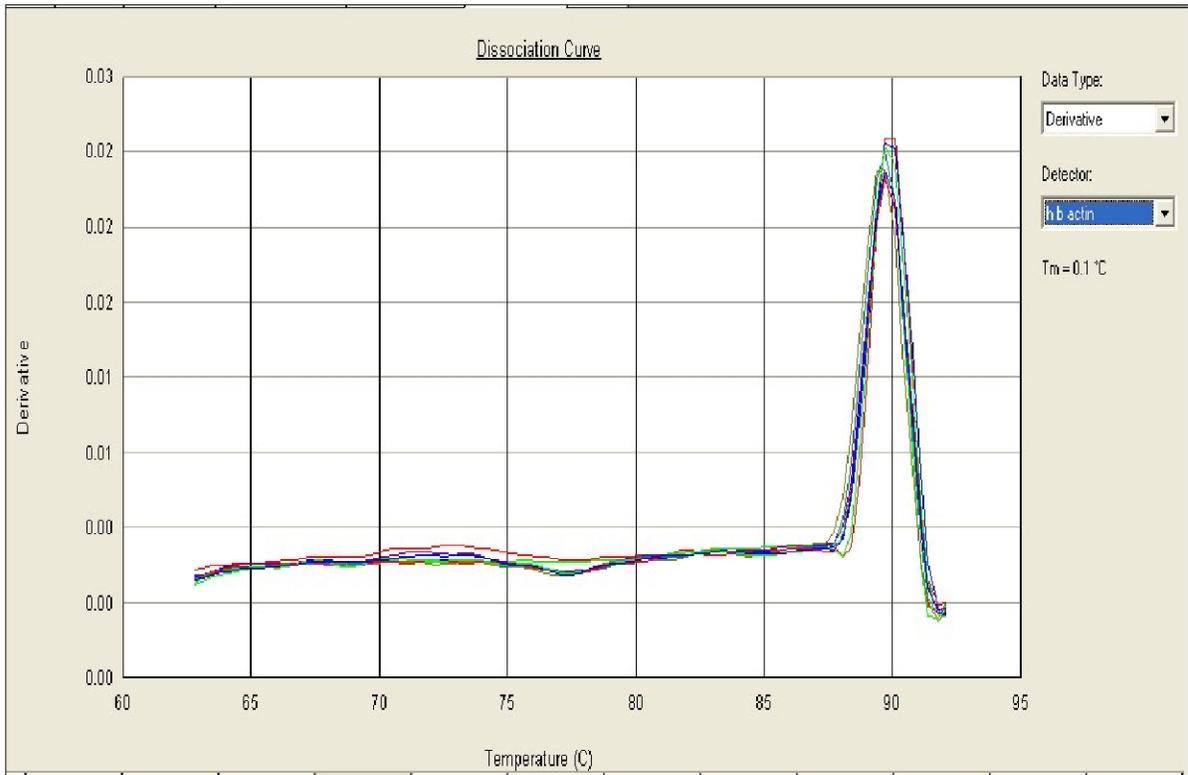


Figura 12. Curva de dissociação da PTP-BMr de todas as amostras corridas no aparelho. Essa Figura mostra a curva de dissociação de todas as amostras (feitas em triplicata), que tiveram temperaturas de dissociação iguais, evidenciando a especificidade da reação e ausência de amplificações inespecíficas.

