

**PERFIL DE ATIVIDADE DA PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASE DE BAIXA MASSA MOLECULAR  
RELATIVA E DA FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE  
AO TARTARATO EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS  
DURANTE O CICLO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

**Tatiana Salles de Souza**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Biologia Oral.

(Edição Revisada)

**Bauru**

2005

**PERFIL DE ATIVIDADE DA PROTEÍNA TIROSINA  
FOSFATASE DE BAIXA MASSA MOLECULAR  
RELATIVA E DA FOSFATASE ÁCIDA RESISTENTE  
AO TARTARATO EM OSTEÓBLASTOS HUMANOS  
DURANTE O CICLO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

**Tatiana Salles de Souza**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Biologia Oral.

(Edição Revisada)

**Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**

**Bauru**

**2005**

de Souza, Tatiana Salles

So89p Perfil de atividade da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa e da fosfatase ácida resistente ao tartarato em osteoblastos humanos durante o ciclo e diferenciação celular. / Tatiana Salles de Souza – Bauru, 2005.

90p. : 15 il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos, fazendo a devida citação da autoria deste trabalho.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

# TATIANA SALLES DE SOUZA

## Dados Curriculares

---

Filiação	Wilson Oliveira de Souza Filho e Alice Salles de Souza.
Nascimento	10 de setembro de 1981 Belém – PA.
1999 – 2002	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo.
2001-2002	Bolsista de Iniciação Científica pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo na Disciplina de Patologia sob orientação do Prof. Dr. Alberto Consolaro.
2003-2005	Curso de Pós-Graduação em Biologia Oral, em nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Bauru, USP.

# DEDICATÓRIA

*Aos meus grandes amores...*

*Meu pai e grande ídolo, Wilson*

*Minha mãe e anjo da guarda, Alice*

*Meu irmão, Thiago*

*Meu namorado, Odirlei*

*“Quem quiser se curar da ignorância  
precisa confessá-la”*

*Michel de Montaigne*

## *Agradecimentos Especiais*

### **A Deus,**

Razão da minha existência, fonte de toda a minha força e esperança, agradeço por tantas oportunidades e por sempre ter sido cercada de muito amor. Seu amparo diário se revela em todos os momentos da minha vida.

### **A minha querida família,**

Mãe, Pai, Thiago... Toda a paciência, compreensão, torcida e infinito amor fizeram a diferença em todos os meus momentos difíceis e a alegria genuína demonstrada nos momentos em que as coisas começavam a dar certo sempre me comoveram, vocês são meus melhores amigos. A construção do meu caráter se deve a grandeza de espírito de vocês.

### **Ao meu namorado, Odirlei,**

Todo o seu afeto, incentivo, compreensão e alegria fazem a minha vida se encher de muito amor. Obrigada pela paciência, tolerância e por me amar, mesmo me conhecendo profundamente. Você definitivamente me faz querer ser uma pessoa melhor.

### **A Mércia e Érica Malaspina,**

Vocês me receberam nesta família com muito carinho e respeito, obrigada pela torcida constante.

### **Ao Prof. Dr. José Mauro Granjeiro**

Obrigada por confiar a mim uma pesquisa sobre um tema tão querido a você. Ao me sugerir este trabalho, mesmo sabendo da minha mais completa

imaturidade científica a respeito deste assunto, você mudou completamente a minha história. Ter sido aceita no Laboratório de Bioquímica me revelou um mundo completamente misterioso e, de certa forma, assustador mas definitivamente incrível, por isto, lhe serei eternamente grata.

### **À Profa. Dra. Ana Paula Campanelli**

A sua seriedade, coerência e generosidade a tornam um modelo para mim na prática docente e na pesquisa, seus conselhos e observações foram muito importantes na execução deste trabalho. Muito obrigada pela ajuda no meu desenvolvimento pessoal e científico.

### **Às minhas amigas Esther Takamori, Kellen Gasque e Tatiana Furlani**

A companhia de vocês encheu minha vida de estímulo e alegria. Nunca esquecerei das nossas sessões de análise sobre a vida e a prática científica. Desejo muita felicidade a vocês.

### **Às minhas queridas amigas Patrícia, Renata, Glaís, Lílian e Tânia**

Vocês se tornaram a minha família durante a graduação, e me proporcionaram as lembranças mais incríveis da minha juventude. Obrigada por todo o apoio, carinho e compreensão pela minha ausência, amo muito todas vocês.

Aos amigos **Cristina Sicca e Juliano Pessan** pela amizade e companheirismo durante todo o curso, guardarei no meu coração com muito carinho a alegria e descontração presentes em todos os momentos, mesmo nos mais difíceis.



## *Agradecimentos*

À **Faculdade de Odontologia de Bauru** na pessoa de sua Diretora Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro e do Coordenador da Pós-Graduação Prof. Dr. José Carlos Pereira.

Ao **Governo do Estado de São Paulo**, na pessoa de seu Governador Geraldo Alkimin por proporcionar a minha formação acadêmica durante a Graduação e Pós-graduação por meio de ensino gratuito e de indiscutível qualidade.

Aos professores **João Santana Silva** (Laboratório de Imunologia – FMRP-USP), **Mary Cleide Sogayar** (Laboratório de Biologia Molecular – IQ – USP), **Francisco Rafael Martins Laurindo** (Laboratório de Biologia Vascular – INCOR – USP) e pós-graduandos **Marcelo Pereira** (Laboratório de Imunologia – FMRP – USP) e **Célio Xavier dos Santos** (Laboratório de Biologia Vascular – INCOR – USP) pela imediata solicitude em colaborar com a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do **Departamento de Ciências Biológicas**, em especial do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, **Profa. Dra. Marília Buzalaf** e **Prof. Dr. Eulázio Taga** pela agradável convivência e por terem ajudado a construir um laboratório de referência na nossa Faculdade.

Aos amigos do grupo de Cultura Celular, **Ariadne, Esther, Eduardo, Katiúcia e Willian** pelos desafios compartilhados e a persistência no sonho na Engenharia de Tecidos.

À 1ª turma de pós-graduação em Biologia Oral, **Cristina, Juliane, Kellen, Mauro e Rejane** pela amizade e apoio constante.

**Aos amigos do Laboratório de Bioquímica** pela convivência saudável durante estes dois anos, certamente recebi lições para toda a vida de cada um de vocês.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da FOB-USP, **Thelma e Ovídio** pela atenção, solicitude e amizade com que sempre me trataram.

À **Vera**, secretária do departamento de Ciências Biológicas, pela sua competência e grande disposição em ajudar.

Ao professor **Alberto Consolaro**, por me orientar durante a graduação, apresentando-me a beleza da pesquisa científica.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo apoio financeiro durante um ano e meio de curso.

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP) da FOB-USP, na pessoa do **Prof. Dr. Ricardo Marins de Carvalho**, pela prontidão em conceder uso dos equipamentos para condução deste trabalho.

A **Érica Garcia Gomes**, orientada de iniciação científica apoiada pela FAPESP neste trabalho, pelo cumprimento das atribuições determinadas.

## Sumário

LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E PALAVRAS DE LÍNGUA ESTRANGEIRA .....	xvi
RESUMO.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Proteínas Tirosina Fosfatases .....	6
2.2 Proteínas Tirosina Fosfatases de Baixa Massa Molecular Relativa .....	7
2.3 Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato.....	14
2.4 Biologia Óssea <i>in vitro</i> .....	16
3 PROPOSIÇÃO.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Cultura de Células .....	23
4.2 Caracterização da Diferenciação dos Osteoblastos.....	24
4.3 Determinação da Atividade PTP-BMr e TRAP no Ciclo Celular e Durante a Diferenciação Celular.....	26
4.4 Determinação do Estresse Oxidativo Durante o Ciclo e Diferenciação Celular .....	26
4.5 Análise Estatística .....	28
5 RESULTADOS .....	29
5.1 Caracterização das Alterações Morfológicas e Atividade Mitogênica dos	

Osteoblastos hFOB 1.19.....	30
5.2 Análise dos Marcadores de Diferenciação Celular.....	34
5.3 Dosagens Enzimáticas da PTP-BMr e da TRAP no Ciclo Celular.....	38
5.4 Dosagens Enzimáticas da PTP-BMr e TRAP na Diferenciação Celular .....	41
5.5 Quantificação de Glutathiona Reduzida e Oxidada .....	44
6 DISCUSSÃO .....	49
6.1 Caracterização da Diferenciação Celular.....	52
6.2 Dosagens Enzimáticas da TRAP e PTP-BMr Durante o Ciclo Celular .....	53
6.3 Dosagens Enzimáticas da TRAP e PTP-BMr durante a Diferenciação Celular .....	56
6.4 Quantificação de Glutathiona Reduzida e Oxidada Durante o Ciclo e Diferenciação .....	57
7 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	61
8 CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65
ABSTRACT .....	73

## *Lista de Figuras*

- FIGURA 1 – Fotomicrografia de luz das células hFOB 1.19** - Realizada em microscópio de contraste de fase durante todo o período experimental em aumento de 10x. Eventos mais significativos apontados com setas. (A) células após 24 horas em cultura, mitoses abundantes; (B) células com 7 dias, já apresentando aspecto poligonal; (C) células com 14 dias, sintetizando muitas vesículas de matriz; (D) 21 dias, iniciando formação de nódulos; (E) 28 dias, diminuição da densidade celular; (F) 35 dias, diminuição da densidade celular mais acentuada ..... 31
- FIGURA 2 - Atividade mitogênica das células hFOB 1.19** – Realizada através de incorporação de timidina com concentração de 0,5  $\mu\text{Ci}$  em placas de 96 poços contendo as células hFOB 1.19 (densidade de 10.000 cels/ $\text{cm}^2$ ). Antes do experimento, as células foram carenciadas para soro durante 24 horas a fim de serem sincronizadas. A exposição à timidina foi realizada seis horas antes dos períodos de coleta. Tempos experimentais de 6, 18, 24, 36 e 48 horas. As barras representam o SD da média das triplicatas. O asterisco (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação aos valores obtidos nos outros tempos experimentais ..... 33
- FIGURA 3 – Atividade fosfatase alcalina (FALC) ( $\text{nmol pNP mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$ )** para monitoramento da diferenciação celular da linhagem hFOB 1.19 cultivadas durante 35 dias. Houve diferença estatisticamente significativa em todas as etapas ( $p < 0,05$ ). O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas ..... 35
- FIGURA 4 – Células da linhagem hFOB 1.19 após coloração de Von Kossa em**

diferentes etapas de mineralização *in vitro* - Segundo esta técnica, os núcleos celulares são corados em vermelho, o cálcio em preto e o citoplasma, em rosa (\*). Os nódulos de mineralização estão demonstrados por setas: (A) grupo controle com ausência de mineralização, 7 dias em cultura, (B) células iniciando a mineralização, tempo de 28 dias, (C) mineralização mais intensa aos 35 dias em cultura ..... 37

**FIGURA 5** – Atividade específica das enzimas FAT, TRAP e PTP-BMr (nmol pNP/mg proteína) durante o ciclo celular da linhagem hFOB 1.19 nos tempos de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. Houve diminuição abrupta na atividade de todas as enzimas entre os tempos de 6 e 18 horas ( $p < 0,05$ ); nos tempos seguintes, as enzimas apresentaram apenas atividade residual. O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas ..... 40

**FIGURA 6** – Atividade específica das enzimas FAT, TRAP e PTP-BMr (nmol pNP/mg proteína) durante a diferenciação celular da linhagem hFOB 1.19 nos tempos de 7,14, 21, 28 e 35 dias. O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas..... 43

**FIGURA 7** – Quantificação dos tióis totais não protéicos – Realizada pelo método do DTNB (A) e pelo método HPLC-eletroquímico para quantificação de GSH (B) obtidos através de lisados dos osteoblastos hFOB 1.19 durante a proliferação celular nos tempos experimentais de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. Todos os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes ..... 46

**FIGURA 8** – Quantificação dos tióis totais não protéicos – Realizada pelo método do DTNB (A) e pelo método HPLC-eletroquímico para

quantificação de GSH (B) obtidos através de lisados dos osteoblastos hFOB 1.19 durante a diferenciação celular nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, com expressão máxima no 21º dia. Todos os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes ..... 47

**FIGURA 9** – Mensuração do estado redox intracelular através de HPLC eletroquímico. A quantificação de GSSG foi realizada indiretamente através do sistema glutathione redutase/NADPH – (A) durante a proliferação dos osteoblastos (B) durante a diferenciação das células. A relação de 2GSH/GSSG foi obtida pela redução de GSSG presente nas mesmas amostras que nas Figuras 7 e 8 respectivamente, porém tratadas com glutathione redutase (0,6 U/ml)/NADPH (mg/mL) por 30 min. Todos os dados representam a média de dois experimentos independentes ..... 48

## *Lista de Tabelas*

- TABELA 1** – Média da Atividade Específica (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes ao ciclo celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19. .... 39
- TABELA 2** – Análise estatística das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes ao ciclo celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19 (ns = não significativa)..... 39
- TABELA 3** – Média da Atividade Específica (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes à diferenciação celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19..... 42
- TABELA 4** – Análise estatística das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes à diferenciação celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19 (ns = não significativa) ..... 42



# *Lista de Siglas, Símbolos e Palavras de Língua Estrangeira*

AE = Atividade Específica  
EC = Comissão de enzimas  
EGF = fator de crescimento epidermal  
FALC = fosfatase alcalina  
FAT = fosfatase ácida total  
FGF = fator de crescimento fibroblástico  
GSH = glutationa reduzida  
GSSG = glutationa oxidada  
 $H_2O_2$  = peróxido de hidrogênio  
HCl = ácido clorídrico  
HPLC = cromatografia líquida de alta performance  
NO = óxido nítrico  
PBSA = Solução salina tamponada em fosfato livre de cálcio e magnésio  
PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas  
PDGFr = receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas  
pH = potencial de hidrogênio  
pHMB = p-hidroximercuribenzoato  
Pi = fosfato inorgânico  
pNP = p-nitrofenol  
pNPP = p-nitrofenil fosfato  
PTK = proteína tirosina quinase  
PTP = proteína tirosina fosfatase  
PTP1B = proteína tirosina fosfatase 1B  
PTP-BMr = proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa  
ROS = espécies reativas de oxigênio  
RTK = receptor de tirosina quinase  
SFB = soro fetal bovino

SV40 = vírus símio 40

TCA = ácido tricloroacético

TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato

UE = unidade enzimática

*Resumo*

## *Resumo*

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil de atividade enzimática da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) e da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) em osteoblastos humanos durante o ciclo e a diferenciação celular, correlacionando com os níveis de estresse oxidativo intracelulares. A atividade enzimática das fosfatases foi determinada nos períodos de 6, 18, 24, 48 e 72 horas (ciclo celular) e 7, 14, 21, 28 e 35 dias (diferenciação) utilizando o p-nitrofenilfosfato e na presença do inibidor específico p-hidroximercuribenzoato (pHMB) para a PTP-BMr, e na presença de tartarato e pHMB para a TRAP. A caracterização da diferenciação celular foi determinada medindo o nível de atividade da fosfatase alcalina e a coloração de Von Kossa. O estresse oxidativo foi determinado através da quantificação da glutatona reduzida e oxidada através dos ensaios de cromatografia líquida de alta performance eletroquímica e DTNB. Durante o ciclo celular a atividade específica (AE) da fosfatases foi fortemente diminuída, especificamente da TRAP e PTP-BMr, sendo praticamente zero após 18 horas da adição de soro, sugerindo que a diminuição na atividade destas enzimas seja necessária para a entrada na fase S. Durante a diferenciação celular observou-se um aumento progressivo da expressão de FALC, TRAP e PTP-BMr nos períodos de 7 e 14 dias, sendo máxima no 21º dia, declinando a seguir. Durante a proliferação, os estados mais reduzidos foram observados nos períodos de 18 e 48 horas e durante a diferenciação o estado mais reduzido foi observado no 21º dia. Desta forma, o presente trabalho mostra que as células da linhagem hFOB 1.19 representam um adequado modelo de estudo para análise da participação de fosfatase no ciclo e diferenciação celular, bem como que as atividades da PTP-BMr e TRAP são claramente moduladas durante o ciclo celular e a diferenciação de osteoblastos humanos, esta última dependente de adequado nível de glutatona reduzida.

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

Na clínica odontológica e médica, o profissional se depara com situações em que a necessidade de uma quantidade substancial de osso se faz presente, como no caso de cirurgias ortognáticas, enxertos, implantes, entre outros. Nestas situações, o tratamento mais empregado tem sido o enxerto autógeno de regiões como crista ilíaca (para cirurgias maiores) e mento e retro-molar (para cirurgias bucais). Este tratamento apresenta vantagens como ausência de resposta imune e a possibilidade de se levar células osteoprogenitoras, juntamente com os fragmentos ósseos que atuam como condutores das células de reparo para o sítio cirúrgico (MISCH<sup>46</sup>, 1998). Entretanto, existem desvantagens na utilização desse tratamento como a limitação da quantidade e tipo de tecido a ser removido, a necessidade de um segundo sítio cirúrgico, o pós-operatório desagradável, a morbidade, o custo da internação, a possibilidade da ocorrência de seqüelas e a imprevisibilidade de resultado (OREFFO<sup>53</sup> *et al.*, 1999).

Buscando solucionar tais problemas, surgiu o campo de pesquisa denominado Engenharia de Tecidos, uma combinação dos princípios de engenharia, química e biologia com o objetivo de desenvolver substitutos naturais que permitissem restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (NEREM<sup>49</sup>, 1992; LANGER & VACANTI<sup>43</sup>, 1993). Logo, a curiosidade acerca do entendimento dos mecanismos envolvidos na osteogênese cresceu; e a busca de novas alternativas terapêuticas a respeito do reparo de defeitos ósseos nos levou a questionar a possibilidade de alguma modulação de duas famílias de proteínas durante o ciclo e a diferenciação celular dos osteoblastos. Uma das famílias estudadas foi a da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr), esta fortemente relacionada ao controle do ciclo e diferenciação celular. A outra família avaliada foi a da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), relacionada à reabsorção óssea.

A habilidade das células em receber e reagir a sinais externos à membrana plasmática é fundamental para a vida. Frequentemente, a ativação de determinadas vias de sinalização se dá através da fosforilação ou da desfosforilação de algumas proteínas celulares específicas, que, a partir da modificação de suas

atividades, modulam a atividade celular (NELSON<sup>49</sup> *et al.*, 2002). A fosforilação e desfosforilação de proteínas são fenômenos críticos na regulação de diversos processos biológicos, incluindo a proliferação e diferenciação celular. As proteínas tirosina quinases (PTKs) e fosfatases (PTPs) são mediadores essenciais deste tipo de regulação, 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 (GRANJEIRO<sup>30</sup>, 2001; HUNTER<sup>35</sup> *et al.*, 2000). 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<sup>8</sup> *et al.*, 2001).

