



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

“Estudos enzimológicos para compreender a função da NPP1 na regulação da
biomineralização”

Luiz Henrique da Silva Andrilli

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022



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

VERSÃO CORRIGIDA

“Estudos enzimológicos para compreender a função da NPP1 na regulação da
biomineralização”

Luiz Henrique da Silva Andrilli

Orientador: Pietro Ciancaglini

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

RIBEIRÃO PRETO - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Luiz Henrique da Silva Andrilli

“Estudos enzimológicos para compreender a função da NPP1 na regulação da biomineralização”. Ribeirão Preto, 2022.

114 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. NPP1. 2. Mineralização. 3. Proteolipossomos.

“Dedico esse trabalho a minha mãe Maria Celia por nunca ter deixado de acreditar em mim, e sempre me motivando nesse caminho que escolhi”

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a CNPq pela disponibilidade da bolsa de estudos (130366/2020-0) por cota institucional e por todo suporte financeiro. A FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro ao laboratório, sem essas instituições de fomento, esse trabalho não seria realizado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, por ter me dado a oportunidade de estar presente em seu laboratório, desde 2016, acreditando em meu potencial e sempre me acompanhando em todo meu crescimento profissional e pessoal. Se tornando uma pessoa muito especial para mim e que irei tê-lo como referência de ser humano íntegro, honesto e de um coração enorme. Me aconselhando e dando todo suporte durante esse período pandêmico, onde as reuniões de maneira remotas se tornaram presentes. E na volta as atividades práticas, sempre estive disposto e presente para o desenvolver desse projeto, juntamente com os cafés nas manhãs que antecedem os trabalhos realizados, com bastante conversa, descontração, discussão de dados, tornando o ambiente de trabalho excelente para que todas as etapas desse projeto fossem realizadas. Serei eternamente grato por trabalhar ao lado dessa pessoa incrível. Muito obrigado Prof. Dr. Pietro.

Meu grande amigo Claudio Ferreira, que sempre esteve ao meu lado nesses anos de iniciação científica e de mestrado, sendo meu braço direito em todos os passos dessa longa jornada realizada. Me amparando nos momentos difíceis, onde achei que não conseguiria, ou que não sou capaz de realizar esse projeto, me colocando pra cima e sempre sendo pé no chão com todas as minhas tomadas de decisões durante esses anos. Das conversas fora do ambiente de trabalho, me ajudando na escrita de relatórios, artigos, da dissertação, assim como, nos momentos de lazer, onde nos divertimos demais, rimos muito, aprendemos muito um com o outro. Sem ele, não seria 1% do que sou hoje, sou eternamente grato com ele e sempre terei ele em meu coração. Pode sempre contar comigo meu amigo.

Aos meus companheiros de laboratório, Heitor e Bruno, que estavam sempre presentes e atenciosos para todas as discussões dos dados obtidos em cada análise por mim desempenhada nesses últimos dois anos. O trabalho deles foram de extrema importância para o desenrolar desse projeto, pois, sem eles, muitos dos experimentos e dados obtidos não seriam possíveis, portanto, eles fazem parte de todo o meu crescimento profissional nesses últimos anos. Da mesma maneira, agradecer a Ekeveliny, que de maneira remota, sempre me apoiou e me ajudou em todas as etapas da minha

formação até esse momento. E por fim, a Maytê pelo suporte e ensinamento durante esses anos de trabalho.

A Camila Bussola, Roberta Pugina, Lucas Bahia, Luis Fernando, Karmel, João, Larissa, Eloisa, Marcos Eufrazio, Lucas Urbano e Tamires, preciosos amigos que tive o enorme prazer em conhecê-los, por todo suporte emocional e acadêmico durante meus anos presente no Departamento de Química da USP de Ribeirão Preto.

As técnicas do Departamento de Química, Janaina, por todo suporte oferecido durante esses anos de trabalho no laboratório de Nanobiotecnologia Aplicada: Sistemas Miméticos de Biomembranas, sem seu esforço esse trabalho não seria possível, e, a Mércia, responsável pelas análises de HPLC realizadas nesse trabalho, contribuindo fundamentalmente no desenvolvimento desse trabalho.

A Priscila Cerviglieri pela a indispensável ajuda na correção em língua inglesa do Abstract desse trabalho, tanto durante a redação de artigos e Abstract para congressos.

A Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Ramos, por todos esses anos de ensinamentos, me ajudando principalmente com a escrita, nas técnicas de Potencial Zeta e FTIR-ATR, disponibilizando tempo para explicar os conceitos e resultados obtidos através destas técnicas.

Ao Prof. Dr. Francisco de Assis Leone, do Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (USP) e Prof.^a Dr.^a Fabiola Taufic Monica Iglesias, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, pela disponibilização da Suramina, usada nos experimentos de inibição desse trabalho.

A minha mãe Maria Celia, e minhas irmãs Nadia e Najara, que segurando a saudade, sempre me apoiaram, me incentivaram e torceram pelo meu sucesso. Assim como meu namorado Tamer Abari, por estar sempre ao meu lado, ajudando, incentivando e me colocando na linha de foco nos estudos para que todo esse trabalho fosse realizado com dedicação, responsabilidade e eficiente.

*“A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável”*

Mahatma Gandhi.

“Estudos enzimológicos para compreender a função da NPP1 na regulação da biomineralização”

RESUMO

Ossificação endocondral é mediada pelas vesículas da matriz (MV), uma classe especial de vesículas extracelulares responsáveis por iniciar a precipitação de fosfato de cálcio. Essas vesículas são enriquecidas por duas enzimas principais: (a) fosfatase alcalina não específica de tecido (TNAP), possuindo atividade fosfomonohidrolítica, produzindo fosfato inorgânico (Pi) pela hidrólise de adenosina-5'-trifosfato (ATP) e de pirofosfato (PPi); e (b) ectonucleotideo pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (NPP1), uma ATP fosfodiesterase, produzindo adenosina-5'-monofosfato (AMP) e PPi. Nesse estudo investigamos a cinética do ATP usando lipossomos incorporados com NPP1 e TNAP como modelos biomiméticos das MV e os efeitos da combinação de ambas enzimas na mineralização *in vitro*.

A NPP1 foi solubilizada com sucesso, resultando em alta porcentagem de recuperação proteica e atividade enzimática. Em seguida, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), esfingomielina (SM) e colesterol (Chol) foram utilizados na composição lipídica dos lipossomos. Nesses lipossomos, foi incorporada a NPP1 e posteriormente caracterizados por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Potencial Zeta e Microscopia de Força Atômica (AFM). Estudos anteriores com TNAP-proteolipossomos constituídos apenas por DPPC mostraram um grande potencial de propagação mineral. O mesmo foi observado nos NPP1-proteolipossomos. Assim, esta composição foi utilizada para incorporação de NPP1 e TNAP simultaneamente em proporções proteicas de 1:1, 1:10 e 10:1, estudando o comportamento cinético de ambas enzimas ao longo do processo de biomineralização utilizando ATP, resultando em dados inéditos.

As cinéticas dos proteolipossomos foram obtidas por quantificação empregando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de adenosina-5'-difosfato (ADP) e AMP como produtos da hidrólise de ATP. As proporções de 10:1 e 1:10 de NPP1 para TNAP resultaram na queda da atividade catalítica. De outra forma, na proporção 1:1 a atividade enzimática geral aumentou. A presença do inibidor específico da NPP1 (suramina) resultou em um declínio significativo na atividade enzimática para todas as proporções. Além disso, esse efeito foi mais acentuado em

NPP1-proteolipossomos, destacando a seletividade da suramina. Todos os ensaios de mineralização *in vitro* usando proteolipossomos mostraram propagação mineral. NPP1-proteolipossomos mostraram dois estágios na curva de mineralização, o segundo estágio é semelhante a toda curva obtida para TNAP-proteolipossomos, devido a mudança na atividade da NPP1, de fosfodiesterase para fosfomonohidrolase.

Os minerais formados no ensaio de mineralização foram secos e analisados por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR). Os espectros revelaram um aumento na correlação fosfato/carbonila ($\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$). Da mesma forma, analisando as bandas de FTIR-ATR para TNAP- e NPP1:TNAP-proteolipossomos (diferentes proporções), observou-se a presença de hidroxiapatita (HAp) derivada do octacálcio fosfato (OCP), enquanto para NPP1-proteolipossomos uma pequena porção de pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD), bem como HAp derivada de OCP foi observada. Assim, lipossomos contendo ambas as enzimas foram uma maneira efetiva de estudar passo a passo a mineralização mediada pela atividade enzimática, reforçando a tese de que os sistemas miméticos são uma notável metodologia para entender as vias que levam a formação/inibição de minerais nas MV.

Palavras chave: NPP1, mineralização, lipossomos, proteolipossomos.

“Enzymological studies to understand the role of NPP1 in the regulation of biomineralization”

Abstract

Endochondral ossification is mediated by matrix vesicles (MV) - a special class of extracellular vesicles responsible for the initial precipitation of calcium phosphates. These vesicles are enriched in two main enzymes: (a) tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP), that has phosphomonohydrolytic activity and produces inorganic phosphate (Pi) from adenosine-5'-triphosphate (ATP) and inorganic pyrophosphate (PPi); (b) and ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1), an ATP phosphodiesterase, producing adenosine-5'-monophosphate (AMP) and PPi. In this study, we investigated the ATP kinetics using liposomes harboring TNAP and NPP1 as MV-biomimetic models, and the effects of the combination the enzymes on *in vitro* biomineralization.

The NPP1 was successfully solubilized, yielding high percentage of protein recovery and enzymatic activity. Sequentially, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), sphingomyelin (SM) and cholesterol (Chol) were used as lipid composition to liposomes. Into the liposomes, the NPP1 was incorporated and further characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Differential Scanning Calorimetry (DSC), Zeta potential and Atomic Force Microscopy (AFM). Previous studies of TNAP-proteoliposomes constituted only by DPPC had shown a great potential for mineral propagation. The same was observed for NPP1-proteoliposomes. Thus, this lipid composition was used for the incorporation of NPP1 and TNAP simultaneously in the protein ratios of 1:1, 10:1 and 1:10, therefore resulting in the study of the kinetic behavior of both enzymes over the biomineralization process using ATP, unprecedented data in the literature.

The kinetics of the proteoliposomes were obtained by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) quantification of adenosine-5'-diphosphate (ADP) and AMP as the products of ATP hydrolysis. The ratios of 1:10 and 10:1 of NPP1 to TNAP resulted in a drop of the catalytic activity. Otherwise, at the 1:1 ratio the overall enzymatic activity increased. The presence of the NPP1 specific inhibitor (suramin) resulted in a significant decline in enzymatic activity for all ratios. Moreover, the effect was accentuated for NPP1-proteoliposomes, highlighting the suramin

selectivity. All *in vitro* mineralization assays using proteoliposomes showed mineral propagation. NPP1-proteoliposomes showed two stages of the mineralization curve, the second stage is similar to the whole TNAP-proteoliposomes curve because of the shift of NPP1 activity from the phosphodiesterase to phosphomohydrolase.

The minerals formed in the mineralization assay were dried and analyzed by Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy - (ATR-FTIR). The spectra revealed an increase in the phosphate/carbonyl correlation ($\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$). Likewise, analyzing ATR-FTIR bands for TNAP- and NPP1:TNAP (different ratios)-proteoliposomes, it was observed the hydroxyapatite (HAp) derived from octacalcium phosphate (OCP) presence, while for NPP1-proteoliposomes a small portion of calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD), as well as HAp derived from OCP was observed. Thus, liposomes containing both enzymes were an effective way to study step-by-step mineralization mediated by enzymatic activity, reinforcing the thesis that mimetic systems are a remarkable methodology to understand the pathways that lead to mineral formation/inhibition in MV.

Keywords: NPP1, mineralization, liposomes, proteoliposomes.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo de ossificação intramembranosa onde células mesenquimais se direcionam ao centro de mineralização e são diferenciadas em osteoblastos (A), subsequentemente sendo encapsuladas e diferenciando-se em osteócitos (B). (Adaptado de ALLEN e BURR, 2019)..... 22
- Figura 2.** Modelo da diferenciação de células mesenquimais originando os processos de ossificação intramembranosa (caminho em tom de vermelho) e endocondral (caminho em tom de azul). Evidenciando cada etapa de diferenciação e interligação da ossificação endocondral com a intramembranosa que depende da concentração dos fatores Sox9 e RUNX2 (adaptado de GALEA et al. 2021) 24
- Figura 3.** Esquema das etapas fundamentais durante a ossificação endocondral, detalhando a presença de um molde cartilaginoso, para que condroblastos iniciem o processo de ossificação. Detalhando os centros primários e secundários da ossificação, assim como diferenciando as espécies presentes durante a formação do osso. (Adaptado de ALLEN e BURR, 2019)..... 27
- Figura 4.** Microscopia eletrônica de transmissão de MV obtidas a partir de embriões de frango e crescidas em placas de cartilagem, possuindo o diâmetro médio entre 100 a 250 nm. (Ampliação de A, x 53.000; B, x 100.000; C, 75.000 e D, 100.000; BOTTINI et al., 2018 [Adaptado de THOUVEREY et al., 2009a])..... 30
- Figura 5.** Modelo esquemático do maquinário presente na MV que é responsável por toda (a) a obtenção de Pi no lúmen das MV e no meio extracelular, juntamente com os transportadores específicos de Pi, tal como (b) o processo de obtenção de íons de Ca^{2+} do meio extra celular para a vesícula. Provendo um ambiente rico e apropriado para a deposição dos primeiros precursores de fosfato de cálcio. (Adaptado de BOTTINI et al., 2018)..... 33
- Figura 6.** Estrutura tridimensional da NPP1 destacando seu domínio nuclease (NUC) (azul), domínio catalítico (verde) com o sítio catalítico (esferas roxas) na presença de Zn^{2+} , e os domínios β -Somatomidina 1 e 2 (SMB 1 e 2, magenta), obtida através de análises de cristalografia (Adaptado de JANSEN et al., 2012) 37
- Figura 7.** Estrutura da (A) Reactive Blue II e (B) Suramin apresentando os grupos inibidores heterocíclicos (azul) e polisulfetos (vermelho) presentes nas moléculas (adaptado de LEE e MULLER, 2017). 40
- Figura 8.** Mapa do vetor de expressão pCMV-Script. Fonte: SNAPGENE..... 51

Figura 9. Modelo dos domínios presentes na NPP1, destacando as regiões (vermelho) C-terminal havendo a inserção da âncora de GPI e (azul) N-terminal, onde houve a remoção do domínio catalítico. (Adaptado de JANSEN et al., 2012).....	52
Figura 10. Células COS-1 saudáveis, aderidas em garrafas de cultura celular, no 3º dia de crescimento. As imagens foram tiradas empregando-se um Microscópio ZEISS com objetiva de 10x/0,25 Ph1.....	53
Figura 11. Culturas celulares de COS-1 contendo 100 µL de G-418: (A) cultura na ausência dos plasmídeos de expressão; (B) cultura contendo apenas o pCMV-Script e (C) cultura com o plasmídeo de expressão NPP1-pCMV-Script.	54
Figura 12. Eletroforese SDS-Page realizado com 7% de Acrilamida, com o (1) padrão molecular, (2) NPP1 solubilizada e concentrada em Amicon, (3) eluido obtido do processo da concentração, (4) EBS, (5) Pellet obtido do processo de solubilização da FM e (6) FM.....	57
Figura 13. Espectro de DC obtido da NPP1 0,02 mg/mL.	59
Figura 14. Eletrograma de (preto) lipossomos e (vermelho) NPP1-proteolipossomos, constituídos por DPPC na faixa de pH de 7,4 a pH 3,0. Todas as análises foram realizadas em triplicata, conforme descrito em material e método.	61
Figura 15. Termogramas de (preto) lipossomos e de (vermelho) NPP1-proteolipossomos, constituídos de DPPC, com concentração lipídica final de 0,75 mg/mL.	62
Figura 16. Micrografias de fase 2D de (A) lipossomo e (B) NPP1-proteolipossomos, constituídos por DPPC.....	64
Figura 17. Micrografias de NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC: (A) imagens de topografia 3D, aplicando um zoom de 3x. Análise de perfil (B) da protusão número 1, (C) do número 2 e (D) do número 3.	65
Figura 18. Eletrogramas de (preto) lipossomos e (vermelho) NPP1-proteolipossomos constituídos de: (A) DPPC:SM (9:1), (B) DPPC:Chol (9:1) e (C) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar).....	68
Figura 19. Quantidade de ATP hidrolisado e ADP e AMP produzidos por proteolipossomos incorporados com: (círculo vermelho) NPP1, (quadrado preto) TNAP, (triângulo azul) NPP1:TNAP, (pentágono verde) NPP1:TNAP (1:10) e (diamante magenta) NPP1:TNAP (10:1), usando 2,0 mM (1000 nmol) de ATP como substrato, durante 48 horas de reação.....	73
Figura 20. Quantidade de ATP hidrolisado e ADP e AMP produzidos por proteolipossomos incorporados com: (círculo vermelho) NPP1, (quadrado preto) TNAP, (triângulo azul)	

NPP1:TNAP, (pentágono verde) NPP1:TNAP (1:10) e (diamante magenta) NPP1:TNAP (10:1), usando 2,0 mM (1000 nmol) de ATP como substrato, na presença de 0,5 mM de Suramina (como inibidor da NPP1), durante 48 horas de reação cinética.....	75
Figura 21. Porcentagem de ATP hidrolisado para os diferentes proteolipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções): (barras azuis escuras) sem suramina e (barras azuis claras) na presença de 0,5 mM de suramina (como inibidor de NPP1), após 48 horas de reação cinética.....	76
Figura 22. Porcentagem de inibição da suramina na produção de: (barras roxas escuras) ADP e (barras roxas claras) AMP por proteolipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções). ADP e AMP foram produzidos pela hidrólise enzimática de ATP na presença de 0,5 mM de suramina (como inibidor de NPP1) após 48 horas de reação.....	76
Figura 23. Curvas de mineralização in vitro obtidas por análise de turbidez (Absorbância em 340 nm), dos controles: (preto) ACP; (vermelho) PS-CPLX; (azul) NPP1; (verde) NPP1+ACP; (violeta) NPP1+PS-CPLX; lipossomos na presença de ACP e PS-CPLX, construídos de (ouro) DPPC; (ciano) DPPC:SM (9:1); (marrom) DPPC:Chol (9:1) e (amarelo) PC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e P _i	79
Figura 24. Curvas de mineralização in vitro por turbidimetria (340 nm) na presença de nucleadores ACP por NPP1-proteolipossomos constituídos de: (preto) DPPC, (vermelho) DPPC:SM (9:1), (azul) DPPC:Chol (9:1) e (verde) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e P _i	81
Figura 25. Curvas de mineralização in vitro por turbidimetria (340 nm) na presença de nucleadores PS-CPLX por NPP1-proteolipossomos constituídos de: (preto) DPPC, (vermelho) DPPC:SM (9:1), (azul) DPPC:Chol (9:1) e (verde) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e P _i	83
Figura 26. Curvas de mineralizações in vitro, realizadas por análises de turbidez a 340 nm, de (ouro) DPPC-lipossomos incorporado com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP (1:1), (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e P _i	85
Figura 27. Espectro de FTIR-ATR do mineral obtido pela mineralização in vitro de NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC na presença de nucleador PS-CPLX.....	89

Figura 28. Espectro de FTIR dos minerais obtidos após a mineralização in vitro, na (A) ausência e (B) presença de 0,5 mM de suramina, de proteolipossomos contituídos de DPPC, incorporados com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP, (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1). 92

Figura 29. Representação de todas as possíveis reações enzimáticas simultâneas (vias que culminam na mineralização do substrato) durante a hidrólise de ATP por TNAP-, NPP1- e NPP1:TNAP-proteolipossomos. As vias que apresentam as etapas determinantes de hidrólise realizada pelos proteolipossomos estão indicadas em negrito..... 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantificação de proteína e atividade da NPP1 (utilizando pNP-5-TMP como substrato). Análise das etapas de purificação da NPP1 a partir de células (COS-1) contendo plasmídeos NPP1:pCMV-Script, (FM) seguido da obtenção da fração de membrana, resultando em sobrenadante e pellet. Seu (EBS) extrato bruto a partir da solubilização parcial em 1% de polidocanol e finalizando a amostra (NPP1) concentrada em Amicon 100kDa (NPP1).	55
Tabela 2. Caracterização biofísica e bioquímica dos lipossomos e NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC. Os lipossomos e proteolipossomos foram obtidos conforme descrito em materiais e métodos.	60
Tabela 3. Caracterização bioquímica e biofísica dos DPPC:SM-lipossomo 9:1, DPPC:Chol-lipossomo 9:1 e DPPC:Chol:SM-lipossomo 8:1:1 (razão molar) e seus respectivos NPP1-proteolipossomos.	67
Tabela 4. Atividade específica da NPP1, incorporada em lipossomos com diferentes composições lipídicas. A atividade foi determinada utilizando pNP-5-TMP e ATP, como substrato, conforme descrito em material e métodos.	69
Tabela 5. Caracterização biofísica e bioquímica de lipossomos e proteolipossomos contendo NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções).	71
Tabela 6. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340nm) de minerais in vitro, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi, durante 20 horas de ensaio na presença de ACP como nucleador.	82
Tabela 7. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340nm) de minerais in vitro, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi, durante 20 horas de ensaio na presença de PS-CPLX como nucleador.	83
Tabela 8. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340nm) de minerais in vitro, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi e P _{Pi} , durante 20 horas de ensaio na ausência de nucleador.	85
Tabela 9. Razões entre as áreas das bandas em ~1070 (ν_3 PO ₄ ³⁻) e -1715 (C=O) cm ⁻¹ obtidas por espectros ATR-FTIR (Figura 28) para o mineral obtido no ensaio de mineralização in vitro (Figura 26) dos DPPC-lipossomos incorporado com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções).	93

LISTAS DE SIGLAS

ACP	Fosfato de Cálcio Amorfo;
ATP	Adenosina-5'-Trifosfato;
ADP	Adenosina-5'-Difosfato;
AMP	Adenosina-5'-Monofosfato;
AFM	Microscopia de Força Atômica;
AnxA5	Anexina A5;
AnxA6	Anexina A6;
ANKH	Homólogo de Anquilose;
Chol	Colesterol;
CPPD	Pirofosfato de Cálcio Dihidratado;
Col-1	Colágeno do Tipo-1;
Col-2	Colágeno do Tipo-2;
Col-X	Colágeno do Tipo-X;
Cys	Cisteína;
COS-1	Células de linhagem Cellosaurus;
Ca/P	Razão molar Cálcio/Fósforo;
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina;
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico;
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura;
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium;
DC	Dicroísmo Circular;
EBS	Extrato Bruto Solubilizado;
FM	Fração de Membrana;
GPI	Glicosilfosfatidilinositol;
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
HAp	Hidroxiapatita;
Hpp	Hipofosfatase;
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazinaetanossulfônico;
HCl	Ácido Clorídrico;
IP	Índice de Polidispersão;
Ksp	Constante de Solubilidade;
Km	Constante de Michaelis-Menten;
Ki	Constante de Inibição;
MV	Vesículas da Matriz;
NPP1	Ecto-nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterase 1;
NPPs	Ecto-nucleotídeo Pirofosfatase/Fosfodiesterases;
NUC	Domínio Nuclease;
NP	Potencial de Nucleação;

OCP	Octacálcio Fosfato;
Pi	Fosfato Inorgânico;
PPi	Pirofosfato;
PC	Fosfatidilcolina;
PS	Fosfatidilserina;
PE	Fosfatidiletanolamina;
PA	Ácido Fosfatídico;
PI	Fosfatidilinositol;
PHOSPHO1	Fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatase 1;
pNP-5'-TMP	p-Nitrofenil-5'-Timidina Trifosfato;
pNPP	p-Nitrofenilfosfato;
PS-CPLX	Fosfatidilserina – Fosfato de Calcio complexo;
PLAP	Fosfatase Alcalina de Placenta;
SM	Esfingomielina;
SMPD3	Esfingomielinase;
SMB-1	Domínio β -Somatomedina 1;
SMB-2	Domínio β -Somatomedina 2;
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio;
SCL	Linfa Cartilaginosa Sintética;
TNAP	Fosfatase Alcalina não Específica de Tecido;
Tris	Fosfato de Cálcio Amorfo;
TCA	Ácido Tricloro Acético;
Tc	Temperatura de Transição de Fase;
Vmax	Velocidade Máxima;
β-TCP	β -Tricálcio Fosfato;
ΔH_{trans}	Entalpia de Transição de Fase;
$\Delta t_{1/2}$	Meia Largura do Pico;
v1	Estiramento Simétrico;
v2	Deformação Simétrica;
v3	Estiramento Assimétrico;
v4	Deformação Assimétrica;

Sumário

1. Introdução.....	21
1.1 Ossificação Intramembranosa.....	22
1.2 Ossificação endocondral	24
1.3 O processo de biomineralização e as MV	28
1.4 Fosfatase Alcalina não específica de tecido.....	34
1.5 Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1	35
1.6 Eventos patológicos durante o processo de biomineralização	40
2. Objetivos	42
2.1 Objetivos Gerais	42
2.2 Objetivos específicos	42
3. Materiais e Metodologia	43
3.1 Materiais	43
3.2 Cultura de células COS-1 e inserção do plasmídeo NPP1-pCMV-Script.	43
3.3 Obtenção da NPP1	44
3.4 Obtenção da TNAP	45
3.5 Caracterização da NPP1 expressa.....	45
3.5.1 <i>SDS-PAGE</i>	45
3.5.2 <i>Dicroísmo Circular</i>	45
3.5.3 <i>Determinação da atividade enzimática</i>	46
3.5.4 <i>Dosagem de Proteína</i>	46
3.6 Obtenção de Lipossomos e Proteolipossomos.....	46
3.7 Caracterização dos Lipossomos e Proteolipossomos.....	47
3.7.1 <i>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)</i>	47
3.7.2 <i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	47
3.7.3 <i>Titulação por Potencial Zeta</i>	48
3.7.4 <i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	48
3.8 Cinética enzimática da hidrólise de ATP por NPP1- e TNAP-proteolipossomos.	48
3.9 Determinação de nucleotídeos por HPLC	49

3.10 Síntese de nucleadores Fosfato de Cálcio Amorfo (ACP) e Fosfatidilserina – Calcio Fosfato complexo (PS-CPLX).....	49
3.11 Mineralização <i>in vitro</i> por análise de turbidez.....	49
3.12 Infravermelho com Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)..	50
4. Resultados e Discussão.....	51
4.1 Expressão e Caracterização da NPP1.	51
4.2 Obtenção de NPP1-proteolipossomos em diferentes composições lipídicas.....	59
4.3 Estudos cinéticos da NPP1 e TNAP incorporados em lipossomos constituídos de DPPC. .	70
4.4 Mineralizações <i>in vitro</i> : estudo da influência da composição lipídica e presença de NPP1- e TNAP-proteolipossomos	78
4.5 Caracterizações dos minerais obtidos na mineralização <i>in vitro</i>	89
5. Conclusões.....	95
6. Referências.....	97

1. Introdução

A concepção de formação óssea e sua origem evolutiva é frequentemente tratada no ambiente acadêmico, em duas esferas centrais de debate, uma investiga a origem e composição do endoesqueleto e exoesqueleto dos primeiros vertebrados que habitaram o planeta Terra, enquanto a outra tende a desvendar a complexidade do processo de ossificação. Cada vez mais pesquisadores tem chegado à conclusão que os primeiros ancestrais que desenvolveram ossos foram anfíbios ou outros seres aquáticos, pois, cerca de 1,5 bilhões de anos atrás com os fortes movimentos das placas tectônicas, várias quantidades de minerais foram sendo hidratados nas águas dos oceanos (WAGNER e ASPENBERG, 2011; DOHERTY et al., 2015; HARIDY et al., 2021). Posteriormente, a presença desses minerais em ambiente aquoso resultou nas primeiras interações com organismos unicelulares e posteriormente, através da evolução, após a formação dos primeiros organismos multicelulares que geraram ossos (KAWASAKI et al., 2004; WAGNER e ASPENBERG, 2011). Conforme avanços evolutivos foram acontecendo, novas espécies de vertebrados foram se estabelecendo em ecossistemas específicos e seletivos a cada processo evolutivo gerado. Como, por exemplo, a emancipação de seres aquáticos em anfíbios, subsequentemente adentrando regiões de terra firme, iniciando a povoação adentro do grande continente. Esse fenômeno só foi possível pela formação do endoesqueleto nos organismos aquáticos ancestrais desses anfíbios, gerando organização, proteção e sustentação de órgãos vitais e tecidos musculares desses indivíduos (KAWASAKI et al., 2004; WAGNER e ASPENBERG, 2011; HARIDY et al., 2021). Portanto, devido estas propriedades mecânicas históricas que os ossos apresentaram durante esses anos, resultando no povoamento dos continentes e a geração de novas espécies de vertebrados, estudos ao longo dos anos vem sendo realizados para compreender o osso, desde como funciona o processo de formação óssea (WUTHIER, 1977; GOLUB, 2009; WUTHIER e LIPSCOMB, 2011; BOLEAN et al., 2017a; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022), até mesmo de possíveis biomateriais compatíveis com cada tipo de osso em procedimentos cirúrgicos para correção de traumas nesse tecido (LEE, J. C e VOLPICELLI, 2017; CRUZ et al., 2019). Enfatizando o processo de formação óssea, esse fenômeno consiste em dois eventos, a ossificação intramembranosa e a endocondral, que ocorrem em estágios de vida diferentes, bem como em tecidos distintos do organismo. Esses processos se iniciam a partir do primeiro trimestre de gravidez, continuando após o período pós natal, não existindo um período específico em que essas ossificações parem de ocorrer. Compreender esse processo inicial para a formação óssea é

extremamente importante para adentrar em escalas menores, visando estudar e detalhar as micro etapas existentes nesse processo altamente complexo.