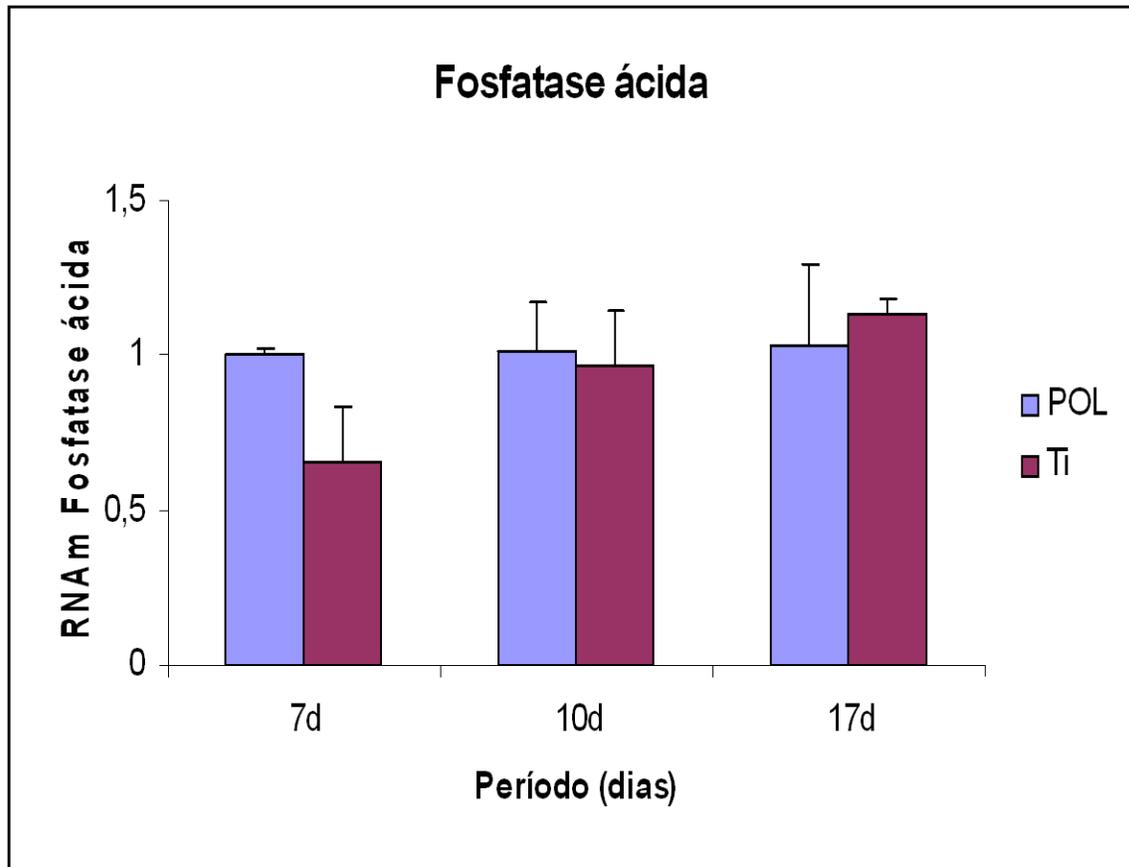


Figura 13. Quantificação do RNAm da PTP-BMr presente no ESO através de PCR em tempo real conforme Material e Métodos 3.7, em 7, 10 e 17 dias de cultivo de células osteoblásticas. As barras em azul representam a quantificação do RNAm sobre placa de polietileno, as barras em roxo representam a quantificação do RNAm na presença do disco de titânio.

Na Figura 12 as curvas de dissociação de todas as amostras que foram quantificadas através de PCR em tempo real podem ser observadas. As temperaturas de dissociação são todas coincidentes evidenciando a especificidade da reação e ausência de amplificações inespecíficas.

A quantificação do RNAm através de PCR em tempo real encontra-se representada na Figura 13. Com 7 dias de cultivo de células osteoblásticas a quantidade de RNAm está ligeiramente reduzida quando comparada com o grupo na ausência de titânio (controle). Com 10 e 17 dias de cultivo não é observada significativa diferença.

Mas deve ser lembrado que, conforme mostrado na Figura 7 quando é avaliada a evolução da expressão do RNAm é observado um pico até 16^o dia de cultivos de células osteoblásticas. Desta maneira o aumento da atividade da fosfatase ácida observado na presença da superfície de titânio (Tabela 2) deverá ser investigado com mais detalhes, pois não é devido ao aumento de sua expressão.

6. Conclusão

A metodologia de extração da PTP-BMr foi otimizada. Ela pode ser extraída de culturas (primárias) com 16 a 19 dias de cultivo.