As fosfatases são hidrolases amplamente distribuídas nos seres vivos que utilizam como substratos os fosfomonoésteres. Estas enzimas são divididas em três grupos principais: as fosfatases alcalinas (pH ótimo para catálise em torno de 9,0), as fosfatases ácidas (pH ótimo para catálise em torno de 5,0) e as proteínas fosfatases, esta classe de proteínas desfosforila radicais fosfato ligados à tirosina, o que exerce efeito inibitório na cascata de sinalização celular disparadas por fosforilação, atenuando a sua intensidade e acelerando a sua extinção (AOYAMA<sup>2</sup>, *et al.* 2003; FIASCHI<sup>26</sup> *et al.*, 2001).

Uma das famílias de proteínas fosfatases de maior importância é a da proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) por desempenhar papel importante no controle da proliferação e diferenciação celular. Esta enzima possui a capacidade de reduzir fortemente a proliferação celular induzida pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), insulina e epinefrina (RAUGEI<sup>59</sup>, 2002). Seus mecanismos de ação durante a diferenciação celular ainda não foram completamente definidos, porém sua superexpressão foi associada à diferenciação celular de mioblastos (FIASCHI<sup>26</sup> *et al.*, 2001).

Constituindo uma grande classe de enzimas hidrolíticas, as fosfatase ácidas apresentam distribuição ubíqua na natureza. As fosfatase ácidas humanas constituem um grupo de 6 isoenzimas previamente identificadas por eletroforese (LAM<sup>39</sup> *et al.*, 1978). A isoforma Tipo 5 difere das outras por ser insensível ao tartarato e p-hidroximercuribenzoato (pHMB), sendo, então, denominada Fosfatase

Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP). A identificação de atividade TRAP durante a osteogênese fez parte dos objetivos deste trabalho, pelo fato de esta enzima ser característica de atividade osteoclástica e não ter sido identificada durante o processo de osteogênese. Embora a TRAP seja um marcador típico de osteoclastos, evidências na literatura indicam atividade desta enzima em osteoblastos, tendo sido purificada de osteoblastos humanos e cortical óssea bovina (LAU & BAYLINK<sup>42</sup>, 2003); porém a TRAP não foi ainda caracterizada durante o processo de osteogênese.

No contexto atual da literatura, informações considerando o mecanismo molecular do controle proliferativo e de diferenciação de uma possível ação osteogênica da PTP-BMr e TRAP, poderia fornecer maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na osteogênese, o que torna pertinente estabelecer a hipótese de que a expressão e a atividade da PTP-BMr e TRAP são moduladas durante o ciclo celular de osteoblastos, bem como durante seu processo de diferenciação que culmina com a mineralização biológica. A avaliação dessas hipóteses é o objetivo deste trabalho, utilizando, para isto, osteoblastos hFOB 1.19.



# *Revisão de Literatura*

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Proteínas Tirosina Fosfatases

As Proteínas tirosina fosfatases (PTPs) constituem uma superfamília composta por mais de 70 enzimas que compreende vários grupos de proteínas independentes funcional e estruturalmente, que participam de eventos celulares vitais através dos processos de desfosforilação celular. Estas proteínas compartilham a conformação do sítio catalítico e o mecanismo de catálise. O sítio catalítico é constituído por uma cisteína e uma arginina, separadas por cinco resíduos de aminoácidos, sendo esquematizado representativamente pela abreviação CX<sub>5</sub>R; (RAMPONI<sup>58</sup> *et al.*, 1997; CIRRI<sup>19</sup> *et al.*, 1993).

Todas as PTPs possuem mecanismo catalítico idêntico (CHIAGURI<sup>12</sup> *et al.*, 2000), com os mesmos resíduos de aminoácidos no sítio ativo, os quais se localizam no fundo de uma bolsa, circundados pelos diferentes resíduos de aminoácidos que são responsáveis por suas propriedades cinéticas e especificidade por seus diferentes substratos (JIA<sup>36</sup> *et al.*, 1995). Estas enzimas catalisam a hidrólise do fosfato presente em proteínas fosforiladas em tirosina (RAMPONI<sup>58</sup> *et al.*, 1997).

A regulação destas proteínas ocorre via controle redox, dependendo do estado de oxidação da cisteína do sítio ativo, estando ativa quando reduzida e inativa quando oxidada (CHIARUGI<sup>17</sup> *et al.*, 2003). Esta regulação é reversível, sendo primeiramente demonstrada pela proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) durante sinalização pelo fator de crescimento epidermal (EGF) por LEE<sup>43</sup>, em 1998.

A ação catalítica das PTPs contrapõe-se à atividade das proteínas tirosina quinases (PTKs) envolvidas no controle da proliferação e diferenciação celular. As PTPs também exercem um papel importante na regulação da proliferação, diferenciação e transformação celular, além da manutenção da integridade do citoesqueleto (CHENGALVALA<sup>8</sup> *et al.*, 2001). 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<sup>8</sup> *et al.*, 2001).

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

- **Proteínas Tirosina Fosfatases específicas** – apresentam alta massa molecular relativa e estão envolvidas em uma grande gama de vias de sinalização, são as enzimas mais estudadas na superfamília das PTPs (AOYAMA<sup>2</sup> *et al.*, 2003). Esta família é ainda subdividida em dois grupos: PTPs tipo receptora e citoplasmática (FAUMAN<sup>25</sup> *et al.*, 1996).
- **Proteínas Tirosina Fosfatases duais** – conseguem hidrolisar tanto a fosfotirosina, como fosfoserina/treonina, possuindo mais afinidade sobre fosfotirosina. Esta dupla especificidade pode estar relacionada à menor profundidade do sítio catalítico.
- **Proteínas Tirosina Fosfatases Cdc25** – enzimas relacionadas ao controle da divisão celular. Em algumas classificações são descritas como pertencentes à família das PTPs duais por serem também capazes de hidrolisar fosfotirosina e fosfoserina/treonina.
- **Proteínas Tirosina Fosfatases de Baixa Massa Molecular Relativa (PTP-BMr)** – possuem papel decisivo na regulação da proliferação celular em resposta ao estímulo pelos receptores de PTKs, como os receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), insulina e epinefrina; além de estarem envolvidas com proteínas envolvidas na regulação da adesão e transcrição celular.

## 2.2 Proteínas Tirosina Fosfatases de Baixa Massa Molecular Relativa

As proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr) constituem uma classe de PTPs que compreende enzimas caracterizadas

pela massa molecular reduzida de aproximadamente 18-20 KDa, estão onipresentes na natureza, sendo encontradas desde procariotas até mamíferos. As PTP-BMr diferem das fosfatases ácidas clássicas pela inibição por vanadato, ao invés do tartarato, e pelo mecanismo catalítico, o qual ocorre via formação de um fosfointermediário envolvendo uma cisteína altamente conservada (RAMPONI & STEFANI<sup>58</sup>, 1997).

As primeiras PTP-BMr (EC 3.1.3.48) foram originalmente estudadas como fosfatases ácidas solúveis de baixa massa molecular relativa (EC 3.1.3.2). A presença de PTP-BMr em tecidos de mamíferos foi demonstrada em 1969 por **HEINRIKSON**<sup>33</sup> *et al.* e por **DISSING**<sup>23</sup> *et al.*, em 1979 que purificaram e caracterizaram duas formas de uma fosfatase ácida de hemácia.

O que diferencia a PTP-BMr das outras proteínas fosfatases é que esta enzima possui na sua estrutura dois resíduos de cisteína (Cys), nas posições 12 e 17 dentro do sítio catalítico (CHIARUGI<sup>15</sup> *et al.*, 2001) enquanto que as outras apresentam apenas um. Esta cisteína adicional próxima à cisteína catalítica confere à PTP-BMr a habilidade de recuperar rapidamente a sua atividade após a geração de estresse oxidativo extra e intracelular, regulando de forma precisa a ativação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFr), seu substrato mais conhecido (CHIARUGI<sup>14</sup> *et al.*, 2001). Outra diferença encontrada entre esta proteína e as outras famílias de PTPs é que enquanto muitas enzimas de outras famílias de PTPs possuíam domínios regulatórios, a PTP-BMr possuía apenas um domínio catalítico (CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, 1998).

Em mamíferos, a estrutura catalítica da PTP-BMr apresentou-se em forma de gancho, sendo totalmente conservada, apresentando a sequência CLGNICR (RAMPONI & STEFANI<sup>58</sup>, 1997), além destes resíduos, duas tirosinas (Tyr) adjacentes nas posições 131 e 132 foram, também, conservadas e têm sido reconhecidas como sítios preferenciais de fosforilação, sendo que o efeito em cada sítio é distinto.

**BUCCIANINI**<sup>4</sup> *et al.*, 1999, através de ensaios de mutação sítio-dirigida, *western blot*, entre outros, observaram que a PTP-BMr comporta-se de maneira diferente quando fosforilada na Tyr<sup>131</sup> ou na Tyr<sup>132</sup>. A fosforilação da Tyr<sup>131</sup> foi seguida por um forte aumento na atividade específica da enzima em cerca de 25

vezes. Já a fosforilação da Tyr<sup>132</sup>, entretanto, não afetava a atividade enzimática, este resíduo tem sido identificado como sítio de reconhecimento da Grb2.

A PTP-BMr não possui uma distribuição específica para tecidos em particular (RAUGEI<sup>59</sup> *et al.*, 2002). Em mamíferos foram encontradas duas isoformas de PTP-BMr, produzidas a partir de um único gene, através de splicing alternativo (CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, 1998). Em humanos existem quatro isoformas de RNA mensageiros já caracterizados para a PTP-BMr, derivadas de splicing alternativo de um único transcrito (RAUGEI<sup>59</sup> *et al.*, 2002). A PTP-BMr foi encontrada no meio intracelular nas regiões do citoplasma e do citoesqueleto, sendo que a sua atuação na porção citoplasmática foi a desfosforilação do PDGFr, modulando parte da cascata de sinalização disparada por este fator de crescimento. No citoesqueleto, a PTP-BMr influenciou a adesão, espalhamento, e migração celular controlando o nível de fosforilação da p190Rho-GAP (proteína que regula a atividade Rho e, conseqüentemente, o rearranjo do citoesqueleto em resposta ao estímulo por PDGF (CHIARUGI<sup>12</sup> *et al.*, 2000).

O mecanismo de catálise desta proteína se dá através dos aminoácidos Cys<sup>12</sup>, Cys<sup>17</sup> e Arg<sup>18</sup>. O primeiro atua como um nucleófilo na formação do intermediário cisteinil fosfato, que vai fazer parte do complexo fosfoenzima. A Cys<sup>17</sup> coopera com a Arg<sup>18</sup> para a ligação do fosfato ao substrato e a Arg<sup>18</sup> funciona como um estabilizador do estado de transição ao se ligar ao substrato (AOYAMA<sup>2</sup> *et al.*, 2003; CIRRI<sup>19</sup> *et al.*, 1993).

O modelo cinético da reação aceito para o mecanismo de catálise da PTP-BMr propôs a entrada de um substrato e a saída de dois produtos, ocorrendo através da formação de um intermediário cisteinil fosfato (WO<sup>70</sup> *et al.*, 1992; CIRRI<sup>19</sup> *et al.*, 1993), sendo que o passo que levou a sua formação foi acompanhado pela protonação do grupo retirado (primeiro produto; grupo fenólico no caso do pNPP). A hidrólise do intermediário cisteinil fosfato é o passo limitante da reação. A Cys<sup>12</sup>, mantida na forma de tiolato pela Ser<sup>19</sup>, seria responsável pelo ataque nucleofílico ao átomo de fósforo do substrato, levando à formação do intermediário fosfoenzima; a Asp<sup>129</sup> atuaria como doador de próton para o grupo que deixa a enzima e a Arg<sup>18</sup> seria responsável pelo reconhecimento do substrato e estabilização do estado de transição. A estabilização do sítio ativo da proteína é de responsabilidade da His<sup>72</sup>, Ser<sup>19</sup> e Ser<sup>43</sup>,

através da formação de uma rede de pontes de hidrogênio que interagem com a Cys<sup>12</sup> e a Asn<sup>15</sup> presentes na alça do sítio ativo, propiciando a geometria mais favorável para a ligação do fosfato (ZHANG<sup>71</sup>, *et al.*, 1994; EVANS<sup>24</sup>, *et al.*, 1996).

A regulação da PTP-BMr ocorre através de um refinado sistema redox, sendo inativa quando oxidada e ativa quando reduzida. A inativação dessa proteína se dá pelo contato com espécies reativas de oxigênio (ROS), como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e óxido nítrico (NO), mas é protegida da inativação pelo fosfato inorgânico (Pi), um inibidor competitivo, sugerindo que a reação das ROS acontece no sítio ativo (CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, 1998). Esta regulação funcional das PTP-BMr pode ser revertida pelos sistemas redox intracelulares, sendo que esta recuperação da atividade é dependente de tióis de baixa massa molecular relativa, como a glutatona (CHIARUGI<sup>14</sup> *et al.*, 2001). A PTP-BMr quando oxidada, não é apenas inativa enzimaticamente, também não é mais capaz de se ligar aos seus substratos naturais (CHIARUGI<sup>17</sup>, 2003).

O mecanismo de inativação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ocorre via oxidação das Cys<sup>12</sup> e 17, essenciais para a catálise, quando o resíduo sulfidrílico é transformado em ácido sulfênico (AOYAMA<sup>2</sup> *et al.*, 2003, CHIARUGI<sup>15</sup> *et al.*, 2001, CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, 1998), inativando a enzima de forma reversível. Porém, uma nova oxidação do ácido sulfênico torna a enzima irreversivelmente inativa, após transformação deste em ácido sulfínico ou sulfônico (AOYAMA<sup>2</sup> *et al.*, 2003). As PTPs oxidadas não têm atividade catalítica porque não conseguem formar o intermediário cisteinil-fosfato durante a primeira etapa da catálise (CHIARUGI<sup>13</sup> *et al.*, 2001).

CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, em 1998, ao estudarem o mecanismo de inativação da PTP-BMr pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através dos experimentos de espectroscopia por fluorescência e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), observaram que a estrutura tridimensional da enzima foi modificada durante a oxidação por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já que a formação da ponte dissulfeto requeria que os dois grupos tióis se movessem de suas posições originais para se aproximarem, demonstraram, também, que a PTP-BMr foi protegida contra a inativação pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do Pi.

A PTP-BMr é oxidada *in vivo* pelo estresse oxidativo exógeno, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela glicose oxidase ou pervanadato de sódio, sendo que a sua atividade é reduzida simultaneamente à difusão de pequenas moléculas oxidantes,

como o  $H_2O_2$  para os compartimentos celulares, impedindo, desta forma, a desfosforilação de seus substratos PDGFr e p190Rho-GAP (CHIARUGI<sup>14</sup>, 2001). A inibição exercida pelas ROS nas PTPs ajuda a propagação da sinalização de receptores de tirosina quinases (RTKs); mediada pela fosforilação dos resíduos de tirosina em proteínas, geralmente associados ao estímulo proliferativo, como durante o estímulo por fatores de crescimento, como PDGF, EGF, fator de crescimento fibroblástico (FGF) e insulina (CHIARUGI<sup>16</sup> *et al.*, 2002).

CHIARUGI<sup>15</sup> *et al.*, 2001, avaliaram qual seria o comportamento da PTP-BMr frente à produção de  $H_2O_2$  induzida pelo estímulo por PDGF e se a glutathiona reduzida (GSH) possuiria ação na reativação desta proteína. Verificou-se que após dois minutos do estímulo por PDGF, 80% da PTP-BMr foi oxidada, esta inativação chegou ao seu máximo em 10 minutos, porém após 40 minutos esta enzima recuperou sua atividade, demonstrando que realmente houve regulação redox pela PTP-BMr e como a depleção da glutathiona prejudicou fortemente a reativação da PTP-BMr, os autores sugeriram que este anti-oxidante possa ter papel fundamental na regulação desta proteína.

CHIARUGI<sup>17</sup> *et al.*, 2003, objetivando verificar o envolvimento da PTP-BMr na adesão celular à matriz extracelular e qual implicação da geração de espécies reativas de oxigênio neste processo, superexpressaram esta proteína em células NIH3T3 e analisaram a habilidade destas células em aderirem à fibronectina, através de ensaios de adesão celular, quantificação de atividade PTP-BMr, medição de  $H_2O_2$  intracelular, entre outros. Verificaram que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta à adesão celular não foi afetada pela superexpressão da PTP-BMr; a superexpressão da PTP-BMr associou-se a um significativo atraso na adesão celular e espalhamento; durante a adesão celular, a PTP-BMr estava fortemente oxidada e esta oxidação foi acompanhada por uma inativação enzimática, seguida pelo completo resgate da atividade catalítica. Para verificar a dependência de glutathiona reduzida (GSH) para recuperação da atividade PTP-BMr durante a adesão mediada por integrinas, eles bloquearam o sistema celular dependente de GSH para redução de proteínas oxidadas através da inibição da  $\gamma$ -glutamyl-cisteína-sintetase, durante a adesão celular, desta forma a concentração de GSH diminuiu cerca de 90%,

prejudicando a reativação da PTP-BMr, indicando que a GSH intracelular possui papel na recuperação da PTP-BMr após a adesão à matriz extracelular.

Em relação ao conhecimento acerca dos substratos da PTP-BMr, o papel biológico das PTP-BMr e fosfatases ácidas era completamente desconhecido até 1985, quando **CHERNOFF & LI**<sup>9</sup> relataram que a fosfatase ácida de baixo peso molecular apresentava atividade fosfotirosina proteína fosfatase, a partir daí, a busca pelo conhecimento de suas características e possíveis substratos aumentou. O primeiro relato acerca dos possíveis substratos fisiológicos da PTP-BMr ocorreu em 1989, quando **RAMPONI**<sup>57</sup> *et al.* observaram que a PTP-BMr do fígado bovino desfosforilava eficientemente, *in vitro*, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFr).

Os substratos conhecidos para a PTP-BMr além do EGFr são os receptores dos fatores de crescimento presentes na membrana plasmática como o PDGF (**STEFANI**<sup>64</sup> *et al.*, 1993), insulina (**CHIARUGI**<sup>10</sup> *et al.*, 1997), FGF (**RIGACCI**<sup>60</sup> *et al.*, 1999) e epinefrina (**RUGIERO**<sup>61</sup> *et al.*, 1998). A PTP-BMr atua nestas moléculas desfosforilando-as, sendo capaz de se ligar especificamente aos receptores destes fatores de crescimento ativado; reduzindo fortemente a propagação do sinal mitogênico disparado por eles (**CHIAGURI**<sup>16</sup> *et al.*, 2002, **CASELLI**<sup>7</sup> *et al.*, 1998, **CHENGALVALA**<sup>8</sup> *et al.*, 2001). Porém o efeito da PTP-BMr foi demonstrado ser mais relevante sobre o PDGFr (**TADDEI**<sup>67</sup> *et al.*, 2000) A PTP-BMr também interfere no rearranjo do citoesqueleto através da desfosforilação do p190RhoGAP, uma proteína envolvida no rearranjo do citoesqueleto (**CHIARUGI**<sup>12</sup> *et al.*, 2000).