1.1 Ossificação Intramembranosa

A ossificação intramembranosa recebe esse nome pela sua formação ser concretizada na ausência de uma região cartilaginosa pré-formada. Em mamíferos, ossificação intramembranosa resulta em ossos na região da cabeça, durante a formação do feto (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al. 2021; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022). Nos demais vertebrados, é responsável pela formação dos primeiros ossos planares tais como clavícula, escapula e costelas (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al. 2021). O início dessa ossificação é devido ao agrupamento de células mesenquimais em regiões específicas de crescimento ósseo, conhecida como blastema óssea, seguido de sua diferenciação em células osteoblásticas (Figura 1.A). Há dois caminhos que as células mesenquimais percorrem até encontrar a região ideal de diferenciação, o caminho aleatório e o direto (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al. 2021; MCKEE et al., 2022).

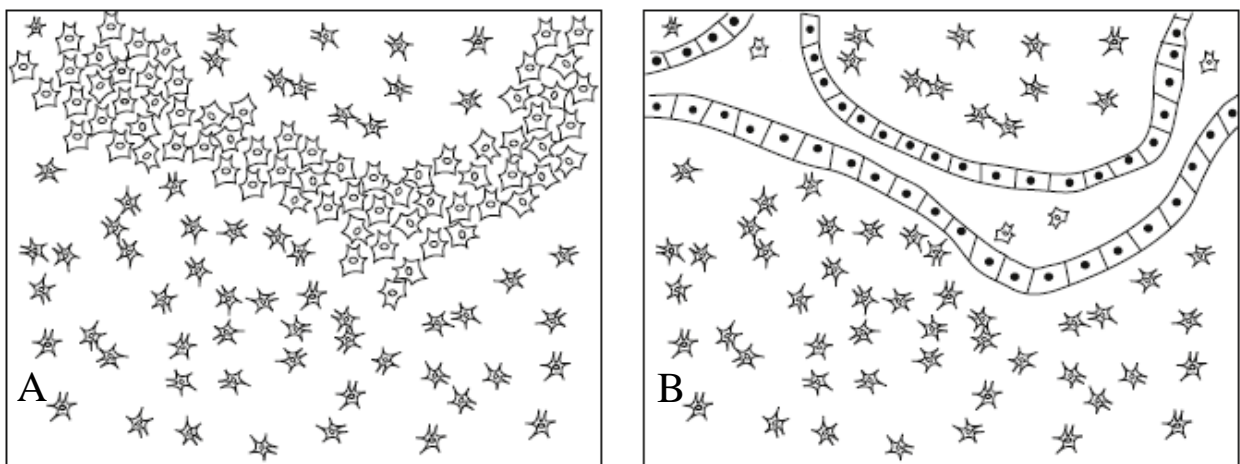


Figura 1. Modelo de ossificação intramembranosa onde células mesenquimais são direcionadas ao centro de mineralização e diferenciadas em osteoblastos (A), subsequentemente sendo encapsuladas e diferenciando-se em osteócitos (B). (Adaptado de ALLEN e BURR, 2019)

Em ambos os casos migratórios, o precursor Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) desenvolve a função de sinalização para o início da diferenciação celular, fornecendo as primeiras células osteoprogenitoras (Figura 2). Essas células osteoprogenitoras possuem subsequentes diferenciações, desenvolvendo funções diferentes durante o processo de adesão celular e

propagação de mineral (GALEA et al. 2021). O fator Sp7, é responsável pela diferenciação de células osteoprogenitoras em pré-osteoblásticas, processo necessário que fornece sinalizadores celulares para que essas células consigam interagir de maneira eficaz a matriz extracelular cartilaginosa (MEC). Nesse tipo de ossificação, a composição da MEC é restrita a apenas colágeno do tipo 1 (Col-1). Quando células pré-osteoblásticas entra em contato com a MEC, imediatamente o precursor Bglap, mais conhecido como osteocalcina, realiza a última etapa de diferenciação, resultando em osteoblastos maduros iniciando o processo de biomineralização óssea (EAMES et al., 2004; ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021). A presença de osteoblastos propagando mineral na MEC é particular da ossificação intramembranosa, sendo um dos principais fatores na diferenciação dos tipos de ossificação em mamíferos.

Conforme as primeiras matrizes ósseas vão se formando, osteoblastos maduros são encapsulados, se diferenciando em osteócitos (Figura 1.B), dando espaço para o desenvolvimento da matriz extracelular, chamadas de tecido ósseo. A diferenciação em osteócitos é conduzida pelo fator Spp1, mais conhecido como osteopontina (EAMES et al., 2004; ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021). Esse mecanismo de encapsulação resulta na formação de uma ilha óssea, onde, mais osteoblastos maduros são recrutados e continuando o processo mineralizante, resultando em um osso lamelar. Outra característica derivada da encapsulação das células de osteoblastos é a formação de cavidades nessa lamela óssea, resultado da encapsulação, afastando as células de osteócitos dos vasos sanguíneos. Consequentemente, essas cavidades permitem que vasos sanguíneos adentrem a estrutura óssea, formando uma cavidade medular fornecendo suplementação sanguínea dentro dos ossos formados por esse processo (WAGNER e ASPENBERG, 2011; ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022). Nas etapas pós natal, ocorre um equilíbrio entre a ossificação intramembranosa e endocondral para a regulação da forma, no reparo de traumas e da regeneração da estrutura óssea. Porém, em alguns ossos, é necessário a ossificação intramembranosa como precursores, para posteriormente, a ossificação endocondral atuar de maneira efetiva, resultando em osso com propriedades mecânicas adequadas para a sua função biológica, como exemplo a expansão periosteal (DAY et al., 2005; GOODNOUGH et al., 2014; GALEA et al., 2021).

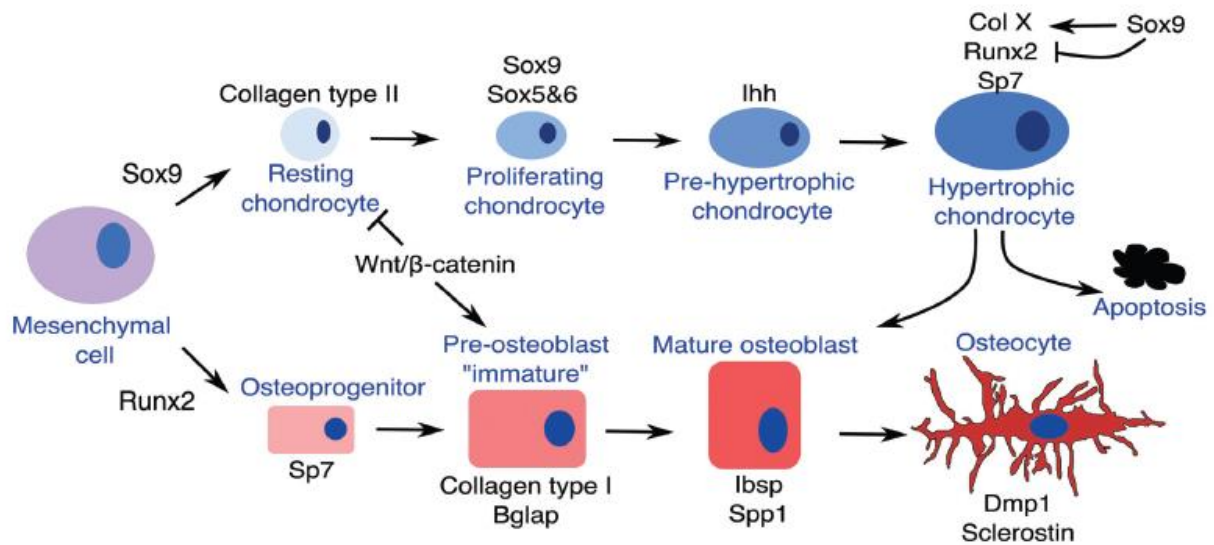


Figura 2. Modelo da diferenciação de células mesenquimais originando os processos de ossificação intramembranosa (caminho em tom de vermelho) e endocondral (caminho em tom de azul). Evidenciando cada etapa de diferenciação e interligação da ossificação endocondral com a intramembranosa que depende da concentração dos fatores Sox9 e RUNX2 (adaptado de GALEA et al. 2021)

Esse efeito é resultado da interação entre os fatores de diferenciação das células mesenquimais durante o processo de crescimento ósseo, ou seja, para a diferenciação em osteoblastos é necessário o RUNX2 e para a diferenciação em condrócitos (ossificação endocondral) o fator Sox9 é predominante, e entre esses dois fatores, o fator Sox9 é diretamente um inibidor do RUNX2, freando a diferenciação dos osteoprogenitores, regendo a ossificação para o modelo endocondral (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022).

1.2 Ossificação endocondral

A ossificação endocondral é um processo que não se limita apenas nos estágios iniciais da formação óssea, pois ela possui papel fundamental para a formação do endoesqueleto completo de mamíferos (DY et al., 2012; ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021). A alta complexidade desse processo é necessária para a formação de osso de diversos formatos e tamanhos para que sua função biológica seja efetiva (Figura 3).

Comparativamente, o estágio inicial desse processo é similar ao da ossificação intramembranosa, onde, células mesenquimais são condensadas na região da propagação óssea, porém, essas células são diferenciadas em condroblastos (KOZHEMYAKINA et al., 2015; LIU et al., 2018), responsáveis pela produção da MEC, predominantemente composta por colágeno do tipo 2 (Col-2) (LEFEBVRE e SMITH, 2005; BOLEAN et al., 2017a; ALLEN e BURR, 2019; NOGUEIRA et al., 2021). A MEC, nesse processo, possui papel fundamental na morfologia do osso formado, isso ocorre pelo fato de que essa matriz no início da ossificação encapsula diversas células presentes na região de ossificação, dando a forma do osso através da cama de cartilagem (ALLEN e BURR, 2019; NOGUEIRA et al., 2021).

A propagação dessa MEC é impulsionada pela presença de pericôndrio, aumentando a quantidade de condroblastos e criando a forma cartilaginosa óssea, que possui duas regiões de importância: (a) a região chamada de diáfise localizada na região central de propagação da cartilagem e (b) a epífise que é a região da extremidade da MEC ao final da sua expansão (LEFEBVRE e SMITH, 2005; ALLEN e BURR, 2019). Na região da diáfise, células são diferenciadas em osteoblastos, iniciando a calcificação da cartilagem. Esse processo é semelhante ao da ossificação intramembranosa, pois o fator RUNX2 é o responsável pela diferenciação do pericôndrio em osteoblastos (ALLEN e BURR, 2019). Essa calcificação é chamada de colar ósseo, resultando em um osso lamelar, limitando o fornecimento de nutrientes para essa região, facilitando a calcificação (GALEA et al., 2021; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022). Assim, condrócitos entram em estado de hipertrofia, podendo sofrer apoptose, ou ser diferenciado em osteoblastos maduros.

O processo de crescimento do colar ósseo continua e transforma-se para periósteo, conglomerando uma vasta população de células osteogênicas (HIRASAWA e KURATANI, 2015). Assim como na ossificação intramembranosa, a morte de condrócitos resulta na criação de cavidades no colar ósseo, auxiliando a entrada de vasos sanguíneos na estrutura desse osso lamelar. Até esse momento, temos a presença de superfície cartilaginosa e a cartilagem lamelar calcificada, então, com a entrada de suplementação vascular e a presença de osteoblastos, proveniente da hipertrofia de condrócitos, acaba resultando no centro primário de ossificação, se expandindo na superfície periostal até a chegada das extremidades axial da cartilagem lamelar calcificada (ALLEN e BURR, 2019; MANGIAVINI et al., 2022). Nesse instante, na região da epífise, inicia

o centro secundário de ossificação, a partir da invasão vascular na região cartilaginosa. Em alguns ossos do corpo, o centro secundário de ossificação ocorre em uma epífise de cada vez, no caso de metacarpos e falange, enquanto nos demais ossos, essa etapa de ossificação ocorre simultaneamente nas duas epífises (ALLEN e BURR, 2019; PERRONE JR e WILLIANS, 2021). Com esses centros de ossificação formados, nessa etapa, o osso é chamado de placa de crescimento, responsável pelo crescimento longitudinal do primeiro centro de ossificação pela MEC, até encontrar o segundo centro de ossificação, resultando na forma e propriedades mecânicas apropriadas para o osso que está sendo formado. A taxa de crescimento ósseo varia de acordo com o tipo de osso que está sendo formado, ao mesmo tempo, que é variável de indivíduo a indivíduo (ALLEN e BURR, 2019; PERRONE JR e WILLIANS, 2021).

A taxa de crescimento ósseo varia de acordo com o tipo de osso que está sendo formado, ao mesmo tempo, que é variável de indivíduo a indivíduo. Essa etapa de crescimento da placa óssea é dividida em 5 sub etapas morfológicas, que são classificadas de acordo com a composição celular que influencia diretamente nessa propagação: (a) zona de descanso; (b) zona de proliferação; (c) zona de hipertrofia; (d) zona da calcificação da cartilagem e (e) zona de ossificação (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021). A zona de descanso é a mais distante do centro de ossificação primário, é constituída majoritariamente de condrócitos, próxima a cartilagem modelo que é continuamente produzido a base de condroblastos, até produzirem uma quantidade significativa de MEC, são diferenciados em condrócitos (GALEA et al., 2021). Em seguida, inicia-se a zona de proliferação desses condrócitos, sendo regulados a partir de cinco precursores fundamentais: (a) Somatotropina/hormônio do crescimento, (b) fatores de crescimento semelhantes à insulina, (c) proteína hedgehog indiana, (d) proteínas morfogênicas ósseas e (e) Wnt- β -catenina (DAY et al., 2005; ALLEN e BURR, 2019). Ainda sobre a regulação dessa etapa, temos a presença de precursores de fibroblastos, um agente que tem potencial de inibição da proliferação de condrócitos maduros (ALLEN e BURR, 2019; NOGUEIRA et al., 2021; GALEA et al., 2021; MCKEE et al., 2022; BUSS et al., 2022).

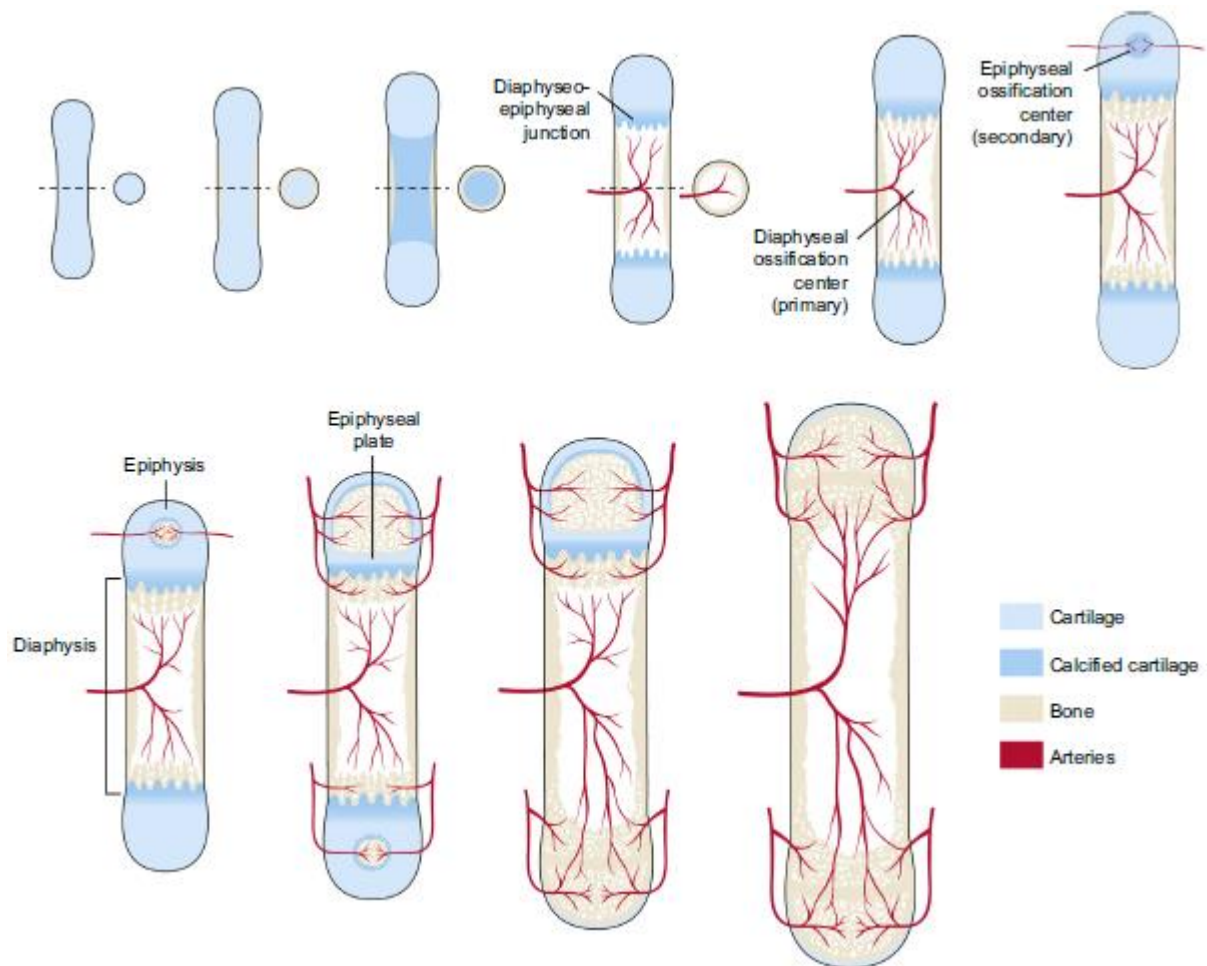


Figura 3. Esquema das etapas fundamentais durante a ossificação endocondral, detalhando a presença de um molde cartilaginoso, para que condroblastos iniciem o processo de ossificação. Detalhando os centros primários e secundários da ossificação, assim como diferenciando as espécies presente durante a formação do osso. (Adaptado de ALLEN e BURR, 2019)

Estando diretamente ligado à próxima etapa de proliferação da placa de crescimento ósseo, que é a zona de hipertrofia, regulando a quantidade de células de condrócitos que estão sendo condensadas. Essa zona é responsável pelo aumento do tamanho celular à medida que os condrócitos atingem idades avançadas. O agente responsável pela sinalização da hipertrofia dessa região é chamado de tiroxina, porém, existem relatos de precursores da zona de proliferação ajudarem na hipertrofia dessas células (ALLEN e BURR, 2019). Essa hipertrofia, também, resulta em crescimento da MEC constituída de Col-2 e do aumento da vascularização nessa região, facilitando assim o processo de mineralização dessa região hipertrófica (LEFEBVRE e SMITH,

2005). Outro efeito interessante ocorre devido a invasão vascular dessa região, ocorre um equilíbrio da composição da MEC, onde nas regiões que possuem vascularização, a tendência de colágeno do tipo X (Col-X) é recorrente, gerando maior rigidez do mineral produzido e a sua ausência nessa zona hipertrófica resulta na pausa do crescimento ósseo (EAMES et al., 2012; NGUYEN e EAMES, 2020).

Essa região condensada com condrócitos hipertróficos inicia o processo de mineralização da MEC, e é conhecido como a zona de calcificação da cartilagem. Essa mineralização apenas ocorre devido a hipertrofia de condrócitos que estão em processo de morte celular, e a sinalização do processo apoptótico é devido a condensação dessas células, não sendo observado esse efeito nas regiões mais superficiais da placa de crescimento. A mineralização da cartilagem é apenas processada pelos condrócitos, que no processo de apoptose liberam vesículas na MEC. Essas vesículas possuem um complexo maquinário proteico e enzimático que potencializam a interação entre cálcio e fosfato para que a calcificação dessa cartilagem ocorra corretamente. Conforme essa região fica cada vez mais calcificada, mais condrócitos sofrem o processo de apoptose, se tornando um ciclo repetitivo e irreversível. Por fim, com todos esses fenômenos somados, inicia-se a última zona da placa de crescimento, a de ossificação. A diferenciação de condrócitos hipertrofos para osteoblastos ocorre de acordo como o modelo da Figura 2, onde o equilíbrio entre os precursores Sox9 e RUNX2 favorece a diferenciação em osteoblastos, finalizando o processo apoptótico de condrócitos (NAKASHIMA et al., 2002; ZHOU et al., 2006 ; DY et al., 2012; GALEA et al., 2021). Os osteoblastos são recrutados para a superfície do tecido calcificado para produzir novo tecido ósseo. Um papel fundamental nessa etapa final é desempenhado por osteoclastos, presente na zona de ossificação, na função de remoção e seleção da cartilagem calcificada e do osso recém formado (ZHOU et al., 2006; DY et al., 2012).

1.3 O processo de biomineralização e as MV

Durante o processo de ossificação, a presença de uma matriz extracelular é extremamente importante para a acomodação e propagação dos primeiros minerais a base de fosfato de cálcio. Por isso, destaca-se o Col-1 e Col-2, provenientes de osteoblastos e condrócitos durante o processo de ossificação intramembranosa e endocondral, respectivamente (BOLEAN et al., 2017a, 2020; BOTTINI et al., 2018; ALLEN e BURR, 2019, GALEA et al., 2021; CRUZ et al., 2020; BUSS et al., 2022). Portanto, o estudo da estrutura e interações desses tipos de colágeno é fundamental para

o entendimento total do processo de biomineralização óssea. Col-1 é uma proteína secretada por osteoblastos, em sua forma de tripla hélice originando fibrilas em padrões de banda. A organização dessa tripla hélice é resultado da associação de duas cadeias α_1 e uma cadeia α_2 , e são responsáveis pela interação com minerais de apatita, servindo como “cama orgânica” para a sua deposição e propagação. Essa deposição pode ocorrer de duas maneiras, interfibrilar ou intrafibrilar. (WANG et al., 2012).

Devido a essa característica, a relação da concentração de colágeno depositado na MEC é restritamente sensível, pois em deficiências de Col-1, a estrutura da MEC forma fibrilação individual, gerando grande volume de espaço entre as fibrilas, favorecendo apenas a deposição intrafibrilar (WANG et al., 2012). Porém, durante o processo de ossificação endocondral, Col-1 é estritamente envolvido na composição final do osso, enquanto Col-2 é responsável pela formação e propagação da MEC. A estrutura do Col-2 é formada pelo entrelaçamento de três cadeias do tipo α_2 , e sua formação é estritamente ligada a células de condroblastos (ALLEN e BURR, 2019; GALEA et al., 2021; BUSS et al., 2022).

Para que os primeiros nódulos mineralizantes se formem, um equilíbrio físico-químico altamente refinado é necessário, possuindo um denominador comum em todos os processos de biomineralização de mamíferos: a presença de vesículas extracelulares (BOLEAN et al., 2017a; BOTTINI et al., 2018; CRUZ et al., 2022). Essas vesículas extracelulares são classificadas em quatro grandes grupos, que são classificados pelo seu tamanho e função biológica: (a) exossomos que possuem de 40 a 100 nm de diâmetro e é de origem de processo de endocitoses; (b) corpos apoptóticos com diâmetro entre 500 a 1000 nm, sendo liberadas pontualmente por morte celular; (c) microvesículas originadas da membrana plasmática de células, a partir de brotamento pelo rompimento desta membrana para o meio extracelular, possuindo diâmetro entre 50 a 1000 nm e (d) vesículas derivadas da membrana plasmática e frações de membrana de organelas, portanto, originadas no lúmen de células (BOTTINI et al., 2018). Dentre todos os tipos de vesículas extracelulares, destaca-se as MV (Figura 4) como o principal agente para a propagação dos primeiros nódulos de minerais. Morfologicamente, a MV possui diâmetro entre 100-250 nm, se ligando fortemente com a MEC composta, principalmente, de Col-1.

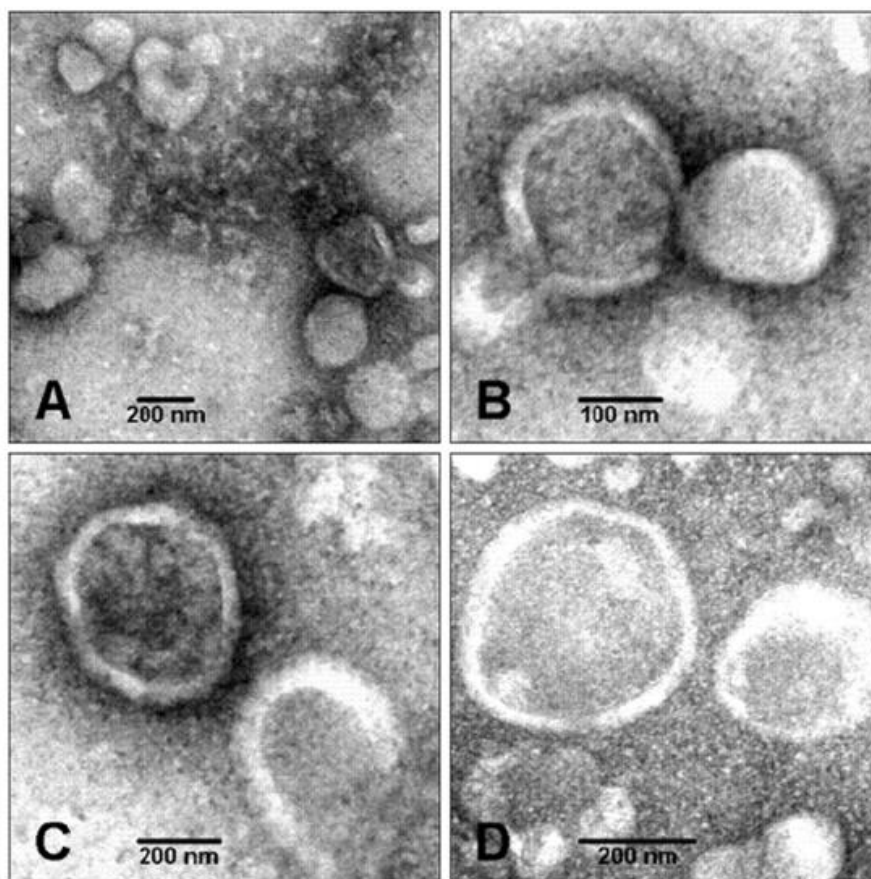


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de MV obtidas a partir de embriões de frango e crescidas em placas de cartilagem, possuindo o diâmetro médio entre 100 a 250 nm. (Ampliação de A, x 53.000; B, x 100.000; C, 75.000 e D, 100.000; BOTTINI et al., 2018 [Adaptado de THOUVEREY et al., 2009a])

A biogênese das MV é conhecida e já debatida quando falamos sobre os processos de ossificação, onde, na ossificação intramembrana ela surge através do estágio de maturação de osteoblastos e na ossificação endocondral as MV são expelidas de osteócito por brotamento, durante o processo de apoptose dessas células. Sua composição estrutural atua ativamente para que os primeiros minerais sejam depositados e propagados nas MEC, resultando em tecidos mineralizados. Para compreender de síntese de precursores de fosfato de cálcio, sua proliferação e consequentemente resultando na formação dos primeiros cristais de hidroxiapatita, necessita-se estudar profundamente todas as biomoléculas presente nas MV. A determinação da composição lipídica presente na membrana das MV iniciou-se com Wuthier em 1968 (WUTHIER, 1968) e se

estendeu até o presente momento. Essa composição, consiste em diversas espécies lipídicas, resultando em propriedades físico-químicas únicas para que sua função seja desenvolvida corretamente (BOLEAN et al., 2017a; BOTTINI et al., 2018). Dentre as principais espécies, destaca-se as classes de: SM, fosfocolina (PC), fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI) e Chol, quando comparadas à membrana plasmática de suas células precursoras (THOUVEREY et al., 2009b; WUTHIER e LIPSCOMB, 2011). Wuthier e Lipscomb (2011) determinou a composição lipídica presente na MV em linhagens de frango de corte velhos, obtendo 13,4 % de SM, 41,8 % de PC, 9,3 % de PS, 14,9 % de PE, 0,9 % de PA e 1,1 % de PI, enquanto Thouverey et al. (2009b), isolando MV de proveniente cultura de células osteossarcoma humano, encontrou 11% de SM, 26,5% PC, 16,5% de PS, 36% de PE, 3,5% de PA e 7% de PI, mostrando uma variedade em sua composição, variando de espécie.