O uso de culturas secundárias demonstrou-se mais eficiente no cultivo das células, pois, possibilitou uma forma de estimar o número inicial de células nas garrafas de cultivo, já que, foi demonstrada uma grande variação do perfil de atividade da PTP-BMr, e a densidade de células dentro dos frascos de cultivo mostrou ser responsável por tal variação.

A PTP-BMr foi parcialmente caracterizada cineticamente através da determinação da atividade da PTP-BMr em osteoblasto, determinação de parâmetros cinéticos, estudo do pH-ótimo de hidrólise do p-NFF pela PTP-BMr, SDS-PAGE e atividade em gel de poliacrilamida do extrato citoplasmático.

Esta caracterização revelou que ela apresenta uma pequena cooperatividade positiva, com um coeficiente de Hill (n) de 1,2, K_m 0,12 mM e pH ótimo em torno de 5,0, típico de uma fosfatase ácida.

Observa-se que a PTP-BMr está presente durante a diferenciação e proliferação celular até atingir a mineralização. Portanto, trata-se de uma proteína indutível.

Foi verificado que a maior atividade ocorre principalmente na fase da célula já diferenciada em osteoblasto, sendo esse dado confirmado pelos níveis de transcrito de RNAm.

Quando em presença de uma superfície de titânio há um maior aumento na atividade catalítica do que nos níveis de RNAm da PTP-BMr. Desta maneira o aumento da atividade da fosfatase ácida observado na presença da superfície de titânio deverá ser investigado com mais detalhes, pois não é devido ao aumento de sua expressão.

7. Bibliografia

- ALMEIDA, J.R.C.; PEDROSA, N.L.; LEITE, J.B.; FLEMING, T.R.P.; CARVALHO, V.H.; CARDOSO, A.A.A. (2007) Marcadores tumorais: Revisão de Literatura. *Rev. Bras. de Cancer.* 26(3): 305-316.
- AOYAMA, H.; SILVA, T.M.A.; MIRANDA, A.A.; FERREIRA, C.V. (2003) Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. *Quimica Nova.* 26(6): 896-900.
- ANDERSON, H.C. (1973) Calcium accumulating vesicles in the intercellular matrix bone, in hard tissue growth, repair and remineralization. *Ciba Foundation Symposium 11 (New Series) Elsevier.* p. 213-26.
- ANDERSON, H.C. (1976) Matrix vesicle calcification. *Fed. Proc.* 35: 105-108.
- ANDERSON, C.; GARIMELLA, R.; TAGUE, S.E. (2005) The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. *Front. Biosci.* 10: 822-837.
- BARROS, N.E.F.; OLIVEIRA, E.M.M.; MARIN, V.A. (2008) Aplicabilidade da metodologia de reação de polimerase em tempo real na determinação do percentual de organismos geneticamente modificados em alimentos. *Rev. Nutr.* 21(1): 85-92.
- BLUM, H.; BEIR, H.; GROSS, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electroforesis.* 8: 93-99.
- BLUMENTHAL, N.C. (1989) Mechanism of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 247: 279-289.
- BOSKEY, A.L. (1981) Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin. Orthop.* 157: 225-257.
- BOTTINI, N.; BITTINI, E.; BOTTINI, F.G.; MUSTELIN, T. (2002) Low molecular weight protein phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms. *Arc. Immun et Therapie Exp.* 50: 95-104.
- BRANEMARK PI.; ADELLI R.; BREINE U.; HANSSON BO.; LINDSTROM J.; OHLSSON A. (1969) Intra-osseous anchorage of dental prostheses. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 3(2): 81-100.
- BRANEMARK PL.; HANSSON B.; ADELL R. (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw: Experience from a 10-year. *Period Scand J Plast Reconstr Surg.* 11: 1-132