O primeiro relato acerca do envolvimento entre a PTP-BMr e o PDGF ocorreu em 1993, quando **STEFANI**<sup>64</sup> *et al.*, utilizando peptídeos sintéticos contendo fosfotirosina, relataram uma atividade hidrolítica preferencial sobre um peptídeo derivado de um sítio de fosforilação do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-r).

**CHIARUGI**<sup>11</sup> *et al.*, em 1998, em estudo realizado em fibroblastos pertencentes à linhagem estabelecida NIH-3T3 observaram que a PTP-BMr atuava na sinalização de PDGFs especificamente na fase G1. A PTP-BMr diminuiu a sinalização mitogênica do PDGF interagindo seletivamente com as vias Src e STAT



(transdutor de sinal e ativador de transcrição), porém, sem afetar as vias fosfatidilinositol 3-quinase e fosfolipase C- $\gamma$ 1.

Pelo fato de a PTP-BMr possuir esta característica de ser um regulador negativo da proliferação celular, alguns trabalhos publicados na literatura seguiram esta vertente. **RUGGIERO**<sup>61</sup> *et al.*, em 1993, estudaram o papel da PTP-BMr sobre o controle da proliferação celular em células normais e transformadas NIH3T3, verificaram que as células que superexpressaram a atividade PTP-BMr obtiveram metade da incorporação de timidina observada nas células sem esta superexpressão. Porém, a inibição da PTP-BMr sobre a taxa de crescimento celular foi mais intensa em células normais crescendo em monocamada do que em células transformadas.

**GRANJEIRO**<sup>30</sup> em 2001, analisando o papel da PTP-BMr na reversão fenotípica tumoral-normal e na transformação maligna induzida por oncogenes em células de glioma de rato pertencentes à linhagem celular C6 e fibroblastos de camundongo (linhagem A31) normais e transformados, através de ensaios de dosagem de atividade PTP-BMr, incorporação de timidina e dosagem de glutathiona oxidada e reduzida, verificou que a reversão fenotípica de linhagem celular de glioma de rato ST1 após tratamento com hidrocortisona estava associada com um aumento significativo da atividade PTP-BMr, sugerindo a participação desta enzima na reversão da transformação celular e supressão de tumor, porém a superexpressão de antígenos relacionados à transformação tumoral resultaram na diminuição da atividade PTP-BMr, possivelmente devido ao aumento do estresse oxidativo observado nestas células.

**CHIARUGI**<sup>18</sup> *et al.*, em 2004, demonstraram que a superexpressão da PTP-BMr poderia ser benéfica para a transformação neoplásica, pelo fato de potencializar fortemente a estabilidade do contato célula-célula através da adesão celular mediada por fibronectina, sugerindo uma contribuição da PTP-BMr na invasividade tumoral, mesmo que, paradoxalmente, diminua a taxa de proliferação celular.

Estudos mais recentes têm dado maior enfoque na avaliação da atividade PTP-BMr durante a diferenciação celular. **LUCENTINI**<sup>44</sup>, *et al.*, em 2003, avaliaram a atividade PTP-BMr em células neuronais pertencentes à linhagem PC12 e *in vivo* em células neuronais de frango através de ensaios de dosagem de atividade

enzimática e *immunoblotting*. Para os ensaios *in vitro*, a atividade PTP-BMr aumentou progressivamente em cerca de 30% entre os tempos experimentais de 0 a 72 horas durante a diferenciação celular. *In vivo*, os resultados foram semelhantes, aumentando a atividade PTP-BMr durante o decorrer do desenvolvimento neuronal.

**FIASCHI**<sup>26</sup> *et al.* em 2001 ao avaliarem se os níveis de PTP-BMr são regulados por condições de inibição da proliferação celular, como confluência e diferenciação, descobriram através de ensaios de dosagem de atividade enzimática, medição de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelular e *immunoblotting* que a atividade e expressão desta proteína foram aumentadas nestas condições, sendo que a PTP-BMr era encontrada mais predominantemente no seu estado reduzido, portanto ativado. Nestas condições, os níveis de fosforilação da PDGFr estavam diminuídos.

### 2.3 Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato

A fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP: EC 3.1.3.2), também conhecida como fosfatase ácida resistente ao tartarato tipo 5, pertence ao grupo das fosfatases ácidas humanas, que são apresentadas como 6 isoformas, sendo que a TRAP, identificada como isoforma tipo 5 de acordo com sua mobilidade eletroforética, difere das outras por ser insensível ao tartarato e ao pHMB (LAU<sup>41</sup>, *et al.*, 1992). O primeiro relato a respeito desta proteína foi feito por **CAMPBELL**<sup>6</sup>, em 1978, a partir de leucócitos extraídos de pacientes portadores de leucemia.

A TRAP é uma metalo-glicoproteína rica em manose, com cerca de 36kDa, cujo pH ótimo para sua atividade encontra-se entre 4,9 e 6,0 (PRICE<sup>56</sup> *et al.*, 1995). É sintetizada por células diferenciadas do sistema monohistiocítico, sendo encontrada no plasma, placenta, macrófagos e leucócitos. Sua expressão mais significativa é nos osteoclastos (FUKUSHIMA<sup>28</sup> *et al.*, 1991), o que torna esta enzima um marcador muito utilizado para avaliação de reabsorção óssea. No interior das células, a TRAP é localizada principalmente em lisossomos, e de forma secundária, esta enzima pode ser encontrada no citoplasma ou no meio extracelular. Foram propostas várias funções para esta enzima, tais como transporte de ferro, reabsorção óssea pelos osteoclastos e desfosforilação de fosfoproteínas (BECK<sup>3</sup> *et al.*, 1999).

A TRAP apresenta-se como duas isoformas, denominadas 5a e 5b, diferindo no conteúdo de carboidratos. A isoforma tipo 5a contém ácido siálico no fim da cadeia carbônica, enquanto que a isoforma 5b, não possui (MIYAZAKI<sup>47</sup> *et al.*, 2003). A estrutura da TRAP proveniente de diferentes fontes humanas apresentou homologia de cerca de 85% a 95% na seqüência de aminoácidos. Propõe-se que esta diferença seja resultante de *splicing* alternativo. Foi identificado apenas um gene para a TRAP e, também, apenas um RNAm (PRICE<sup>56</sup> *et al.*, 1995).

A regulação da atividade TRAP ocorre através da redução dos íons ferro no centro da enzima, sendo ativa quando reduzida e inativa quando oxidada (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998). Um destes íons está relacionado a um resíduo de tirosina que o estabiliza, o outro íon está efetivamente sujeito às mudanças no estado redox, regulando a atividade desta enzima (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998). Esta regulação redox da atividade TRAP através dos íons ferro presentes no sítio ativo da enzima promove alterações seletivas na sua coloração em função da atividade, estando púrpura no seu estado de pró-enzima (oxidada e inativa), rosa na sua forma reduzida (ativa) e sem cor, quando fortemente reduzida, devido à remoção do outro íon ferro do centro da enzima (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998). Uma outra via de regulação é feita de forma não competitiva pelo molibdato, que funciona como um poderoso inibidor não competitivo da TRAP (PRICE<sup>56</sup> *et al.*, 1995). Também, pode-se inativar irreversivelmente esta enzima através de oxidação na presença de ascorbato (BECK<sup>3</sup> *et al.*, 1999).

BECK<sup>3</sup> *et al.*, em 1999, ao avaliarem o mecanismo de inibição da TRAP pelo peróxido de hidrogênio e ascorbato verificaram que esse causou inativação da TRAP, sendo que após um tratamento durante 20 horas reduziu sua atividade em até 96%. A inclusão do inibidor competitivo fosfato conferiu proteção contra esta inativação, sugerindo que a ação do peróxido de hidrogênio sobre esta enzima se dava no sítio ativo, da mesma forma que a PTP-BMr.

Os substratos conhecidos para a TRAP são os ésteres fosfóricos de álcoois aromáticos, como o pNPP,  $\alpha$ -nafitil fosfato e fosfotirosina (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998). Em 1998 descreveu-se que o principal papel da TRAP, *in vivo*, foi atuar como uma PTP regulada pelo estado redox de seu núcleo metálico (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998).

A TRAP originada de osteoclastos tem sido proposta como um marcador para a reabsorção óssea associada ao osteoclasto, podendo ser utilizada para o diagnóstico ou acompanhamento da terapia, visto que a atividade TRAP aumentada no soro já foi demonstrada em pacientes com hiperparatireoidismo, doença de Paget, carcinomas ósseos e osteoporose. A atividade TRAP foi correlacionada positivamente com a concentração de hidroxiprolina, *cross-links* de colágeno e densidade mineral óssea (PRICE<sup>56</sup> *et al.*, 1995; BULL<sup>5</sup> *et al.*, 1999).

Apesar de a TRAP ser um marcador típico de osteoclastos, evidências na literatura mostram que osteoblastos também apresentam atividade desta proteína, sendo esta purificada de osteoblastos humanos e cortical óssea bovina. LAU<sup>42</sup> *et al.*, 2003, ao realizarem uma comparação bioquímica entre as TRAPs provenientes de osteoblastos e osteoclastos verificaram que suas propriedades eram diferentes, por exemplo, enquanto que a TRAP produzida pelos osteoclastos era uma enzima secretada, a isoenzima produzida pelos osteoblastos demonstrava ser uma enzima intracelular, ambas apresentaram atividade proteína fosfatase.

## 2.4 Biologia Óssea *in vitro*

O tecido ósseo funciona como um depósito de íons (cálcio, fosfato e magnésio) armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, mantendo assim a homeostase do organismo. Além disto, proporciona suporte e proteção para órgãos vitais. Trata-se de um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular mineralizado, a matriz óssea. Sua composição celular é formada por osteócitos, que se situam em cavidades ou lacunas no interior da matriz; por osteoclastos, que são células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo e participam do processo de remodelação por osteoblastos (JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>37</sup>, 1999).

Os osteoblastos são as células responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo 1, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas), são também capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Estas células, *in vivo*, ordenam-se nas superfícies ósseas e encontram-se emparelhadas, em arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa

atividade sintética, são cuboidais, com o citoplasma basofílico e em baixa atividade tornam-se achatadas e a basofilia citoplasmática diminui (JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>37</sup>, 1999).

Os pré-osteoblastos, quando expressam genes relacionados ao ciclo celular, ativam a proliferação celular e sintetizam uma matriz extracelular contendo fibronectina e colágeno predominantemente do tipo I (outros tipos de colágenos como III e V também são produzidos em menor escala). Após este período, ocorre a diminuição da atividade proliferativa e simultaneamente o aumento da atividade fosfatase alcalina, dando início à maturação da matriz extracelular pelos osteoblastos que passaram pela fase de comprometimento. Estes produzem intensamente o colágeno tipo I e proteínas não colagênicas associadas à mineralização biológica. Posteriormente, o aumento na expressão de osteocalcina e osteopontina inicia o período de mineralização da matriz. A mineralização induz modificações metabólicas e na morfologia dos osteoblastos, os quais se transformam em osteócitos, cercados pela matriz mineralizada (STEIN<sup>65</sup> *et al.*, 1990).

Os osteoblastos cultivados *in vitro* passam por três fases durante o desenvolvimento, denominados: proliferação, maturação da matriz extracelular e mineralização, que são determinados por modificações na expressão gênica. Estas células também passam por dois pontos de restrição pelos quais não podem seguir adiante sem sinalização celular. O primeiro ponto de restrição ocorre quando a proliferação é regulada negativamente e genes envolvidos na produção e deposição de matriz extracelular devem ser expressos para que a diferenciação celular possa ocorrer; o segundo ponto restritivo ocorre quando a matriz extracelular já está amadurecida, mas não pode iniciar a expressão de genes relacionados à mineralização caso o meio não forneça condições para a mineralização prosseguir (STEIN<sup>65</sup> *et al.*, 1990).

O processo de mineralização biológica consiste na deposição de íons inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio. A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, porém também são encontrados os íons magnésio, sódio, potássio, bicarbonato e citrato. O cálcio e o fosfato formam cristais que estudos de difração de raios-X mostram ter a estrutura de hidroxiapatita, cuja superfície possui íons hidratados

formando a chamada camada de hidratação, responsável pela facilitação da troca de íons entre o cristal e o líquido intersticial (JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>37</sup>, 1999).

Os osteoblastos são células amplamente utilizadas *in vitro* para o estudo do metabolismo ósseo e interações células/biomaterial. Para este fim foram desenvolvidas linhagens celulares imortalizadas provenientes de ratos (UMR-106), camundongos (MC3T3-E1), fetos humanos (hFOB 1.19) e osteosarcoma (SAOS-2, WANG<sup>68</sup> *et al.*, 1999; HARRIS<sup>32</sup> *et al.*, 1995, DECLERCQ<sup>22</sup> *et al.*, 2004, COELHO<sup>20</sup> *et al.*, 2000, COELHO<sup>21</sup> *et al.*, 2000).

Outra fonte de células osteoprogenitoras e osteoblastos para estudos *in vitro* é a coleta de fragmentos de osso medular para realização da cultura primária. A cultura primária de osteoblastos humanos é um excelente modelo de estudo pelo fato de que, quando cultivadas em meio adequado, conseguem mimetizar *in vitro* uma matriz extracelular mineralizada. Esta técnica, porém, possui a grande desvantagem de haver a impossibilidade de usar uma mesma linhagem celular para vários experimentos, pelo fato de que já foi bastante demonstrado na literatura que células diplóides possuem *in vitro* uma vida útil limitada (FRESHNEY<sup>27</sup>, 2000; COELHO<sup>21</sup> *et al.*, 2000). Outras desvantagens deste modelo de estudo são as limitações para realização de experimentos longos, como heterogeneidade do fenótipo, baixas taxas de crescimento e limitado período de vida em cultura (SUBRAMANIAM<sup>66</sup> *et al.*, 2002). Por este motivo foi escolhida uma linhagem de células imortalizadas para a realização deste estudo.

A imortalização de células parece ser um passo intermediário para a transformação celular. Este estado é conseguido usando genes específicos de vírus oncogênicos, como o gene SV-40, o que dá às células a propriedade de retardar a senescência, fornecendo a elas capacidade de aumentar o número de mitoses, sem perda de fenótipo normal. A imortalização gera características semelhantes à cultura primária, como dependência de ancoragem, de soro, inibição por densidade e não formação de tumor em ratos tipo *nude* (SPELSBERG<sup>63</sup> *et al.*, 1995). Estas características geram muitas vantagens em pesquisas de longa duração, além de garantirem reprodutibilidade e possuírem taxa de proliferação muito acelerada.

A linhagem escolhida, hFOB 1.19, consiste em osteoblastos derivados de biópsias de fetos humanos provenientes de abortos espontâneos imortalizados

devido à inclusão do mutante termo-sensível SV-40 TAg, proteína funcional à temperatura de 33,5°C que se liga à proteína p53 inibindo-a e permitindo, desta forma, a replicação do DNA e conseqüente proliferação celular acelerada, entretanto, à 39,5°C a proteína SV-40 é inativada, e a célula inicia a sua diferenciação (SPELSBERG<sup>63</sup> *et al.*, 1995).

O primeiro relato acerca da linhagem celular escolhida, hFOB 1.19 foi feito por **HARRIS**<sup>32</sup> *et al.* em 1995, que isolaram células osteoprogenitoras de tecido fetal e desenvolveram esta linhagem com características muito semelhantes a osteoblastos humanos em cultura primária, respondendo a marcadores como osteocalcina e fosfatase alcalina, além de formarem nódulos de mineralização.

**SUBRAMANIAM**<sup>66</sup> *et al.*, em 2002 ao avaliarem se esta linhagem possuía os atributos necessários para um modelo de estudo adequado, caracterizaram seu cariótipo, sua habilidade de formar osso *in vivo* sem desenvolvimento de transformação celular, e avaliaram a ultra-estrutura da matriz extracelular depositada pelas células hFOB 1.19 através de microscopia eletrônica. Seus resultados mostraram alterações cromossômicas em menor número e grau de complexidade do que células de osteosarcoma. Houve formação de osso em 2-3 semanas em ratos nude sem tumorigênese, e a análise microscópica revelou um arranjo paralelo de fibras colágenas tipo 1 e 3, demonstrando que esta linhagem pode servir como um adequado modelo de estudo por se comportar de maneira muito semelhante à cultura primária de osteoblastos.

A confiabilidade de estudos a respeito da biologia óssea *in vitro* se sustenta no princípio de que os osteoblastos em condições adequadas de suplementação do meio de cultura e temperatura controlada, no caso de células que tenham esta peculiaridade, como a hFOB 1.19 demonstram uma expressão de genes no decorrer do tempo que segue o padrão de expressão gênica observado em ossos longos de neonatos e em calvária de fetos de ratos *in vivo*, como foi verificado por **YOON** em 1987, apud **STEIN**<sup>65</sup> *et al.*, 1990, através de ensaios de hibridização *in situ*. Fato que suporta a relevância biológica do sistema de cultivo de osteoblastos.

*Proposição*



### 3 PROPOSIÇÃO

No contexto atual da literatura, informações considerando o mecanismo molecular do controle proliferativo e de diferenciação de uma possível ação osteogênica da PTP-BMr e TRAP, poderia fornecer maior conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na osteogênese. Como este conhecimento ainda não foi pesquisado na literatura, torna-se pertinente estabelecer a hipótese de que a expressão e a atividade da PTP-BMr e TRAP são moduladas durante o ciclo celular de osteoblastos, bem como durante seu processo de diferenciação que culmina com a mineralização biológica. A avaliação dessas hipóteses é o objetivo deste trabalho, utilizando, para isto, osteoblastos hFOB 1.19.

Os objetivos específicos foram:

1. Padronizar o cultivo celular e caracterizar a diferenciação de osteoblastos humanos através dos ensaios de atividade fosfatase alcalina e visualização de nódulos de mineralização através de coloração pelo método de Von Kossa.
2. Avaliar o perfil de atividade enzimática da TRAP no **ciclo celular** e durante as diferentes fases da **diferenciação** de osteoblastos humanos hFOB 1.19, correlacionado com o estresse oxidativo, através da quantificação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).
3. Avaliar o perfil de atividade enzimática da PTP-BMr no **ciclo celular** e durante as diferentes fases da **diferenciação** de osteoblastos humanos hFOB 1.19, correlacionado-o com o estresse oxidativo, através da quantificação dos níveis de glutatona reduzida (GSH) e glutatona oxidada (GSSG).