Essa variabilidade de lipídios confere propriedades de fluidez únicas, podendo auxiliar durante seu processo de brotamento, adesão e propagação de mineral nas MEC, até a obtenção do osso maduro (THOUVEREY et al., 2009b; WUTHIER e LIPSCOMB 2011; BOLEAN et al., 2017a; BOTTINI et al., 2018). Houston et al. (2004) demonstraram a importância dos fosfolipídios PC e PE durante o processo de produção de Pi no lúmen das MV, estando acoplada diretamente à degradação desses fosfolipídios. Os fosfolipídios ácidos apresentam grande afinidade por cálcio, principalmente a PS, são geralmente encontrados nas membranas das vesículas extracelulares (SELA et al., 2000). Esses fosfolipídios são capazes de promover a formação de HAp *in vitro*, mesmo na ausência de TNAP (EANES e HAILER, 1985).

Este fato sugere uma possível associação dos fosfolipídios com o processo de mineralização. Estudos *in vitro* comprovam que TNAP-proteolipossomos constituídos de DPPC são mais efetivos na deposição de fosfato de cálcio, cerca de 78%, em relação a TNAP-proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol 10% (razão molar) (SIMAO et al., 2019). Porém, aumentando a concentração de Chol, de 10% para 36% (razão molar), observa-se que há um aumento de 4 vezes a deposição de fosfato de cálcio em relação ao proteolipossomo constituído de DPPC (FAVARIN et al., 2017 e 2020).

Com essas informações, é possível desenvolver modelos que são capazes de explicar a sequência e a ordem desses pequenos eventos que precedem a formação mineral e a sua deposição nas MEC. Entretanto, para compreender como os primeiros minerais são formados dentro das MV é um trabalho árduo, porém, é válido estudar cada processo separadamente como uma estratégia empregada para resolver esse enorme quebra-cabeça (Figura 5). Assim, a homeostase de Ca^{2+} inicia-se com a regulação de sua concentração no líquido extracelular obtido no sistema endócrino, responsável por manter sua concentração na faixa de 2,2 a 2,7 mmol/L (KHANAL e NEMERE, 2008). Compreender a captação de íons Ca^{2+} no líquido extracelular pelas MV é essencial para elucidar o mecanismo bioquímico da proliferação dos primeiros nódulos mineralizantes. Estudos mostram que um seletivo grupo de proteínas presentes nas MV possuem alta afinidade por íons Ca^{2+} e fosfolipídios ácidos, principalmente PS, são responsáveis pela homeostase de Ca^{2+} das MV (WUTHIER e LIPSCOMB, 2011; BOLEAN et al., 2015). Essas proteínas pertencem à família das Anexinas, sendo a Anexina A5 (AnxA5) e a Anexina A6 (AnxA6) predominante nessa etapa de transporte de Ca^{2+} .

Bolean et al. (2015) mostraram que a incorporação de AnxA5 em lipossomos é maior em bicamadas lipídicas contendo PS em sua composição, da mesma forma que na presença de íons Ca^{2+} , consequentemente mostrando a capacidade de capturar este íon pelos proteolipossomos formados. A presença de AnxA5 em proteolipossomos mostrou interação com fibrilas de Col-2, indicando sua importância durante a liberação e interação de MV com a MEC, induzindo a calcificação da cartilagem (VON DER MARK e MOLLENHAUER, 1997). AnxA6 tem um papel diferente de AnxA5, principalmente devido à sua localização em MV, o que resulta em características diferentes, como a presença de regiões hidrofóbicas enriquecidas em Chol na membrana externa, dependentes de Ca^{2+} inseridos na superfície interna do monocamadas de membrana (VESCHI et al., 2020). De acordo com Veschi et al. (2020), a AnxA6 e a AnxA5 cooperam na geração de um microambiente rico em Ca^{2+} , que será responsável pela nucleação dos primeiros cristais de apatita no lúmen das MV.

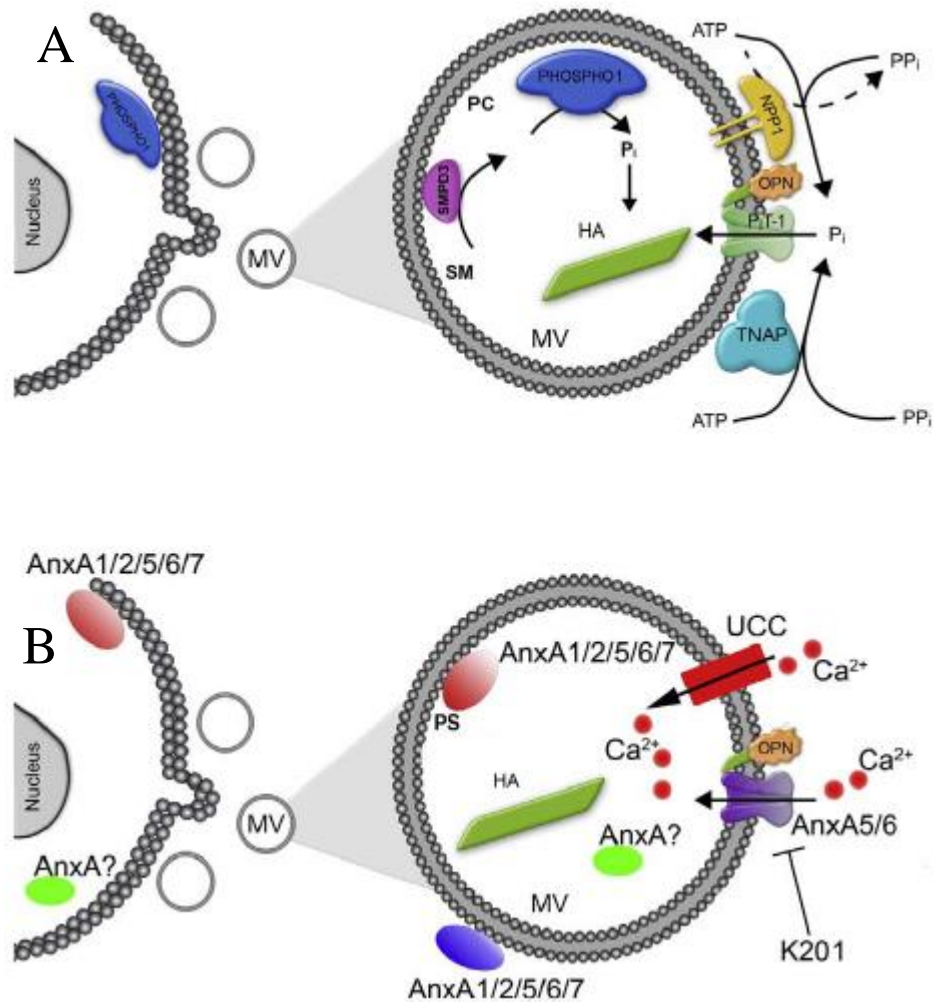


Figura 5. Modelo esquemático do maquinário presente na MV que é responsável pela (a) obtenção de Pi no lúmen das MV e no meio extracelular, juntamente com os transportadores específicos de Pi, tal como (b) o processo de obtenção de íons de Ca²⁺ do meio extra celular para a vesícula. Provendo um ambiente rico e apropriado para a deposição dos primeiros precursores de fosfato de cálcio. (Adaptado de BOTTINI et al., 2018)

Na homeostase do Pi e do PPi (Figura 5.B), ATP é o principal nucleotídeo que gera essas espécies iônicas envolvidas na formação e regulação da biomineralização óssea (BOTTINI et al., 2018). Em relação à geração de Pi no lúmen das MV, duas proteínas são descritas como as principais responsáveis por essa via, a esfingomielinase (SMPD3) e fosfoetanolamina/fosfocolina fosfatase (PHOSPHO1) (HOUSTON et al., 2004; YADAV et al., 2016). Os principais substratos para esta via hidrolítica são os fosfolipídios presentes na monocamada interna das MV, que são

hidrolisados pela SMPD3 resultando em PC e PE, que são prontamente hidrolisados pela PHOSPHO1 resultando em Pi livre em solução. Esse fenômeno, não resulta em desestabilização da membrana das MV. No entanto, esta via reacional não é a única relatada na literatura, pois a obtenção de PC e PE pode ser dependente da ação das fosfolipases e do ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 6 (DILLON et al., 2019). Na região transmembrana são encontradas espécies de proteínas que desempenham um papel ativo durante o processo de nucleação mineral, sendo responsáveis pelo transporte de Pi da região extracelular para a lúmen da MV, e são chamadas de transportadores de fosfato PiT-1 (SLC20A1) e PiT-2 (SLC20A2) (YADAV et al., 2016). Esses transportadores são chamados de co-transportadores Na⁺/Pi tipo III devido à sua capacidade de transportar Pi através de um fluxo dependente de Na⁺ (SUZUKI et al., 2010). Desempenhando o papel de fornecedor de íons Pi no meio extracelular, e encontrada na região integral da membrana, estudos recentes mostram a influência da Sódio/potássio ATPase no controle da relação Pi/PPi no meio extracelular. Essa influência se deve à sua função de transporte de três íons Na⁺ para fora e dois íons K⁺ para dentro dos MV para cada molécula de ATP hidrolisada (SANTOS et al., 2005; SEBINELLI et al., 2019).

1.4 Fosfatase Alcalina não específica de tecido

As fosfatases alcalinas pertencem a uma família multigênica que codifica diferentes formas da enzima, distribuídas em quase todos os tecidos. No homem e nos primatas superiores, três isoformas distintas têm sido identificadas: a da placenta, a do intestino e a do fígado-osso-rim (LOWE et al., 1990; LE DU e MILLAN, 2002). As isoformas da placenta e do intestino são tecido-específicas e são expressas unicamente na placenta e no intestino, respectivamente, enquanto a isoforma do fígado-osso-rim é encontrada em quase todos os tecidos, sendo também denominada por esta razão de TNAP (WUTHIER et al., 1985; NAKAMURA et al., 1988; HSU e ANDERSON, 1995).

TNAP é capaz de hidrolisar ATP, resultando ADP e Pi como produtos da reação. Sua regulação no processo de biomineralização é dirigida alostericamente pelo ATP (PIZAURO et al., 1993) e inibida competitivamente pelo Pi, seu produto de reação (PIZAURO et al., 1987), sugerindo que os níveis relativos de PPi, um inibidor da biomineralização, e de Pi, um inibidor da TNAP, presentes no fluído extracelular da matriz, também desempenham um papel importante na regulação do processo de mineralização biológica. Esta hipótese é suportada pela demonstração de

que os níveis de Pi, derivado da hidrólise do PPi pela TNAP, atuam como um sinal da indução da expressão da glicoproteína fosforilada osteopontina em osteoblastos (BECK et al., 2000). Foi demonstrado que a TNAP pode também contribuir para a geração de PPi através de sua atividade de fosfodiesterase, hidrolisando ATP (ZHANG et al., 2006), contradizendo evidências de que a enzima teria uma função antagonista à da glicoproteína-1 no processo de mineralização (HESSLE et al., 2002), embora uma das principais funções da TNAP seja a remoção de PPi do ambiente de mineralização através de sua atividade de fosfomonohidrolase (REZENDE et al., 1994). Ciancaglini et al. (2006) mostraram que as propriedades cinéticas da TNAP dependem diretamente do microambiente em que se encontra, ou seja, da composição lipídica em que está incorporado, bem como dos íons Mg^{2+} no sítio catalítico para que sua ativação seja efetiva. Nosso grupo já demonstrou a eficácia do uso de sistemas miméticos de membrana na reconstituição de TNAP em bicamadas lipídicas. As proteínas que possuem âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) são encontradas, em maiores concentrações, nas regiões da membrana ricas em Chol e SM, que são os principais constituintes lipídicos dos *lipids rafts* das MV e, portanto, alvo de estudos sobre o efeito da atividade catalítica da TNAP na presença dessas espécies lipídicas em lipossomos (BOLEAN et al., 2010; FAVARIN et al., 2017 e 2020). Segundo Favarin et al. (2017), lipossomos na presença de Chol e em diferentes tipos de esteróis aumentam a capacidade de incorporação da TNAP na bicamada lipídica, resultando em aumento de sua atividade fosfomonohidrolítica.

1.5 Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1

As nucleosídeos pirofosfatase/fosfodiesterases (NPPs) são uma classe de enzimas expressas em diversos tecidos tais como ósseo, cartilaginoso e adiposo, possuindo funções específicas em cada tipo de tecidos e células em seres vivos (HUANG et al., 1994; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Observando as principais enzimas dessa grande família, destaca-se a NPP1, uma proteína integral de membrana plasmática (CAMOLEZI et al., 2002; STEFAN et al., 2005 e 2006; JANSEN et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2012) a Autotaxina (NPP2) que é uma enzima secretada para o meio extracelular, acredita-se possuir função de hidrólise de Pi a partir de fosfolipídios desempenhando diversas funções celulares, e a B10 (NPP3) uma proteína abundante nos espaços intracelulares (TERKELTAUB, 2001).

Entre todas as funções por elas desempenhadas, destaca-se a sua capacidade de hidrólise de diversos tipos de nucleotídeos polifosforilados e fosfodiésteres, para a geração de PPi, um dos

principais agentes reguladores da biomineralização (SIMAO et al., 2010; CIANCAGLINI et al., 2010; JANSEN et al., 2012; MCKEE et al., 2013). Um trabalho recente de Szeri et al. (2022) comprova que a concentração P*Pi* além de ser gerada pela NPP1, por hidrólise de ATP, também pode ser aumentada por uma proteína de membrana, transportadora de P*Pi* diretamente do citossol para o fluído extracelular, chamada Homólogo de Anquilose (ANKH). Efetivamente estes autores, trabalhando com células nocaute em NPP1^{-/-} mostraram a importância das NPPs no microambiente de mineralização, atuando mais diretamente no soro do que no osso. A NPP1 e as ANKH fornecem 75 e 25%, respectivamente, do P*Pi* extracelular. Provando que ambas, em sinergia, atuam diretamente no controle da concentração ideal de P*Pi* extracelular, prevenindo calcificações patológicas.

Desta forma, a NPP1 atua como grande geradora de P*Pi*, que juntamente com a TNAP controlam a razão Pi/P*Pi* no meio extracelular, influenciando assim diretamente na geração dos primeiros cristais de HAp (FAVARIN et al., 2017; SIMAO et al., 2019). A NPP1 possui peso molecular de aproximadamente 125 kDa, com 906 resíduos de aminoácidos, sendo uma glicoproteína transmembrana homodimérica do Tipo II, ou seja, ela é um monômero, que sofre dimerização quando se encontra próxima de outra unidade.

Essa dimerização ocorre através de seus resíduos de cisteína (Cys), mais especificamente nos resíduos Cys413 e Cys805, gerando uma ligação dissulfeto entre os dois monômeros, formando sua estrutura em homodímero (JANSEN et al., 2012). Em sua estrutura tridimensional apresentada na Figura 6, observa-se 5 domínios funcionais em sua estrutura, apresentados em cores distintas.

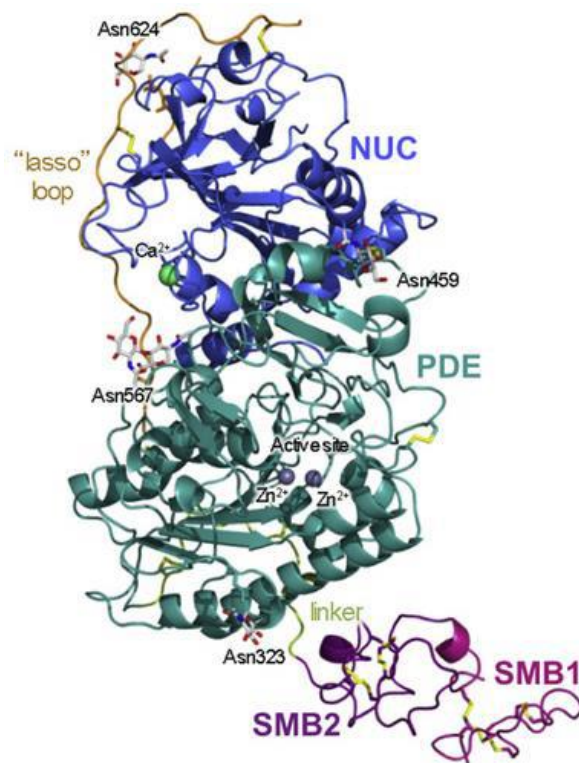


Figura 6. Estrutura tridimensional da NPP1 destacando seu domínio nuclease (NUC) (azul), domínio catalítico (verde) com o sítio catalítico (esferas roxas) na presença de Zn²⁺, e os domínios β-Somatomidina 1 e 2 (SMB 1 e 2, magenta), obtida através de análises de cristalografia (Adaptado de JANSEN et al., 2012)

Na posição N-terminal da NPP1, encontra-se o domínio transmembrana de 1 a 88 resíduos de aminoácidos, responsável pela interação da enzima com a membrana das MV e onde também se encontram presentes os grupos de Cys responsável pela homodimerização (STEFAN et al., 2005; JANSEN et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Na sequência, têm-se os domínios SBM 1 e 2, que são domínios pequenos de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, responsáveis apenas pela estabilização do sítio catalítico da enzima quando ela se encontra na região transmembrana na forma monômérica ou dimérica (KIRSCH et al., 1997; BOLLEN et al., 2000). Na região intermediária de sua estrutura, encontra-se o domínio catalítico de aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos, possuindo de 24 a 60% de identidade entre as demais NPPs existentes. Seu sítio ativo encontra-se próximo dos domínios SBM 1 e 2, para sua futura estabilização e continua atividade durante as mudanças de conformação. Sobre seu sítio ativo, a NPP1 é parte de um grande grupo de enzimas denominados de metaloenzimas fosfo-

/sulfato coordenadas, que necessitam de um íon metálico (Ca^{2+} , Mg^{2+} e/ou Zn^{2+}) interagindo com o sítio ativo para que sua atividade catalítica seja eficiente. Além disso, são enzimas que possuem inibição na presença de macromoléculas sulfonadas (GALPERIN et al., 1998; MASSE et al., 2010; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Por fim, o restante dos resíduos de aminoácidos constitui o NUC que não possui atividade catalítica, porém é uma peça chave na sinalização e translação das NPPs, partindo do retículo endoplasmático até o complexo de Golgi (WUTHIER et al., 1985). Um detalhe a ser observado é a presença de uma *EF-hand*, uma conformação específica no loop, entre duas sequências de α -hélice, gerada por interações da estrutura da enzima com íons de Ca^{2+} alterando a conformação do sítio ativo, conseqüentemente, aumentando a interação com o substrato (PETERSEN et al., 2007; ZIMMERMANN et al., 2012).

Essa enzima está interligada a diversas funções no corpo humano, dentre elas a função de inibir a precipitação de HAp devido sua função de gerar PPI. Esta hipótese tem sido confirmada por estudos *in vitro*, onde células transfectadas com o cDNA da NPP1 demonstraram elevados níveis de PPI em MV derivadas de osteoblastos, acompanhados por reduzida mineralização da matriz (TERKELTAUB et al., 1994; JOHNSON et al., 1999). Além disso, ratos NPP1^{-/-} desenvolveram anormalidades relacionadas à hipermineralização, efeito derivado da baixa expressão da NPP1 em tecidos específicos, tais como ossificação do ligamento longitudinal posterior da coluna vertebral, hiperostose esquelética idiopática difusa, hiperostose anquilose da coluna vertebral e ossificação patológica de tecido mole, incluindo calcificação arterial (OKAWA et al., 1998; YADAV et al., 2016). Em contrapartida, a expressão elevada de NPP1 resulta na calcificação do tecido cartilaginoso, através da formação de CPPD principalmente durante o processo de envelhecimento da cartilagem do menisco do joelho (JOHNSON et al., 2001; MASUDA et al., 2001; ZHANG et al., 2006; SUN et al., 2010). Cabe destacar que, assim como em tecidos que expressam muita NPP1, precipitação anormal de CPPD também tem sido observada em associação com a deficiência de TNAP. Essa precipitação anormal a partir de deficiência de TNAP ocorre devido a sua função de gerar Pi a partir de PPI previamente formado pelas NPP1 presentes nos tecidos ósseos. Portanto, excesso de PPI em pacientes com quadro clínico de hipofosfatase, podem acabar desenvolvendo mineralização patológica de CPPD da cartilagem articular (JONES et al., 1992). Cabe destacar que, na ausência de TNAP, relatos recentes têm

demonstrado a atuação da NPP1 como uma fosfatase. Esta questão ainda merece estudos futuros para melhor compreensão (SIMAO et al., 2010 e 2013; CIANCAGLINI et al., 2010).

Devido à necessidade em compreender a função da NPP1 no processo de mineralização e assim controlar as concentrações de PPi formado nos tecidos, estudos sobre potenciais inibidores da NPP1 foram desenvolvidos ao longo dos anos, com o intuito de desenvolver fármacos como tratamento dessas doenças relacionadas a essa enzima (JOSEPH et al., 2004; LEE. et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017) Dentre todos os inibidores estudados, observou-se que a NPP1 é inibida por compostos análogos de adenina nucleotídeos e seus derivados, interferindo diretamente no seu sítio ativo, e macromoléculas com determinado grupo funcional que possuem capacidade de inibição dessa enzima através de sua estrutura terciária, sendo assim uma inibição alostérica (JOSEPH et al., 2004; MULLER et al., 2006; LAKETA et al., 2010; BAQI et al., 2010; LEE, S. Y. et al., 2017).

Inibidores análogos de adenina nucleotídeos e seus possíveis derivados possuem estrutura muito similar aos principais substratos da NPP1, possuindo baixos valores de inibição nas diversas isoformas estudadas da NPP1. Esses inibidores são organizados em seis grandes grupos para facilitar a sua identificação, proveniente das diferentes estruturas que eles podem apresentar, **(a)** α,β -metileno análogos, **(b)** β,γ -metileno análogos, **(c)** 2-metiltio-adenina análogos, **(d)** dialdeídos derivados, **(e)** diadenosina derivados e **(f)** 2'(3')-*O*-dibenzoil derivados (JOSEPH et al., 2004; MULLER et al., 2006; IQBAL et al., 2008; LAKETA et al., 2010; BAQI et al., 2010; LEE, S. Y. et al., 2017). Inibidores não baseados em adenina nucleotídeos apresentam maior capacidade de inibição da NPP1 e podem ser subdivididos em quatro grandes grupos, **(i)** polisulfonatos, **(ii)** polissacarídeos, **(iii)** polioxometalatos e **(iv)** pequenos compostos heterocíclicos. Os polisulfonatos são inibidores nucleotídeos, que apresentam ótimo desempenho de inibição com diversos substratos estudados e são comercializados sem necessidade de realização de síntese para obtenção do produto final. Nos demais casos de inibidores não nucleotídeos, necessita-se de síntese para a inserção de grupos sulfetos ou fosfato às macromoléculas orgânicas, a qual irá interagir com o sítio ativo da NPP1 gerando inibição competitiva (MULLER et al. 2006; IQBAL et al., 2008; BAQI et al., 2010). Entre os principais polisulfonatos estudados, destacam-se o Reactive Blue II e Suramin (Figura 7) como os principais, caracterizados como inibidores competitivos e não competitivos, respectivamente.

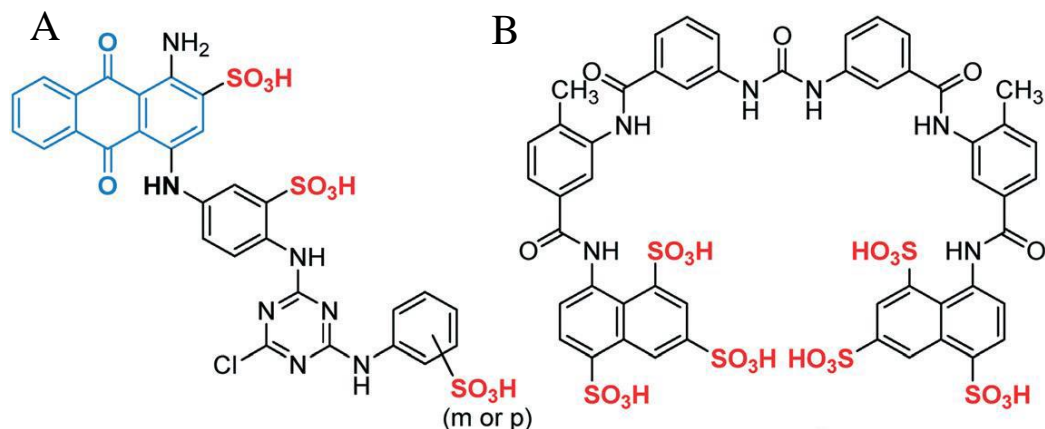


Figura 7. Estrutura da (A) Reactive Blue II e (B) Suramin apresentando os grupos inibidores heterocíclicos (azul) e polisulfetos (vermelho) presentes nas moléculas (adaptado de LEE, S. Y. e MULLER, 2017).

A escolha do inibidor ideal para a realizações de ensaios enzimáticos depende de diversos tipos de fator externos. Enzimas homologas são afetadas de formas distintas por um mesmo inibidor, de maneira que, estudos prévios para a determinação da eficácia do inibidor são imprescindíveis para a padronização de uma metodologia. Comparativamente, a Suramina apresenta menores valores de K_i , em comparação ao Reactive Blue II, em três isoenzimas de NPP1 (rato, camundongo e humana), resultando em uma inibição mais efetiva (JANSEN et al. 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Ambos inibidores, possuem mecanismo de inibição não competitiva, da NPP1 humana, para pNP-5'-TMP. A utilização de Suramina como inibidor da NPP1 nessa dissertação de mestrado tem o intuito de explorar o comportamento cinético da NPP1, em sistemas miméticos mais complexos, variando as espécies proteicas presentes na bicamada lipídica.