- BRITO, A.N.M.; ANDRADE, M.O., PEREIRA, T.M.M.; PEREIRA, N.M.L.; SILVA, T.M.M. (2005) A importância das proteínas fosfatases nos linfócitos humanos *NewsLab*.69:102-108.
- BUCCIATINI, M.; CHIAGURI, P.; TADDEI, L.; STEFANI, M. RAUGEI, G.; NORDLUND, P.; RAMPONI, G. (1999) The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr131 or Tyr132 by Src kinase. *FEBS Lett.* 456(1):73-8.
- BUZALAF, M.A.; TAGA, E.M.; GRANJEIRO, J.M.; FERREIRA, C.V.; LOURENCAO, V.A.; ORTEGA, M.M.; POLETTO, D.W.; AOYAMA, H. (1998) Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. *Exp Lung Res.* 24(3):269-72.
- CAMOLEZI, F.L.; DAGHASTANLI, K.R.; MAGALHAES, P.P.; PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int. J. Biochem Cell Biol.* 34(9):1091-101.
- CARANO, R.A.D.; FILVAROFF, E.H. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Disc Today.* 8(21):980-989.
- CASELLI, A.; MARZOCCHINI, R.; CAMICI, G.; MANAO, G.; MONETI, G.; PIERACCINI, G.; RAMPONI, G. (1998) The Inactivation mechanism of Low Molecular Weight Phosphotyrosine-protein Phosphatase by H₂O₂. *The J. of Biol Chem.* 273(49):32554-32560.
- CAVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIC, H.G.; SAAD, M.J.A. (2002) Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46(4):419-425.
- CHENG, S.L.; ZHANG, S.F. and AVIOLI, L.V. (1996) Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J. Cel. Biochem.* 61:182-193.
- CHENG, A.; DUBE, N.; GU, F.; TREMBLAY, M.L. (2002) Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. *Eur. J. Biochem.* 269(4):1050-1059.
- CHENGALVALA, M.V.; BAPAT, A.R.; HURLBURT, W.W.; KOSTEK, B.; GONDER, D.S.; MASTROENI, R.A.; FRAIL, D.E. (2001) Biochemical characterization of osteo-testicular protein tyrosine phosphatase and its functional significance in rat primary osteoblasts. *Biochemistry.* 40:814-21.
- CHERNOFF, J.; LI, H.C. (1985) A major phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 240(1):135-145.

- CHIARUGI, P.; CIRRI, P.; TADDEI, L.; GIANNONI, E.; CAMICI, G.; MANAO, G.; RAUGEI, G.; RAMPONI, G. (2000) The low M(r) protein-tyrosine phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.*275(7):4640-4646.
- CHIARUGI, P.; TADDEI, M.L.; SCHIAVONE, N.; PAPUCCI, L.; GIANNONI, E.; FIASCHI, T.; CAPACCIOLI, S.; RAUGEI, G.; RAMPONI, G.L. (2004) LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. *Oncogene*.23(22):3905-3914.
- CHIARUGI, P.; TADDEI, M.L.; RAMPONI, G. (2005) Oxidation and tyrosine phosphorylation: synergistic or antagonistic cues in protein tyrosine phosphatase. *Cell. Mol. Life Sci.*62(9):931-936.
- DALLAN, L.A.O.; MIYAKAWA, A.A.; LISBOA, L.A.; FILHO, C.A.A.; CAMPOS, L.; BORIN, T.; KRIEGER, J.E.; OLIVEIRA, S.A. (2004) Precocious structural and molecular (cDNA) changes in the human saphenous veins cultivated under arterial hemodynamic conditions. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.*19(2):126-135.
- DECLERCQ, H.; VAN DEN VREKEN, N.; DE MAEYER, E.; VERBEECK, R. SCHACHT, E.; DE RIDDER, L.; CORNELISSEN, M. (2004) Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials*.25:757-768.
- DISSING, J. E SVENSMARK, O. (1990) Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A,B and C isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta*.1041:232-42.
- DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. (2000) The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*.289(1):1501-1504.
- FARGUHARSON, C. and JEFFERIES, D. (2000) Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. *Poult. Sci.*(79):994-1004.
- FAUMAN, E.B.; SAPER, M.A. (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends Biochem. Sci.*26(11):413-417.
- FREEMONT, A.J. (1993) Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Path.*(74)411-416.
- FIASCHI, T.; CHIARUGI, P.; BURICCHI, F.; GIANNONI, E.; TADDEI, M.L.; TALINI, D.; COZZI, G.; ZECCHI-ORLANDINI, S.; RAUGEI, G.; RAMPONI, G. (2001) Low molecular weight protein-tyrosine phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. *J. Biol. Chem.*276(52):49156-49163.