# *Material e Métodos*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de Células

Osteoblastos humanos da linhagem hFOB 1.19 (ATTC) foram cultivados segundo descrito por **HARRIS**<sup>32</sup> *et al.*, em 1995, utilizando-se meio de Eagle modificado por Dubelcco com meio de Ham F12 (DMEM/F12 – proporção 1:1), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). O meio de cultura era trocado a cada três dias. Quando subconfluentes, as células eram removidas dos frascos de cultura por meio de Tripsina 0,25% (Gibco), contadas utilizando um hemocítmetro e semeadas em densidade de 10.000 células por cm<sup>2</sup> para a realização dos experimentos (COELHO<sup>20</sup> *et al.*, 2000; COELHO<sup>21</sup> *et al.*, 2000; DECLERCQ<sup>22</sup> *et al.*, 2004). Durante o experimento, as células eram incubadas a 33,5°C com atmosfera contendo 5% CO<sub>2</sub> e 95% ar durante a etapa de proliferação celular e a 39,5°C sob as mesmas condições atmosféricas, durante os ensaios de diferenciação celular. Todos os experimentos foram realizados entre a 5<sup>a</sup> e a 7<sup>a</sup> passagem duas vezes em triplicata em placas de 6 poços.

Para os ensaios referentes ao ciclo celular, as células foram mantidas com meio de cultura descrito acima durante 72 horas. Após este período ocorria a substituição deste meio de cultura para meio de cultura sem soro durante 24 horas a fim de sincronizar as células. Após este intervalo, as células recebiam meio de cultura contendo 10% SFB para saírem da fase G<sub>0</sub>, quando os ensaios destinados ao estudo da PTP-BMr e TRAP relacionados ao ciclo celular foram realizados. Os períodos experimentais destinados a este estudo foram de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas para os ensaios de dosagens enzimáticas e HPLC; para o ensaio mitogênico de incorporação de timidina os tempos foram 6, 18, 24, 36 e 48 horas.

Procedimentos semelhantes foram empregados para as análises durante a diferenciação dos osteoblastos, exceto que as células receberam meio contendo soro fetal bovino em todo o período do experimento. Os períodos de análise para esta etapa da pesquisa foram 7, 14, 21, 28 e 35 dias. A confirmação da ocorrência da diferenciação celular foi avaliada pela presença de nódulos de mineralização e atividade da fosfatase alcalina.

## 4.2 Caracterização da Diferenciação dos Osteoblastos

O aspecto morfológico das células foi monitorado durante todo experimento através de avaliação em microscópio de contraste de fase para observação da evolução do desenvolvimento celular. Para confirmação da diferenciação celular durante os períodos experimentais os osteoblastos foram caracterizados segundo a atividade da fosfatase alcalina, para acompanhamento da fase inicial da mineralização, e coloração pelo método de Von Kossa para melhor visualização dos nódulos de mineralização.

### 4.2.1 Ensaio da Atividade Mitogênica

O ensaio de atividade mitogênica dos osteoblastos hFOB 1.19 foi realizado com o intuito de verificar o perfil de proliferação destas células. Este ensaio foi realizado em placas de 96 poços com fundo plano, com uma concentração de 10.000 cels/cm<sup>2</sup>. Após um período de 72 horas em incubadora umidificada a 33,5°C, as células foram sincronizadas a partir da substituição do meio DMEM/F12 com SFB 10% por meio DMEM/F12. Após 24 horas, foi fornecido às células novo meio contendo soro fetal bovino 10% para o retorno destas ao ciclo celular. Os osteoblastos eram expostos a metil-3H-timidina, com uma concentração de 0,5 µCi por poço seis horas antes dos períodos de coleta (6, 18, 24, 36 e 48 horas). A quantidade de timidina incorporada pelas células foi determinada utilizando-se um coletor de células (Cambridge Technology Inc., Watertown, MA, USA) e um contador de cintilação líquida (Beckman Instruments Inc., Fullerton, CA, USA). A média para a contagem por minuto (cpm ± SD) foi determinada em triplicata.

### 4.2.2 Coloração Pelo Método de Von Kossa

Para verificar se as células da linhagem hFOB 1.19 eram realmente capazes de diferenciar através da produção de nódulos de mineralização *in vitro*, realizou-se a coloração pelo método de Von Kossa. Resumidamente, o meio de cultura foi removido, seguido pelo acréscimo de solução de formol a 10% para

fixação da amostra durante 10 minutos. Esta solução foi removida e as células lavadas com PBS por 10 minutos. Após esta etapa, acrescentou-se solução de nitrato de prata a 5%, com exposição à luz ultravioleta durante 30 minutos. Em seguida, a placa foi lavada novamente com PBS três vezes e as células foram imersas em solução de hipossulfito de sódio 5% por 3 minutos, para finalmente realizar a contra-coloração com solução de safranina 10%. De acordo com esta técnica, os núcleos celulares foram corados em vermelho, o cálcio em preto e o citoplasma, em rosa (SANT'ANA<sup>62</sup> *et al.*, 2002).

#### 4.2.3 Atividade da Fosfatase Alcalina

A coleta das amostras foi realizada segundo o protocolo proposto por **DECLERCQ**<sup>22</sup> *et al.*, 2004, que recomenda a remoção do meio de cultura seguida por uma lavagem com solução salina tamponada em fosfato livre de cálcio e magnésio (PBS-A). Colocou-se, então, em cada poço 1.300 µL de tampão de lise (10mM Tris HCl pH7,5; 0,5mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1% Triton X-100). Este material foi transportado para microtubos e sonicados por 5 segundos em ambiente resfriado. Após esta etapa, a amostra era centrifugada a 14.000 rpm, por 2 minutos para finalmente ser realizada a dosagem enzimática.

A atividade enzimática foi determinada a 37°C, através da formação do p-nitrofenol (pNP, coeficiente de extinção molar em meio alcalino = 18.000M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) utilizando-se um tampão glicina (25mM, pH 9,4), contendo 2 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 mM e p-nitrofenilfosfato (pNPP) em um volume final de 300 µL, de acordo com os procedimentos descritos por **DECLERCQ**<sup>22</sup> *et al.*, 2004. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL da amostra após coleta em fluxo laminar aos tubos contendo 125 µL de meio de reação. Após 50 minutos, a reação era paralisada com 125 µL de hidróxido de sódio, 1M e o sobrenadante era lido em cubeta de 500 µL (caminho óptico de 1 cm) em espectrofotômetro na absorvância de 405 nm.

Uma unidade de atividade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1µmol de produto por minuto. A atividade enzimática específica (AE) foi expressa como unidade de atividade

enzimática por miligrama de proteína (AE=UE/mg). A dosagem de proteína total foi feita pelo método de Bradford, utilizando como padrão a albumina bovina a 0,1%.

#### 4.3 Determinação da Atividade PTP-BMr e TRAP no Ciclo Celular e Durante a Diferenciação Celular

A atividade específica (AE) da fosfatase ácida total (FAT) foi determinada com descrito por **GRANJEIRO**<sup>29</sup> *et al.*, 1997, com os volumes adaptados para **DECLERCQ**<sup>22</sup> *et al.*, 2004. Para um volume final de 300 µL, a reação foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato a um meio de reação com o volume de 125 µL contendo 100mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5mM do substrato pNPP. Para a dosagem da PTP-BMr adicionou-se o inibidor p-hidroximercuribenzoato (pHMB), responsável pela completa inibição desta enzima (**GRANJEIRO**<sup>29</sup> *et al.*, 1997). A determinação da AE no meio de reação contendo pHMB e tartarato permite a determinação da TRAP, correspondente à atividade residual. A paralisação da reação ocorreu pela adição de 125 µL de NaOH 1,0 M, após incubação por 50 minutos a 37°C. A medida de absorção foi realizada a 405 nm, ( $\xi=18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

#### 4.4 Determinação do Estresse Oxidativo Durante o Ciclo e Diferenciação Celular

Após os tempos experimentais já determinados, os osteoblastos foram lisados com tampão de lise (acetato 100 mM, pH 5.4) contendo 10 µM de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA). Uma alíquota dos lisados foi separada para dosagem de proteína total realizada pelo Kit da Bio-Rad (baseado no método de Bradford), utilizando a albumina bovina como padrão. Outra alíquota das amostras foi desproteïnizada pela adição de igual volume de 10% do ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 10.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi congelado a -80°C. O conteúdo de GSH das amostras foi analisado por um sistema de HPLC com detecção eletroquímica segundo **HIRAKU**<sup>34</sup> *et al.*, 2002 ou, em

alguns casos, monitorado espectrofotometricamente pela reação com ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico, o DTNB (AKERBOOM & SIES<sup>1</sup>, 1981).

#### 4.4.1 Análise de Tióis Totais Não Protéicos Pela Reação com DTNB

As amostras precipitadas foram misturadas com 1mM DTNB em 100mM de tampão Tris, pH 8,0. Após 10 min de reação a 37°C, a quantidade total de tióis foi determinada pela medida da absorbância a 412 nm ( $\xi=13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (AKERBOOM & SIES<sup>1</sup>, 1981).

#### 4.4.2 Análise Cromatográfica Por HPLC para GSH e GSSG intracelular

A análise de GSH dos lisados de osteoblastos foi realizada com auxílio de um sistema de HPLC da Waters Corp. Milford, MA (constituído por 2 bombas 515, acopladas ao detector eletroquímico 247 e equipado com eletrodo de Ouro). As amostras foram submetidas à separação cromatográfica usando uma coluna X-Terra (4,5 x 250 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). Como fase móvel foi utilizada solução de 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2,5), 200 mg/L heptanossulfonato de sódio, 5 mg/L EDTA em 1% metanol (v/v), em fluxo de 0.5 mL/min. Foi injetado no sistema de HPLC um volume de 25  $\mu\text{L}$  amostra, correspondente a cerca de 10  $\mu\text{g}$  de proteína total. A eluição do GSH foi monitorada com detecção eletroquímica (potencial de oxidação GSH, 600 mV) (HIRAKU<sup>34</sup> *et al.*, 2002). O composto foi identificado e quantificado pela comparação de seu tempo de retenção com padrão autêntico submetido às mesmas condições cromatográficas. A análise de GSSG foi realizada indiretamente pela sua redução enzimática a GSH pela glutathiona redutase (0,6 U/mL)/ NADPH (0,2 mg/mL) por 30 min. Após esse período, a reação foi paralisada com a adição de 10% do TCA. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e analisadas no sistema HPLC-eletroquímico. A quantificação do GSSG foi realizada pela diferença do GSSG total reduzido em relação ao GSH total das mesmas amostras, considerando-se a estequiometria 2GSH/GSSG.

#### **4.5 Análise Estatística**

A análise estatística pertinente a cada ensaio foi realizada através do teste análise de variância a um critério. Realizou-se em todos os ensaios o teste de comparações múltiplas de Tukey, ao nível de significância de 5% (INSTAT software, Graphpad, San Diego, CA, USA).



# *Resultados*

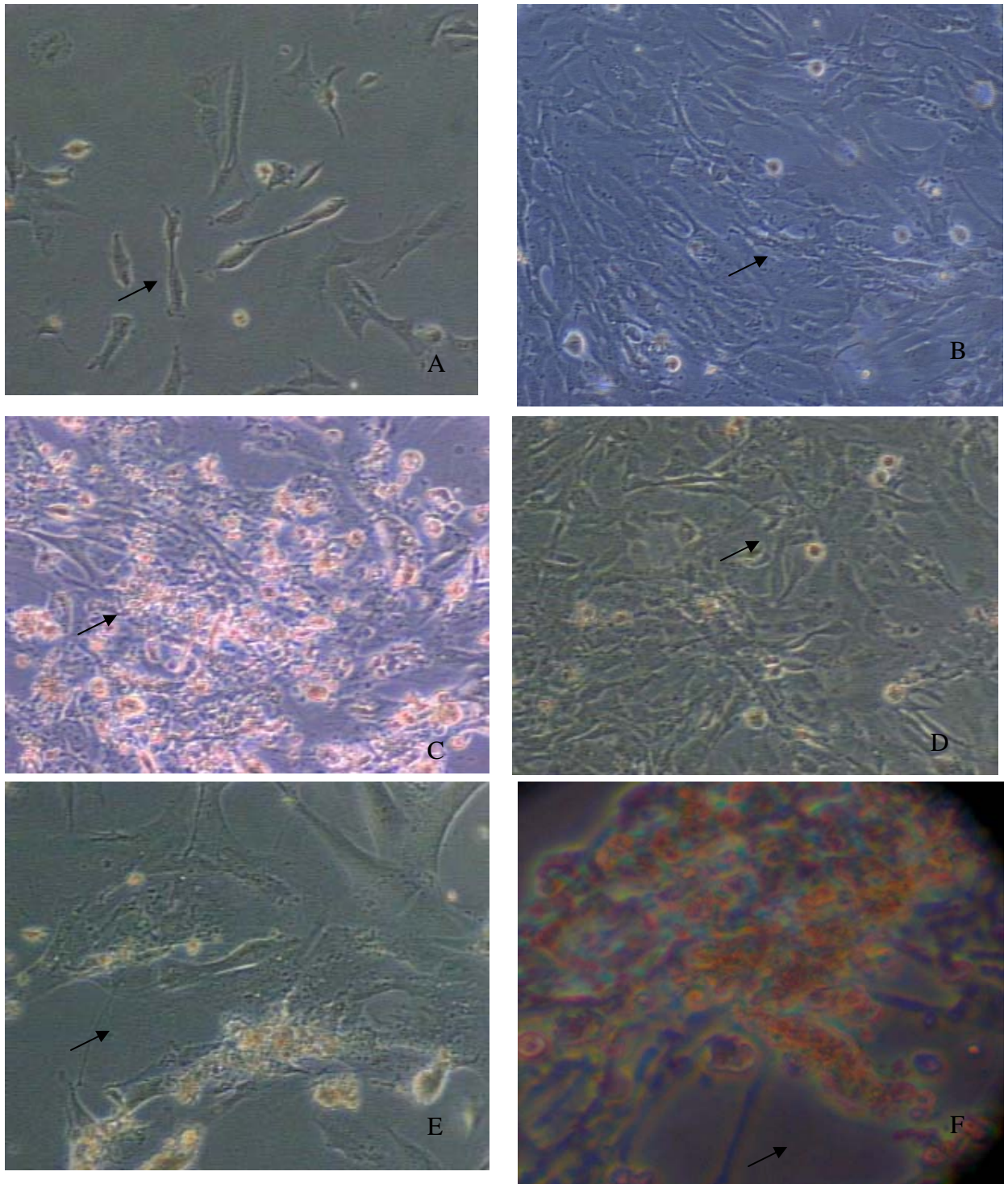
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das Alterações Morfológicas e Atividade Mitogênica dos Osteoblastos hFOB 1.19

O aspecto morfológico das células hFOB 1.1.9 foi monitorado durante todo o experimento em microscópio de contraste de fase. Durante este período, a morfologia celular evoluiu da seguinte forma: durante a fase de adesão dos osteoblastos ao substrato plástico houve expansão do citoplasma, evoluindo para uma morfologia fusiforme durante a fase proliferativa e apresentando alta atividade mitogênica. Foi possível a visualização de mitoses através do microscópio de contraste de fase, como demonstrado na Figura 1A, quando referente ao tempo experimental de 24 horas.

Observou-se que a confluência ocorria após sete dias. No decorrer deste processo, a morfologia celular apresentou alteração da sua forma fusiforme nos primeiros dias em cultura para uma aparência poligonal, sendo que a partir dos 21 dias em cultura, em algumas áreas, observou-se uma tentativa de se organizar em redes (Figura 1D), provavelmente para dar início à formação dos nódulos de mineralização. Durante a semana referente ao ensaio de 14 dias, observou-se formações indicativas de vesículas de matriz secretadas pelas células, sendo que aos 21 dias estas formações ainda estavam presentes, porém em menor quantidade e aos 28 dias eram inexistentes.

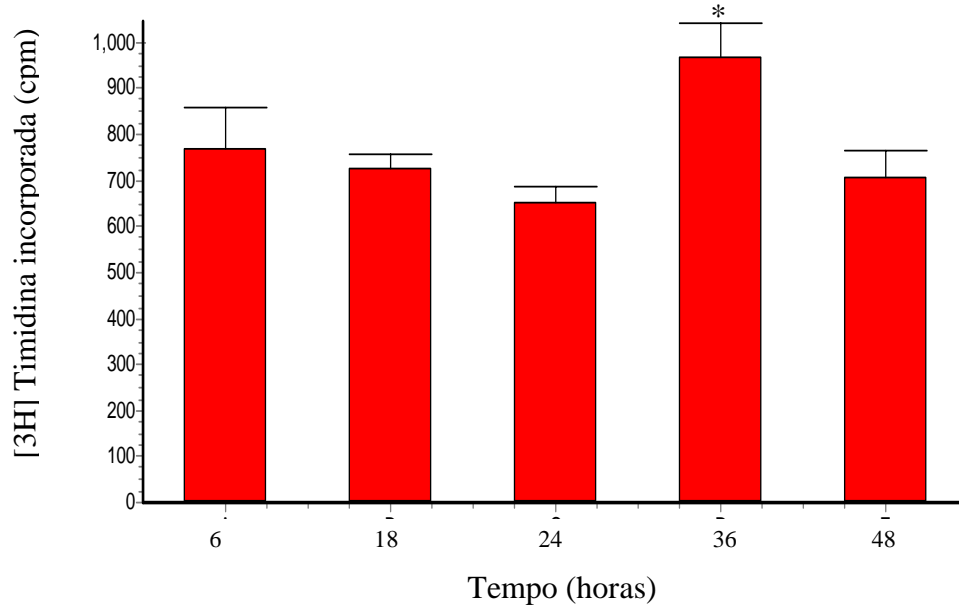
Outra observação relacionada ao monitoramento das células no transcorrer do ensaio refere-se à redução da densidade celular no decorrer do experimento, como demonstrado na figura 1E, no quadro indicativo do período de 28 dias. Esta redução da densidade celular foi progressiva, sendo mais intensa no tempo experimental de 35 dias (Figura 1F).



**FIGURA 1: Fotomicrografia de luz das células hFOB 1.19** - Realizada em microscópio de contraste de fase durante todo o período experimental em aumento de 10x. Eventos mais significativos apontados com setas. (A) células após 24 horas em cultura, mitoses abundantes; (B) células com 7 dias, já apresentando aspecto poligonal; (C) células com 14 dias, sintetizando muitas vesículas de matriz; (D) 21 dias, iniciando formação de nódulos; (E) 28 dias, diminuição da densidade celular; (F) 35 dias, diminuição da densidade celular mais acentuada.