1.6 Eventos patológicos durante o processo de biomineralização

A elucidação desse complexo equilíbrio da homeostase Pi/PPi durante a biomineralização e regeneração óssea tem sido um grande desafio para a ciência moderna, principalmente devido aos efeitos patológicos gerados pela deficiência ou super expressão de componentes proteicos que estão diretamente envolvidos nesse processo. Diversas doenças derivadas da deturpação da relação Pi/PPi são relatadas na literatura. Um dos principais exemplos é a hipofosfatasia (HPP), onde, indivíduos que apresentam esse quadro clínico apresentam baixo TNAP expresso nos tecidos. A

HPP é hereditária e recessiva, mas casos autossômicos dominantes foram relatados em formas mais leves (MILLAN, 2016). Até o momento, um total de 335 mutações espalhadas por todo o gene ALPL foram relatados (MILLAN, 2016). A fisiopatologia da HPP se deve basicamente à falhas na mineralização dos tecidos duros, que levam ao raquitismo ou osteomalácia, além de malformações dentárias. Além disso, a mineralização reduzida das costelas resulta em insuficiência respiratória grave, que é a principal causa de morte (MILLAN, 2016; WHYTE, et al, 2016). Por outro lado, calcificação das artérias e do sistema vascular sanguíneo são observadas em indivíduos que apresentam distúrbio na expressão de ambas as enzimas. Esses sintomas geralmente são observados na doença renal crônica e na doença renal terminal (OPDEBEECK et al., 2021). Essas doenças são correlacionadas com baixas concentrações de PPi nos fluidos vasculares, que inibem a formação de fosfato de cálcio durante o transporte de íons. Assim, a super expressão de TNAP resulta em um aumento da relação Pi/PPi, diminuindo a concentração de PPi em relação à quantidade de Pi presente no plasma. Esse mesmo efeito ocorre quando temos baixa expressão de NPP1, pois a concentração de PPi no líquido corporal é reduzida e, conseqüentemente, a relação Pi/PPi aumenta, resultando em calcificação desses tecidos (MILLAN e WHYTE, 2015). A calcificação do tecido cartilaginoso está envolvida em pacientes que apresentam super expressão de NPP1 em seu corpo. Maiores concentrações de PPi são encontradas em indivíduos que apresentam essa condição, gerando a precipitação CPPD (ZHANG et al., 2006; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Diferentemente do que ocorre nos casos de HPP, a presença de alta concentração de NPP1 expresso aumenta consideravelmente a concentração de PPi até o ponto em que o produto de solubilidade (Ksp) de CPPD é atingido, o que não ocorre em quadros de HPP, pois a manutenção da concentração de PPi não é suficiente para precipitação CPPD para ocorrer (ZHANG et al., 2006; MILLAN, 2016; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Portanto, o estudo sobre o controle da relação Pi/PPi presente no plasma humano é de extrema importância para entender, controlar e prevenir esses efeitos patológicos causados pela perturbação dessa relação.

2. Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho pretende estudar o efeito cinético desempenhado por TNAP e NPP1 incorporados em diferentes proporções de proteínas, em lipossomos, a fim de determinar as quantidades de cada produto obtido durante a hidrólise de ATP, tal como o caminho reacional de cada enzima em diferentes condições bioquímicas, além da presença de 0,5mM de Suramina como inibidor da NPP1. Desta forma esta abordagem inédita acoplando estudos cinéticos de hidrólise de ATP com a mineralização (padronizada por FAVARIN et al., 2017), poderá estimar as possíveis espécies de fosfato de cálcio formado e determinar qual composição enzimática presente nos proteolipossomos é mais efetiva para a mineralização.

2.2 Objetivos específicos

- Expressar e caracterizar a NPP1, utilizando células de COS-1;
- Preparar e caracterizar os lipossomos e NPP1-proteolipossomos constituídos com diferentes composições lipídicas;
- Preparar e caracterizar lipossomos constituídos de DPPC, e proteolipossomos incorporando TNAP e NPP1 em diferentes proporções;
- Realizar ensaios, fora do estado estacionário, de hidrólise de ATP por NPP1-, TNAP- e NPP1:TNAP-proteolipossomos (em diferentes proporções) na ausência e na presença de 0,5 mM de Suramina;
- Realizar ensaios de mineralização *in vitro* por turbidez, na presença de nucleadores, de NPP1-proteolipossomos em diferentes composições lipídicas;
- Realizar ensaios de mineralização *in vitro*, de NPP1-, TNAP- e NPP1:TNAP-proteolipossomos (em diferentes proporções) constituídos de DPPC;
- Caracterizar os minerais formados utilizando a técnica de FTIR-ATR.

3. Materiais e Metodologia

3.1 Materiais

Todos os lipídios usados nesse trabalho foram obtidos pela Sigma Aldrich ®. Os sais de tris (hidroximetil) aminometano (Tris), ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperazinaetanossulfônico (HEPES), hidróxido de sódio (NaOH), Cloreto de Magnésio (MgCl₂), Sulfato de Magnésio (MgSO₄), Acrilamida, Bis-Acrilamida, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃), Nitrato de Prata (AgNO₃), Carbonato de Sódio Anidro (Na₂CO₃), Cloreto de Cálcio (CaCl₂), Cloreto de Sódio (NaCl), Cloreto de Potássio (KCl), Bicarbonato de Sódio (NaHCO₃), Sacrose e Glicose foram obtidos pela Merck ®, os sais p-nitrofenil-5'-timidinammonofosfato (pNP-5'-TMP) e p-nitrofenilfosfato (pNPP) foram obtidos pela Sigma Aldrich ®. Os solventes, ácido clorídrico (HCl) 37% (m/v), formaldeído padrão analítico, glicerol, metanol padrão analítico, ácido acético glacial padrão analítico, β-mercaptoetanol e etanol padrão analítico foram obtidos pela Merck ®. As soluções da cultura celular, foram obtidos pela Gibco ®.

3.2 Cultura de células COS-1 e inserção do plasmídeo NPP1-pCMV-Script.

O cultivo celular de células de linhagem Cellosaurus (COS-1), para a inserção e expressão da NPP1, foi realizado como descrito por Simao et al. (2010). O cultivo de celular foi realizado adicionando 200 µL de células de COS-1 em 25 mL de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), suplementado com 10% de Soro bovino fetal e 1% de aminoácidos essenciais, previamente adicionados em uma garrafa de cultivo 75 cm². As células foram cultivadas até atingirem sua total confluência, sequentemente tripsinizadas e contadas para ajustar a diluição com 1,0 x10⁷ células. Essas células foram ressuspensas em 800 µL em Tampão HEPES Salino, pH 7.5, adicionando 10 µg do plasmídeo que contém o cDNA da NPP1 e transferidas para uma cela de eletroporação. Utilizou-se do plasmídeo pCMV-Script contendo cDNA da NPP1 de camundongo, a partir do resíduo 85 ao 905, ligado à sinalização N-terminal de NPP2 de rato peptídeo (33 resíduos) e foi gentilmente cedido pelo Dr. Mathieu Bollen (Leuven, Bélgica), pela intermediação do Dr. José Luis Millan (SPB, USA). Para expressar NPP1, o fragmento de cDNA de 2,46 kb contendo a sequência de codificação da região extracelular da NPP1 de rato/camundongo foi amplificado e clonado em um vetor de expressão pcDNA3.1/D-V5-His-TOPO (Invitrogen). Para realizar a eletroporação, essa cela foi levada para o eletroporador,

aplicando uma tensão elétrica de 220 V e 960 μ F de capacitância. Em seguida, as células eletroporadas foram incubadas em banho de gelo durante 20 minutos. Após esse período, 200 μ L das células eletroporadas foram adicionadas em garrafas contendo D-MEM, suplementado com 10% de Soro bovino fetal e 1% de aminoácidos essenciais. As garrafas foram mantidas em atmosfera de 5% CO₂ controlada a 37°C. No dia seguinte a eletroporação, inicia-se o processo de seleção, adicionando 100 μ L de antibiótico G418 (solução com concentração de 100 mg/mL) em cada garrafa e mantidas na estufa, nas mesmas condições anteriores, durante um período de 4 dias. Durante este período espera-se que todas as garrafas cheguem à confluência, para que tenhamos a maior eficiência na expressão da NPP1.

3.3 Obtenção da NPP1

A purificação da NPP1 foi realizada conforme descrito por Camolezi et al. (2010) e Simao et al. (2010). Após os quatro dias de crescimento celular, as garrafas são retiradas da estufa e na sequência foi removido todo o meio de cultivo das garrafas 75 cm². O fundo da garrafa foi lavado com 25,0 mL de Tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, contendo 2,0 mM de MgCl₂. Na sequência, adicionou-se 10,0 mL, de Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,5, contendo 10,0 mM de MgSO₄ e 0,8 mM de NaCl em cada garrafa, raspando com delicadeza as células aderidas na garrafa com o auxílio de um rodinho. Essas células foram homogeneizadas em potters, através de um pistilo e centrifugadas a 1000 x g, 4°C durante 3 minutos, para a remoção de organelas, separando o sobrenadante para a obtenção das frações da membrana (FM). Então, o sobrenadante foi ultracentrifugado a 100.000 x g, 4°C durante 1 hora. O sobrenadante obtido foi descartado e o pellet foi ressuspenso em Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,4, contendo 2,0 mM de MgCl₂. Com as FM preparadas, inicia-se o processo de obtenção do extrato bruto solubilizado (EBS) da NPP1. As FM são então ajustadas para uma concentração final de proteína de 0,2 mg/mL, adicionado 1% de polidocanol (m/v) e são incubadas a 25°C, durante duas horas sob agitação branda. Em seguida, ultracentrifuga-se a 100.000 x g, a 4°C, durante uma hora, separando o sobrenadante, obtendo assim o EBS da NPP1. Esse EBS é submetido a uma última etapa, de concentração, utilizando um concentrador Amicon®, com uma membrana de exclusão de peso molecular de 100 kDa, em banho de gelo, reduzindo o volume em 1/6.

3.4 Obtenção da TNAP

A expressão da TNAP em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foi realizada e isolada como descrito por Simao et al. (2010).

3.5 Caracterização da NPP1 expressa

3.5.1 SDS-PAGE

Uma solução de Bis-Acrilamida 30% foi preparada, juntamente com Tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (para o gel de corrida), Tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (para o gel empilhamento) e uma solução de 10% de persulfato de amônio. As porcentagens de gel utilizado foram de 5% para o empilhamento e de 7% para o gel de corrida. O preparo de amostra foi realizado como descrito por Laemmli (1970) Portanto, 20 µg de NPP1 foram adicionados a uma solução contendo 0,004% de azul de bromofenol, 20% de glicerol, 4% de SDS, Tris-HCl 0,125 M e 10% de β-mercaptoetanol, aquecendo-a durante 10 minutos para a sua total desnaturação. Os parâmetros de corrida do gel foram de 55 V até a solução passar por todo gel de empilhamento, e de 85 V até o final da corrida.

Para a coloração o gel foi transferido para uma solução fixadora, contendo 40% de metanol (v/v), 12% de ácido acético (v/v) e 750 µL de formaldeído. Na sequência, o gel é lavado três vezes com etanol 50% (v/v), durante 20 minutos em cada lavagem. Adiciona-se 100,0 mL de uma solução de Na₂S₂O₃ 1,2 mM mantendo sob agitação durante 1 minuto, na sequência lavando o gel três vezes com H₂O deionizada durante 30 segundos. Em seguida, adiciona 100,0 mL de uma solução de AgNO₃ 11,5 mM sob agitação, durante vinte minutos na ausência de luz. Lavando novamente o gel com H₂O deionizada durante 30 segundos. A revelação das cores do gel é feita adicionando 100,0 mL de uma solução de Na₂CO₃ 0,3 M, contendo 25 µL de Formaldeído, sob constante agitação. A coloração é parada com a adição de uma solução 50% metanol (v/v) e 12% de ácido acético (v/v).

3.5.2 Dicroísmo Circular

Análises de dicroísmo circular foram realizadas empregando-se o equipamento J-810 Spectropolarimeter JASCO. As amostras de NPP1 foram diluídas em H₂O deionizada, resultando em uma concentração final de 0,02 mg/mL. Tampão Tris-HCl 5,0 mM, contendo 0,2 mM de

MgCl₂, foi utilizado como branco. Os parâmetros de varredura foram de 250 a 190 nm, com uma velocidade de 50 nm/min, todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade da NPP1, durante as etapas de purificação, foi determinada utilizando pNP-5-TMP como substrato, medindo sua atividade de fosfodiesterase. As condições iniciais dos ensaios foram Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,4, contendo 10,0 mM de MgCl₂ e 10,0 mM de pNP-5-TMP. A reação teve seu tempo monitorado e encerrada com a adição de 0,5 mL de NaOH 1,0 M (CIANCAGLINI et al., 2010; SIMAO et al., 2010), quantificando a liberação do íon p-nitrofenolato, como produto cromogênico, ($\epsilon_{410} = 17,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em um espectrofotômetro a 410 nm. A velocidade de reação é apresentada em U/mg. Unidade (U) expressa em nmol de íon p-nitrofenolato produzido por minuto de reação (nmol/min).

3.5.4 Dosagem de Proteína

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

3.6 Obtenção de Lipossomos e Proteolipossomos

Os lipídios DPPC, SM e Chol foram pesados e dissolvidos em clorofórmio, o qual foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução, formando um filme lipídico nas paredes do tubo, resultando em 1,5 mg/mL: DPPC sozinho; ou em proporções DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1). Os filmes foram mantidos em vácuo por 12 hs, para garantir a completa remoção do solvente. Em seguida, ambos os filmes lipídicos, devidamente rotulados, foram ressuspensos com tampão Tris-HCl 100 mM contendo 2,0 mM de MgCl₂, pH 7,4. Essas misturas foram incubadas acima da temperatura de transição dos lipídios, 70 °C, por 1 h com agitações em vortex em intervalos de 10 min., obtendo-se assim vesículas multilamelares. Para a obtenção de vesículas unilamelares grandes, utilizou-se o sistema de extrusão Liposofast (Sigma-Aldrich) com membranas de policarbonato de 100 nm. As suspensões lipídicas foram extrusadas 21 vezes, a 65 °C e as vesículas formadas foram estocadas a 4°C (BOLEAN et al., 2010; 2011 e 2015).

Foram preparadas as formas livres de detergentes da TNAP e NPP1, para isso, ambas as enzimas foram incubadas com resina Calbiosorb (0,03 mg de resina/mL de enzima), em constante agitação, durante duas horas em banho de gelo (CAMOLEZI et al., 2002). Lipossomos constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) foram incubados com NPP1 em sua forma livre de detergente (0,2 mg/mL) em Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,5, contendo 2,0 mM MgCl₂, durante uma hora a 25°C. Lipossomos DPPC foram incubados com NPP1 e TNAP nas suas formas livres de detergente (0,2 mg/mL total de enzima), em Tampão Tris-HCl 50,0 mM contendo 2,0 mM de MgCl₂, durante uma hora, a 25°C.

Todos os proteolipossomos foram centrifugados a 100.000 x g durante uma hora, a 4°C. Os pellets formados foram ressuspensos no mesmo tampão de trabalho, mantendo o volume original da incubação. A quantidade de proteína incorporada foi medida como descrito Seção 2.3.4 As atividades da NPP1 e TNAP nos sobrenadantes e no pellet ressuspensos foram medidas igual a seção 2.3.3. As condições do ensaio foram Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,4, contendo 10,0 mM de MgCl₂, 10,0 mM do p-NPP ou pNP-5'-TMP, em um volume final de 0,5 mL. A reação é interrompida com a adição de 0,5 mL de NaOH 1,0 M (CIANCAGLINI et al., 2010).

3.7 Caracterização dos Lipossomos e Proteolipossomos

3.7.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

As medidas de distribuição de diâmetro médio dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas por DLS empregando-se o equipamento Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments, sendo as amostras previamente diluídas e filtradas (Millipore MCE membrane filter - 0,8 µm), de modo a se obter um índice de polidispersão (IP) adequado.

3.7.2 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Caracterização termodinâmica dos lipossomos e NPP1-proteolipossomos, constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (ambos em razão molar), foram determinadas a partir do equipamento N-DSC II: Differential Scanning Calorimeter (Calorimetry Sciences Corporation), com uma faixa de análise de 10 °C a 90 °C, com velocidade de aquecimento/resfriamento de 0,5 °C por min., segundo descrito previamente por Bolean et al. (2015).

3.7.3 Titulação por Potencial Zeta

As análises foram realizadas empregando-se o equipamento Potencial Zeta de Superfície ZEN 1020 (Malvern Instrument), um acessório do equipamento de espalhamento de luz Zetasizer Nano ZS – Malvern Instruments. Realizou-se também a titulação dos lipossomos e proteolipossomos formados em pH 7,4, utilizou-se de NaOH 0,1M e HCl 0,1M como soluções titulantes.

3.7.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Amostras de lipossomos e proteolipossomos (preparadas sob o mesmo condições descritas na Seção 3.5) foram filtradas através de membranas Millipore® com poro de 0,8 µm de tamanho e estabilizadas pela adição de glutaraldeído 1:1 (v/v) (concentração final de ~ 5%) para evitar a deformação e ruptura da vesícula. As misturas foram homogeneizadas e, em seguida, 5 µL da amostra foi colocada em contato com uma mica recém-clivada, deixados para secar à temperatura ambiente. As micrografias por AFM foram obtidas pelo equipamento Shimadzu SPM-9600 Scanning Probe Microscopy (Shimadzu Corporation, Japan) operando em modo dinâmico. A varredura foi realizada ao ar a 25°C usando sondas de silício, com frequência de ressonância variando de 324 a 369 kHz (Nanosensors™, Suíça). A taxa de varredura foi definida entre 0,2-0,3 Hz para evitar deformações e/ou danos nas vesículas causada pela ponta. Os valores das constantes de mola do cantilever foi de aproximadamente 38 ± 8 N/man e os valores de suas frequências de ressonância foram de aproximadamente 336 ± 67 kHz. Os valores de rugosidade foram determinados pelo software SPMOffline, da Shimadzu (BOLEAN et al., 2017b).

3.8 Cinética enzimática da hidrólise de ATP por NPP1- e TNAP-proteolipossomos.

As condições iniciais dos ensaios foram Tampão Tris-HCl 50,0 mM, pH 7,4, contendo 2,0 mM de MgCl₂ e 2,0 mM ATP (CIANCAGLINI et al., 2010). A hidrólise de ATP foi realizada pela TNAP-, NPP1-, ou NPP1:TNAP- (com proporções diferentes), presentes nos proteolipossomos, iniciadas pela adição da enzima, incorporadas as vesículas, e finalizadas usando 0,5 mL de tricloroacético (TCA) 30% (v/v), nos intervalos de tempo apropriados. Ensaios de inibição enzimática também foram realizados usando as mesmas condições descrita acima e com a adição de 0,5 M de Suramina como inibidor específico da NPP1. Os tubos da reação foram centrifugados a 4.000 x g, usando o sobrenadante para a quantificação de ATP, ADP e AMP por HPLC.

3.9 Determinação de nucleotídeos por HPLC

Os nucleotídeos foram separados e quantificados por HPLC, injetando uma alíquota de 20,0 µL da amostra em uma coluna de fase reversa C18 (Shimadzu) e usando fluxo de 1,5 mL/min, com uma fase móvel composta de Tampão fosfato de potássio 50,0 mM, pH 6,4, contendo 5,0 mM de hidrogeno sulfato de tetrabutilamônio, e metanol 18% (v/v). Foi monitorada a absorvância em 260 nm continuamente, e a concentração de nucleotídeo foram determinadas pela área dos picos obtidos, em seus respectivos tempos de retenção. Todas as determinações foram realizadas em triplicatas. Controles da hidrólise espontânea do ATP em ADP e AMP foram incluídas em cada tempo de ensaio, sendo usados também como controle nas análises de HPLC. Foram feitas, uma curva padrão para ATP (até 0,7 nmol), ADP (até 0,8 nmol) e AMP (até 0,8 nmol) (SIMAO et al., 2010).

3.10 Síntese de nucleadores ACP e PS-CPLX.

A síntese de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e fosfatidilserina – cálcio/fosfato complexo (PS-CPLX) de foi realizada conforme descrito por Genge, et al (2007), com as adaptações de Simao et al. (2019).

3.11 Mineralização *in vitro* por análise de turbidez

NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (ambos em razão molar) e DPPC-lipossomos incorporados com -NPP1, -TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções), na ausência e presença de 0,5 M de Suramina foram utilizados nesse experimento. Os proteolipossomos foram incubados em Tampão de linfa cartilaginosa sintética (LCS) contendo 2,0 mM Ca^{2+} , 104,5 mM Na^+ , 133,5 mM Cl^- , 63,5 mM sucrose, 16,5 mM Tris, 12,7 mM K^+ , 5,55 mM glicose, 1,83 mM HCO_3^- , 0,57 mM SO_4^{2-} e 2,0 mM Mg^{2+} a pH 7.5, na ausência de nucleador ou na presença de nucleador ACP ou PS-CPLX. O ensaio foi realizado usando 2,0 mM de ATP, como fonte de Pi (SIMAO et al., 2019; FAVARIN et al., 2020). Enzimas em solução e os respectivos lipossomos foram usados como controle das medidas de turbidez. A propagação/precipitação do mineral foi acompanhada em uma microplaca de 96 poços, por análises de turbidez a 340 nm usando um leitor de microplacas (modelo SpectraMax® M3, Molecular Devices LLC, San Jose, CA). As análises de turbidez foram acompanhadas minuto a minuto durante 24 horas de incubação, a 37°C. Os resultados foram normalizados descontando o

primeiro valor de turbidez obtido para cada proteolipossomo. Para isso, Genge et al. (2007), sugeriu a adoção de parâmetros qualitativos, aplicando uma função sigmoïdal aos dados de mineralização, detalhando: os tempos iniciais (t_i), e finais (t_f) de propagação, a taxa máxima de propagação ($t_{MaxRate}$), o máximo de crescimento (U_{max}), velocidade média (U_{med}) e o potencial de nucleação (NP) de cada curva. Onde U, indica a o valor de turbidez obtido em 340 nm.

3.12 Infravermelho com Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

As amostras dos minerais formados como descrito na Seção 2.11, foram colocadas em um cristal de germânio ($4000-600\text{ cm}^{-1}$) de um acessório de refletância total atenuada, para identificar os grupos químicos encontrados no espectroscópio FTIR (modelo IRPrestige-21, Shimadzu CO., Tokyo, Japan). A eficácia da mineralização *in vitro* foi determinada pelo cálculo da razão entre as áreas das bandas correspondentes do estiramento assimétrico do grupo PO_4^{3-} em $\sim 1032\text{ cm}^{-1}$ e da banda de carbonila (C=O) presente nos fosfolipídios em $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$, usado como referência interna (SIMAO et al., 2019, FAVARIN et al., 2020).

4. Resultados e Discussão

4.1 Expressão e Caracterização da NPP1.

As células de COS-1 foram retiradas do tubo criogênico onde estavam congeladas e transferidas para garrafas contendo meio D-MEM suplementado com 10% de SBF e 1 % de aminoácidos essenciais. A escolha desse meio de cultivo deve-se a ambientação adequada de nutrientes necessários para as células crescerem corretamente. Dulbecco e Freeman (1959), modificaram o Meio Essencial Mínimo de Águia, quadruplicando as concentrações de aminoácidos e vitaminas presentes nesse meio e aplicaram em um cultivo de células COS-1, evitando que a presença do vírus do polio destrua essas células em cultivo *in vitro*, resultando no que conhecemos hoje como D-MEM. A escolha dessa linhagem celular é diretamente correlacionada com o plasmídeo escolhido, pois a sequência específica de sinalização, “primers”, regiões iniciadoras, mecanismos de regulação da expressão e principalmente, a não toxicidade desse plasmídeo no meio intracelular, previamente já padronizados (SIMAO et al., 2010). A construção do plasmídeo de expressão se baseou na presença do vetor de expressão pCMV-Script (Figura 8).

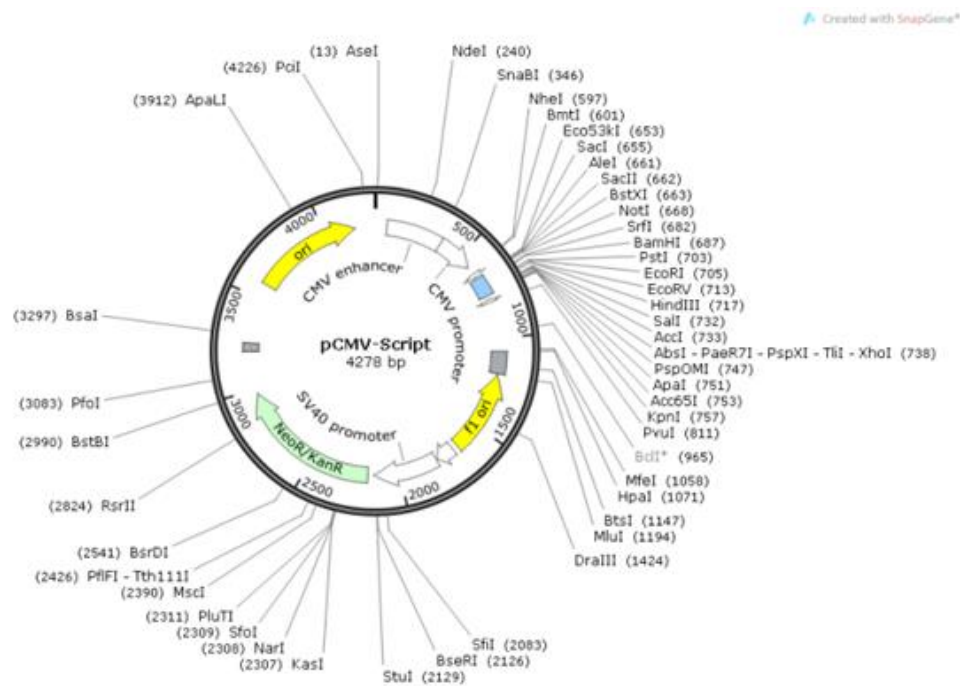


Figura 8. Mapa do vetor de expressão pCMV-Script. Fonte: SNAPGENE

Como descrito em Materiais e Métodos 3.2, com a obtenção do plasmídeo NPP1-pCMV-Script, removendo a sua região transmembrana, adicionando dois fragmentos que expressam a fosfatase alcalina de placenta (PLAP), onde um peptídeo de sinalização é responsável para a expressão de uma âncora de GPI na região C-terminal da NPP1 e outro para a codificação do peptídeo de sinal da PLAP (SIMAO et al., 2010) (Figura 9). Observa-se uma mudança na orientação da NPP1 em sua presença na membrana, com o domínio NUC mais próximos da região da membrana, e conseqüentemente deixando o domínio catalítico distante dessa região.

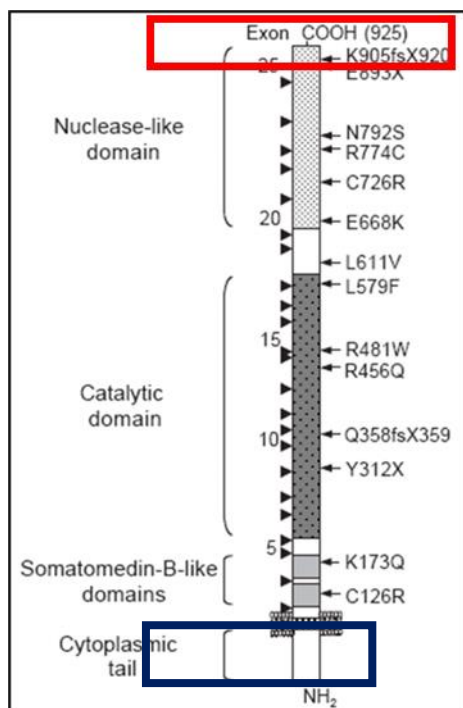


Figura 9. Modelo dos domínios presentes na NPP1, destacando as regiões (vermelho) C-terminal havendo a inserção da âncora de GPI e (azul) N-terminal, onde houve a remoção do domínio catalítico. (Adaptado de JANSEN et al., 2012)

A opção de ancorar a NPP1 com GPI deve-se pelo fato de estudos de purificação da TNAP terem sido padronizadas pela solubilização de 1% de polidocanol (CIANCAGLINI et al., 1990; SIMAO et al., 2010), e sua presença em lipossomos comprovarem a facilidade de sua inserção pelo método de inserção direta, mantendo sua atividade catalítica (BOLEAN et al., 2010; SIMAO et al., 2010). Então, células COS-1 foram cultivadas e passados 3 dias, observou-se a adesão das células nas garrafas, e, subsequente, o início da confluência das células (Figura 10). A partir do seu núcleo, visto em branco na Figura 10, células de COS-1 aderiram ao fundo da garrafa e estão proliferando

saudavelmente, indicando o acerto ao usar o meio D-MEM suplementado. Porém, pela qualidade da imagem, não dá para observar o formato e nem o tamanho pela forma de sua membrana. Atingindo a confluência, inicia-se o procedimento de eletroporação do plasmídeo NPP1-pCMV-Script.