- FUGIMOTO, S.; URATA, Y.; NAKAGAWA, T. E OHARA, A. (1984) Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. *J. Biochem.*96:1079-88.
- GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.; MELLO, W.S.; GODOI, H.S. (2008) Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta. Sci. Technol.*30 (1):109-118.
- GEBRAN, M.P.; WASSAL, T (2007) Avaliação *in vitro* da adesão de osteoblastos sobre implantes ossointegráveis com superfície tratada. *Implantinews.*4(1):79-84.
- GERBER, H.P. and FERRARA, N. (2000) Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc. Med.*(10):223-228.
- GIBSON UE, HEID CA, WILLIAMS PM. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*6(10):995-1001.
- GLIMCHER, M.J. (1987) The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Intr. Course Lect.*36:49-69.
- GRANJEIRO, J.M.; FERREIRA, C.V.; JUCA, M.B.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. (1997a) Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. *Biochem. and Mol. Biol. Intern.* 41(6):1201-8.
- GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M.; AOYAMA, H. (1997b) Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad. Bras. Cienc.*69(4):451-60.
- GRANJEIRO, J.M.; TAGA, E.M. AOYAMA, H. (1999) Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups. *Phys. Plantarum.*107(2):151-8.
- GRANJEIRO, J.M.; FERREIRA, C.V.; GRANJEIRO, P.A.; DA SILVA, C.C.; TAGA, E.M.; VOLPE, P.L.; AOYAMA, H. (2002) Inhibition of bovine kidney low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase by uric acid. *J. of Enzyme Inhibition and Medicinal Chem.*17(5):345-50.
- HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. (1996)Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986-994.
- HIGUCHI. R, FOCKLER C, DOLLINGER G, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time Biotechnology. *11(9):1023-1030.*

- HLOBIKOVÁ, A.; KNILLOVÁ, J.; BÁRTEK, J.; LUKÁS, J.; KOLÁR, Z. (2003) The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. *Biomed. Papers.*147(1):19-25.
- HUNTER, T. (2000) The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. *The Croon. Lecture.*; v.353, p.583-605, 1998. apud MORRISON, F.M.; MAURO, L.J.; MORRISON, D.F. Structural characterization and chromosomal localization of the mouse cDNA and gene encoding the bone tyrosine phosphatase, most-PTP. *Gene.*257:195-208.
- JIA, Z.; BARFORD, D.; FLINT, A.J.; TONKS, N.K. (1995) Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science.*268:1754-8.
- JOHNSON, L.N.; BARFORD, D. (1993) The effect of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*22:199-232.
- JOHNSON, T.O.; ERMOLIEFF, J.; JIROUSEK, M.R. (2002) Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for diabetes. *Nat Rev Drug Disco.*1(9):696-709,.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. S. F. (2004) *Histologia Básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga.
- KOBOKI, Y.; TAKITA, H.; KOMORI, T.; MIZUMO, M.; FURU-UCHI, E. and Taniguchi, K. (1989) Separation of bone matrix-proteins by calcium-induced preparation. *Calcif. Tissue Int.*44:269-277.
- KOGIANNI, G.; NOBLE, B. S. (2007) The biology of osteocytes. *Curr Osteoporos Rep.*5(2):81-86.
- KREBS, E (1994) The growth of research on protein tyrosine phosphatases. *Ann. Rev. Biochem Sci.*v.39:439 apud MAURO, L;J, *et al.* (1996) Parathyroid hormone regulates the expression of the receptor protein tyrosine phosphatase, OST-PTP, in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology.*137(3):925-33.
- LAEMMLI, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.*227:680-685.
- LAFORGIA, S.; MORSE, B.; LEVY, J.; BARNEA, G.; CANNIZZARO, L.A.; LI, F.. NOWELL, P.C. BOGHOSIAN-SELL, L.; GLICK, J.; WESTON, A.; *et al.* (1991) Receptor protein-tyrosine phosphatase gamma is a candidate tumor suppressor gene at human chromosome region 3p21. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*88:5036-40.