Realizou-se o ensaio de incorporação de metil-3H-timidina para investigar o comportamento proliferativo das células hFOB 1.19. Estas células apresentaram baixa resposta proliferativa após a reinserção de soro fetal bovino, demonstrado pelo quantidade de timidina incorporada pelas células, provavelmente devido à sementeira das células em baixa densidade (10.000 células/cm<sup>2</sup>).

Para este ensaio utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer, ao nível de significância de 5%, que demonstrou não existir diferença significativa entre as médias dos grupos de 6 horas , 18 horas e 24 horas, apresentando, desta forma, um platô na incorporação de timidina. As células apresentaram um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ), na incorporação de timidina no tempo de 36 horas, diminuindo no tempo experimental seguinte, de 48 horas, exibindo um ciclo de proliferação celular semelhante ao determinado pelo fabricante (ATCC) (Figura 2).

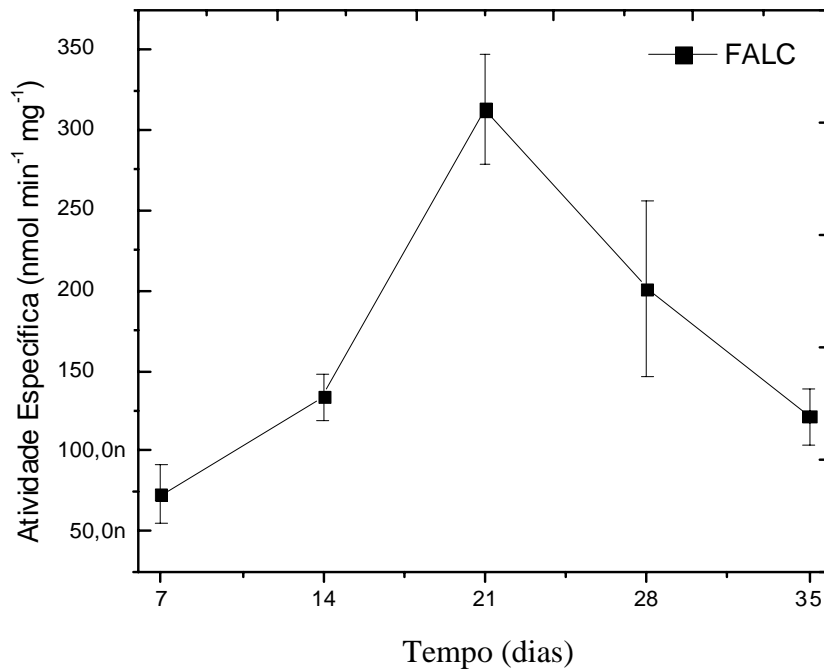


**FIGURA 2: Atividade mitogênica das células hFOB 1.19** – Realizada através de incorporação de timidina com concentração de 0,5  $\mu\text{Ci}$  em placas de 96 poços contendo as células hFOB 1.19 (densidade de 10.000 cels/cm<sup>2</sup>). Antes do experimento, as células foram carenciadas para soro durante 24 horas a fim de serem sincronizadas. A exposição à timidina foi realizada seis horas antes dos períodos de coleta. Tempos experimentais de 6, 18, 24, 36 e 48 horas. As barras representam o SD da média das triplicatas. O asterisco (\*) indica  $p < 0,05$  em comparação aos valores obtidos nos outros tempos experimentais.

## **5.2 Análise dos Marcadores de Diferenciação Celular**

O processo de análise da diferenciação da linhagem celular hFOB 1.19 foi realizado através de dois marcadores, a dosagem de fosfatase alcalina e visualização dos nódulos de mineralização da matriz extracelular pela coloração por Von Kossa, ambas realizadas durante os tempos experimentais de 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

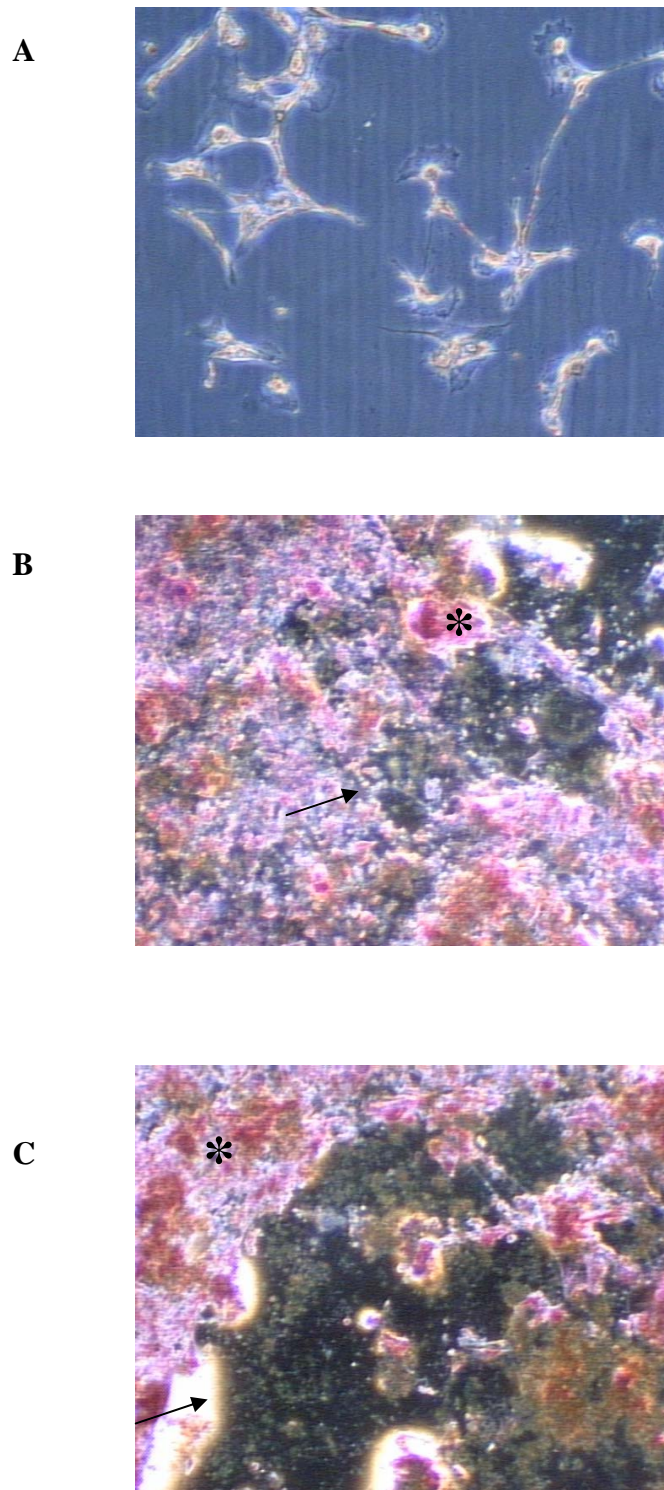
Durante o ensaio de dosagem enzimática da atividade fosfatase alcalina observou-se um aumento progressivo e estatisticamente significativo da expressão de fosfatase alcalina durante os períodos de 7 dias (72,5 nmol/min mg), 14 dias (133,55 nmol/min mg) e 21 dias, sendo máxima neste (312,8 nmol/min mg), declinando nos períodos seguintes também de forma estatisticamente significativa para 201,44 nmol/min mg no 28º dia e 121,18 nmol/min mg no 35º dia (Figura 3).



**FIGURA 3:** Atividade fosfatase alcalina (FALC) (nmol pNP mg<sup>-1</sup> proteína min<sup>-1</sup>) para monitoramento da diferenciação celular da linhagem hFOB 1.19 cultivadas durante 35 dias. Houve diferença estatisticamente significativa em todas as etapas ( $p < 0,05$ ). O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas.

A detecção da atividade osteogênica das células hFOB 1.19 foi confirmada pela detecção de nódulos de mineralização produzidos *in vitro* através da técnica de coloração por Von Kossa. Neste experimento utilizou-se como grupo controle a amostra de sete dias (Figura 4A), pelo fato de estar ainda nas etapas iniciais de mineralização biológica. A partir da técnica empregada, a visualização dos nódulos de mineralização foi possível no período de 28 dias (Figura 4B), onde observou-se os núcleos celulares corados em vermelho, o cálcio em preto e o citoplasma, em rosa, da mesma forma que descrito por **SANT'ANA et al.**, 2002. O fundo do frasco pode ser visualizado por translucidez próximo ao nódulo de mineralização. A quantidade de nódulos mineralizados foi máxima no tempo experimental de 35 dias (Figura 4C).





**FIGURA 4:** Células da linhagem hFOB 1.19 após coloração de Von Kossa em diferentes etapas de mineralização *in vitro* - Segundo esta técnica, os núcleos celulares são corados em vermelho(\*), o cálcio em preto e o citoplasma, em rosa. Os nódulos de mineralização estão demonstrados por setas: (A) grupo controle com ausência de mineralização, 7 dias em cultura, (B) células iniciando a mineralização, tempo de 28 dias, (C) mineralização mais intensa aos 35 dias em cultura.

### 5.3 Dosagens Enzimáticas da PTP-BMr e da TRAP no Ciclo Celular

A dosagem enzimática da PTP-BMr, TRAP e fosfatase ácida total (FAT) teve como objetivo determinar a variação da atividade destas enzimas durante o ciclo celular das células hFOB 1.19 (Figura 3). O monitoramento da atividade específica destas enzimas foi realizado nos tempos de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas.

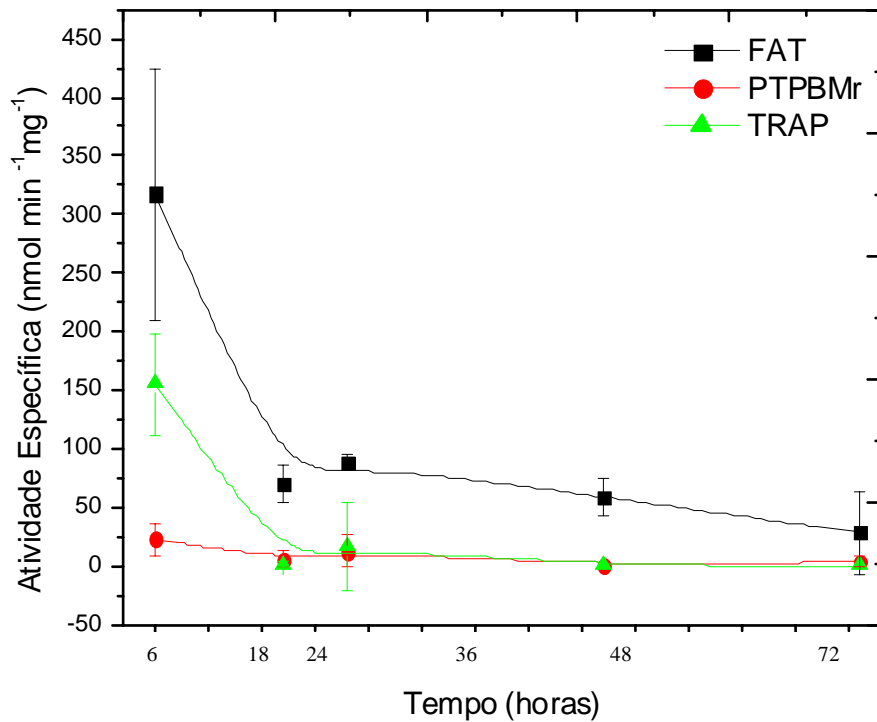
As enzimas analisadas neste estudo apresentaram o mesmo padrão de atividade nos períodos experimentais considerados. Em relação à atividade FAT, observou-se uma queda na sua atividade enzimática de 317,70 para 69,55  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  após 18 horas de adição do soro fetal bovino, representando uma redução de 78% ( $p < 0,05$ ) na atividade da FAT, permanecendo em um platô nos tempos seguintes, sem diferença estatisticamente significativa durante as dosagens seguintes (Tabela 1 e 2). A redução na atividade PTP-BMr foi da ordem de 75% entre seis horas e 18 horas ( $p < 0,05$ ), atingindo uma atividade residual de 10% após 72 horas. Comportamento similar foi observado para a TRAP, porém com modulação mais marcante, restando apenas cerca de 10% da atividade inicial após 24 horas e, a partir de 48 horas não foi mais detectada. As tabelas abaixo mostrarão os valores médios de atividade das enzimas estudadas em cada tempo experimental e a análise estatística referente a cada uma segundo o Teste de comparação múltipla de Tukey.

**TABELA 1:** Média da Atividade Específica ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes ao ciclo celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19.

Tempos	FAT	PTP-BMr	TRAP
6h	317,70	22,54	155,24
18h	69,55	5,69	0,89
24h	88,24	12,40	16,24
36h	69,15	10,14	11,18
48h	58,83	0,00	0,00
72h	28,29	3,53	0,00

**TABELA 2:** Análise estatística das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes ao ciclo celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19 (ns = não significante).

Comparação	Valor de P		
	FAT	PTP-BMr	TRAP
6h x 18h	*** $P < 0,001$	* $P < 0,05$	*** $P < 0,001$
18h x 24h	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$
24h x 36h	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$
36h x 48h	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$
48h x 72h	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$	ns $P > 0,05$



**FIGURA 5:** Atividade específica das enzimas FAT, TRAP e PTP-BMr ( $\text{nmol pNP/mg proteína}$ ) durante o ciclo celular da linhagem hFOB 1.19 nos tempos de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. Houve diminuição abrupta na atividade de todas as enzimas entre os tempos de 6 e 18 horas ( $p < 0,05$ ); nos tempos seguintes, as enzimas apresentaram apenas atividade residual. O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas.

#### 5.4 Dosagens Enzimáticas da TRAP e PTP-BMr na Diferenciação Celular

A dosagem enzimática da FAT, PTP-BMr e TRAP durante a diferenciação as células pertencentes à linhagem hFOB 1.19 teve como objetivo determinar o perfil destas enzimas nesta condição (Figura 4). O monitoramento da atividade específica destas enzimas foi realizado nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias.

A atividade específica da FAT não variou de forma estatisticamente significativa entre os tempos de 7 dias e 14 dias, conforme demonstrado nas tabelas 3 e 4; porém, nas dosagens referentes ao tempo de 21 dias, houve uma queda expressiva na atividade desta proteína, aumentando novamente de forma acentuada no período de 28 dias; sendo que no tempo de 35 dias observou-se outra vez uma queda acentuada na atividade desta proteína, comparativamente semelhante, segundo o teste estatístico de Tukey, àquela observada no tempo de 21 dias.

Resumidamente, as atividades PTP-BMr e TRAP demonstraram um perfil semelhante durante esta etapa do trabalho, aumentando de forma progressiva a atividade específica destas proteínas até o período de 21 dias, diminuindo nos tempos seguintes. Interessante ressaltar que a atividade da PTP-BMr apresentou um pico de atividade em 21 dias, enquanto a TRAP exibiu um platô de atividade 21 e 28 dias (Figura 4).

Especificamente, para a PTP-BMr durante o ensaio de diferenciação celular verificou-se que a atividade PTP-BMr no tempo experimental de 7 dias revelou-se baixa, com o valor da média da atividade específica em  $29,33 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . Porém a sua atividade aumentou em pouco mais de duas vezes no início do processo de diferenciação celular, demonstrado no grupo de 14 dias por uma média na atividade específica em  $88,51 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . A atividade PTP-BMr chegou ao seu máximo no tempo experimental de 21 dias, com uma atividade fosfatásica que quase triplicou em relação ao período anterior, mostrando uma média de  $181,88 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , ou seja, um aumento da ordem de 600% em relação ao primeiro período. Em seguida a atividade PTP-BMr diminuiu progressivamente, caindo para  $104,98 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  no tempo de 28 dias e uma média de  $60,20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  no tempo de 35 dias.

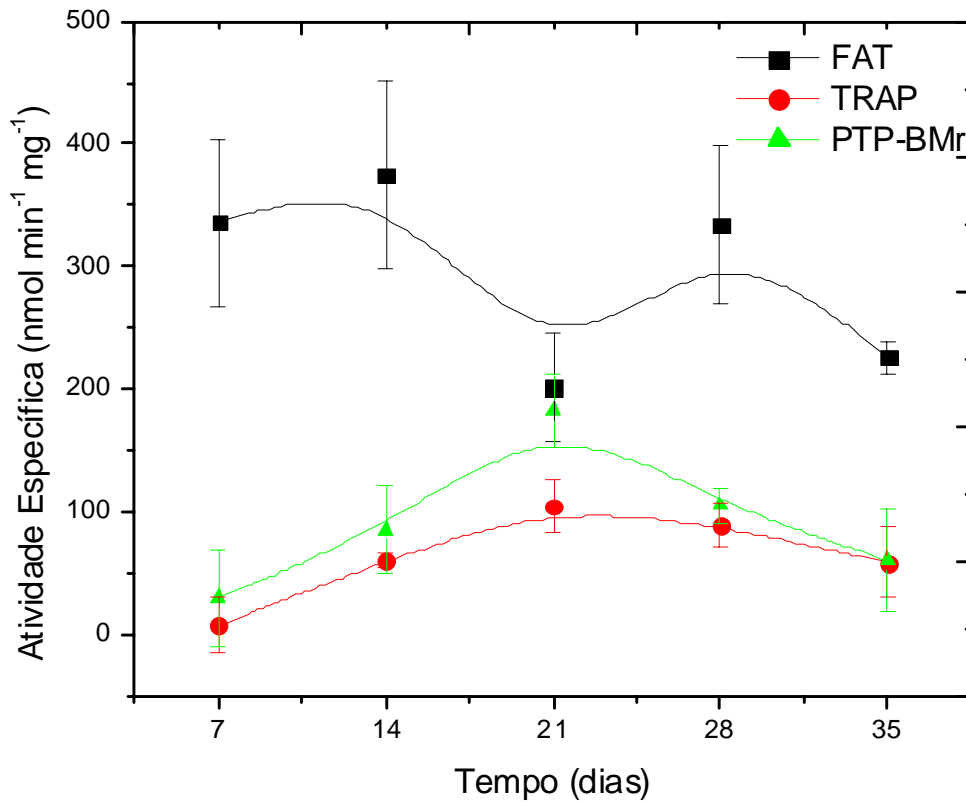
Os valores encontrados para a TRAP durante esta etapa iniciaram com  $7,37 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , aumentando significativamente (cerca de 800%) para  $60,20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  no tempo de 14 dias, chegando ao seu máximo no tempo de 21 dias apresentando atividade enzimática de  $104,70 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (1420%), sendo que a partir daí a atividade desta proteína diminui progressivamente durante o resto do período experimental para  $88,66 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  no 28º dia e  $58,33 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .

**TABELA 3:** Média da Atividade Específica ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes à diferenciação celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19.

Tempos	Média da Atividade Específica ( $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ )		
	FAT	PTP-BMr	TRAP
7d	335,55	29,33	7,37
14d	375,00	88,51	60,20
21d	201,20	181,88	104,70
28d	334,00	104,98	88,66
35	225,66	60,23	58,33

**TABELA 4:** Análise estatística das enzimas FAT, PTP-BMr e TRAP nos tempos experimentais referentes à diferenciação celular das células provenientes da linhagem imortalizada hFOB 1.19 (ns = não significante).

Comparação	Valor de P		
	FAT	PTP-BMr	TRAP
7d x 14d	ns $P > 0,05$	** $P < 0,01$	*** $P < 0,001$
14d x 21d	*** $P < 0,001$	*** $P < 0,001$	*** $P < 0,001$
21d x 28d	*** $P < 0,001$	*** $P < 0,001$	ns $P > 0,05$
28d x 35d	* $P < 0,05$	ns $P > 0,05$	* $P < 0,05$



**FIGURA 6:** Atividade específica das enzimas FAT, TRAP e PTP-BMr (nmol pNP/mg proteína) durante a diferenciação celular da linhagem hFOB 1.19 nos tempos de 7,14, 21, 28 e 35 dias. O gráfico representa as médias de cada tempo experimental  $\pm$  desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicatas.

## 5.5 Quantificação de Glutathiona Reduzida e Oxidada

Realizou-se a quantificação da GSH a partir dos extratos celulares das células hFOB 1.19 obtidos através do tampão de lise descrito no capítulo anterior. Para este fim realizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) através de detecção eletroquímica, utilizando um volume de injeção de 25  $\mu$ L, e pelo método do ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). A quantificação de GSH durante a proliferação celular está demonstrada na Figura 7 e durante a diferenciação celular, na Figura 8. O conteúdo de GSH medido nos osteoblastos por detecção HPLC-eletroquímico foi cerca de quatro vezes menor que o obtido para tióis totais não protéicos, como observado nas Figuras 7A e 7B e 8A e 8B. Estas diferenças devem estar relacionadas com a inespecificidade do método do DTNB em reagir com o “pool” total de tióis não protéicos das amostras, porém, é importante salientar que o padrão de expressão da GSH e GSSG foi semelhante em ambos os ensaios.

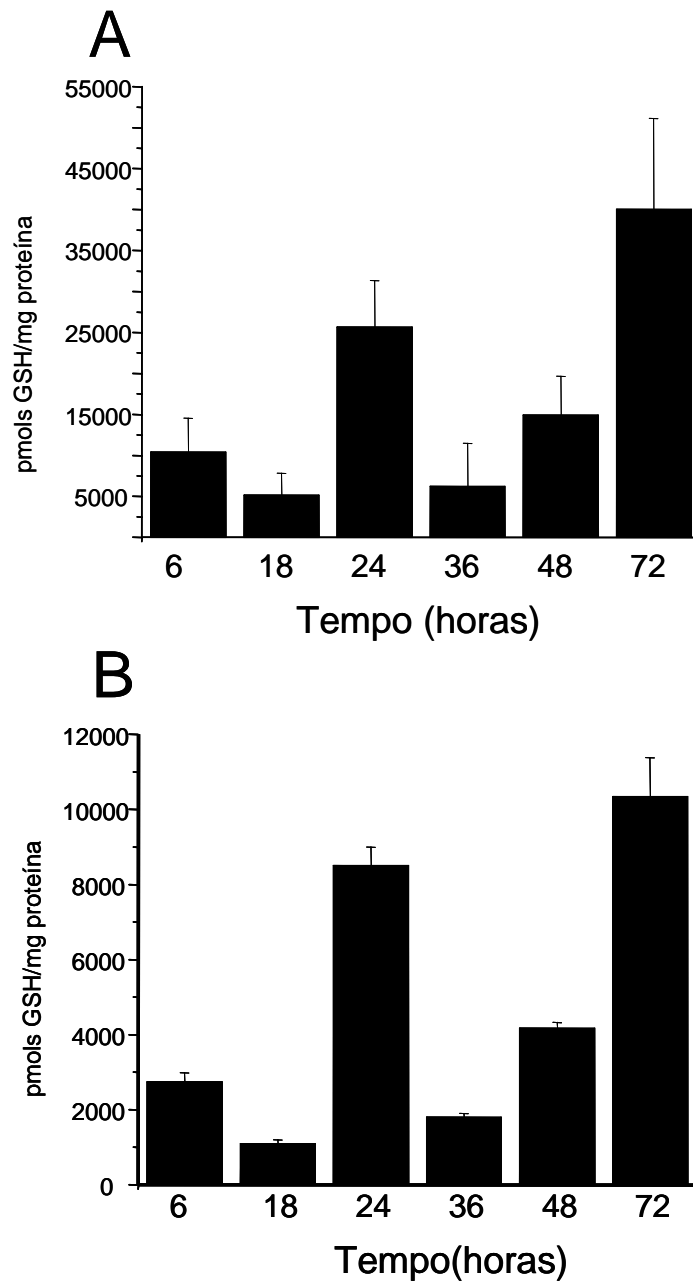
A dosagem de GSH, refletindo a quantidade de substrato disponível para atuar como antioxidante apresentou-se durante o ciclo celular de forma cíclica, iniciando com uma dosagem reduzida no tempo de 6 horas, apresentando o primeiro pico no tempo de 24 horas, reduzindo novamente no período seguinte, de 36 horas, para um padrão análogo ao inicial, aumentando a concentração deste peptídeo no tempo de 48 horas, chegando a um novo pico no tempo de 72 horas.

A dosagem da GSH no estudo relacionado à diferenciação celular aumentou de forma contínua até o período de 21 dias, reduzindo nos tempos seguintes (Figura 8A e 8B). A relação 2GSH/GSSG nos osteoblastos (Figura 9B) pelo sistema glutathiona redutase/NADPH durante a diferenciação celular seguiu o mesmo padrão, apresentando-se mais reduzido no período de 21 dias.

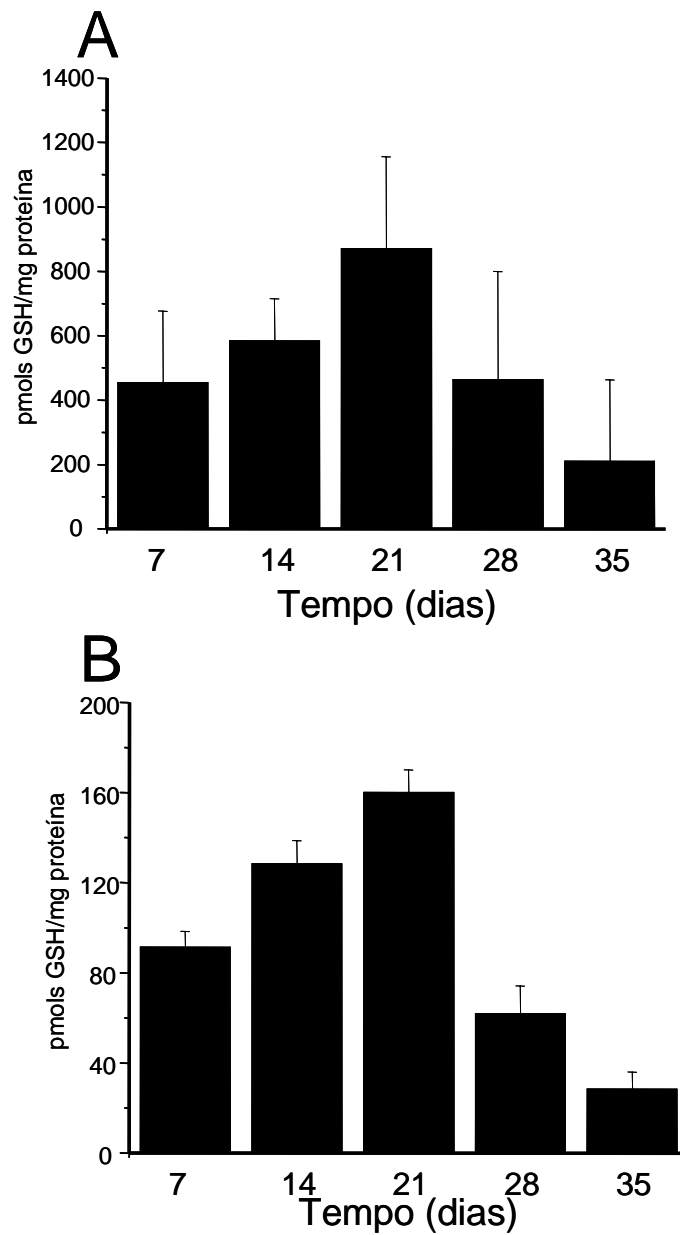
Buscando-se entender mais adequadamente o estado redox celular, realizou-se a quantificação da relação glutathiona reduzida/glutathiona oxidada (2GSH/GSSG) nos osteoblastos hFOB 1.19 (Figura 9A) pelo sistema glutathiona redutase/NADPH. O estado redox foi alterado durante a proliferação da seguinte forma: o estado redox celular apresentou-se mais reduzido, em cerca de 3 vezes nos períodos de 18 e 48 horas. Estes períodos corresponderam aos pré-períodos do



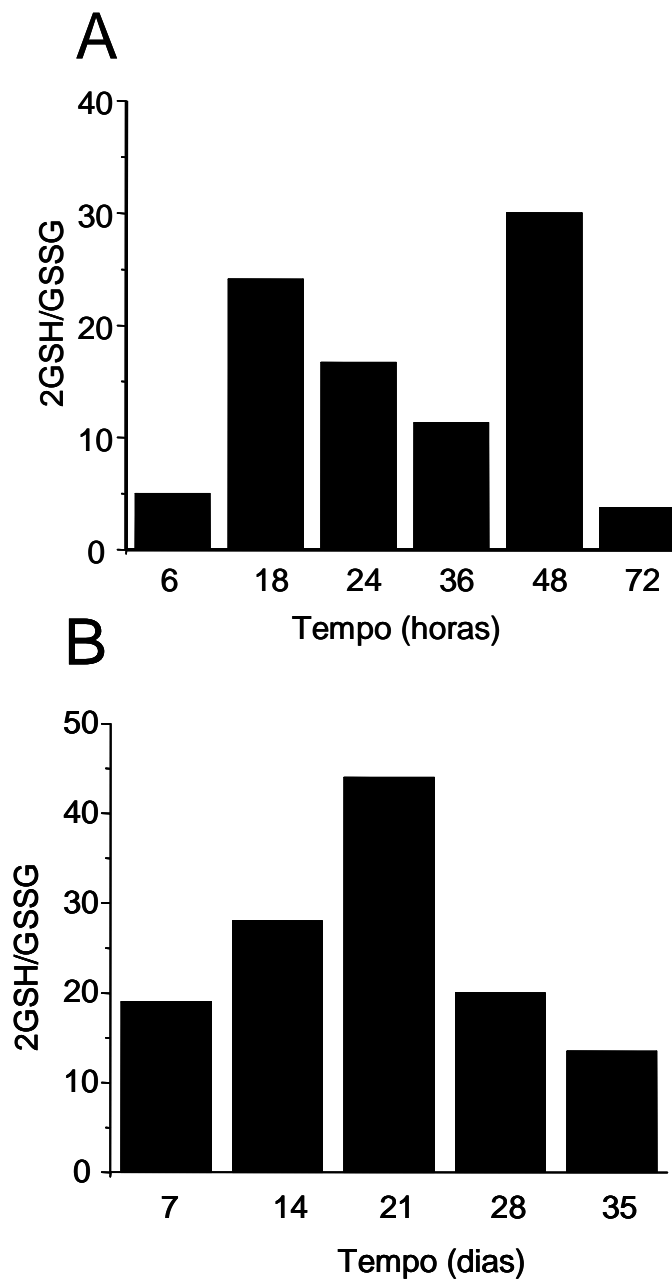
conteúdo de GSH e de tióis totais nos lisados celulares, se compararmos com a figura 7A.



**FIGURA 7:** Quantificação dos tióis totais não protéicos – Realizada pelo método do DTNB (A) e pelo método HPLC-eletróquímico para quantificação de GSH (B) obtidos através de lisados dos osteoblastos hFOB 1.19 durante a proliferação celular nos tempos experimentais de 6, 18, 24, 36, 48 e 72 horas. Todos os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.



**FIGURA 8:** Quantificação dos tíois totais não protéicos – Realizada pelo método do DTNB (A) e pelo método HPLC-eletróquímico para quantificação de GSH (B) obtidos através de lisados dos osteoblastos hFOB 1.19 durante a diferenciação celular nos tempos de 7, 14, 21, 28 e 35 dias, com expressão máxima no 21º dia. Todos os dados representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes.



**FIGURA 9:** Mensuração do estado redox intracelular através de HPLC eletroquímico. A quantificação de GSSG foi realizada indiretamente através do sistema glutatona redutase/NADPH – (A) durante a proliferação dos osteoblastos (B) durante a diferenciação das células. A relação de 2GSH/GSSG foi obtida pela redução de GSSG presente nas mesmas amostras que nas Figuras 7 e 8 respectivamente, porém tratadas com glutatona redutase (0,6 U/ml)/NADPH (mg/mL) por 30 min. Todos os dados representam a média de dois experimentos independentes.

# *Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

As técnicas de cultivo celular têm-se mostrado uma importante ferramenta para o estudo adequado do comportamento celular frente a diversas situações. Em particular, quanto à diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos ativos, a cultura primária tem demonstrado ser um excelente modelo de estudo, porém possui limitações para realização de experimentos longos, como heterogeneidade do fenótipo, baixas taxas de crescimento e limitado período de vida em cultura (SUBRAMANIAM<sup>66</sup> *et al.*, 2002). Por este motivo foi escolhida uma linhagem de células imortalizadas para a realização deste projeto.

Desta forma, a linhagem celular mais adequada para a proposta deste trabalho foi a linhagem desenvolvida por **HARRIS**<sup>32</sup>, *et al.* 1995, proveniente de fêtures de fetos humanos hFOB 1.19, por ser descrita na literatura como uma linhagem celular capaz de diferenciar *in vitro*, comprovada pelos marcadores estabelecidos fosfatase alcalina, cujo pico indica o início do processo de mineralização biológica, e coloração por Von Kossa, que cora os nódulos de mineralização. A escolha de uma linhagem de osteoblastos humanos não provenientes de osteosarcoma foi feita com o objetivo de se excluir qualquer viés relacionado ao fenótipo característico de determinada espécie, caso fosse escolhida uma linhagem de outra espécie, que não a humana, ou de células transformadas com modificações no cariótipo em relação a células normais, como é o caso de células provenientes de neoplasias.

Com o intuito de atingir os objetivos propostos, decidiu-se realizar ensaios relacionados à comprovação da diferenciação celular alcançada pelas células utilizadas como modelo de estudo, através dos ensaios de dosagem de fosfatase alcalina e coloração por Von Kossa; e dosagem de atividade enzimática e cromatografia líquida de alta performance (HPLC), para analisar o perfil das proteínas estudadas e o mecanismo de controle de sua atividade.

A enzima fosfatase alcalina tem sido associada com a mineralização biológica pelo fato de que o aumento na expressão desta enzima seja necessário antes do começo da mineralização da matriz, fornecendo um enriquecimento de fosfato inorgânico para a nucleação e proliferação de cristais de hidroxiapatita (COELHO<sup>20</sup> *et*

*al.*, 2000). Desta forma, convencionou-se a utilizar este ensaio em praticamente todos os trabalhos acerca do estudo de diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos ativos como método comprobatório, porque, apesar desta proteína não ser exclusiva de osteoblastos ativos, (JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>37</sup>, 1999) esta é a fosfatase predominantemente encontrada nas vesículas que funcionam como sítios iniciais da mineralização da matriz extracelular de tecidos como cartilagem, ossos e dentina. (WHYTE<sup>69</sup> *et al.*, 1996).

Na literatura referente a este assunto, há outros métodos de análise de diferenciação celular, como marcação imunohistoquímica de proteínas relacionadas à atividade osteoblástica, como marcação de colágeno tipo I, tipo III e osteocalcina, entre outros, (MANIATOPOULOS<sup>45</sup> *et al.*, 1988; COELHO<sup>20</sup> *et al.*, 2000; COELHO<sup>21</sup> *et al.*, 2000; DECLECK<sup>22</sup> *et al.*, 2004). Para as etapas finais da diferenciação *in vitro*, quando se espera que as células tenham produzido nódulos de mineralização, um dos métodos disponíveis para confirmação da sua presença é a verificação de depósitos de fosfato de cálcio pela coloração por Von Kossa ou Alizarina, ou por espectrometria, que revela a composição físico-química da fase mineral de compostos. Dentre estes métodos, a coloração pelo método de Von Kossa é a mais utilizada, provavelmente devido à facilidade da técnica. Por este motivo e pelo fato de ser amplamente aceita na literatura, esta coloração foi utilizada neste trabalho.

Em relação aos ensaios de dosagem enzimática, houve no decorrer do processo, certa dificuldade de adaptação da técnica, pelo fato de inicialmente a proposta do trabalho utilizar como modelo experimental a cultura primária de osteoblastos humanos, o que limitaria a possibilidade de expandir o número de passagens com a finalidade de aumentar o número de células. Como não havia possibilidade de aumentar a quantidade de material coletado, por motivos éticos, já que o material era obtido de sobras de enxertos autógenos do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP, foram feitos vários ensaios piloto para conciliar um mínimo de amostra para uma leitura confiável no espectrofotômetro. Desta forma, foi necessário adequar as proporções de volumes recomendados por GRANJEIRO<sup>29</sup> *et al.* em 1997, para meios de reação, amostras e meios de paralisação da reação de acordo com o trabalho proposto por DECLERCQ<sup>22</sup> *et al.*, 2004. Estes volumes foram mantidos, após a troca do modelo experimental para as células hFOB 1.19.

O outro ensaio utilizado neste estudo para avaliação da regulação das enzimas estudadas foi a cromatografia líquida de alta performance (HPLC), cuja função foi quantificar a relação de glutathiona reduzida e glutathiona oxidada, com o intuito de verificar se a modulação enzimática durante a osteogênese *in vitro* se dava através da regulação por este anti-oxidante.