Figura 10. Células COS-1 saudáveis, aderidas em garrafas de cultura celular, no 3º dia de crescimento. As imagens foram tiradas empregando-se um Microscópio ZEISS com objetiva de 10x/0,25 Ph1.

Há várias metodologias de transfecção de um plasmídeo para uma célula, sendo ela procariótica ou eucariótica. Essas metodologias são classificadas em três classes principais: (a) biológicas; (b) físicos e (c) químicos. (a) Metodologia biológicas estão diretamente entrelaçadas a presença de um vetor baseado em vírus (PURCELL et al., 1996; ANDERSON et al., 1998) onde proteínas específicas de cada processo ajudam na inserção do plasmídeo desejado dentro da célula hospedeira. (b) Enquanto físicos são processos que tendem a abrir poros na membrana plasmática das células e inserir adentro o plasmídeo de maneira mecânica, os exemplos mais clássicos são o choque de temperatura e a eletroporação (NEUMANN et al., 1982). Por fim, (c) as técnicas químicas se resumem a adição de alguma solução salina, exemplo da precipitação por fosfato de cálcio (GRAHAM et al., 1973), agentes terceiros como lipossomos (DIMITRIADIS, 1978). O

método padronizado e aplicado pelo nosso laboratório de pesquisa é o de eletroporação, que consiste em uma aplicação de um pulso de campo elétrico, gerando uma cavidade, ou permeabilização na membrana plasmática da célula, ocasionando em um fluxo instantâneo entre as regiões intra e extra celular. Para reparar a membrana, são necessárias baixas temperaturas, que são fornecidas através de banho de gelo.

Com as células eletroporadas e iniciando seu processo de proliferação, para garantir que apenas as células eletroporadas com sucesso cresçam, é necessário adicionar o antibiótico G-418, pois, o plasmídeo pCMV-Script possui um sítio de resistência a esse antibiótico em sua composição (SIMAO et al., 2010). Portanto, células que não possuem esse plasmídeo não crescerão. Esse efeito pode ser observado pelo microscópio, ou através da coloração do meio de cultura (Figura 11), pois, quando ocorre a mudança de cor de vermelho para amarelo, indica o crescimento celular.

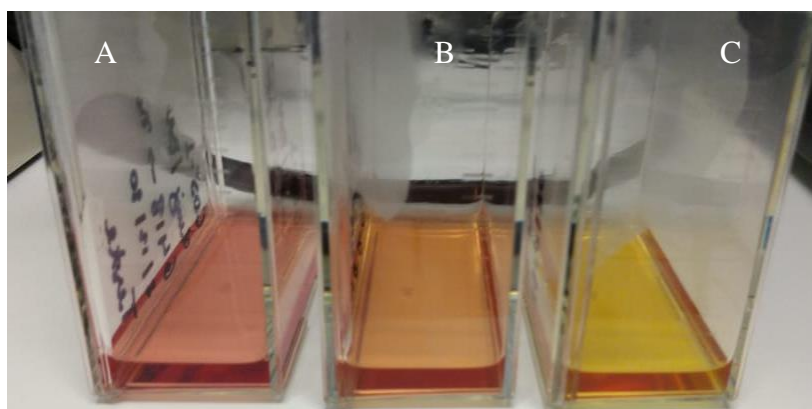


Figura 11. Culturas celulares de COS-1 contendo 100 μ L de G-418: (A) cultura na ausência dos plasmídeos de expressão; (B) cultura contendo apenas o pCMV-Script e (C) cultura com o plasmídeo de expressão NPP1-pCMV-Script.

Portanto, observa-se que nas células COS-1 não eletroporadas (Figura 11.A) apresentam a mesma coloração inicial do meio de cultura, indicando que a presença do antibiótico inibiu seu crescimento. Em contrapartida, células eletroporadas com o plasmídeo vazio e com o cDNA da NPP1 (Figura 11.B e 11.C, respectivamente) apresentaram alteração da coloração do meio de cultura ao final dos 4 dias, indicando o crescimento celular. A necessidade de 4 dias de cultura é para que ocorra a total confluência das células aderidas na garrafa, assegurando que o crescimento celular foi eficaz e que haja tempo suficiente para que todas as células que contém o vetor possam realizar o processo de expressão proteica (HANCOCK, 2003; SIMAO et al., 2010).

Passados os 4 dias de expressão da NPP1, inicia-se o procedimento de purificação. Como essa NPP1 é uma quimera, possui um sítio de expressão de âncoras GPI no seu constructo, ela se encontra na membrana plasmática das células, sendo assim, a obtenção da FM é um processo essencial para que a purificação seja eficiente (CAMOLEZI et al., 2002; SIMAO et al., 2010; CIANCAGLINI et al., 2010).

Após o isolamento conforme padronizado Simao et al. (2007) e descrito em Materiais e Métodos 3.3, é necessária outra etapa de purificação, pois co-existem espécies proteicas diferentes da NPP1 na FM. Assim, adotou-se o procedimento desenvolvido por Ciancaglini et al. (1990), permitindo aproveitar da presença de uma âncora de GPI na NPP1 para facilitar sua purificação. As condições ótimas de solubilização foram com 0,2 mg/mL de proteína total, com 1% de polidocanol sob agitação leve durante 1 hora, para garantir que haja uma solubilização parcial de proteínas presentes na FM. Segundo Ciancaglini et al. (1990), essa portagem de polidocanol é suficiente para que apenas algumas proteínas se solubilizem, mantendo a grande maioria na FM. Para determinar o sucesso desse procedimento de purificação, em cada etapa do processo foi quantificada a proteína (HARTREE, 1972) e determinada a atividade enzimática (ver Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de proteína e atividade da NPP1 (utilizando pNP-5-TMP como substrato). Análise das etapas de purificação da NPP1 a partir de células (COS-1) contendo plasmídeos NPP1:pCMV-Script, (FM) seguido da obtenção da fração de membrana, resultando em sobrenadante e pellet. Seu (EBS) extrato bruto a partir da solubilização parcial em 1% de polidocanol e finalizando a amostra (NPP1) concentrada em Amicon 100kDa (NPP1).

Amostra	Volume da Fração (mL)	[Proteína] (mg/mL)	Total de Proteína (mg)	Recuperação Proteína (%)	[Atividade] (U/mL)	[Atividade] (U/mg)	Quantidade Total (U)	Fator de Purificação
COS-1	40,0	1,475 ± 0,01	59,0	100	0,0007 ± 3x10 ⁻⁶	0,005 ± 0,0003	0,028	1,00
FM	10,0	0,713 ± 0,005	7,1	12,1	0,376 ± 0,003	0,026 ± 0,0012	3,76	5,2
EBS	35,65	0,056 ± 0,001	2,0	3,4	0,89 ± 0,006	15,91 ± 0,003	31,72	3182,0
NPP1	6,0	0,247 ± 0,002	1,5	2,5	11,22 ± 0,007	45,62 ± 0,005	273,72	9124,0

A recuperação de proteína nos mostra a porcentagem de NPP1 em cada etapa de purificação, a partir da massa total inicial. Observa-se que o percentual recuperado da NPP1 foi de 2,5%, sendo perceptível o grau de eficiência do processo de purificação pela adição de 1% de polidocanol que solubiliza preferencialmente proteínas com GPI.

Analisando a capacidade de hidrólise do pNP-5-TMP em cada etapa da obtenção da NPP1 purificada, podemos observar um aumento gradativo da atividade (U/mL), na atividade específica (U/mg) e da quantidade de U total. A atividade específica é usualmente usada para medir o rendimento cinético de uma enzima perante um determinado substrato. Então, para mensurar a evolução da quantidade de produto obtido em cada etapa, calculou-se o fator de purificação, que é a razão entre a atividade específica do extrato bruto, pela atividade específica de cada etapa. Assim, observa-se que na FM há uma relação de 5,2, comparado com o obtido inicialmente. Já no EBS, essa relação é de 3182,0, apresentando um aumento significativo de produto gerado na cinética enzimática, a partir da quantidade de proteína presente no ensaio. Esse aumento da relação obtido entre EBS e FM, deve-se ao fato da solubilização com polidocanol, resultando em maiores quantidades de NPP1 em solução, conseqüentemente, aumentando a atividade específica. Por fim, após o processo de concentração da NPP1 purificada, essa relação é de 9124,0, mais que o dobro do que foi obtido no EBS. Portanto, essa metodologia de purificação mostrou ser eficaz na obtenção da NPP1, aumentando o grau de rendimento e aumentando sua capacidade catalítica.

Obtida a NPP1, realizou-se uma SDS-PAGE para determinar a pureza da NPP1 durante o processo de purificação (Figura 12). Nesse experimento, utilizou-se padrões (FM e EBS) para determinar se o processo de purificação deixou algum vestígio em alguma etapa, pela presença/ausência da banda da NPP1, em 100 kDa, em cada amostra aplicada no gel.

A diferença na intensidade das bandas é proveniente da concentração final proteica inserida no gel. Para géis que serão corados com nitrato de prata, a sensibilidade da metodologia é na faixa de 10 µg de proteína, portanto, para uma melhor resolução do gel, todas as amostras foram padronizadas para ser inserido 10 µg em cada poço de análise.

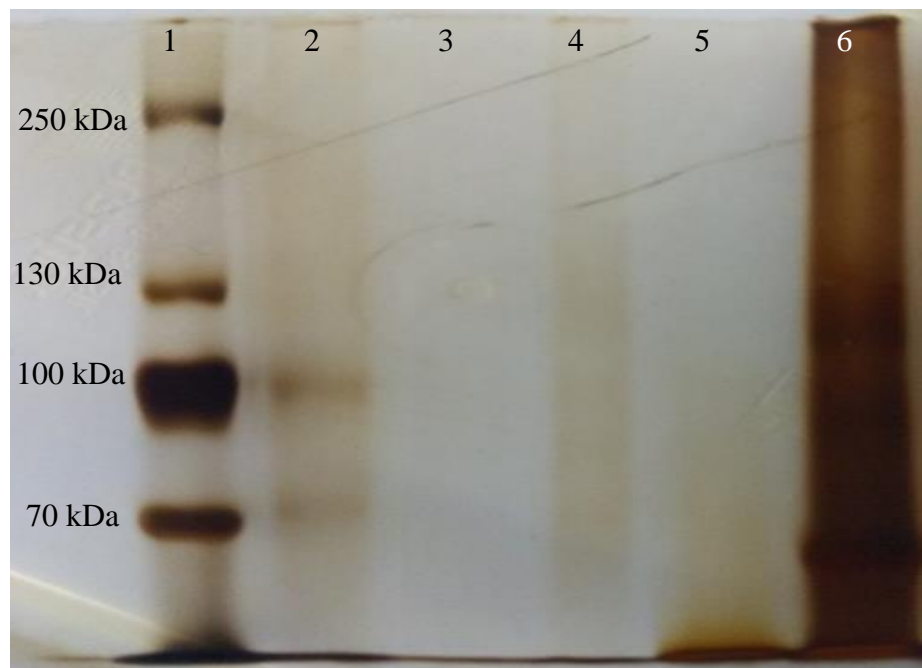


Figura 12. Eletroforese SDS-Page realizado com 7% de Acrilamida, com o (1) padrão molecular, (2) NPP1 solubilizada e concentrada em Amicon, (3) eluido obtido do processo da concentração, (4) EBS, (5) Pellet obtido do processo de solubilização da FM e (6) FM.

Devido essa diferença de intensidade, vemos que a FM apresenta uma mistura proteica, vista no gel através de sua coloração em toda a faixa de peso molecular apresentada. Porém, há como observar algumas bandas mais nítidas na FM, principalmente na região em 70 e 100 kDa, indicando que nessa etapa, já houve exclusão de algumas proteínas. Sequencialmente, vemos que o EBS apresenta leves bandas nas regiões de 100 kDa, porém, muito difícil de se observar pela baixa concentração de proteína obtida nessa etapa.

O pellet obtido a partir do EBS não apresenta bandas proteicas na região analisada. Por fim, na última etapa de purificação, observa-se que a NPP1 foi retida no filtro, não apresenta nenhuma banda proteica acima de 100 kDa, e em contra partida, é possível observar duas bandas, uma em ~100 kDa e outra em 70 kDa.

A primeira banda indica a presença de NPP1 e a segunda indica um possível interferente que permaneceu durante o processo de purificação. De qualquer forma o trabalho foi continuado com a amostra obtida até o processo de obtenção dos proteolipossomos, pois somente proteína que

possuem âncora de GPI é inserida na bicamada de lipossomos, eliminando este contaminante (CAMOLEZI et al., 2002; SIMAO et al., 2010)

A estrutura secundária das proteínas é específica de cada uma delas, dependendo das interações intramoleculares dos resíduos de aminoácidos da sequência primária, portanto, estudar e entender como estas ocorrem é de extrema importância (SREERAMA e WOOD, 2004; GREENFIELD, 2007). Assim, a técnica de dicroísmo circular é empregada para a obter o espectro UV-Vis em regiões onde ocorre o desvio da luz polarizada. Esse desvio deve-se a ligação peptídica presente na estrutura proteica, e a partir da diferença de absorvância proveniente desse desvio de luz polarizada, que é obtido os valores de elipticidade, que por sua vez, são característicos de cada tipo de conformação presente na estrutura secundária proteica.

Portanto, medidas de dicroísmo circular (DC) foram realizadas para a determinação da estrutura secundária da NPP1 obtida. Porém, como descrito anteriormente nessa seção, a ausência do domínio transmembrana da NPP1 expressa, resulta em alterações nas quantidades de β -folha e α -hélice, além da presença de algum contaminante.

Com essa informação estrutural em mente, a determinação das porcentagens de β -folha e α -hélice foi utilizando o site RCSB Protein Data Bank (PDB), aplicado a cada domínio presente na NPP1 mutante expressa, assim, estimando a porcentagem de cada tipo de estrutura, a partir da caracterização cristalina que consta no site, temos que, no domínio SMB1 (88-127 resíduos) com 22,5 e 15%, domínio SMB2 (128-168 resíduos) com 24,4 e 14,6%, domínio catalítico (186-580) com 34,4 e 15,7%, e domínio NUC (629-905) 25,6 e 15,9% de α -hélice e β -folha respectivamente, em cada domínio (JANSEN et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017; DENNIS et al., 2020).

Ao todo, somando as estruturas em cada domínio pelo total de resíduos de aminoácidos gera um total 30,0 e 15,6% de α -hélice e β -folha, respectivamente. Então, foi realizado o dicroísmo circular da NPP1 expressa (Figura 13), para analisar a estrutura secundária, a partir das alterações no DNA de expressão.

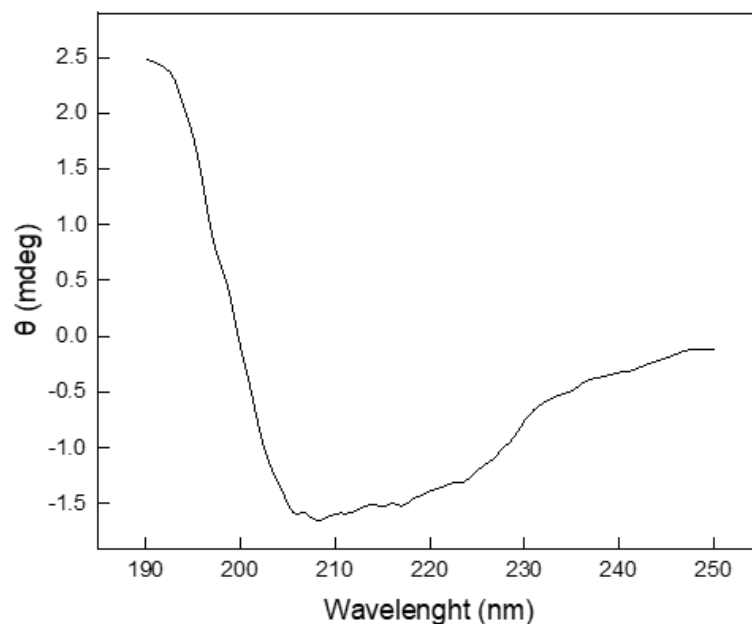


Figura 13. Espectro de DC obtido da NPP1 0,02 mg/mL.

Os padrões de DC de proteínas com estrutura α -hélice são os mais comuns de serem observados, pois, apresentam duas bandas negativas em 210 e 222 nm e uma banda positiva em 190 nm, enquanto, conformações β -folha mais comuns, apresentam apenas uma absorção negativa em 215 nm e uma banda de absorção positiva em 195 nm (SREERAMA e WOOD, 2004; GREENFIELD, 2007). A partir do espectro de CD da NPP1, é possível estimar a quantidade de α -hélice a partir do valor obtido em 222 nm, portanto, obteve-se 25% de α -hélice presente em sua estrutura (KELLY et al., 2005). Valores muito similares foram obtidos para a estrutura nativa da NPP1, que é de 30%. Porcentagem de estrutura β -folha foram determinadas utilizando website DICHROWEB, obtendo 13,4% presente na NPP1 expressa. Na estrutura nativa da NPP1 é encontrado 15,4% dessa conformação. Outros métodos de desconvolução são descrito na literatura, utilizando softwares pagos ou gratuitos (BOHM e JAENICKE, 1992; SREERAMA e WOOD, 2000)

4.2 Obtenção de NPP1-proteolipossomos em diferentes composições lipídicas.

Iniciamos os estudos de incorporação da NPP1 com lipossomos constituídos por DPPC, por ser um lipídeo mais comum e abundante em membranas. A incorporação da NPP1 nos lipossomos é termodinamicamente favorável, pois com a remoção do polidocanol do extrato bruto solubilizado da NPP1, ocorre um aumento da entropia pela exposição dos ácidos graxos presentes

na ancora de GPI ao meio aquoso, direcionando a sua inserção na monocamada externa dos lipossomos, estabilizando termodinamicamente (BOLEAN et al., 2015 e 2017a; FAVARIN et al., 2017). Para caracterização desses proteolipossomos, foi determinada a quantidade de NPP1 incorporada nos lipossomos constituídos por DPPC. Posteriormente foi avaliado o diâmetro médio das vesículas, através da técnica de DLS, determinando também a sua polidispersividade (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização biofísica e bioquímica dos lipossomos e NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC. Os lipossomos e proteolipossomos foram obtidos conforme descrito em materiais e métodos.

Vesículas de DPPC	[NPP1] ($\mu\text{g/mL}$)	Diâmetro Médio (nm)	IP	$\Delta H_{(\text{trans})}$ (kcal/mol)	Tc ($^{\circ}\text{C}$)	$\Delta t_{1/2}$
Lipossomos	-	108,2	0,073	5,81	38,3	2,6
NPP1-proteolipossomo	100,5 \pm 9,5	152,8	0,302	4,3	39,8	4,1

Obteve-se um diâmetro médio para lipossomos constituídos por DPPC de 108,2 nm. Este valor é bem próximo ao diâmetro dos poros da membrana de extrusão, assim, a metodologia apresenta um controle de tamanho adequado. Essa afirmação é confirmada pelo seu respectivo valor do índice de polidispersão (IP), mostrando ser um valor baixo, significando que a suspensão apresenta homogeneidade nos diâmetros nas vesículas formadas (Tabela 2).

NPP1-proteolipossomo apresenta uma incorporação de 100,5 $\mu\text{g/mL}$ de NPP1, resultando em um diâmetro médio de 152,8 e um IP de 0,302. Segundo Bolean et al. (2020), esse aumento pode ser justificado pela incorporação de proteína ao lipossomo. Como a incorporação da NPP1 não é homogênea, ocasiona em variações do diâmetro médio na suspensão, resultando em um alto valor do IP (SEBINELLI et al., 2019; FAVARIN et al., 2020; VESCHI et al., 2020). Titulação das vesículas formadas por Potencial Zeta foram realizadas (Figura 14), na intenção de averiguar a carga da dupla camada elétrica em diferentes pH, calculando seu ponto isotérico.

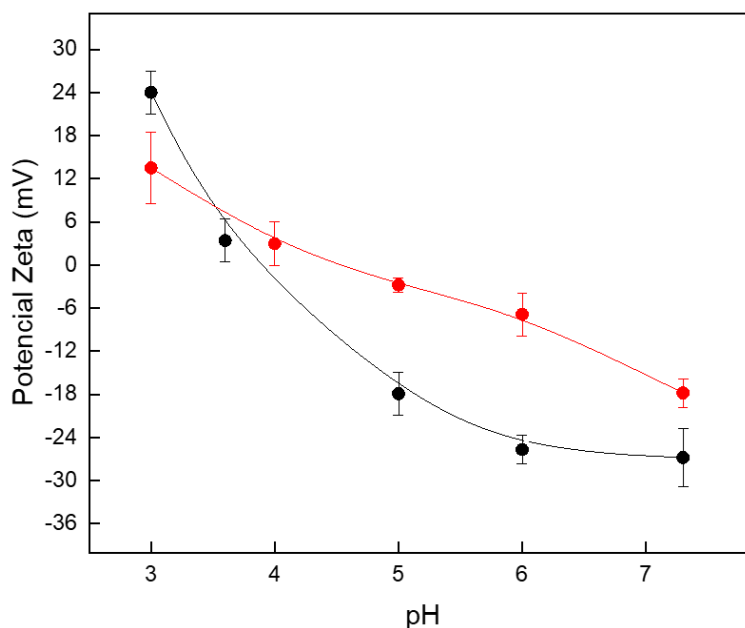


Figura 14. Eletrograma de (preto) lipossomos e (vermelho) NPP1-proteolipossomos, constituídos por DPPC na faixa de pH de 7,4 a pH 3,0. Todas as análises foram realizadas em triplicata, conforme descrito em material e método.

Observa-se que em pH neutro, lipossomos constituídos por DPPC apresentam valores mais negativos em relação quando NPP1 é incorporada, porém, em pH mais ácidos, valores mais positivos de potencial zeta são observados nos lipossomos. O ponto isoelétrico foi determinado pela averiguação do valor de pH que apresenta potencial zeta igual a zero, portanto, o ponto isoelétrico dos lipossomos é de 3,9, enquanto 4,5 foram obtidos para NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC. Indicando que a presença de NPP1 desloca o ponto isoelétrico das vesículas para pH mais próximos do que é encontrado fisiologicamente. Esse fenômeno é observado pela alteração de suas cargas superficiais dependendo da condição do microambiente. O ponto isoelétrico permite avaliar em que pH a vesícula se encontra mais instável, ou seja, susceptível a sofrer agregações. Isso se deve pelo fato das relações intermoleculares de Dispersão de London serem mais predominantes entre duas vesículas com carga residual superficial próximas a zero (YINGCHONCHAROEN et al., 2016). Outro ponto importante a ser destacado é que o deslocamento observado no ponto isoelétrico observado para os NPP1-proteolipossomos se deve à presença da proteína na interface que afeta a carga superficial

Análises de calorimetria foram realizadas nas vesículas, obtendo os termogramas de transição de fase, como é visto na Figura 15. Lipossomos constituídos por DPPC apresentaram variação da entalpia de transição (ΔH_{trans}) de 5,81 kcal/mol, com uma temperatura de transição (T_c) de 38°C e a largura da meia altura do pico ($\Delta t_{1/2}$) de 2,6. Segundo Bolean et al. (2010), DPPC-lipossomos apresentou valor de ΔH_{trans} de 7,63 kcal/mol, com uma T_c de 41,5°C e $\Delta t_{1/2}$ de 1,81.

Os parâmetros termodinâmicos variam dependendo do tampão e força iônica do meio (entre outros) usados nos ensaios, mas os valores encontrados são relativamente próximos dentre os lipossomos formados por DPPC são descritos na literatura (BOLEAN et al., 2010 e 2011).

O ΔH_{trans} fornece o quanto de energia é necessário para que a transição de fase ocorra, de gel para líquido cristalino (BOLEAN et al., 2010). Portanto, torna-se um parâmetro valioso para avaliar o efeito da fluidez na incorporação e atividade da NPP1 presente aos lipossomos. Os valores de ΔH_{trans} para NPP1-proteolipossomo foram de 4,3 kcal/mol, a T_c foi de 39,8 °C, e por fim, seu $\Delta t_{1/2}$ de 4,1.

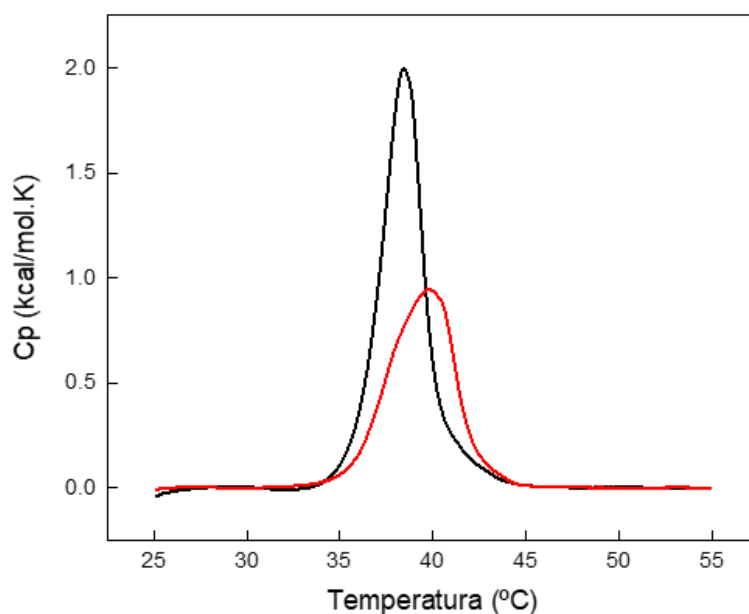


Figura 15. Termogramas de (preto) lipossomos e de (vermelho) NPP1-proteolipossomos, constituídos de DPPC, com concentração lipídica final de 0,75 mg/mL.

A diminuição da ΔH_{trans} encontrada para os NPP1-proteolipossomo é observada pela diminuição da altura do pico, assim como o deslocamento do pico provocado pelo aumento da T_c . Mas o parâmetro principal de ser visto nesta perspectiva é o $\Delta t_{1/2}$, pois, vemos que a largura da meia altura do pico nos mostra a cooperatividade. Este parâmetro é resultante das dispersões de London da região hidrofóbica da bicamada lipídica, portanto, a NPP1 incorporada nesses lipossomos interfere diretamente nas interações lipídio:lipídio, alargando o pico de transição (BOLEAN et al., 2010).

Estudos para a TNAP incorporada à lipossomos constituídos de DPPC, quando clivada do proteolipossomos através da o deslocamento do pico de transição e a mudança dos parâmetros termodinâmicos $\Delta t_{1/2}$ não foram observados. Esse efeito pode ser derivado pela presença de duas âncoras de GPI na estrutura da TNAP por ser uma forma dimérica, deixando mais rígida a sua conformação na superfície da vesícula, portanto não interferindo significativamente nas propriedades termodinâmicas (BOLEAN et al., 2010). No caso da NPP1 expressa e obtida em nosso laboratório, temos a presença de apenas uma âncora de GPI, o que pode ocasionar maior mobilidade, podendo haver interações entre a cadeia peptídica com a interface lipídica, afetando assim, com maior intensidade os parâmetros termodinâmicos.

Análises de AFM foram realizadas para identificar a morfologia dos NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC. Segundo Bolean et al. (2017b), a morfologia de lipossomos constituídos por DPPC possui características esféricas, lisas e homogêneas. Da mesma maneira, a presença do glutaraldeído em lipossomos, empregado na nossa metodologia para obtenção das imagens, não alteram significativamente suas propriedades de fluidez e termodinâmicas (BOLEAN et al., 2017b, SEBINELLI et al., 2019). Micrografias de NPP1-proteolipossomos estão mostradas na Figura 16 e observou-se a presença de protusões em toda a região de sua superfície.