- LIM YJ, OSHIDA Y, ANDRES CJ, BARCO MT. (2001) Surface characterization of variously treated titanium materials. *Int. J. Oral MaxilloFac. Implants*.16:333–342.
- LIVAK. K.; SCHMITTGEN, T. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-DDCT} Method. *Methods*. 25:402-8.
- LOVERIDGE, N. FARQUHARSON, C. (1993) Studies on growth plate chondrocytes in situ: cell proliferation and differentiation. *Acta Paediatr. Suppl*.391:42-48.
- MACCARI, R.; PAOLI, P.; OTTANÀ, R.; JACOMELLI, M.; CIURLEO, R.; MANAO, G.; STEINDL, T.; LANGER, T.; VIGORITA, M.G.; CAMICI, G. (2007) 5-Arylidene-2,4-thiazolidinediones as inhibitors of protein tyrosine phosphatases. *Bioorg. Med. Chem*.15(15):5137-5149.
- MALENTACCHI, F.; MARZOCCHINI, R.; GELMINI, S.; ORLANDO, C.; SERIO, M.; RAMPONI, G.; RAUGEI, G. (2005) Up-regulated expression of low molecular weight protein tyrosine phosphatases in different human cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun*.334(3):875-883.
- MANIATOPOULOS C.; SODEK J.; MELCHER AH. (1998) Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res*.254(2):317-30.
- MARZIA, M.; SIMS, N.A.; VOIT, S.; MIGLIACCIO, S.; TARANTA, A.; BERNARDINI, S.; FARAGGIANA, T.; YONEDA, T.; MUNDY, G.R.; BOYCE BF, BARON, R.; TETI, A. (2000) Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J. Cell Biol*.151(2):311-20.
- MAURO, L.J.; OLMSTED, E.A.; DAVIS, A.R.; DIXON, J.E. (1996) Parathyroid hormone regulates the expression of the receptor protein tyrosine phosphatase, OST-PTP, in rat osteoblast-like cells. *Endocrinology*.137(3):925-33.
- MORRISON, F.M.; MAURO, L.J. (2000) Structural characterization and chromosomal localization of the mouse cDNA and gene encoding the bone tyrosine phosphatase, most-PTP. *Gene*.257:195-208.
- NIMNUAL, A. S.; TAYLOR, L. J.; BAR-SAGI, D. (2003) Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol*.5(3):185-187.