## 6.1 Caracterização da Diferenciação Celular

O monitoramento das alterações morfológicas é de grande utilidade durante estudos de diferenciação celular, pelo fato de estas alterações serem resultantes da reorganização do citoesqueleto, que é uma das estruturas que possuem o papel de controle do desenvolvimento celular (STEIN<sup>65</sup> *et al.*, 1990). Para as células hFOB 1.19 observou-se uma modificação da morfologia celular de um formato fusiforme, durante a proliferação celular, para um formato poligonal, após a confluência. Estes achados estão de acordo com os relatos na literatura acerca da linhagem hFOB 1.19 (HARRIS<sup>32</sup> *et al.*, 1995; SPELSBERG<sup>63</sup> *et al.*, 1995), estão também de acordo com os artigos relacionados ao estabelecimento de cultura primária de osteoblastos (DECLERCQ<sup>22</sup> *et al.*, 2004; MANIATOPOULUS<sup>45</sup> *et al.*, 1988; COELHO<sup>20</sup> *et al.* 2000, COELHO<sup>21</sup> *et al.* 2000).

A dosagem de atividade fosfatase alcalina (FALC) é um marcador bastante difundido na literatura acerca do estudo de diferenciação celular *in vitro*. No presente trabalho, as células hFOB 1.19 obtiveram uma marcação positiva desta proteína, com um pico bem definido na sua atividade no tempo experimental de 21 dias. Entretanto, apesar de esta modulação ter alcançado um pico de atividade enzimática no período experimental de 21 dias, semelhante à maioria dos trabalhos envolvidos no estudo da diferenciação celular *in vitro*, a atividade específica da FALC foi menos intensa do que aquela encontrada na literatura para cultura primária de osteoblastos humanos (DECLERCQ<sup>22</sup> *et al.*, 2004; COELHO<sup>20</sup> *et al.* 2000; COELHO<sup>21</sup> *et al.* 2000). Porém, os resultados obtidos foram condizentes com aqueles relacionados à linhagem utilizada neste estudo, sugerindo que apesar de realmente existir uma marcação positiva da etapa inicial de mineralização *in vitro*, esta é mais fraca ao comparar com células provenientes de cultura primária,



provavelmente devido ao fato de existir menores oportunidades das células de cultura primária para a perda de fenótipo.

A coloração por Von Kossa, o outro marcador de diferenciação celular utilizado neste trabalho, foi utilizada para a confirmação da etapa final de diferenciação de osteoblastos ativos, definida pela produção de nódulos de mineralização. Os resultados obtidos através do ensaio de coloração por Von Kossa neste trabalho contrastaram com os encontrados para cultura primária de osteoblastos humanos, como descrito por **COELHO**<sup>20</sup> *et al.* 2000 e **COELHO**<sup>21</sup> *et al.* 2000, que, ao trabalharem com cultura primária de osteoblastos humanos, já observaram nódulos de mineralização a partir do 21º dia. **HARRIS**<sup>32</sup> *et al.*, em 1995 ao relatarem o desenvolvimento da linhagem hFOB 1.19, comunicaram que observaram a formação de nódulos mineralizados também a partir do 21º dia. No presente trabalho, os nódulos só foram visíveis a partir do 28º dia, apresentando-se mais intensos no 35º dia.

Esta diferença de resultados entre a mesma linhagem celular pode estar relacionada com as passagens nas quais as células foram semeadas já que **HARRIS**<sup>32</sup> *et al.*, em 1995 relataram que as células da linhagem hFOB 1.19 poderiam ser utilizadas até a 30ª passagem sem prejuízo na diferenciação celular, porém os resultados de seus trabalhos nunca foram referentes a longas passagens e sim a passagens iniciais, isto significa que possa existir uma perda de fenótipo no decorrer das passagens, diminuindo, desta forma, a intensidade da marcação da diferenciação celular. Estudos posteriores serão necessários para explicar essa diferença.

## 6.2 Dosagens Enzimáticas da TRAP e PTP-BMr Durante o Ciclo Celular

A inibição do crescimento celular induzida pelo contato celular é uma característica marcante de células normais em monocamada. Apesar de a maioria dos processos celulares a esse respeito ainda serem desconhecidos, o envolvimento de proteínas tirosina fosfatases de baixa massa molecular relativa (PTP-BMr), nestes processos foi demonstrado na literatura corrente (**CHIARUGI**<sup>13</sup> *et al.*, 2001, **PANI**<sup>55</sup> *et al.*, 2000, **CHIARUGI**<sup>16</sup> *et al.*, 2002, **GRANJEIRO**<sup>30</sup> *et al.*, 2001). O papel

fenotípico mais relevante desta enzima foi o controle da propagação do sinal mitogênico disparado pelo PDGF através da desfosforilação do receptor deste fator de crescimento, impedindo a transdução de sinais proliferativos, impossibilitando, desta forma, a mitose induzida pelo PDGF (CHIARUGI<sup>14</sup> *et al.*, 2001). No presente trabalho, não se buscou especificamente a relação entre a sinalização pelo PDGF sobre osteoblastos e esta influência sobre a PTP-BMr, mas sim, se frente ao estímulo proliferativo fisiológico de osteoblastos *in vitro*, o comportamento da PTP-BMr seria semelhante ao encontrado para a quando estimulado pela PDGF, ou seja, uma regulação negativa desta proteína durante a proliferação celular.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram esta idéia, visto que as atividades PTPase e TRAP foram encontradas, porém com atividade PTP-BMr mínima no primeiro tempo experimental relacionado ao estudo do ciclo celular e praticamente nula durante os períodos restantes, correspondendo a pouco menos de 10% da atividade FAT, enquanto os níveis de incorporação de metil-3H-timidina aumentaram no sentido inverso, demonstrando o aumento estatisticamente significativo da síntese de DNA, provavelmente pelo fato de que a atividade fosfatásica deva ser diminuída durante a fase de proliferação celular. Estes resultados sugerem que a diminuição na atividade fosfatásica seja necessária para a entrada na fase S, e que durante as etapas subseqüentes do ciclo celular sua atividade deva se manter diminuída, colaborando para uma maior concentração de proteínas fosforiladas em tirosina.

A diminuição intensa na atividade PTP-BMr durante a proliferação celular parece ser necessária, como já demonstrado por CHIARUGI<sup>10</sup> *et al.*, em 1997, quando a superexpressão de um mutante inativo da PTP-BMr em células NIH-IR se relacionou à proliferação aumentada destas células em relação às células sem esta mutação, quando tratadas com insulina. TADDEI<sup>67</sup> *et al.*, em 2000, também chegaram a esta mesma conclusão do efeito negativo da PTP-BMr sobre o ciclo celular, adicionando a informação que esse efeito se fez mais presente quando relacionado ao PDGF do que a insulina. Além destes, em outros trabalhos seguindo a mesma proposta, foram encontrados resultados semelhantes. CHIARUGI<sup>11</sup> *et al.*, em 1998 também observaram a diminuição da taxa de proliferação frente ao estímulo pela PTP-BMr, assim como RUGIERO<sup>61</sup> *et al.*, em 1993. FIASCHI<sup>26</sup> *et al.*, em

2001, ao avaliarem a relação entre densidade celular e os níveis de PTP-BMr verificaram que as culturas com baixa confluência, portanto em intensa atividade mitogênica, apresentaram níveis muito baixos de atividade PTP-BMr comparando-se com os grupos confluentes. **CHIARUGI**<sup>16</sup> *et al.*, em 2002 propuseram a mesma idéia, mas em um experimento diferente, onde ao promover a superexpressão de um mutante inativo da PTP-BMr induziram um aumento intenso na duração e no pico de fosforilação nas células NIH-3T3 com conseqüente aumento de proliferação celular nestas células.

Os resultados dos ensaios relacionados ao ciclo celular correlacionam parcialmente com os resultados de **GRANJEIRO**<sup>29</sup>, em 2001, que também encontrou uma diminuição significativa na atividade PTP-BMr e TRAP em células de glioma de rato até o período de 36 horas, deixando de existir após 42 horas. Especulativamente podemos associar esta diferença ao fato das células provenientes de glioma serem células transformadas, instigando estudos mais detalhados para entender o real significado destes achados.

A literatura a respeito da relação entre a TRAP e o ciclo celular contém muito pouca informação sobre este tema, principalmente no que se refere a esta atividade em osteoblastos, pelo fato de esta enzima ser profundamente relacionada à atividade osteoclástica e apenas recentemente, a partir dos achados de **LAU**<sup>42</sup>, *et al.*, em 2003, a curiosidade acerca da sua relação com a atividade osteoblástica aumentou.

Vários artigos demonstraram a presença de atividade proteína fosfatase pela TRAP (**HALLEEN**<sup>31</sup> *et al.*, 1998; **FUKUSHIMA**<sup>28</sup> *et al.*, 1991; **LAU**<sup>42</sup> *et al.*, 2003, **GRANJEIRO**<sup>30</sup>, 2001). O presente trabalho sugeriu a mesma idéia. As células hFOB 1.19 apresentaram no início da sua atividade mitogênica uma expressão da TRAP com cerca de 50% da FAT, decaindo para próximo de zero no decorrer do experimento acerca do ciclo celular, enquanto os níveis de incorporação de metil-3H-timidina aumentaram no sentido inverso, demonstrando que a atividade TRAP deva ser regulada negativamente para o sucesso da proliferação celular.

### 6.3 Dosagens Enzimáticas da TRAP e PTP-BMr durante a Diferenciação Celular

A diferenciação celular é um processo coordenado que inclui a saída do ciclo celular e a expressão de genes determinados para especificar a identidade do tecido. Em particular, a osteogênese necessita do contato célula-célula para este fim. Muitas PTPases estão associadas com a diferenciação celular, como a rVH6 ou MKP1 (MOUREY<sup>48</sup> *et al.*, 1996; FIACHI<sup>26</sup> *et al.*, 2001). Neste trabalho pode-se observar que para osteoblastos humanos, as atividades PTP-BMr e TRAP estão moduladas durante este processo e podem representar associação com o processo de diferenciação celular.

Artigos já publicados mostraram que a atividade proteína fosfatase estava aumentada em lisados ou frações de membranas celulares derivadas de culturas altamente densas (OSTMAN<sup>54</sup> *et al.*, 1994). **FIASCHI**<sup>26</sup>, *et al.*, em 2001 observaram que tanto a confluência como a diferenciação celular regularam positivamente a expressão de PTP-BMr em células musculares C2C12 e células neuronais PC12, sendo que os níveis aumentaram de acordo com o desenvolvimento da diferenciação destas células e que durante a miogênese a PTP-BMr se acumulou na membrana plasmática. Observaram também que a expressão da PTP-BMr era influenciada pela densidade celular em mioblastos de camundongo C2C12. Este trabalho também relatou que tanto a miogênese como o contato célula-célula levaram a uma diminuição intensa nos níveis de fosforilação da tirosina do PDGFr (substrato conhecido da PTP-BMr)

**LUCENTINI**<sup>44</sup> *et al.*, em 2003, avaliaram a atividade PTP-BMr em células neuronais pertencentes à linhagem PC12 e *in vivo* em células neuronais de frango através de ensaios de dosagem de atividade enzimática e *immunoblotting*. Para os ensaios *in vitro*, a atividade PTP-BMr aumentou progressivamente em cerca de 30% entre os tempos experimentais de 0 a 72 horas durante a diferenciação celular. *In vivo*, os resultados foram semelhantes, aumentando a atividade PTP-BMr durante o decorrer do desenvolvimento neuronal em cerca de 30%, seus achados também relacionaram o aumento da atividade PTP-BMr com a diminuição da taxa de proliferação celular.

No presente estudo, os resultados obtidos foram muito semelhantes a todos estes encontrados na literatura, a atividade PTP-BMr aumentou progressivamente durante os primeiros tempos experimentais relacionados à diferenciação, chegando ao seu pico no 21º dia, coincidentemente ao pico de diferenciação osteoblástico, caracterizado pela marcação da atividade enzimática da fosfatase alcalina. Após esta atividade máxima, a atividade PTP-BMr diminuiu, apesar de as células continuarem confluentes. Contudo, a atividade FAT seguiu um padrão de atividade específica distinto das duas outras enzimas estudadas, visto que o período experimental de menor atividade foi justamente aquele de maior atividade das outras enzimas (21 dias).

Em relação à TRAP, esta demonstrou um perfil de atividade semelhante à PTP-BMr sugerindo que essa possa estar realmente apresentando atividade tirosina fosfatase, desenvolvendo, provavelmente, um importante papel regulatório em várias funções celulares do osteoblasto, incluindo proliferação e/ou diferenciação celular. Os dados referentes ao estudo da TRAP permitem constatar que sua atividade segue o mesmo padrão de atividade que a PTP-BMr, coincidindo a sua atividade máxima também no tempo experimental de 21 dias, período identificado como o de maior diferenciação celular, declinando a seguir.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram, em conjunto e pela primeira vez, que a atividade da PTP de BMr e a TRAP foram moduladas durante a diferenciação de osteoblastos.

#### **6.4 Quantificação de Glutathiona Reduzida e Oxidada Durante o Ciclo e Diferenciação**

A regulação da atividade PTP-BMr ocorreu via redox, apresentando-se ativa quando reduzida e inativa quando oxidada, pelo fato de que quando oxidada, esta enzima sofreu a formação de uma ponte dissulfeto nas cisteínas 12 e 17, presentes no sítio catalítico, com conseqüente mudança conformacional, impedindo o início do processo de catálise. Esta inativação foi causada por concentrações fisiológicas de  $H_2O_2$  e como a sua reativação seria devida à redução com tíóis de baixa massa molecular, a literatura sugeriu que condições de estresse oxidativo e outros processos

que produzem peróxido de hidrogênio regulem a atividade PTP-BMr na célula (CASELLI<sup>7</sup>, 1998).

A glutationa reduzida (GSH) é considerada um dos mais importantes redutores intracelulares, estando envolvida na proteção contra a citotoxicidade de agentes eletrofílicos, metabólitos e regulação dos efeitos do estresse oxidativo nas células, mantendo, desta forma, o balanço redox intracelular (NING & GRANT<sup>51</sup>, 2000). Este tripeptídeo foi considerado responsável pela reativação da PTP-BMr após esta sofrer estresse oxidativo (CHIARUGI<sup>14</sup> *et al.*, 2001; PANI<sup>55</sup> *et al.*, 2000; CHIARUGI<sup>17</sup> *et al.*, 2003; CHIARUGI<sup>13</sup> *et al.*, 2001; FIASCHI<sup>26</sup> *et al.*, 2000). Acredita-se que, *in vivo*, a reativação da PTP-BMr seja realizada após a remoção do estresse oxidativo exógeno sob o sistema glutaredoxina/GSH/GSH redutase/NADPH (CHIARUGI<sup>15</sup> *et al.*, 2001), e que o papel da GSH sobre as proteínas fosfatases seja proteger o derivado sulfênico de futura oxidação, já que uma próxima oxidação seria irreversível, transformando o ácido sulfênico em ácido sulfínico ou sulfônico. Na presença da GSH, o derivado sulfênico pode ser convertido em um produto mais estável, prevenindo a futura oxidação (CHIARUGI<sup>15</sup> *et al.* 2001). Uma outra forma de prevenção desta oxidação irreversível, presente apenas nas proteínas fosfatases de baixa massa molecular relativa, seria a formação da ponte dissulfeto, após uma primeira oxidação (CASELLI<sup>7</sup> *et al.*, 1998).

CHIARUGI<sup>17</sup> *et al.*, em 2003, na busca de um melhor entendimento sobre a dependência de GSH na recuperação da atividade PTP-BMr, bloquearam o sistema celular dependente de GSH para redução de proteínas oxidadas através da inibição da  $\gamma$ -glutamil-cisteina-sintetase, diminuindo, desta forma, a concentração de GSH em cerca de 90%, o que prejudicou a reativação da PTP-BMr após indução de estresse oxidativo, indicando que a GSH é, de fato, importante na recuperação da PTP-BMr após sua inativação.

No presente trabalho, a análise da quantidade total de tióis apresentados nos experimentos relacionados ao ciclo e a diferenciação celular foi semelhante ao já reportado na literatura para osteoblastos (NING & GRANT<sup>51</sup>, 2000). A dosagem de GSH intracelular foi realizada através de dois experimentos, o DTNB e HPLC eletroquímico, sendo que apesar de os valores obtidos pelo método do DTNB terem sido maiores que aqueles obtidos pelo HPLC, provavelmente devido à menor

especificidade do método do DTNB, os resultados apresentaram um padrão semelhante. Além da quantificação da GSH e GSSG isoladamente, com o intuito de avaliar mais adequadamente o estado redox celular, quantificou-se a relação 2GSH/GSSG nos osteoblastos. Vários métodos são disponíveis para a quantificação de GSSG, contudo após a execução de experimentos controle, decidiu-se optar pela redução enzimática do GSSG pelo sistema glutatona redutase/NADPH já que, além de mais eficiente que outros tipos de redução, como por exemplo, redução química por Zinco ou ditioneitol, o método utilizado não demonstrou interferência com análise por HPLC-eletroquímico (dados não mostrados).

Em relação à quantificação da GSH isoladamente, nas amostras referentes ao estudo do comportamento oxidativo dos osteoblastos hFOB 1.19 durante a proliferação celular, pôde-se observar que seu pico, nos tempos experimentais de 18 e 48 horas (Figura 7A e 7B), referente ao estado redox mais redutor, relacionou-se com o período anterior de maior incorporação de timidina (36 horas, Figura 2). Este estado mais reduzido representa a maior produção de síntese de proteínas pelos osteoblastos, como descrito por **KIRLIN**<sup>38</sup> *et al.*, em 1999.

No caso da dosagem isolada de GSH durante a diferenciação celular, o estado redox celular apresentou-se mais reduzido no período de 21 dias (Figura 9 B), este período se correlacionou com o período de maior atividade PTP-BMr (Figura 6). Na realidade os gráficos de produção de GSH e atividade PTP-BMr e TRAP seguiram exatamente o mesmo perfil, indicando uma relação positiva entre o estado reduzido celular, uma maior atividade PTP-BMr e TRAP e a diferenciação celular.

Estes dados concordam com os obtidos por **FIASCHI**<sup>26</sup> *et al.*, em 2001, que verificaram através de ensaio de citometria de fluxo a diminuição dos níveis de ROS intracelular durante a confluência e miogênese *in vitro*. **PANI**<sup>55</sup> *et al.*, em 2000, em experimento semelhante, sugeriram que a diminuição na produção de ROS e o aumento na atividade PTP-BMr impediria a sinalização mitogênica em culturas densas. Os resultados obtidos no presente trabalho também se correlacionam com os descritos por **CHIARUGI**<sup>17</sup> *et al.*, em 2003, que afirmaram que a regulação positiva da PTP-BMr estava envolvida com o envio de sinais antiproliferativos, através da diminuição do estresse oxidativo intracelular gerada por agentes redutores.