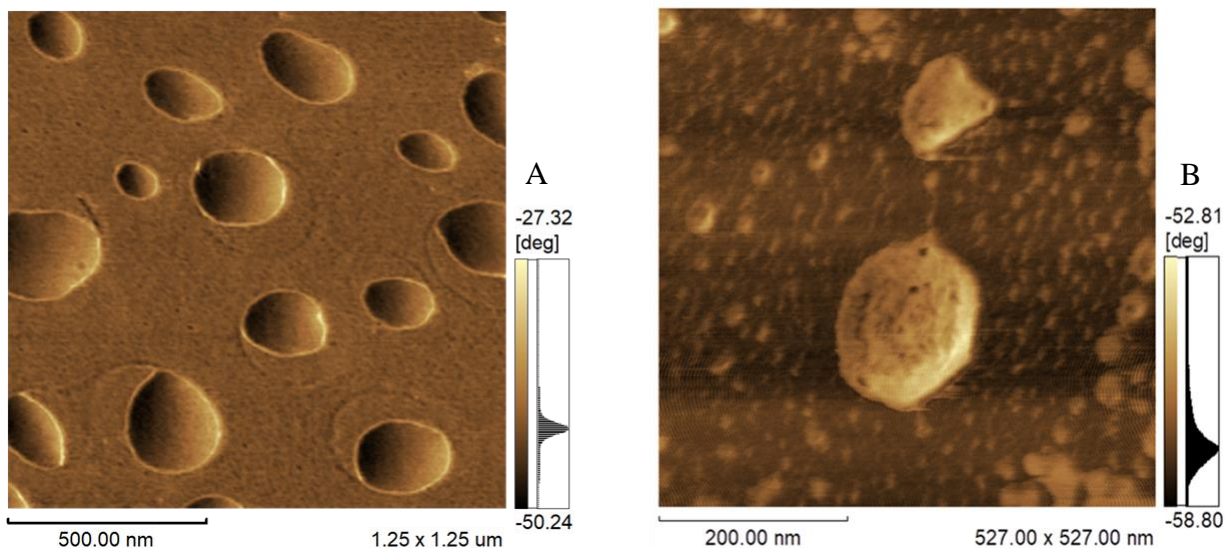


Figura 16. Micrografias de fase 2D de (A) lipossomo e (B) NPP1-proteolipossomos, constituídos por DPPC.

Observando a imagem de AFM por fase, vemos que as vesículas apresentam diâmetro médio em torno de 200 nm, com protusões espalhadas pela superfície do proteolipossomos (Figura 17. B). Esse aumento significativo do diâmetro médio dos proteolipossomos deve-se pelo microambiente onde esse parâmetro é determinado. Pois em análises de DLS, os proteolipossomos estão em ambiente aquoso, e em AFM em superfícies solidas sustentada pela presença de glutaraldeído, em contato com o ar ambiente, resultando em deformações de seu diâmetro. (BOLEAN et al., 2017b). Já foi relatado anteriormente que a presença de uma proteína de membrana ou ancorada altera significativamente a rugosidade de lipossomos constituídos por DPPC, aparecendo protusões em toda superfície, possuindo altura e diâmetro variados, dependendo do tipo de proteína e da sua metodologia de inserção (BOLEAN et al., 2017b; SEBINELLI et al., 2019). Portanto, a presença da NPP1 em DPPC-lipossomos esféricos e lisos (Figura 16. A), também resultou nesse fenômeno, observado por imagens de topografia 3D (Figura 17. A) e traçando os perfis das maiores protusões foram para identificar sua altura e seu diâmetro (Figura 17. B, C e D)

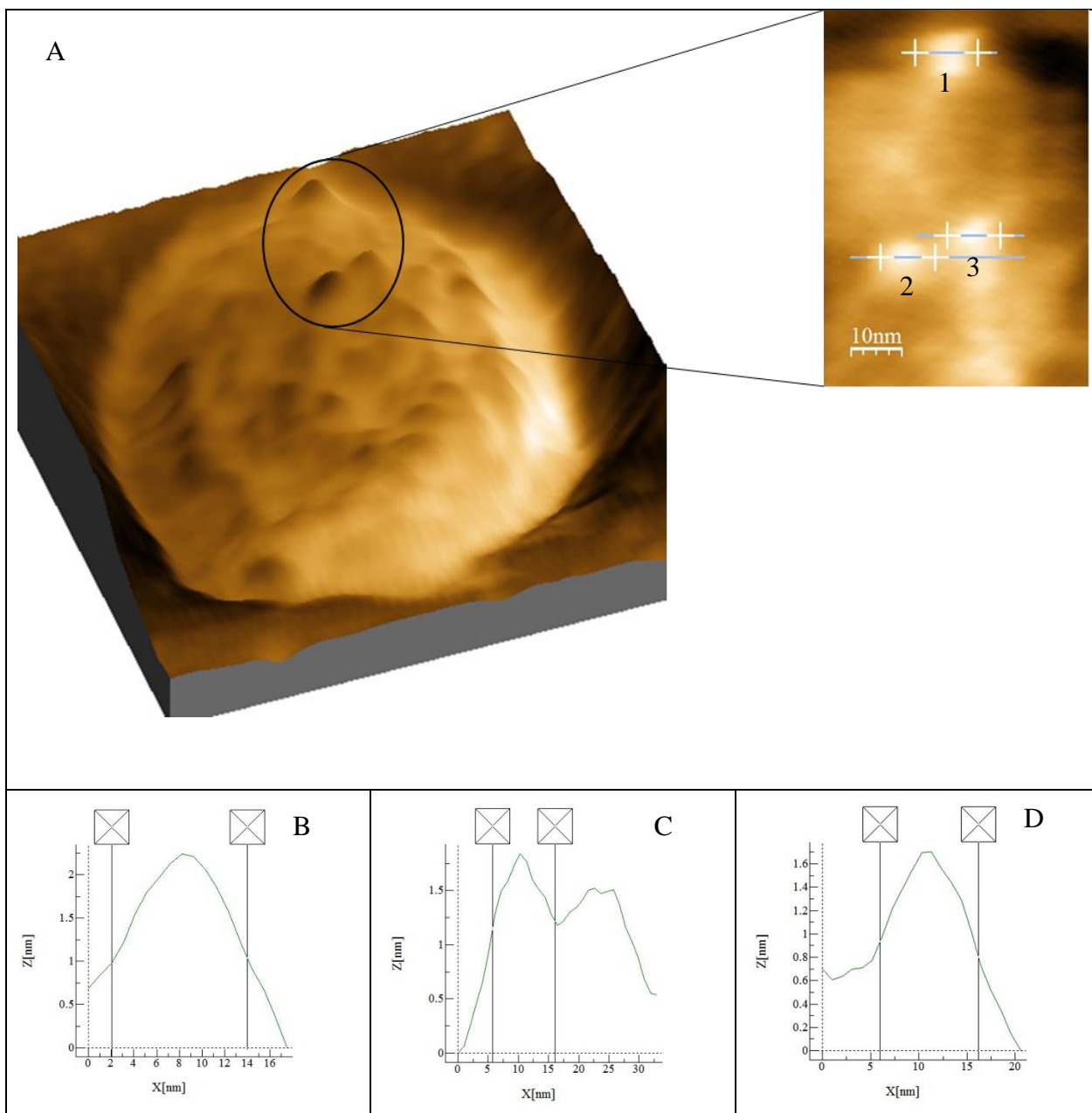


Figura 17. Micrografias de NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC: (A) imagens de topografia 3D, aplicando um zoom de 3x. Análise de perfil (B) da protusão número 1, (C) do número 2 e (D) do número 3.

Observa-se que as protusões possuem um diâmetro de, 12,0; 11,0 e 11,5 nm para as imagens B, C e D, respectivamente, portanto não possuindo alterações significativas. A altura de cada protusão foi determinada, obteve-se 2,4; 1,9 e 1,7 nm para B, C e D, respectivamente, apresentando uma relativa variação. Como esse equipamento de AFM opera no modo toque moderado/suave, as imagens de fase nos mostram diferença de rigidez por toda superfície da

vesícula. Essa diferença é observada pelo deslocamento da angulação de fase quando o cantiléver passa pela superfície das vesículas, assim, regiões mais fluidas apresentam colorações mais escuras, e regiões mais rígidas cores mais brilhantes (SEBINELLI et al., 2019). Portanto, as regiões onde a NPP1 está ancorada estão mais fluidas em relação à superfície lipídica. Essa fluidez da NPP1 é vista apenas no topo das protusões, pois, conforme o cantiléver se aproxima da região da bicamada lipídica, estruturas mais rígidas são observadas. Bolean et al. (2017b) determinaram a caracterização por AFM de TNAP-lipossomos constituídos por DPPC:DPPS e as protusões apresentaram altura em torno de 0,9 nm e diâmetro de 58,2 nm, mostrando que os domínios da TNAP são mais fluidos que a bicamada dos lipossomos. Conforme já comentado acima, as estruturas da TNAP e NPP1 possuem duas e uma âncoras de GPI e massa molecular de ~70 kDa e ~120 kDa (CAMOLEZI et al., 2002; JANSEN et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017; FAVARIN et al., 2017), respectivamente, portanto, é esperado que haja diferenças entres os perfis de protusão (e maior para a TNAP) quando comparadas entre elas, quando inseridas em lipossomos.

Determinada a caracterização dos lipossomos e NPP1-proteolipossomos constituídos por DPPC, foram preparados lipossomos com outros lipídios em sua composição. O emprego de outras formulações no preparo de lipossomos é justificado pela tentativa de recriar o microambiente lipídico presente nas MV, responsáveis pelo início do processo de biomineralização (WUTHIER et al., 1985). Essa alteração do microambiente lipídico ocasiona mudanças nas propriedades físico-químicas dos lipossomos, e conseqüentemente dos seus futuros proteolipossomos (BOLEAN et al., 2015; FAVARIN et al., 2017; SEBINELLI et al., 2019). Portanto, os lipossomos constituídos de DPPC:SM e DPPC:Chol, ambos na razão molar (9:1) e DPPC:SM:Chol na razão molar (8:1:1) foram preparados e tiveram sua caracterização por DLS e dosagem de proteína, especificamente para os proteolipossomos (Tabela 3). A escolha desse tipo de composição lipídica é derivada de trabalhos do nosso grupo com a TNAP em lipossomos com essas mesmas composições (BOLEAN et al., 2010; FAVARIN et al., 2020).

Tabela 3. Caracterização bioquímica e biofísica dos DPPC:SM-lipossomo 9:1, DPPC:Chol-lipossomo 9:1 e DPPC:Chol:SM-lipossomo 8:1:1 (razão molar) e seus respectivos NPP1-proteolipossomos.

Vesículas	NPP1	(%) NPP1 Incorporada	Diâmetro Médio (nm)	IP
DPPC:SM	-	-	118,0	0,074
	+	92	827,3	0,908
DPPC:Chol	-	-	118,9	0,026
	+	81	179,1	0,569
DPPC:SM:Chol	-	-	116,8	0,027
	+	82	258,3	0,716

*(referente a quantidade incubada de NPP1, ver Material e Métodos 3.6)

Todos os lipossomos estudados apresentaram valores de diâmetro médio próximos ao diâmetro do poro da membrana de extrusão, possuindo IP baixo, mostrando que a suspensão possui homogeneidade de tamanho. Já em análises dos proteolipossomos, observa-se que todos os casos, ocorre aumento nos valores de diâmetro médio em relação aos seus lipossomos, mesma tendência observada para vesículas de composição de somente DPPC. Analisando os IP dos proteolipossomos obtidos, houve aumento em todos os casos, sugestivo da presença da enzima nos lipossomos, pois sua incorporação resulta em aumento da heterogeneidade das vesículas, conforme já comentado anteriormente para os lipossomos constituídos de DPPC. Comparando apenas os NPP1-proteolipossomos, constituídos por DPPC:SM, apresentou um expressivo aumento no valor do diâmetro médio e IP, indicativo que a presença da enzima nos lipossomos pode estar agregando as vesículas. Analisando os valores de incorporação da NPP1 nos lipossomos, nas composições DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar), revelou aumento da quantidade de proteína, mostrando ser mais favorável a inserção, em relação aos lipossomos constituídos apenas pro DPPC. Isso pode ser justificado pela presença de micro domínios nas misturas lipídicas que não estão presentes somente na composição de DPPC (BOLEAN et al., 2011; SIMAO et al., 2019; FAVARIN et al., 2020). Titulações por potencial zeta também foram realizadas para a determinação do ponto isoelétrico de cada vesícula formada, e conseqüentemente a determinação de suas cargas na dupla camada elétrica em diferentes microambientes (Figura 18).

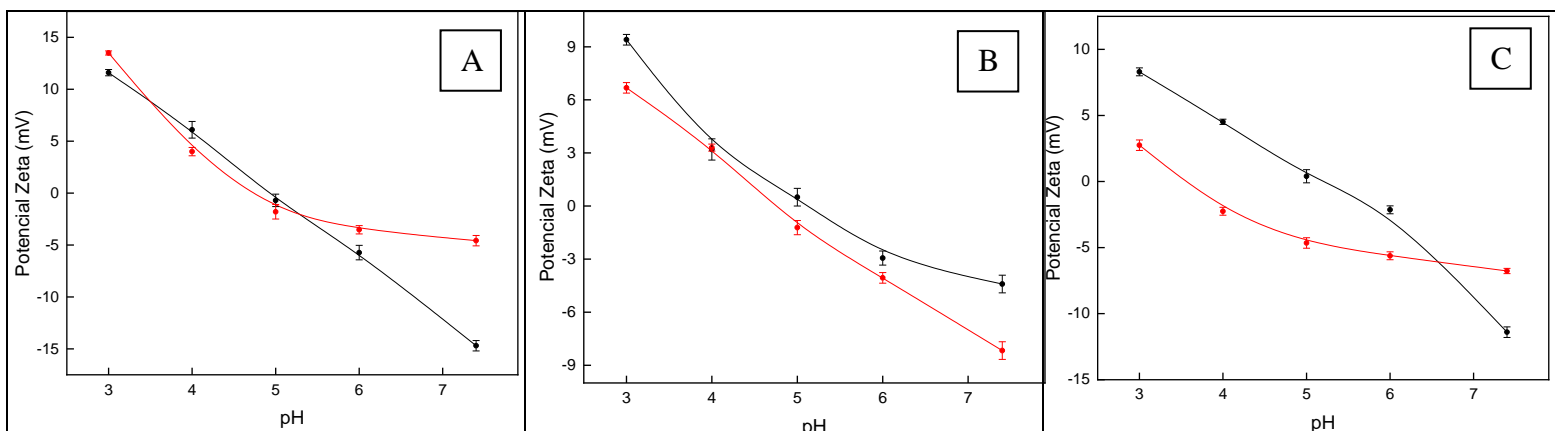


Figura 18. Eletrogramas de (preto) lipossomos e (vermelho) NPP1-proteolipossomos constituídos de: (A) DPPC:SM (9:1), (B) DPPC:Chol (9:1) e (C) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar).

Lipossomos constituídos por DPPC:SM (9:1) apresentaram valores mais negativos de potencial zeta, em pH 7,4, comparando com seus NPP1-proteolipossomos, que apresentaram valores próximo de zero. Este resultado justifica o alto valor no diâmetro médio e IP, podendo ser também o reflexo de agregações após o processo de incorporação da NPP1. Os pontos isoeletrônicos foram de 4,9 e 4,7, respectivamente, não possuindo diferenças significativas. No caso de lipossomos constituídos por DPPC:Chol (9:1), o potencial zeta em todos os pH estudados foram mais positivos em relação aos NPP1-proteolipossomos, indicando que a presença da proteína nessas vesículas acarreta na diminuição do potencial zeta.

Essa diminuição pode ser visível também pelo ponto isoeletrico calculado, que foram de 5,1 e 4,7, respectivamente, onde NPP1-proteolipossomos, apresentaram valores menores em relação aos seus lipossomos de origem. Por fim, lipossomos DPPC:SM:Chol (8:1:1) tem valores de potencial zeta maiores, em módulo, em pH fisiológico, do que em relação aos NPP1-proteolipossomos, que inclusive apresentam maiores estabilidades. Os pontos isoeletricos foram de 5,2 e 3,5, respectivamente. Porém, os NPP1-proteolipossomos, apresentaram potencial zeta entre 3,0 e -5,0 mV, em todos os pH estudados, apresentando grandes riscos de agregação em todos os pH estudados. Vale destacar que o mesmo comportamento de deslocar os valores potencial zeta foram observados em todos os NPP-proteolipossomos, reforçando a influência dos grupos ionizáveis presentes na cadeia peptídica da proteína.

As atividades específicas da NPP1 incorporada foram determinadas para cada proteolipossomo, avaliando a influência do microambiente lipídico sobre o seu efeito catalítico quando o substrato pNP-5-TMP e o ATP foi empregado (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade específica da NPP1, incorporada em lipossomos com diferentes composições lipídicas. A atividade foi determinada utilizando pNP-5-TMP e ATP, como substrato, conforme descrito em material e métodos.

NPP1-Proteolipossomo (composição lipídica)	Atividade Específica (U/mg)	
	pNP-5'-TMPase	ATPase
DPPC	52,8 ± 1,2	10,6 ± 0,8
DPPC:SM	48,2 ± 2,3	12,0 ± 1,3
DPPC:Chol	44,5 ± 2,1	18,5 ± 1,1
DPPC:SM:Chol	45,7 ± 1,8	22,8 ± 1,6

Podemos observar que as atividades específicas da NPP1 presente em todas as composições lipídicas estudadas foram maiores em relação à NPP1 livre em solução, indicando que a presença do microambiente lipídico influencia para um aumento da atividade da enzima. Simao et al. (2010), também determinou a atividade específica para NPP1-lipossomos constituídos por DPPC, usando pNP-5'-TMP e ATP como substrato, e obteve 33,9 e 3,3 U/mg, respectivamente. Os valores são relativamente menores que os obtido nesse trabalho. Se compararmos os valores nominais de atividade ATPase com a pNP-5'-TMP para todos os NPP1-proteolipossomos são sempre mais baixos (Tabela 4). Esse comportamento é proveniente das funções catalíticas da NPP1 na hidrólise de ATP, uma função é de pirofosfatase/fosfodiesterase e a outra é fosfomonohidrolase, gerando os produtos AMP e PPi; e ADP e Pi, respectivamente (CIANCAGLINI et al., 2010; JANSEN et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Também é pelo efeito do substrato, onde segundo Simao et al. (2010), a velocidade catalítica (V_m) da NPP1 para pNP-5'-TMP é dez vezes maior em relação ao ATP (33,9 e 3,3 U/mg, respectivamente). Mesmo que sua eficiência catalítica ($k_{cat}/K_{0,5}$) para pNP-5'-TMP seja menor em relação ao ATP (367 e 448 $M^{-1} s^{-1}$, respectivamente).

Além disso, foi descrita atividade de PPIase (gerando duas moléculas de Pi) pela NPP1, complementando também que em condições fisiológicas, a NPP1 apresentou maior afinidade por ATP onde desempenha função de fosfodiesterase, em relação a substratos onde desempenha função de fosfomonohidrolase, especialmente na ausência de TNAP (CIANCAGLINI et al., 2010; SIMAO et al., 2010).

Porém, é importante observar a NPP1-proteolipossomos em composições com duas ou mais espécies lipídicas reduz a pNP-5'-TMPase, quando comparada com vesículas constituídas apenas por DPPC. Já para a atividade ATPase, a NPP1-proteolipossomos em formulações contendo colesterol apresentou valores maiores (Tabela 4). Efeitos de microambientes lipídicos na atividade de proteínas inseridas em lipossomos já foram bem descritos por Camolezi et al. (2002), Ciancaglini et al. (2010), Simao et al. (2010) e Favarin et al. (2017 e 2020).

Finalmente foram realizados experimentos de atividade ATPase empregando-se meios reacionais mais complexos, especialmente contendo SCL microambiente iônico da linfa cartilaginosa, que serão usados para os experimentos de mineralização nos próximos capítulos da dissertação. Surpreendentemente revelaram um aumento de aproximadamente 30% da habilidade de hidrólise do ATP pela NPP1-proteolipossomos, com o aumento da força iônica gerada pela presença de todos os íons constituintes do SCL.

4.3 Estudos cinéticos da NPP1 e TNAP incorporados em lipossomos constituídos de DPPC.

Para este estudo foram preparados proteolipossomos contendo NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções), e usando apenas DPPC como componente lipídico das vesículas por duas razões principais: (i) este microambiente afeta positivamente a atividade de enzimas incorporadas em lipossomos; (ii) DPPC como modelo mimético já está caracterizado e ser um fosfolipídio abundante nas MV.

As incorporações da NPP1 e TNAP foram realizadas como descrito em Materiais e Métodos 3.6 e também seguindo as padronizações descritas por Simao et al. (2010). As características Bioquímicas e biofísica de todas as vesículas está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Caracterização biofísica e bioquímica de lipossomos e proteolipossomos contendo NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções)

Vesícula	Diâmetro (nm)	IP	Potencial Zeta (mV)	[Enzima] (µg/mL)
Lipossomos	108,2	0,073	-4,86 ± 0,9	---
NPP1-proteolipossomos	152,8	0,302	-23,4 ± 0,8	100,5 ± 9,5
TNAP-proteolipossomos	132,6	0,241	-15,5 ± 0,8	85,5 ± 4,5
NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:1)	158,9	0,329	-19,3 ± 0,8	98,1 ± 3,4
NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:10)	145,1	0,236	-16,4 ± 0,9	92,8 ± 5,5
NPP1:TNAP-proteolipossomos (10:1)	160,8	0,316	-19,2 ± 0,8	89,5 ± 1,5

Quanto ao diâmetro e IP, todos os proteolipossomos, independente da enzima incorporada tiveram relativa homogeneidade de variações entre 132 e 158 nm. A presença da NPP1, conforme comentado anteriormente, apresentaram potenciais zeta mais negativos (-23,4 mV), comparativamente, TNAP-proteolipossomos apresentam valores de -15,5 mV. Enquanto NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:10) apresentaram -16,4 mV de potencial zeta, diminuído o a carga da dupla camada elétrica. Já as proporções, NPP1:TNAP-proteolipossomos (10:1) apresentaram um potencial zeta de -19,2 mV, muito similar ao determinado para NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:1) (-19,3 mV), indicando que proteolipossomos incorporados com NPP1, tendem a possuir cargas mais negativas em relação a proteolipossomos incorporados com TNAP (Tabela 5).

A quantidade de proteína incorporada aos lipossomos foi de aproximadamente 50% da concentração inicial das enzimas incubadas no ensaio adicionadas no processo de inserção direta (Materiais e Métodos 3.6). A concentração de proteína determinada nos proteolipossomos apresentou uma faixa de 85,5 até 100,5 µg/mL (Tabela 5). Considerando que a NPP1 possui um peso molecular próximo a 125,0 kDa (SIMAO et al., 2010), e o dímero ativo da TNAP possui peso molecular próximo de 120 kDa (LE DU e MILLAN, 2002), temos uma razão de proteína:lipídio de ~1:2.500 para todos os proteolipossomos formados.

Nosso grupo de pesquisa trabalhou nos últimos anos para entender os papéis detalhados de TNAP e NPP1, e outras enzimas importantes presentes nas MV investigando o mecanismo da biomineralização óssea (BOLEAN et al., 2017a; BOTTINI et al., 2018; CRUZ et al., 2022). Uma

questão essencial que ainda não foi elucidada é o microambiente que ambas as enzimas atuam, pois, se trata de um microambiente sensível, onde simples alterações afetam diretamente nas propriedades biológicas e funcionais dessas enzimas. Previamente, estudos do nosso grupo mostraram que presença da NPP1 e TNAP na superfície das MV atuam diretamente na formação e seleção de substratos fosforilados para a obtenção de Pi na região da MEC (CIANCAGLINI et al., 2010; BOLEAN et al., 2017a).

Simao et al. (2010) e Ciancaglini et al. (2010) também mostraram que essas enzimas podem atuar em conjunto quando confrontadas com uma mistura fisiológica como ATP e PPi, quando incorporada à lipossomos constituídos por DPPC. Além disso, sob condições fisiológicas, TNAP e NPP1 presentes na membrana nativa de MV ou reconstituídos em lipossomos podem ser biologicamente mais relevantes do que ensaios feitos em preparações de enzimas solubilizadas (CIANCAGLINI et al., 2012; BOLEAN et al., 2017a).

As quantidades de ATP hidrolisado e ADP e AMP produzidos para os diferentes proteolipossomos são mostrados na Figura 19. As quantificações foram determinadas por análises de HPLC, conforme descrito em Materiais e Metodos 3.9.

As quantificações dos nucleotídeos hidrolisadas demonstraram que todos os proteolipossomos foram capazes de hidrolisar ATP de forma eficiente. Os ensaios de mineralização requerem que a hidrólise seja superior a 3-5% da quantidade inicial de ATP (fora do estado estacionário), portanto, a abordagem de cinética não estacionária foi escolhida.

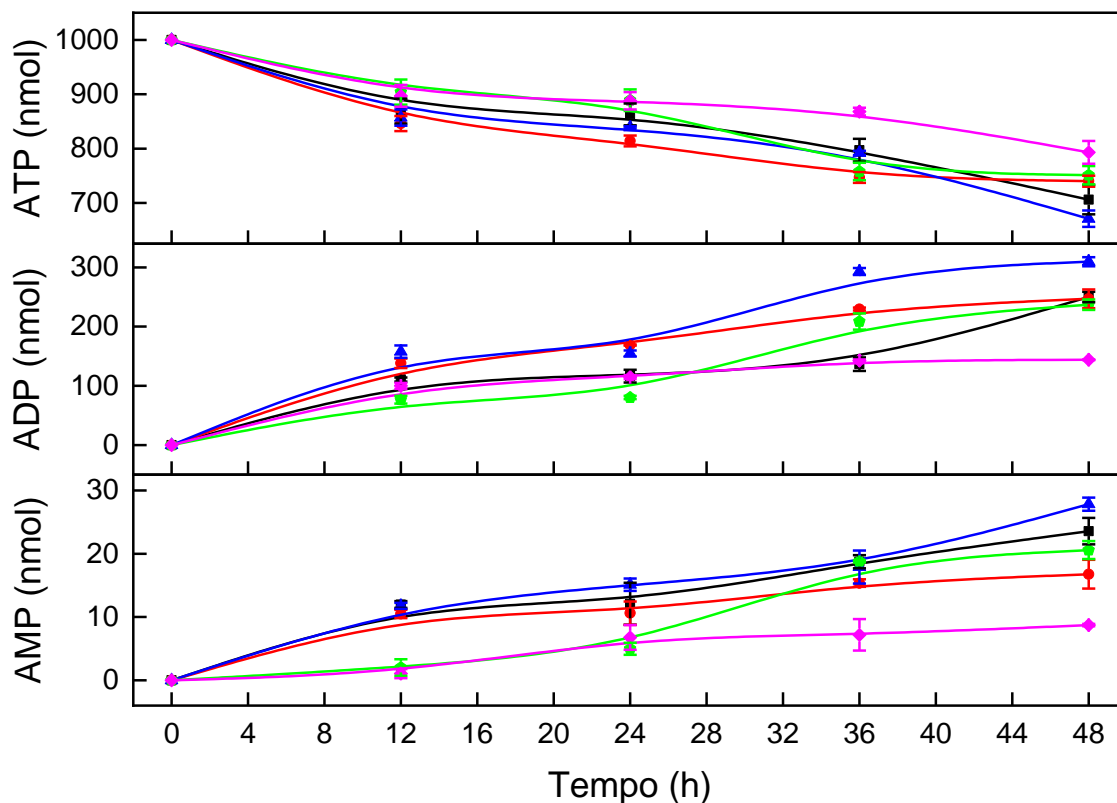


Figura 19. Quantidade de ATP hidrolisado e ADP e AMP produzidos por proteolipossomos incorporados com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP (1:1), (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1), usando 2,0 mM (1000 nmol) de ATP como substrato, durante 48 horas de reação.