- NIJWEIDE, P.J.; MULDER, R.P.J. (1986) Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes. *Histochemistry*.84:342-347. apud CHENGALVALA, M.V.; BAPAT, A.R.; HURLBURT, W.W.; KOSTEK, B.; GONDER, D.S.; MASTROENI, R.A.; FRAIL, D.E. (2001) Biochemical characterization of osteo-testicular protein tyrosine phosphatase and its functional significance in rat primary osteoblasts. *Biochemistry*.40:814-21.
- NYSTROM, F.H.; QUON, M.J. (1999) Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal*.11(8):563-574.
- OKUMURA, A.; GOTO, M.; YOSHINARI, M.; MASUKO, S.; KATSUKI, T.; TANAKA, T. (2001) Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2). *Biomaterials*.22 (16):2263-2271.
- OSYKZKA, A.M. and LEBROY, P.S. (2005) Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology*.146:3428-3437.
- OWEN, T. *et al.* (1990) *J. Cell. Physiol*.143:420-430, apud Chengalvala, M.V.; Bapat, A.R.; Hurlburt, W.W.; Kostek, B.; Gonder, D.S.; Mastroeni, R.A.; Frail, D.E (2001) Biochemical characterization of osteo-testicular protein tyrosine phosphatase and its functional significance in rat primary osteoblasts. *Biochemistry*.40:814-21.
- PANDEY, S.K.; YU, X.X.; WATTS, L.M.; MICHAEL, M.D.; SLOOP, K.W.; RIVARD, A.R.; LEEDOM, T.A.; MANCHEM, V.P.; SAMADZADEH, L.; MCKAY, R.A.; MONIA, B.P.; BHANOT, S. (2007) Reduction of low molecular weight protein-tyrosine phosphatase expression improves hyperglycemia and insulin sensitivity in obese mice. *J. Biol. Chem*.282(19):14291-14299.
- PEREIRA, M.L.L.; COSTA, M.A.; CARVALHO, J.F.C.; FERNANDES, M.H.R.; (2005) Efeito da nicotina na morfologia e proliferação de células de osso alveolar humano em diferentes fases de diferenciação. *Rev. Portuguesa de Medicina Dentária*.46(2):81-91
- PIZAURO, J.M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. (2002) Tibial dyschondroplasia: mechanisms of the lesion and control. *Braz. J. of Poultry Science (Revista Brasileira de Ciência Avícola)* 4(3):169-185.
- POOLE, A.R.; MITSUI, Y.; HINEK A. and LEE, E.R. (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat. Rec*.224:167-179.

- PROSTET BRANEMARK PI. (1983) Osseointegration and its experimental background. *J Dent* .50(3):399-410.
- QUEIROZ, C.M.T. (2002) Trabalho de conclusão do curso de Neuroquímica de Pós-graduação em Neurologia experimental da Universidade Federal de São Paulo.
- RAMPONI, G.; MANAO, G.; CAMICI, G.; CAPPUGI, G.; RUGGIERO, M.; BOTTARO, D. P. (1989) The 18 KDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.*250(2):469-473.
- RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. (2002) Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. *Cell. Mol. Life Sci.*59(6):941-949.
- RIGACCI, S.; DEGL'INNOCENTI, D.; BUCCIANTINI, M.; CIRRI, P.; BERTI, A.; RAMPONI, G. (1996) pp60v-src phosphorylates and activates low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*271(3):1278-81.
- RUGIERO, M.; PAZZAGLI, C.; RIGACCI, S.; MAGNELLI, L.; RAUGEI, G.; BERTI, A.; VINCENZO, P.; CHIARUGIA; JACALYN, H.; PIERCE; CAMICIB, G.; RAMPONIB, G. (1993) Negative growth control by a novel low Mr phosphotyrosine protein phosphatase in normal and transformed cells. *FEBS Lett.*326:294-8.
- SEGEL, I.H. (1979) *Bioquímica Teoria e Problemas*, 2a Ed. Editora S.A. Rio de Janeiro.
- SCHROEDER, A.; ZYPEN, E.; STICK, H. (1981) The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium-sprayed surfaces. *J Maxillofac Surg.*1:15-25.
- SHIMOHAMA, S.; FUGIMOTO, S.; TANIGUCHI, T.; KAMIYAMA, M.; KIMURA, J. (2004) Reduction of low molecular weight acid phosphatase activity in Alzheimer brains. *Annals of neurology.*33 (6):616-621.
- TAGA, E.M.; VAN ETTEN, R.L. (1982) Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys* v.214:505-15.
- TAILOR, P.; GILMAN, J.; WILLIAMS, S.; COUTURE, C.; MUSTELIN, T. (1997) Regulation of the Low Molecular Weight Phosphotyrosine Phosphatase by Phosphorylation at Tyrosines 131 and 132. *The J. of Biol. Chem.*272 (9):5371-4.