Para a dosagem de relação GSH/GSSG, os picos encontrados nesta fase devem ser entendidos como correspondentes a maior quantidade de substrato disponível para atuar como antioxidante. O gráfico representativo dos valores GSH/GSSG para a proliferação celular (Figura 9A) não se relacionaram diretamente com os gráficos da TRAP e PTP-BMr durante a proliferação celular (Figura 5). Mas para a diferenciação, pôde-se encontrar esta relação (Figuras 6 e 9B). Isto significa, que, apesar de a PTP-BMr necessitar estar em um ambiente reduzido para que a sua atividade seja possível, o papel da glutathione não se resume a facilitador da sua ação. Durante a proliferação celular, mesmo estando em um ambiente reduzido, houve claramente uma sinalização negativa para a atividade PTP-BMr, que não a oxidação. Durante a diferenciação celular, o balanço redox encontrado para as células hFOB 1.19 exibiu um perfil muito semelhante ao encontrado para a atividade PTP-BMr e TRAP, de forma que, comparando com os achados de **CHIARUGI**<sup>17</sup>, *et al.*, em 2003, que reduziram em cerca de 90% a atividade GSH e encontraram um prejuízo na atividade PTP-BMr, é possível afirmar uma relação entre causa e efeito para a atividade das fosfatases estudadas e o ambiente redox encontrado.

Não há artigos na literatura que avaliem atividade TRAP relacionando sua potencial regulação positiva pelo sistema redutor dependente de glutathione, impossibilitando, desta forma, a comparação deste resultado com outros. É sabido que a TRAP é regulada através do estado redox do seu sítio ativo. A TRAP é sintetizada como pró-enzima, contendo dois íons férricos no sítio ativo, permanecendo inativa (oxidada) até seu ambiente se tornar reduzido, o que causa o desligamento de um destes íons férricos do sítio catalítico, tornando, a partir deste momento, a enzima na sua forma ativa (HALLEN<sup>31</sup> *et al.*, 1998; ODDIE<sup>52</sup> *et al.*, 2000).

Embora utilizando mecanismos distintos, é razoável considerar que o estado redox celular atua de forma moduladora da atividade TRAP e PTP-BMr, controlado o nível de proteína fosforilada na célula e, portanto, a expressão gênica durante a proliferação e diferenciação celular. Estudos mais detalhados serão necessários para desvendar os substratos e mecanismos inerentes desta via de sinalização.



# *Conclusões*

## 7 CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, por meio da metodologia aplicada, podemos constatar que:

1. As células hFOB 1.19 demonstraram ser uma linhagem celular adequada para servir como modelo de estudo para avaliações a respeito do metabolismo, fisiologia e diferenciação de osteoblastos *in vitro*, apresentando o perfil de atividade da fosfatase alcalina compatível com o esperado para osteoblastos ativos e nódulos de mineralização visíveis através da coloração pelo método de Von Kossa.
2. Durante o ciclo celular a Atividade Específica da fosfatases é fortemente diminuída, especificamente da TRAP e PTP-BMr, sendo praticamente zero após 18 horas da adição de soro, sugerindo que a diminuição na atividade destas enzimas seja necessária para a entrada na fase S.
3. Durante a diferenciação celular observou-se um aumento progressivo da expressão da PTP-BMr e TRAP durante nos períodos de 7 e 14 dias, sendo máxima no 21o dia, coincidindo com a máxima diferenciação celular, sugerindo que o papel dessas tirosina fosfatase possa estar relacionada ao controle da diferenciação celular
4. Durante a proliferação celular o ambiente reduzido proporcionado pelo sistema redutor dependente de glutathione não se relaciona à regulação positiva da atividade PTP-BMr e TRAP.
5. Durante a diferenciação celular o ambiente reduzido proporcionado pelo sistema redutor dependente de glutathione gera um ambiente adequado para o controle da diferenciação celular relacionados à atividade PTP-BMr e TRAP.

Destarte, concluímos que as atividades da PTP-BMr e TRAP são moduladas durante o ciclo celular e a diferenciação de osteoblastos humanos, esta última dependente de adequado nível de glutathione reduzida.

*Perspectivas*

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos no presente trabalho foram bastante animadores acerca de um melhor entendimento do processo de osteogênese *in vitro*, principalmente no que consta a respeito das fosfatases estudadas. Como perspectivas de trabalhos visando a um maior entendimento acerca deste ramo da pesquisa, podemos citar:

1. Estudo da diferenciação celular da linhagem hFOB 1.19 para determinação de até que passagem estas células apresentam uma diferenciação efetiva;
2. Ensaios com diferentes tempos experimentais para avaliação de quando ocorre o pico de atividade TRAP neste modelo experimental;
3. Avaliar a diferença entre a atividade fosfatásica entre células normais e transformadas a fim de obter um melhor entendimento do papel das fosfatases nestas duas situações.
4. Verificação da atividade TRAP em osteoblastos, analisando se esta atividade é caracterizada como proteína fosfatase ou fosfatase ácida.
5. Identificação das vias de sinalização celular disparadas pelas enzimas TRAP e PTP-BMr e a modulação destas através do estado redox celular.

*Referências  
Bibliográficas*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

1. AKERBOOM, T.P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Meth Enzymol.**, v.77, p.373-82, 1981.
2. AOYAMA, H. *et al.* Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Quim Nova**, v.26, n.6, p.896-900, 2003.
3. BECK, J.L. *et al.* Irreversible inactivation of puple acid phosphatase by hydrogen peroxide and ascorbate. **J Inorg Biochem.**, v.73, p.245-52, 1999.
4. BUCCIANTINI, M. *et al.* The low Mr phosphotyrosine protein phosphatase behaves differently when phosphorylated at Tyr<sup>131</sup> or Tyr<sup>132</sup> by Src kinase. **FEBS Lett.**, v.456, p.73-8, 1999.
5. BULL, H. *et al.* Desmistified Acid phosphatases. **Mol Path.**, p. 65-72, 1999.
6. CAMPBELL, H.D.; ZERNER, B. Iron containing acid phosphatases: comparison of the enzymes from bull spleen and pig allanoic fluid. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.82, n.2, p.615-20, 1973.
7. CASELLI, A *et al.* The inactivation mechanism of low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **J Biol Chem.**, v.273, n.49, p.32554-60, 1998.
8. CHENGALVALA, M.V. *et al.* Biochemical characterization of osteo-testicular protein tyrosine phosphatase and its functional significance in rat primary osteoblasts. **Biochemistry**, v.40, n.3, p.814-21, 2001.
9. CHERNOFF, J.; LI, H.C. A major phosphotyrosylprotein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular weight acid phosphatase. **Arch Biochem Biophys.**, v.240, p.135-45, 1985.
10. CHIARUGI, P. *et al.* LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signaling. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.238, n.2, p.676-82. 1997.

---

<sup>1</sup> Normas recomendadas para o uso no âmbito da Universidade de São Paulo com base no documento *Referências Bibliográficas: Exemplos*, emanados do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP em reunião de setembro de 1990.

11. CHIARUGI, P. *et al.* Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase tyrosine phosphorylation by c-src during PDGF induced mitogenesis correlates with its subcellular targeting. **J Biol Chem.**, v.273, n.49, p.32522-7, 1998.
12. CHIARUGI, P. *et al.* The low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase is involved in Rho-mediated cytoskeleton rearrangement after integrin and platelet-derived growth factor stimulation. **J Biol Chem.**, v.275, n.7, p.4640-6, 2000.
13. CHIARUGI, P. *et al.* Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase is involved in growth inhibition during cell differentiation. **J Biol Chem.**, v.276, n.52, p.49156-63, 2001.
14. CHIARUGI, P. The redox regulation of LMW-PTP during cell proliferation or growth inhibition. **IUMB Life**, v.52, p.55-9, 2001.
15. CHIARUGI, P. *et al.* Two vicinal cysteins confer a peculiar redox regulation of LMW-PTP in response to platelet-derived growth factor stimulation. **J Biol Chem.**, v.276, n.36, p.33478-87, 2001.
16. CHIARUGI, P. *et al.*, Insight into the role of low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase (LMW-PTP) on PDGFr signaling. **J Biol Chem.**, v.277, n.40, p.37331-8, 2002.
17. CHIARUGI, P. *et al.* Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: the oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. **J Cell Biol.**, v.161, n.5, p.933-44, 2003.
18. CHIARUGI, P. *et al.* LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth. **Oncogene**, v.23, p.3905-14, 2004.
19. CIRRI, P. *et al.* The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of LMW-PTP. **Eur J Biochem.**, v.214, p.647-57, 1993.
20. COELHO, M.J.; CABRAL, A.T.; FERNANDE, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. **Biomaterials**, v.21, p.1087-94, June 2000.

21. COELHO, M.J., FERNANDES, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. **Biomaterials**, v.21, p.1095-102, June 2000.
22. DECLERCQ, H. *et al.* Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. **Biomaterials**, v.25, n.5, p.757-68, 2004.
23. DISSING, J.; DAHL, O.; SVENSMARK, O. Phosphonic and arsenic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. **Biochim Biophys Acta**, v.569, p. 159-76, 1979.
24. EVANS, B. *et al.* Site-directed mutagenesis, kinetic, and spectroscopic studies of the P-loop residues in low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase. **Biochemistry**, v.35, p.13609-17, 1996.
25. FAUMAM, E. B. *et al.* The X-ray crystal structures of tyrosine phosphatase with bound tungstate and nitrate. **J. Biol. Chem.**, v.271, n.31, p.18780-8, 1996.
26. FIASCHI, T. *et al.* Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase is involved growth inhibition during cell differentiation. **J Biol Chem.**, v.276, n.52, p.49156-63, 2001.
27. FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 4ed. New York, Wiley-liss, 2000.
28. FUKUSHIMA, O.; BEKKER, P. J.; GAY C. V. Ultrastructura localization of tartrate-resistant acid phosphatase (purple acid phosphatase) activity in chicken cartilage and bone. **Am J Anat.**, v.191, p. 228-236, 1991.
29. GRANJEIRO, J. M.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. **An Acad Bras Ci.**, v.69, n.4, p.451-60, 1997.
30. GRANJEIRO, J.M. **Papel da PTP-BMr no controle da proliferação celular e na origem de neoplasias**. Bauru, 2001. 100p. Tese (Livre-docência) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
31. HALLEEN, J. M. H. *et al.* Studies on the protein tyrosine phosphatase activity of tartrate-resistant acid phosphatase. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.352, n.1,



- p.97-102, 1998.
32. HARRIS, S.A. *et al.* Development and characterization of a conditionally immortalized osteoblastic cell line. **J Bone Miner Res.**, v.10, n.2, p.178-86, 1995.
  33. HEINRIKSON, R.L. Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. **J Biol Chem.**, v.244, n.2, p.299-307, Jan. 1969.
  34. HIRAKU, Y. *et al.* Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. **Biochim Biophys Acta.** v.1570, p.47-52, 2002.
  35. HUNTER, T. The phosphorylation of proteins on tyrosine: its role in cell growth and disease. **The Croon. Lec.**, v.353, p.583-605, 1998.
  36. JIA, Z. *et al.* Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. **Science**, v.268, p.1754-8, 1995.
  37. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:\_\_\_\_\_. **Histologia Básica.** 9.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1999. Cap.8., p.111-28.
  38. KIRLIN, W.G. *et al.* Glutathione redox potential in response to differentiation and enzyme inducers. **Free Rad Biol Med.**, v.27, n. 11/12, p.1208-18, 1999.
  39. LAM., W. *et al.* Biochemical properties of tartrate-resistant acid phosphatase in serum of adults and children. **Clin. Chem.**, v.24, n.7, p.1105-8, 1978.
  40. LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, v.260, n.5110, p.920-6, May 1993.
  41. LAU, K.H. Conversion of skeletal tartrate-sensitive acid phosphatases into tartrate-resistant isoenzymes in vitro. **Int J Biochem.**, v.24, p.1815-24, 1992.
  42. LAU, K.H.W.; BAYLINK, D.J. Osteoblastic tartrate-resistant acid phosphatase:its potential role in the molecular mechanism of action of fluoride. **J Bone Miner Res.**, v.18, n.10, p.1897-00, 2003.
  43. LEE, S.R. *et al.* Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431cells stimulated with epidermal growth factor. **J Biol Chem.**, v. 273,

- n.25, p.15366–72, June 1998.
44. LUCENTINI, L. *et al.* Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase from PC12 cells. Purification, some properties and expression during neurogenesis in vitro and in vivo. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.35, p.1378–87, 2003.
  45. MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of Young adult rats. **Cell Tissue Res.**, v.254, p.317-330, 1988.
  46. MISCH, C.E. Nonfunctional immediate teeth. **Dent. Today**, v.17, n.6, p.88-91, 1998
  47. MIYAZAKI, S. *et al.* Development of immunoassays for type-5 tartrate-resistant acid phosphatase in human serum. **Clin Chim Acta**, v.329, p.109-15, 2003.
  48. MOUREY, R.J. *et al.* A novel cytoplasmic dual specificity protein tyrosine phosphatase implicated in muscle and neuronal differentiation. **J Biol Chem.**, v.271, n. 7, p. 3795–802, Feb. 1996.
  49. NELSON, D.; COX, M.M. Biossinalização. In: \_\_\_\_\_. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3ed. São Paulo, Sarvier, 2002. Cap. 13, p.340-78.
  50. NEREM, R.M. Tissue engineering in the USA. **Med. Biol. Eng. Comput.**, v.30, n.4, p.CE8-12, 1992.
  51. NING, J.; GRANT, M.H. The role of reduced glutathione and glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in osteoblasts. **Toxicol in Vitro**, v.14, p.329-35, 2000.
  52. ODDIE, G.W. *et al.* Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. **Bone**, v.27, n.5, p.575-84, 2000.
  53. OREFFO, R.O.C.; TRIFFIT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. **Bone**, v.25, n.2, p.5S-9S, Aug. 1999.
  54. OSTMAN, A.; YANG, Q.; TONKS, N.K. Expression of DEP-1, a receptor-like protein tyrosine phosphatase is enhanced with increasing cell density. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.91, p.9680-4, Oct. 1994.
  55. PANI, G. *et al.* A Redox Signaling Mechanism for Density-dependent Inhibition

- of Cell Growth. **J Biol Chem.**, v.271, n.49, p.38891-9, 2000.
56. PRICE, C. P.; KIRWAN, A.; VADER, C. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. **Clin. Chem.**, v.41, n.5, p. 641-643, 1995.
57. RAMPONI, G. *et al.* The 18kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. **FEBS Lett.**, v. 250, n.2, p.469-73, 1989.
58. RAMPONI, G.; STEFANI, M.; Structural, catalytic, and functional properties of low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatases. Evidence of a long evolutionary history. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.29, n.2, p.279-92, 1997.
59. RAUGEI, G., RAMPONI, G., CHIARUGI, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. **Cell Mol Life Sci.**, v.59, p.941-9, 2002.
60. RIGACCI, S. *et al.* Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase activity on fibroblast growth factor receptor is not associated with enzyme translocation. **FEBS Lett.**, v.459, p.191-4. 1999.
61. RUGIERO, M. *et al.* Negative growth control by a novel low Massa molecular relativa phosphotyrosine protein phosphatase in normal and transformed cells. **FEBS Lett.**, v.326, n.1,2,3, p.294-8, 1993.
62. SANT'ANA, A.C.P.; MARQUES, M.M.; BARROSO E.C.; PASSANEZI, E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. **Rev Fac Odontol Bauru.**, v. 10, n.3, p. 134-40, 2002.
63. SPELSBERG, T.C.; HARRIS, S.A.; RIGGS, B.L. Immortalized osteoblast cell systems (new human fetal osteoblast systems). **Calcif Tissue Int.**, v.56, supl. 1, p.S18-21, 1995.
64. STEFANI, M. *et al.*, Dephosphorylation of tyrosine phosphorylated synthetic peptides by rat liver phosphotyrosine protein phosphatase isoenzymes. **FEBS Lett.**, v.326, n.1,2,3 p.131-4, 1993.
65. STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; OWEN, T.O. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast

- differentiation. **FASEB J.**, v.4, n.13, p.3111-23, 1990.
66. SUBRAMANIAM, M. *et al.* Further characterization of human fetal osteoblasts hFOB 1.19 and hFOB/ER $\alpha$  cells: bone formation in vivo and karyotype analysis using multicolor fluorescent in situ hybridization. **J Cell Biochem.**, v.87, p.9-15, 2002.
67. TADDEI, M.L. *et al.* LMW-PTP Exerts a Differential Regulation on PDGF- and Insulin-Mediated Signaling. **Biochem Biophys Res Com.**, v.270, p.564-569, 2000.
68. WANG, D. *et al.* Isolation and characterization of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential. **J Bone Miner Res.**, v.14, n.6, p.893-8, 1999.
69. WHYTE, P. Hipophosphatasia: Nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: BILEZIKIAN, J.P.; RAISZ, L.G.; KODAN, G.A. **Principles of Bone Biology**. London, Academic Press, 1996, Cap. 68, p. 951 – 68.
70. WO, Y.Y. *et al.* Sequencing, cloning and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmatic phosphotyrosyl protein phosphatase. **J Biol Chem.**, v.267, p.10856-65, 1992.
71. ZHANG, Z.Y.; WANG, Y.; DIXON, J.E. Dissecting the catalytic mechanism of protein tyrosine phosphatases. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.91 p.1624-8, 1994.

# *Abstract*

## *Abstract*

### **LOW MOLECULAR WEIGHT PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE AND TARTRATE RESISTANT ACIDE PHOSPHATASE ACTIVITY IN HUMAN OSTEOBLASTS DURING CELL CYCLE AND DIFFERENTIATION**

Low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity were determined in hFOB 1.19 human osteoblasts cell line during cell proliferation and differentiation. LMW-PTP and TRAP enzymatic activity were determined at 6, 18, 24, 36, 48 and 72 hours after fetal calf serum stimulation of subconfluent cultures and 7, 14, 21, 28 and 35 days after cell confluence and differentiation. The LMW-PTP and TRAP activity were measured using p-nitrophenylphosphate as substrate. The osteogenic potential of hFOB 1.19 cells was studied by measuring alkaline phosphatase activity, and mineralized nodule formation by Von Kossa staining. The oxidative stress was determined by HPLC and DNTB assays. During cell cycle progression, LMW-PTP and TRAP activities were strongly reduced, being almost undetectable after 18h of serum stimulation, while  $H^3$ -thymidine incorporation progressively increased, suggesting that the decrease in the LMW-PTP and TRAP activities were necessary for entry into the S phase. During osteoblastic differentiation, the activity of LMW-PTP and alkaline phosphatase progressively increased until the 21<sup>th</sup> day, decreasing thereafter. In conclusion, this work demonstrates that hFOB 1.19 cells constitute a suitable model system for the study of the role played by LMW-PTP and TRAP in cell cycle progression and cell differentiation, and that LMW-PTP and TRAP activities are clearly modulated during osteoblastic proliferation and differentiation *in vitro*. The activities of these phosphatases during cell differentiation depended on the correct levels of reduced glutathione.