Analisando o comportamento de cada proteolipossomo, temos que NPP1-proteolipossomos hidrolisa ATP rapidamente até 36 horas de reação seguido de uma estabilização que dura até o fim da reação. Enquanto -TNAP e -NPP1:TNAP (1:1) proteolipossomos apresentam o mesmo comportamento na hidrólise de ATP durante todo o período de reação, sendo que NPP1:TNAP-proteolipossomo (1:1), resultou em maiores quantidades de ATP hidrolisado. NPP1:TNAP-proteolipossomos (10:1) apresentaram menores valores de ATP hidrolisados durante o período de reação, e NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:10), apresentaram um significativo crescimento na hidrólise de ATP entre 24 e 36 horas de reação. Portanto, os proteolipossomos que mais apresentaram hidrólise foram os incorporados com, em ordem crescente: (5º) NPP1:TNAP (10:1); (4º) NPP1:TNAP (1:10); (3º) NPP1; (2º) TNAP e (1º) NPP1:TNAP (1:1). Os mesmos comportamentos foram observados para a obtenção de ADP e AMP (Figura 19).

NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:1) apresentaram maior hidrólise de ATP em relação aos -NPP1 e -TNAP proteolipossomos, mostrando que em condições iguais de incorporação, uma enzima contribui com a outra, potencializando a hidrólise. Porém, quando temos proporções diferentes de NPP1 e TNAP incorporadas a lipossomos constituídos de DPPC, a hidrólise de ATP é inferior aos -NPP1 e -TNAP proteolipossomos, mostrando que esse desequilíbrio pode afetar diretamente na atividade enzimática. Ciancaglini et al. (2010) já tinham mostrado a modulação conjunta destas enzimas em lipossomos, mas somente em proporções estequiométricas e ficou em aberta a questão de ser uma interação entre as proteínas presentes concomitantemente na interface lipídica ou um deslocamento de reação pela preferência entre atividade fosfomonohidrolítica ou fosfodiesterase da NPP1. Assim, na tentativa de entender estes efeitos, foram planejados experimentos na presença de um inibidor específico da atividade fosfodiesterase da NPP1, escolhendo a suramina.

Para determinar a concentração de suramina a ser utilizada nos experimentos de cinética, realizou-se pré-ensaios com os NPP1-proteolipossomos, utilizando 10,0 de mM pNP-5'-TMP e 2,0 mM de ATP, como substrato.

As concentrações de suramina utilizadas nesses ensaios foram de 0,26 μ M; 0,1 mM; 0,5 mM e 0,1 M, adicionado nas condições de reações como descrito no Materiais e Métodos 3.5.3. Foi obtida inibição de 2,0, 45, 78 e 100% para atividade pNP-5'-TMPase, respectivamente. Para atividade de ATPase obteve-se 0, 37, 71 e 100%, respectivamente. Porém, as mesmas condições experimentais foram aplicadas para a verificação da influência de suramina na atividade ATPase de TNAP-proteolipossomos, obtendo inibição de 0, 12, 27 e 54% respectivamente. Assim, para os experimentos subsequentes foi escolhida a condição de maior porcentagem de inibição para NPP1, e a menor porcentagem de inibição apresentada para TNAP. Desta forma, para os experimentos mostrados na Figura 20, foram realizados com 2 mM de ATP e 0,5 mM de suramina 0,5 mM.

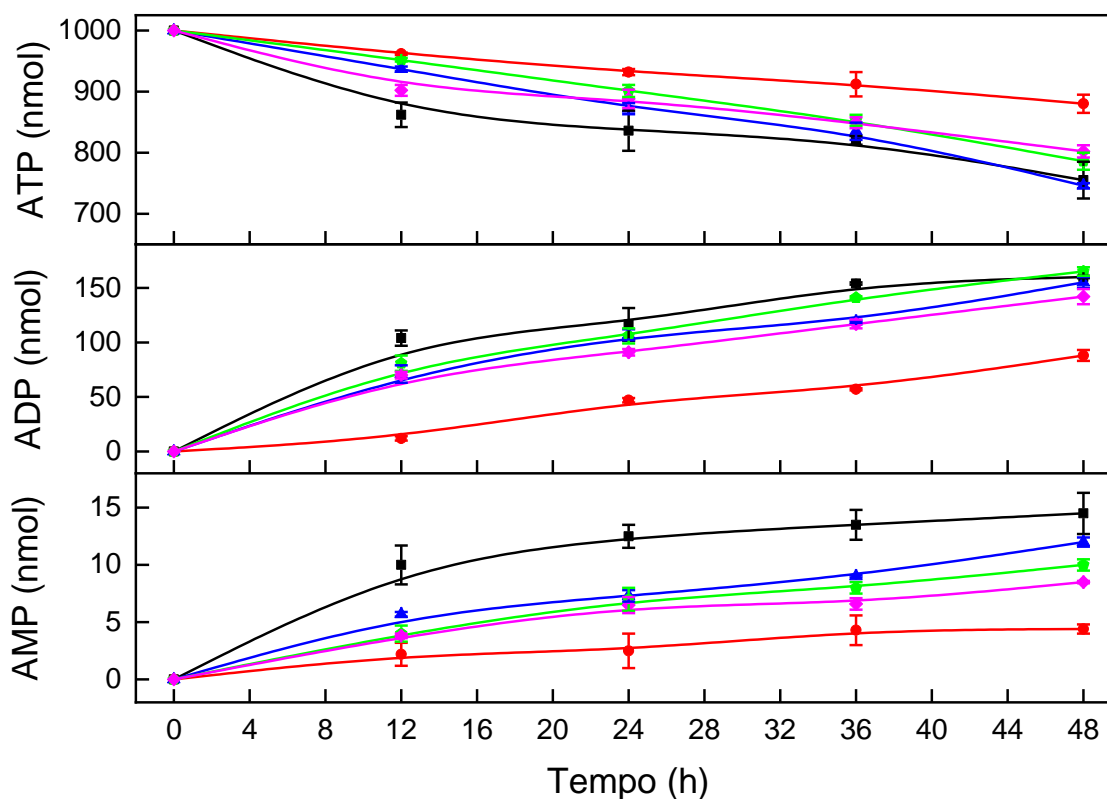


Figura 20. Quantidade de ATP hidrolisado e ADP e AMP produzidos por proteolipossomos incorporados com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP, (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1), usando 2,0 mM (1000 nmol) de ATP como substrato, na presença de 0,5 mM de Suramina (como inibidor da NPP1), durante 48 horas de reação cinética.

Diferentemente do que foi obtido nas cinéticas sem 0,5 mM suramina, os NPP1-proteolipossomos apresentaram menores valores na hidrólise de ATP, o que é esperado, devido a suramina ser um inibidor mais seletivo para a NPP1 (LEE, S. Y. e MULLER, 2017). Assim, a ordem de proteolipossomos que apresentaram maior potencial de hidrólise de ATP foi alterado, em ordem crescente: (5°) NPP1; (4°) NPP1:TNAP (10:1); (3°) NPP1:TNAP (1:10); (2°) TNAP e (1°) NPP1:TNAP. Proteolipossomos que contêm NPP1:TNAP, em proporções (10:1) ou (1:10), com a inibição da NPP1 resulta em comportamentos cinéticos próximos aos da TNAP-proteolipossomos. Para elucidar quantitativamente as curvas cinéticas obtidas, elaborou-se um gráfico para aferir a porcentagem de ATP hidrolisado (Figura 21), assim como o percentual de ADP e AMP formado (Figura 22) durante as 48 horas de reação, na ausência e presença de suramina.

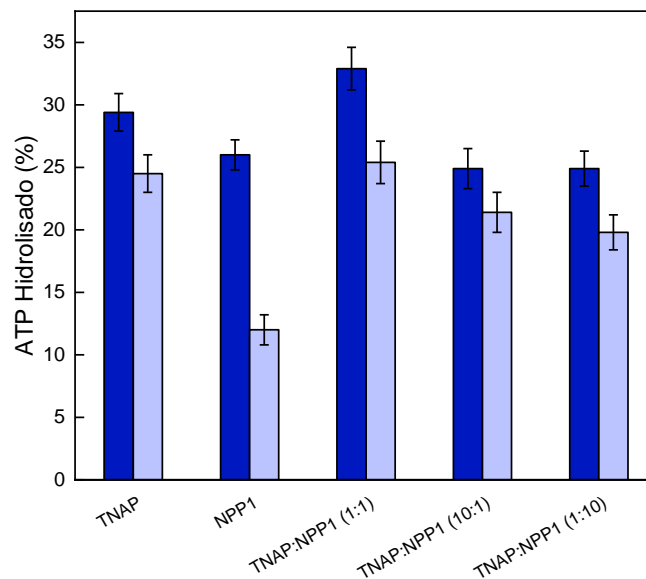


Figura 21. Porcentagem de ATP hidrolisado para os diferentes proteolipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções): (barras azuis escuras) sem suramina e (barras azuis claras) na presença de 0,5 mM de suramina (como inibidor de NPP1), após 48 horas de reação cinética.

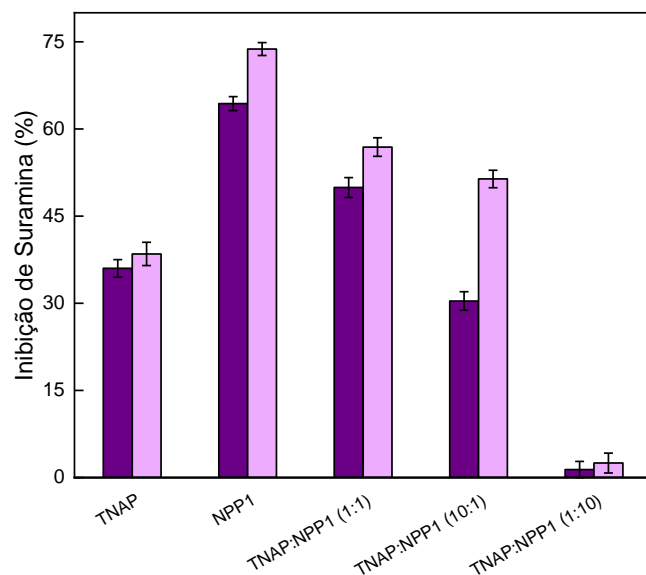


Figura 22. Porcentagem de inibição da suramina na produção de: (barras roxas escuras) ADP e (barras roxas claras) AMP por proteolipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções). ADP e AMP foram produzidos pela hidrólise enzimática de ATP na presença de 0,5 mM de suramina (como inibidor de NPP1) após 48 horas de reação.

Cinética enzimática para extratos de frações de membrana contendo NPP1 humana, expressas em células COS-7 (IQBAL et al., 2008) e NPP1 humana recombinante expressas em células NS0 (NAMASIVAYAM et al., 2017) tem sido desenvolvida nos últimos anos. Estes estudos empregando-se ATP como substrato apresentaram valores de constante de Michaelis-Menten (K_m) entre 6,0 e 8,5 μM , velocidade máxima (V_{max}) entre 275,0 e 290,0 U/mg e uma relação de k_{cat}/K_m entre 586,0 e 674 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Iqbal et al. (2008), realizou estudos de inibição para a NPP1 humana em solução, utilizando suramina e reactive blue 2, obtendo uma constante de inibição (K_i) de 0,26 e 0,52 μM , respectivamente.

Porém, como descrito nesse trabalho (Materiais e Metodologia 3.2 e Resultados e Discussão 4.1), e previamente relatado por Simao et al. (2010) e Ciancaglini et al. (2010), a NPP1 utilizada nesse trabalho é uma quimera, e estudos realizados em reconstituição de enzimas em lipossomos mostraram alteração nos parâmetros cinéticos da enzima quando comparada com a forma nativa humana. Mas isso é irrelevante para o nosso trabalho pois neste contexto do trabalho é ter uma NPP1 que possa ser facilmente inserida na membrana e avaliar a modulação conjunta com a TNAP.

Simao et al. (2010) mostraram que NPP1, além de sua atividade de fosfodiesterase em substratos fosforilados, tais como ATP, ADP, etc., também pode atuar como uma fosfomonohidrolase de ATP, formando Pi e ADP. Também mostrou que apesar da maior afinidade de NPP1 para ATP em relação a TNAP (10 vezes para atividade de fosfomonohidrolase), o V_{max} foi 5 vezes menor para uma eficiência enzimática semelhante (apresentando um k_{cat}/K_m em torno de 448 e 382 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ para NPP1 e TNAP, respectivamente). Resultando em uma condição semelhante para a formação de Pi em função do tempo, mas com uma diferença, a NPP1 produz PPi na mesma taxa que a TNAP produz Pi (apresentando um k_{cat}/K_m em torno de 367 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

Por outro lado, quando as duas enzimas estão presentes simultaneamente incorporadas em lipossomos, a atividade de fosfomonohidrolase se destaca sobre a atividade de fosfodiesterase (SIMAO et al., 2010; CIANCAGLINI et al., 2010). Exemplificando esse fenômeno, os NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:1) reduziram a concentração de ATP para 33% após 48 horas (Figura 19 e Figura 21). Por outro lado, a presença de uma relação diferente em NPP1 e TNAP incorporadas simultaneamente (1:10 ou 10:1) reduz em 25% a hidrólise de ATP (Figura 19). Este

comportamento pode ser justificado pelas diferenças no k_{cat}/K_m , como comentado acima, para proteolipossomos contendo NPP1 e TNAP. A produção de AMP apresenta níveis muito baixos em comparação com a quantidade de ADP. Entretanto, mesmo que apresentando diferenças nas produções de ADP e AMP nos proteolipossomos estudados, essa produção foi mais elevada, como esperado, para NPP1-proteolipossomos. Ciancaglini et al. (2010) e Simao et al. (2010) obtiveram resultados similares para TNAP-, NPP1- e NPP1:TNAP-proteolipossomos (1:1).

Quando esse estudo cinético foi realizado na presença de suramina 0,5 mM (Figura 20), a hidrólise de ATP foi reduzida de forma mais eficiente para NPP1-proteolipossomo como esperado, uma vez que este inibidor afeta eficientemente esta enzima (LEE, S. Y. e MULLER, 2017), mas, inesperadamente, afetou também cerca de 5% da atividade TNAP (Figura 22). ADP e AMP produzidos na presença de suramina foram reduzidos em 63 e 74%, respectivamente, para NPP1-proteolipossomos após 48 horas de reação (Figura 20 e Figura 22).

NPP1:TNAP-proteolipossomos (em diferentes proporções) reduzem a eficiência de inibição da suramina, mesmo quando a TNAP está em uma razão molar mais baixa (Figura 22). Provavelmente esse comportamento é justificado devido às mudanças na afinidade do substrato quando as duas enzimas estão juntas na interface dos lipossomos, conforme descrito por Simao et al. (2010). A capacidade da TNAP de usar ATP como fonte de Pi para iniciar a mineralização já foi documentada por diversos pesquisadores (HSU et al., 1999).

No entanto, apesar de termos começado a discutir o papel da TNAP em trabalhos anteriores, desvendar os detalhes de como o Pi é derivado de ATP e como este participa na mineralização ainda precisam ser estabelecidos (SIMAO et al., 2019; FAVARIN et al., 2017 e 2020).

4.4 Mineralizações *in vitro*: estudo da influência da composição lipídica e presença de NPP1- e TNAP-proteolipossomos

As mineralizações *in vitro* têm um grande potencial para estudar o comportamento dos mais variados agentes que influenciam no processo de biomineralização óssea (GENGE et al., 2007; SIMAO et al. 2019; FAVARIN et al., 2020). Genge et al. (2007) descreveram a presença de dois nucleadores que potencializam a propagação de mineral na presença de AnxA5 e de PS,

durante o processo de mineralização *in vitro*. Um desses nucleadores é o ACP, e o outro é um complexo de PS, contendo o próprio ACP (PS-CPLX) (GENGE et al., 2007).

Sendo a mineralização *in vitro* um processo de extrema complexidade que depende de múltiplos fatores, é necessário realizar estudos com os componentes que podem influenciar a propagação de mineral dos proteolipossomos separadamente. Portanto, foi realizada a mineralização *in vitro* para nucleadores ACP e PS-CPLX, utilizados no ensaio com proteolipossomos, avaliando-se separadamente a sua capacidade de propagação de mineral (Figura 23). Na sequência, foi avaliado se a presença da NPP1 em solução, e apenas na presença dos nucleadores, possui potencial de nucleação. E por fim, avaliando-se a habilidade dos lipossomos constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar) na propagação de mineral na presença dos nucleadores.

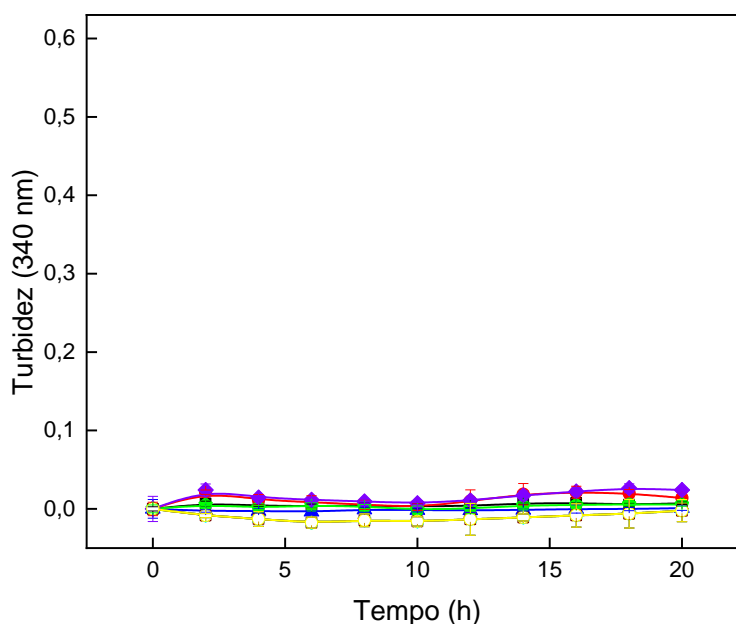


Figura 23. Curvas de mineralização *in vitro* obtidas por análise de turbidez (Absorbância em 340 nm), dos controles: (preto) ACP; (vermelho) PS-CPLX; (azul) NPP1; (verde) NPP1+ACP; (violeta) NPP1+PS-CPLX; lipossomos na presença de ACP e PS-CPLX, constituídos de (ouro) DPPC; (ciano) DPPC:SM (9:1); (marrom) DPPC:Chol (9:1) e (amarelo) PC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e PPI.

Um trabalho recente de Erceg et al. (2022) estudou a influência de lipossomos com diferentes tamanhos e cargas superficiais na precipitação de fosfato de cálcio, mas empregando soluções aquosas supersaturadas. Quando comparado com os respectivos controles, os lipossomos influenciaram tanto a precipitação quanto a cinética de transformação das fases morfológicas do fosfato de cálcio formado. Os maiores efeitos foram observados nos lipossomos contendo PS e íons Ca^{2+} , encontrados na superfície dos minerais. Os resultados confirmam que, apesar das diferenças na composição química, solubilidade, e/ou estabilidades de cada fosfolípido usado, existem semelhanças no mecanismo de formação dos biominerais de fosfatos de cálcio.

Por outro lado, Genge et al. (2007) mostraram que mineralizações na presença da AnxA5, com os nucleadores ACP e PS-CPLX, resultaram em um potencial de propagar minerais de fosfato de cálcio devido à presença de Pi e Ca^{2+} no SCL.

Portanto, a presença de ATP no meio reacional, em ensaios na ausência de NPP1, não gera íons Pi para iniciar a formação dos primeiros minerais de fosfato de cálcio. Na presença de NPP1, com ou sem nucleadores, também não foi observada a formação de minerais. Duas hipóteses podem ser descritas aqui: (i) indicativo da geração preferencialmente de PPI (atividade de pirofosfodiesterase), pela hidrólise do ATP, que inibe o processo de propagação; ou (ii) a baixa atividade que a NPP1 apresenta em solução nesta condição é insuficiente para fornecer Pi necessário para a propagação do mineral (CIANCAGLINI et al., 2010; JANSEN et al., 2012; LEE, S. Y. e MULLER, 2017).

Em seguida, foram iniciados os ensaios em NPP1-proteolipossomo, constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar), na presença de ACP (Figura 24).

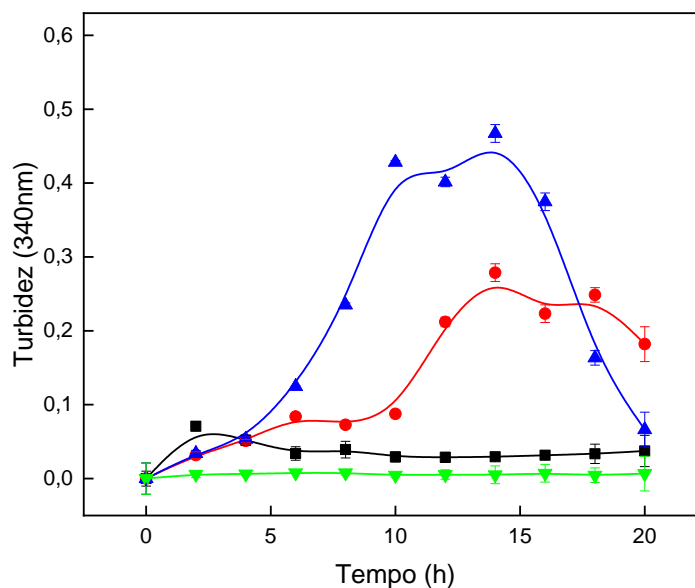


Figura 24. Curvas de mineralização *in vitro* por turbidimetria (340 nm) na presença de nucleadores ACP por NPP1-proteolipossomos constituídos de: (preto) DPPC, (vermelho) DPPC:SM (9:1), (azul) DPPC:Chol (9:1) e (verde) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e PPI.

NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar) não apresentaram propagação mineral. A presença de ACP apenas proporcionou propagação de mineral para os NPP1-proteolipossomos nas composições de DPPC:SM (9:1) e DPPC:Chol (9:1) (razão molar). A primeira composição, possuindo propagação inferior em relação à segunda (Figura 24). Porém, análises mais detalhadas sobre o perfil de curva são necessárias para evidenciar a diferença entre elas.

Para isso, Genge et al. (2007) sugeriram a adoção de parâmetros qualitativos, aplicando-se uma função sigmoidal aos dados de mineralização, detalhando: os tempos iniciais (t_i), e finais (t_f) de propagação, a taxa máxima de propagação ($t_{MaxRate}$), o máximo de crescimento (U_{max}), velocidade média (U_{med}) e o potencial de nucleação (NP) de cada curva, onde U, indica o valor de turbidez obtido em 340 nm. Assim, aplicou-se essas análises nas curvas de NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:SM (9:1) e DPPC:Chol (9:1) (razão molar) (Tabela 6).

Tabela 6. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340nm) de minerais *in vitro*, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi, durante 20 horas de ensaio na presença de ACP como nucleador

Parâmetros/ Composição Lipídica	NPP1-Proteolipossomos		
		DPPC:SM	DPPC:Chol
t_i (h)	0*	10,0 ± 0,2	0
t_f (h)	6,4 ± 0,3*	13,5 ± 0,3	13,5 ± 0,6
$t_{Max\ Rate}$ (h)	2,4 ± 0,2*	11,6 ± 0,6	7,6 ± 0,3
U_{Max} (U)	0,082 ± 0,013*	0,26 ± 0,07	0,44 ± 0,08
U_{med} (U/h)	0,018 ± 0,002*	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01
NP($U_{Max}/t_{Max\ Rate}$)	0,03 ± 0,01*	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01

*Etapa inicial da curva de mineralização

Analisando-se o comportamento dos NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:SM (9:1) (razão molar), foi observada a presença de duas etapas de propagação de mineral, a primeira, iniciando instantaneamente e possuindo um t_f de 6,4 horas. A segunda etapa, possui um t_i de 10 horas e um t_f de 13,5 horas. NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol (9:1) (razão molar) também apresentam uma propagação de mineral instantânea, porém, com uma única etapa de crescimento, possuindo um t_f próximo dos proteolipossomos constituídos de DPPC:SM (9:1). Segundo Genge et al. (2017), o que determina a eficácia de um nucleador durante a propagação mineral é a NP, que correlaciona a U_{max} com a $t_{MaxRate}$ de cada curva, ou seja, leva em consideração a quantidade final de turbidez obtida, em relação a taxa com que essa propagação ocorre, portanto, observa-se que NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol (9:1) (razão molar) possuem quase o dobro de todos os parâmetros em relação aos NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:SM (9:1) (razão molar). Assim, NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:Chol (9:1) (razão molar) propaga mineral de maneira mais eficiente na presença de nucleadores ACP (Figura 24 e Tabela 6).

Mineralizações *in vitro* por análise de turbidez foram empregadas para a determinação de propagação de mineral utilizando os mesmos NPP1-proteolipossomos, porém, na presença de nucleadores PS-CPLX (Figura 25).

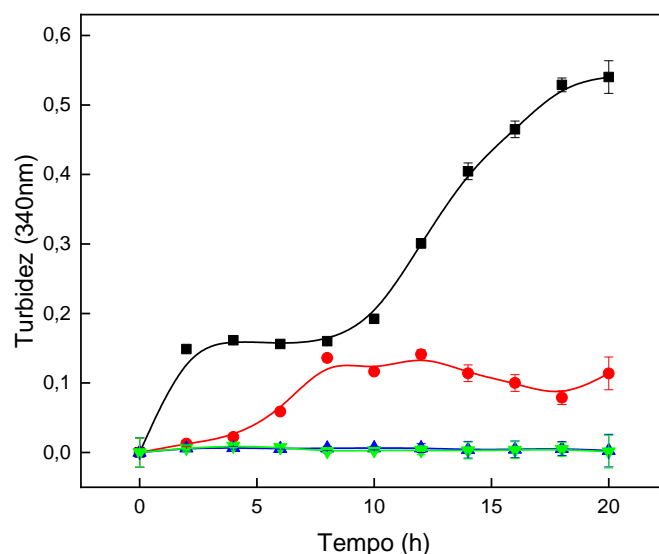


Figura 25. Curvas de mineralização *in vitro* por turbidimetria (340 nm) na presença de nucleadores PS-CPLX por NPP1-proteolipossomos constituídos de: (preto) DPPC, (vermelho) DPPC:SM (9:1), (azul) DPPC:Chol (9:1) e (verde) DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e PPI.

As vesículas constituídas de DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar) incorporadas com NPP1 não apresentaram propagação mineral em todo tempo de análise. NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC e DPPC:SM (9:1) (razão molar) apresentam propagação mineral, sendo que a primeira composição apresentou uma propagação significativa em comparação aos demais, tanto com nucleadores ACP, quanto PS-CPLX (Figura 25).

Tabela 7. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340 nm) de minerais *in vitro*, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi, durante 20 horas de ensaio na presença de PS-CPLX como nucleador.

Parâmetros/ Composição lipídica	NPP1-Proteolipossomos		
		DPPC	DPPC:SM
t_i (h)	0*	7,9 ± 0,2	0
t_f (h)	2,1 ± 0,2*	17,9 ± 0,3	8,1 ± 0,6
t_{Max Rate} (h)	1,7 ± 0,4*	12,4 ± 0,6	5,5 ± 0,3
U_{Max} (U)	0,16 ± 0,03*	0,54 ± 0,07	0,14 ± 0,08
U_{med} (U/h)	0,07 ± 0,02*	0,05 ± 0,01	0,017 ± 0,006
NP(U_{Max}/t_{Max Rate})	0,09 ± 0,03*	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01

*Etapa inicial da curva de mineralização

NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC apresentaram duas etapas de propagação de mineral, uma iniciada instantaneamente com t_f em 2,1 horas, seguida de um platô. A segunda etapa possui t_i em 7,9 horas, e propagando mineral nas próximas 10 horas. Os NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:SM (9:1) (razão molar) propagaram mineral instantaneamente, porém, com um t_f de 8,1 horas, o mais curto estudado. Sobre a quantidade (U em 340 nm) propagado, NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC obtiveram resultados em torno de 3 vezes maior em relação aos constituídos de DPPC:SM (9:1), em todos os parâmetros, portanto, propagando mineral de maneira mais efetiva (Figura 25 e Tabela 7).