- TAILOR, P.; GILMAN, J.; WILLIAMS, S.; COUTURE, C.; MUSTELIN, T. (1999) Regulation of the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase by phosphorylation at tyrosines 131 and 132. *J. Biol. Chem.*272(9):5371-4
- VAN DEN DOLDER, J. and CANSEN, J.A. (2007) Enrichment of osteogenic cell populations from rat bone marrow stroma. *Biomaterials.*28:249-55.
- VAN HUIJSDUIJNEN, R.H.; BOMBRUN, A.; SWINNEN, D. (2002) Selecting protein tyrosine phosphatases as drug targets. *Drug Discov. Today.*7(19):1013-1019.
- WAHEED, A.; LAIDLER, P. M.; WO, Y. Y. P. E VAN ETTER, R. L. (1988) Purification and physicochemical characterization of a human placenta acid phosphatase activity. *Biochemistry.*27:4265-73.
- WALTON, K.M. DIXON, J.E. (1993) Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev.* 62:101-20.
- WATT, F.M. (1986) The extracellular matrix and cells shape. *Tibs.*11:482-485.
- WILLIAMS DF. (1981) Titanium and titanium alloys. In: Williams DF, editor. *Biocompatibility of clinical implant materials.* Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc.1: 9–44.
- WO, Y.Y.; MCCORMACK, A.L.; SHABANOWITZ, J.; HUNT, D.F.; DAVIS, J.P.; MITCHELL, G. L.; VAN ETTEN, R.L. (1992) Sequencing, cloning, and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*267:10856-10865.
- WO, Y.Y. P.; ZHOU, M.M.; STEVIS, P.; DAVIS, J.P.; ZHANG, Z.Y.; VAN ETTEN, R.L. (1992) Cloning, expression, and catalytic mechanism of the low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. *Biochemistry.*31:1712-1721.
- WITHIER, R.E.; BIZAZ, S.; RUSSEL, R.G. and FIEISCH, H. (1972) Relationship between pyrophosphate, amorphous calcium phosphate and other factors in the sequence of calcification in vivo. *Calcif. Tissue Res.*10:198-206.
- WITHIER, R.E. (1975) Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.*409:128-43.
- WITHIER, R.E. (1977) Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles, and extracellular fluid. *Calcif. Tissue Res.*23:125-33.

- WITHIER, R.E. (1982) A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on role of cells, mitochondria and matrix vesicles. *Clin. Orthop.*169:219-42.
- WITHIER, 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.*260:15972-9.
- WITHIER, R.E. (1986) Mechanism of matrix vesicles mediated mineralization. In: "Cell Mediated Calcification and Matrix-Vesicles". (Ali, S.Y. ed.) Elsevier Sciences Publishers B.V. Amsterdam.47-55.
- XING, K.; RAZA, A.; LOFGREN, S.; FERNANDO, M.R.; HO, Y.S.; LOU, M.F. (2007) Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) and its possible physiological functions of redox signaling in the eye lens. *Biochim. Biophys. Acta.*1774(5):545-555.
- YAMAZOE, T.; AOKI, K.; SIMOKAWA, H.; OHYA, K.; TAKAGI, Y. (2002) Gene expression of bone matrix proteins in a calcified tissue appeared in subcutaneously transplanted rat dental pulp. *J. Med. Dent. Sci.*49(1):57-66
- ZABELL, A. P. R; SCHROFF, A. D; BAIN, B. E; ETTEN, R. L. V; WIEST, O. (2006) Crystal structure of the human B-form Low Molecular Weight Phosphotyrosyl Phosphatase at 1.6- Å Resolution. *The J. of Biol. Chem.*281(10):6520-6527.
- ZHANG, Z.Y. (2002) Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*42:209-234.
- ZHANG, Z.Y. (2001) Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*5(4):416-423.
- ZHANG, Z.Y.; ZHOU, B.; XIE, L. (2002) Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. *Pharmacol. Ther.*93(3):307-17.
- ZHANG, Z.Y. E VAN ETTEN, R. L. (1990) Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart. *Arch. Biochem. Biophys.*282:39-49.