Comparando-se os dois nucleadores estudados, temos que NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC:SM:Chol (8:1:1) não apresentaram propagação mineral (Figuras 24 e 25). Já para a constituição de DPPC:Chol (9:1) (razão molar), a propagação de mineral foi mais abundante na presença de ACP, porém, foi seguida de uma queda brusca na turbidez, podendo indicar uma possível má formação mineral. Para a composição DPPC:SM (9:1) (razão molar), em ambos os nucleadores houve propagação de mineral, porém, com valores de turbidez não expressivos, iniciando-se instantaneamente a propagação, mas com baixo rendimento. Por fim, a composição DPPC não propagou mineral na presença de ACP, porém, em PS-CPLX houve propagação de mineral, sendo a maior dentre os NPP1-proteolipossomos estudados (Figura 25 e Tabela 7). Destacamos aqui que a propagação instantânea de mineral, com o maior valor de U_{max} e perdurando a propagação durante todo tempo de análise (Tabela 7), pode ser o melhor microambiente lipídico promissor para a realização de estudos com NPP1 e TNAP incorporadas simultaneamente. Lamentavelmente, a literatura não apresenta estudos similares empregando-se NPP1 para estudos de mineralizações que possam ser usadas para comparar os resultados obtidos, mas isso atesta o ineditismo de nosso trabalho.

Uma vez que mineralizações com TNAP incorporada em lipossomos constituídos de DPPC, DPPC:SM (9:1), DPPC:Chol (9:1) e DPPC:SM:Chol (8:1:1) (razão molar) revelaram que, em microambiente lipídico constituído apenas de DPPC, ocorre com o dobro nos valores de propagação mineral em relação às demais composições, na ausência de nucleador (SIMAO et al., 2019), foi a razão por, escolhemos esta formulação para os estudos que mostraremos a seguir.

Assim, como pode ser visto na Figura 26, realizaram-se as mineralizações *in vitro* por turbidimetria, conforme descrito no Materiais e Métodos 3.11, na ausência de nucleador, com os DPPC-lipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções).

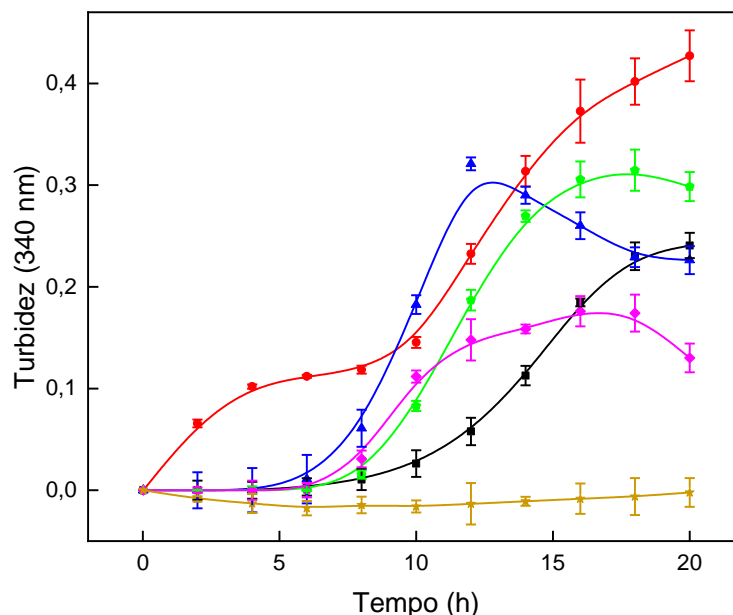


Figura 26. Curvas de mineralizações *in vitro*, realizadas por análises de turbidez a 340 nm, de (ouro) DPPC-lipossomos incorporado com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP (1:1), (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1). A reação foi realizada durante 20 horas, a 37°C, contendo 2,0 mM de ATP como fonte de Pi e PPi.

Tabela 8. Análises de uma curva de propagação de mineral típica: parâmetros qualitativos de turbidez (U em 340nm) de minerais *in vitro*, com a hidrólise de ATP como fonte de Pi e PPi, durante 20 horas de ensaio na ausência de nucleador.

Proteolipossomo/ Parâmetros	NPP1	TNAP	NPP1:TNAP (1:1)	NPP1:TNAP (1:10)	NPP1:TNAP (10:1)
t_i (h)	0*	6,61 ± 0,42	7,92 ± 0,12	6,7 ± 0,66	5,2 ± 0,35
t_f (h)	3,49 ± 0,48*	19,8 ± 0,31	21,3 ± 0,71	12,7 ± 0,28	13,9 ± 0,61
$t_{Max Rate}$ (h)	1,31 ± 0,03*	12,5 ± 0,28	13,9 ± 0,56	9,5 ± 0,36	9,1 ± 0,15
U_{Max} (U)	0,11 ± 0,03*	0,44 ± 0,02	0,27 ± 0,07	0,30 ± 0,02	0,31 ± 0,02
U_{med} (U/h)	0,03 ± 0,04*	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,05	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,04
$NP(U_{Max}/t_{Max Rate})$	0,084*	0,035	0,019	0,032	0,028

*Etapa inicial da curva de mineralização

DPPC-lipossomos sem nucleador (Figura 23), ou NPP1 não incorporado em lipossomos (Figura 23), em meio SCL, não mostraram alterações na turbidez (340 nm) durante o tempo de incubação. Provavelmente, esta condição na ausência de Pi na composição do SCL previne a formação de minerais e é um bom controle de ensaio, semelhante ao descrito por Genge et al. (2007). Por outro lado, todos os proteolipossomos estudados revelaram um crescimento progressivo da turbidez após 7 horas de incubação, com exceção do NPP1-proteolipossomo que teve um pequeno aumento instantaneamente, atingindo um platô, com turbidez em torno de 0,1 até 6 horas, que foi seguido por uma curva semelhante aos demais proteolipossomos (Figura 26). Para entender esses dados de mineralização, é oportuno fazer uma correlação com a atividade exibida pelas enzimas inseridas nos proteolipossomos mostrados na Figura 19, para as primeiras 20 horas de reação.

NPP1-proteolipossomos apresentaram o potencial de propagação mais intenso, expresso pelo maior valor em NP (0,084), observado na etapa inicial de mineralização, mas com um baixo (0,11) U_{Max} . A segunda etapa de propagação mineral tem um NP (0,35) semelhante ao NPP1:TNAP-proteolipossomo (1:1) (0,032) com U_{med} e U_{max} semelhantes, quando comparados a outros proteolipossomos estudados (ver Figura 26 e Tabela 8). Destaca-se que o comportamento de propagação mineral instantâneo dos NPP1-proteolipossomos mostrou um comportamento semelhante ao obtido por NPP1:TNAP-proteolipossomo (10:1) Este resultado é provavelmente devido à maior quantidade de PPI presente no meio produzido por NPP1, observado pelos níveis mais altos de AMP quantificados por HPLC (Figura 19) Além disso, devemos ressaltar que o papel dos íons PPI não é apenas ser um substrato TNAP durante o processo de mineralização, mas também pode atuar como inibidor da atividade da fosfomonohidrolase TNAP (MILLAN, 2006) e um agente inibidor do crescimento mineral, que em grandes concentrações substitui o Pi na ligação de cálcio, resultando em CPPD (FLEISCH et al., 1966; ORRISS, 2020). Esses fatores podem explicar as curvas de mineralização apresentadas na Figura 26 para NPP1- e NPP1:TNAP (10:1)-proteolipossomos.

A curva de mineralização para TNAP-proteolipossomos (Figura 26) mostra que essas vesículas começam a mineralizar tardiamente quando comparadas a todos os proteolipossomos estudados, possuindo um t_i 13,9 horas (Tabela 8). Estas curvas têm um $t_{Max.Rate}$ semelhante à segunda etapa da curva obtida com NPP1-proteolipossomos, apesar de um U_{med} mais baixo (0,02),

porém atingindo níveis de U_{Max} semelhantes (se descontando a etapa inicial de mineralização da curva NPP1-proteolipossomos, que finaliza no t_f de 3,49). Este comportamento diferente entre os proteolipossomos contendo TNAP ou NPP1 pode estar associado à capacidade de fornecer Pi, devido à diferença de afinidade de ATP e eficiência enzimática (k_{cat}/K_m) conforme mencionado, identificado e discutido para as curvas de cinética da Figura 19.

Assim, à medida que a mineralização se inicia, a quantidade de mineral aumenta, mediada pela formação enzimática de Pi e pela diminuição da quantidade de Ca^{2+} na fase de solução do SCL. O rendimento mineral final é determinado pelo produto de solubilidade (K_{sp}) da fase sólida. Além disso, por exemplo, os minerais amorfos podem ser modificados pela adsorção de outros componentes presentes no microambiente iônico. Quanto mais minerais são formados, mais a força motriz para sua formação diminui progressivamente, uma vez que a concentração de Ca^{2+} no microambiente diminui. A quantidade de mineral formado atinge o máximo, que depende da disponibilidade de Pi (produzido pela hidrólise enzimática de ATP), bem como da presença de entidades adsorvidas na superfície (força iônica, pH, PPI, etc.) influenciando na formação de ACP e CPPD (GENGE et al., 2017).

Podemos ver que o comportamento de mineralização para NPP1:TNAP-proteolipossomos (em variadas proporções) revelou os menores $t_{Max,Rate}$ com U_{med} baixo, mas com um bom índice NP (Tabela 8). Isso pode ser explicado pela produção concomitante de Pi e PPI pelas respectivas enzimas cuja combinação resulta em uma relação Pi/PPI diferente aos outros proteolipossomos. Este cenário foi encontrado tanto na proporção 1:10 quanto na proporção 10:1 de NPP1:TNAP-proteolipossomos, resultando em NP mais baixas (Figura 26 e Tabela 8), em relação aos proteolipossomos estudados anteriormente. Deve-se ressaltar a leve inclinação para baixo observada para a curva de mineralização após atingir U_{max} (Figura 26 e Tabela 8), ocorre sempre na condição onde ambas as enzimas estão presentes nos proteolipossomos, independentemente da proporção. Esse efeito provavelmente se deve à presença de proporções distintas de Pi e PPI, que não ocorrem em proteolipossomos com apenas uma enzima (Figura 19). Este mesmo comportamento foi observado para algumas formulações lipídicas de NPP1-lipossomos, mas na presença de nucleador (Figura 25).

Infelizmente, as curvas de mineralização turbidimétrica realizadas para todos os proteolipossomas em SCL e na presença de 2 mM de ATP e de 0,5 mM de Suramina não puderam ser registradas, pois este composto absorve em toda a região do espectro UV (340 nm).

A necessidade de entender esse processo é de extrema importância, tanto para compreender o mecanismo bioquímico e biofísico da formação óssea, quanto para propor modelos de tratamento para doenças derivada de má formação óssea. Portanto, a manutenção de uma razão Pi/PPi ideal é universalmente aceita como condição necessária para a formação mineral na matriz extracelular (MILLAN, 2013). Diferentes relações Pi/PPi promovem a formação de diferentes fases minerais. De fato, razões em torno de 140 resultam exclusivamente na formação de apatitas, enquanto a redução dessa razão diminui a quantidade de apatitas formadas até valores de Pi/PPi = 24, a partir dos quais se observa a formação de CPPD (THOUVEREY et al., 2009a). A relação Pi/PPi não foi totalmente investigada em condições fisiológicas, no entanto, considerando que 1-2 mM de Pi e 1-10 μ M de PPi podem ser encontrados no meio extracelular, a relação Pi/PPi resultante gira em torno de 1000. Conforme descrito por Garimella et al. (2006), uma pequena variação na ordem de μ mol de PPi já é suficiente para induzir a inibição da formação de apatita, enquanto uma variação em Pi da ordem de mM é necessária para induzir a formação de CPPD (HOAC et al., 2013).

Se a nucleação da fase mineral é inibida de forma sistêmica, a existência de tecidos mineralizados indica especialização celular para um fenótipo capaz de criar o microambiente necessário para a mineralização da matriz extracelular. Células osteogênicas, como osteoblastos ou condrócitos, além de seu papel na construção da matriz extracelular que será a base para a deposição mineral, também expressam uma série de enzimas capazes de remover localmente os inibidores de mineralização. Além disso, há uma ideia crescente de que as células osteogênicas controlam a deposição da fase mineral por meio de mecanismos ainda mais complexos, que vão desde a formação intracelular de precursores minerais até a liberação de vesículas extracelulares mineralizantes, como MV (MAHAMID et al., 2011; BOTTINI et al., 2018; PEI et al., 2018).

Por fim, identificar o tipo de mineral propagado durante esse processo é necessário, pois como descrito acima, o mecanismo de formação de fosfato de cálcio pela biogênese das MV é um processo complexo, onde, qualquer alteração na razão Pi/PPi e Cálcio/Fosforo (Ca/P), podem resultar em minerais com características patológicas.

4.5 Caracterizações dos minerais obtidos na mineralização *in vitro*

A formação de HAp através de síntese inorgânica, depende diretamente da concentração de íons de Ca^{2+} e de PO_4^{3-} e principalmente de altas temperaturas. Porém, em ambientes biológicos, ou seja, em organismos que necessitam desse tipo de tecido, uma maquinaria é responsável por catalisar esse tipo de reação. Segundo Berzina-Cimdina e Borodajenko (2012), para a realização da síntese de HAp, necessita-se de uma relação de Ca/P de 1,67 (mol/mol). Nesse trabalho, a geração de Pi foi obtida através da hidrólise de ATP (Resultados e Discussão 4.3 e 4.4), ou seja, a relação Ca/P varia em função do tempo.

Para realizar a caracterização de um mineral, utiliza-se de técnicas espectroscópicas para a determinação da sua composição molar (Ca/P, por exemplo), presença de grupos funcionais, simetria de ligação, entre outras. No presente trabalho escolhemos a técnica de FTIR-ATR, por termos acesso em nosso Departamento de Química e requer pequenas quantidades de material para a análise. Então, a partir da mineralização *in vitro* para NPP1-proteolipossomo constituídos de DPPC na presença de nucleador PS-CPLX, realizou-se a sua caracterização por FTIR-ATR dos minerais obtidos (Figura 27).

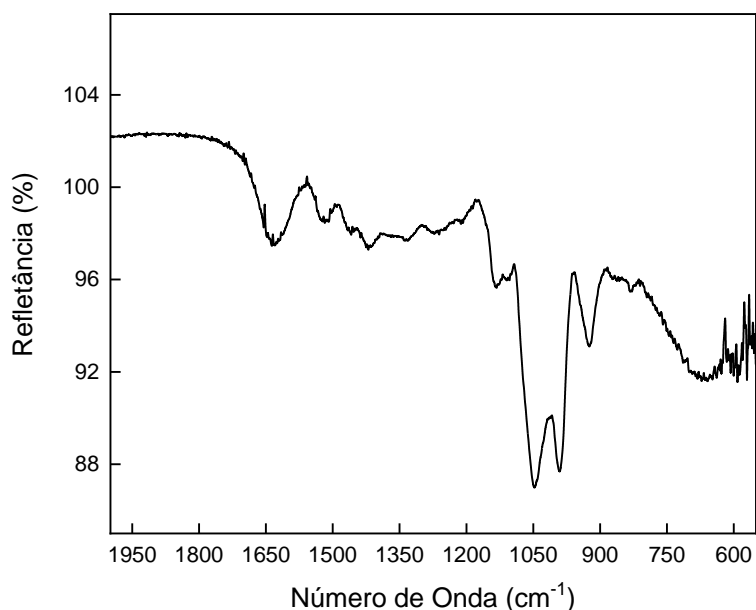


Figura 27. Espectro de FTIR-ATR do mineral obtido pela mineralização *in vitro* de NPP1-proteolipossomos constituídos de DPPC na presença de nucleador PS-CPLX.

Portanto na Figura 27 é observada bandas na região entre ~ 1715 e 1650 cm^{-1} . Essas bandas são provenientes da deformação assimétrica (ν_4) da ligação O-H, e do grupo C=O proveniente do grupo glicerol presente em DPPC e PS. É possível observar também, bandas de deformação simétricas (ν_2) na região de $\sim 1540 \text{ cm}^{-1}$, referente a ligação $-\text{CH}_2-$, e ν_2 em $\sim 1420 \text{ cm}^{-1}$, referente a ligação $-\text{CH}_3$, geralmente encontradas em compostos aminados (GARIMELLA et al., 2006; CERNESCU et al., 2018).

A partir da região de $\sim 1210 \text{ cm}^{-1}$, temos a presença das variadas formas cristalinas em que fosfato pode ser encontrado, pois tudo irá depender de algumas variáveis que podem ser controladas, tais como: razão Ca/P, temperatura, pressão, presença de nucleadores e força iônica (GARIMELLA et al., 2006; BERZINA-CIMDINA e BORODAJENKO, 2012; CERNESCU et al., 2018)

Observa-se bandas de PPI em $\sim 1210 \text{ cm}^{-1}$. Porém, nessa faixa do espectro é correlacionado, também, a deformação axial de ésteres, que estão presentes nos fosfolipídios, que é o resultado da reação entre o grupo álcool (glicerol) e o ácido carboxílico (ácido graxo) (CERNESCU et al., 2018).

Estiramento assimétrico (ν_3) da ligação $-\text{P}-\text{O}$ é observado na região ~ 1221 ($-\text{PO}_2$) e ~ 1131 ($-\text{PO}_3^{2-}$) cm^{-1} (Figura 27). Na sequência é observado o estiramento simétrico (ν_1) da ligação $-\text{P}-\text{O}$, estiramento natural, não proveniente de excitação da radiação infravermelho, em ~ 990 e 925 cm^{-1} (YANG et al., 2009; SAVCHYN et al., 2012). Tanto ν_3 e ν_1 podem ser encontrados em vários tipos de fosfato de cálcio (BERZINA-CIMDINA e BORODAJENKO, 2012). Por fim, foi obtido bandas em ~ 870 e 825 cm^{-1} , sendo atribuídas a hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), precipitado em sua forma ácida, ou quando hidroxiapatita é formada com deficiência de cálcio (RAYNAUD et al., 2002; DESTAINVILLE et al., 2003). Há também, a possibilidade da substituição de íons fosfato por íons CO_3^{2-} , resultado de uma ν_2 na região de $\sim 830 \text{ cm}^{-1}$.

Deve ser destacado que a caracterização da HAp, bem como outro mineral de fosfato de cálcio, a partir de um espectro de FTIR-ATR é bem difícil, devido a vários interferentes que possuem esse tipo de análise. Assim, qualquer tipo de fase de fosfato formada, gera uma banda que dificulta a interpretação para um espectro puro de HAp. Em 850 cm^{-1} , podemos ver a presença de HPO_4^{2-} , geralmente relacionado com falta de Ca^{2+} durante o processo de síntese de HAp (KWON

et al., 2003; QUERIDO et al., 2020). Já em 925 cm^{-1} , podemos observar a presença de uma banda de -PO_4^{3-} tipicamente de um tricálcio fosfato (β -TCP). Porém, quando avançamos na análise do espectro, é possível notar que a presença das bandas em ~ 990 e 1150 cm^{-1} estão presentes em espectros provenientes de HAp e não de β -TCP. Portanto, na nossa análise para NPP1-proteolipossomos foi observada tanto a presença de fosfolipídios, bem como, podendo conter, β -TCP, HAp e ACP em sua composição. Destacamos que é descrito na literatura que a presença de ACP é agente precursor da formação de HAp em organismos vivos (QUERIDO et al., 2020).

Na intenção de mensurar se houve crescimento de fosfato durante o processo de mineralização *in vitro*, realiza-se a razão entre as áreas das bandas de $\nu_3\text{-PO}_4^{3-}$ ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$) com das bandas referentes ao C=O de ésteres ($\sim 1715\text{ cm}^{-1}$), de maneira que, essa razão ($\text{PO}_4^{3-}/\text{C=O}$) exclui a interferência da quantidade, em massa, de cada amostra estudada (SIMAO et al., 2019; FAVARIN et al., 2020). O aumento dessa razão $\text{PO}_4^{3-}/\text{C=O}$ indica presença de espécies sedimentadas com fosfato em sua estrutura, necessitando de análises mais refinadas para a determinação mais precisa do mineral formado (SIMAO et al., 2019; FAVARIN et al., 2020).

Os minerais obtidos por NPP1-proteolipossomo constituídos de DPPC, na presença de nucleador PS-CPLX, obteve razão $\text{PO}_4^{3-}/\text{C=O}$ de 3,54, resultando no aumento da banda de fosfato na presença do nucleador. Isso pode estar correlacionado com os maiores aumentos de turbidez (Figura 25) onde a presença de nucleador durante a mineralização desses proteolipossomos mostrou ser o mais promissor na propagação de minerais.

Portanto, entender o caminho de formação de Pi ou PPI é fundamental para elucidar e potencializar esse processo de obtenção da HAp. Então, a elaboração de DPPC-lipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções), e na ausência de nucleador, auxilia para o entendimento desse processo como descrito em Resultados e Discussão 4.4. Consequentemente, a caracterização dos minerais obtidos ao final da mineralização *in vitro* de DPPC-lipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções), na ausência e presença de 0,5 mM de suramina, foram realizadas utilizando a técnica de FTIR-ATR (Figura 28).

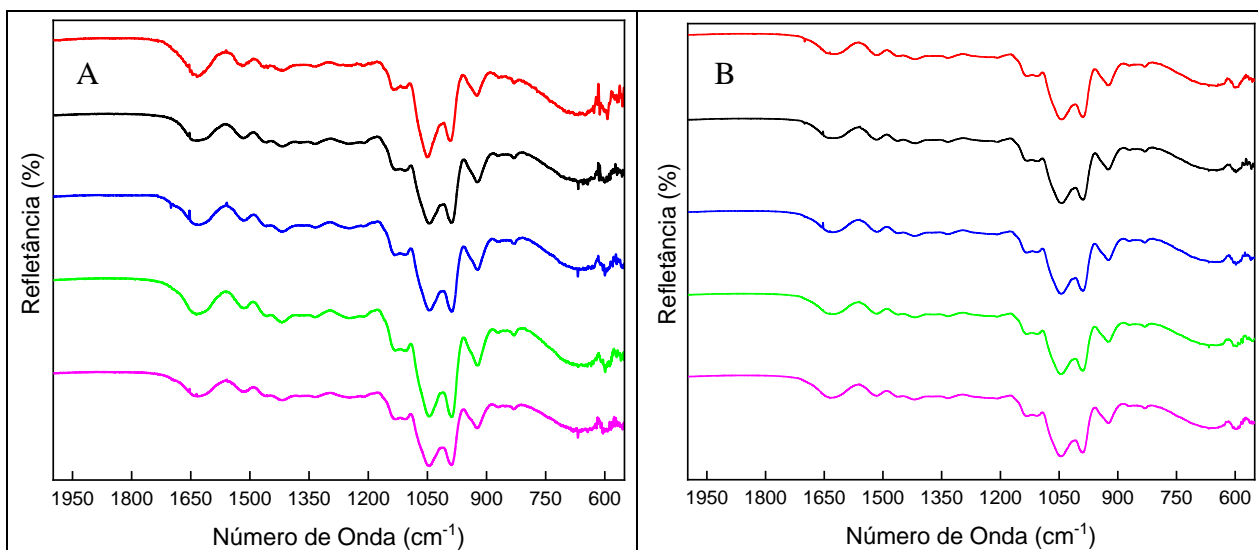


Figura 28. Espectro de FTIR dos minerais obtidos após a mineralização *in vitro*, na (A) ausência e (B) presença de 0,5 mM de suramina, de proteolipossomos contituidos de DPPC, incorporados com: (vermelho) NPP1, (preto) TNAP, (azul) NPP1:TNAP, (verde) NPP1:TNAP (1:10) e (magenta) NPP1:TNAP (10:1).

Todos os espectros de FTIR-ATR obtidos da deposição de minerais, durante o processo de mineralização *in vitro* de DPPC-lipossomos incorporados com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (diferentes proporções), apresentaram bandas próximas ao espectro de FTIR-ATR discutido anteriormente.

Os espectros de ATR-FTIR obtidos para o mineral produzido para todos os proteolipossomos estudados, apresentaram uma banda em $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ relacionada a banda $\nu_3 - \text{PO}_4^{3-}$, sempre encontrada também em espectros de ACP (WUTHIER et al., 1985; MAROVIC et al., 2014; SIMAO et al., 2019; QUERIDO et al., 2020; FAVARIN et al., 2020).

Comparando todos os espectros obtidos por FTIR-ATR na ausência de 0,5 mM de suramina (Figura 28.A), com espectros dos sais dicalcio fosfato anidro, dicalcio fosfato di-hidrato e monocalcio fosfato não é possível observar bandas características dos seus espectros de FTIR-ATR pois é possível apenas a presença de $\nu_1 - \text{PO}_3^{2-}$ nos espectros (SAUER e WUTHIER, 1988; LAOHAVISUTI et al., 2021).

HAp, Ap e HAp deficiente em cálcio possuem picos bem definidos e específicos para CO_3^{2-} em ~ 1500 e 875 cm^{-1} , sendo observado essas características nos espectros obtidos. Porém,

eles apresentam apenas uma única banda de fosfato intensa em $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$, o que não é observado (GADALETA et al., 1996; GHEISARI et al., 2015; QUERIDO et al., 2020).

Espectros de CPPD puro é possível observar a baixa intensidade de ν_1 e ν_3 para ligações -P-O, e altas intensidades na banda de $\sim 1210\text{ cm}^{-1}$, região específicas de PPI (GRAS et al., 2013), podendo estar presente em pequenas quantidades em todos os minerais obtido durante a mineralização *in vitro* (Figura 28.A).

Para HAp obtidas através de OCP mostra a presença de ν_1 e ν_3 das ligações -PO₂ e -PO₃²⁻ (SAUER, 1988) respectivamente, similarmente ao observado nos minerais obtidos das mineralizações *in vitro* (Figura 28.A), indicando que a formação de OCP pode ocorrer como intermediário da reação, obtendo HAp como produto final de síntese.

Portanto, calculou-se a razão PO₄³⁻/C=O (ver Tabela 9), avaliando as mudanças dessa razão entre os minerais obtidos pelos proteolipossomos, na ausência e presença de 0,5 mM de suramina, conforme recomendado por Simao et al. (2019).

Tabela 9. Razões entre as áreas das bandas em ~ 1070 (ν_3 PO₄³⁻) e -1715 (C=O) cm^{-1} obtidas por espectros ATR-FTIR (Figura 28) para o mineral obtido no ensaio de mineralização *in vitro* (Figura 26) dos DPPC-lipossomos incorporado com NPP1, TNAP e NPP1:TNAP (em diferentes proporções).

Proteolipossomos	Suramina (mM)	
	0	0,5
NPP1	3,07 ± 0,22	4,40 ± 0,21
TNAP	4,28 ± 0,10	4,35 ± 0,12
NPP1:TNAP (1:1)	3,65 ± 0,20	4,15 ± 0,14
NPP1:TNAP (1:10)	3,80 ± 0,11	4,14 ± 0,18
NPP1:TNAP (10:1)	3,73 ± 0,04	3,82 ± 0,22

Simao et al. (2019) e Favarin et al. (2020) descreveram que a razão PO₄³⁻/C=O foram maiores para proteolipossomos consituídos de DMPC ou DPPC incorporados com TNAP. Mostrando que, além dos componentes essenciais necessários para a mineralização, como

enzimas, substratos, íons e bicamadas lipídicas, o grau de empacotamento das bicamadas lipídicas e a presença de esteróis podem afetar tanto a eficiência catalítica do TNAP quanto as condições de supersaturação necessários para precipitar minerais ACP ou Ap.

Assim, para os experimentos realizados em SCL e ATP como fonte de Pi, na ausência de Suramina, os minerais formados apresentaram aumento da razão $\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$ quando DPPC-lipossomos está incorporado com TNAP (4,28) ou com NPP1:TNAP (1:10) (3,80). Conseqüentemente, as razões $\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$ são menores para NPP1-proteolipossomos (3,07), e quando comparamos DPPC-lipossomos incorporados com NPP1:TNAP (em diferentes proporções), a presença de maior proporção NPP1 ocasiona na diminuição da razão $\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$ (Tabela 9).

Nos experimentos com suramina 0,5 mM, os minerais formados apresentaram razão $\text{PO}_4^{3-}/\text{C}=\text{O}$ semelhante (valor médio de 4,17) aos minerais obtidos por TNAP-proteolipossomos (Tabela 9) na ausência de suramina. Isso pode ser explicado pelo efeito inibitório da suramina na atividade catalítica da NPP1 afetar em maior porcentagem (74%) a sua função de fosfodiesterase, obtendo maiores concentrações de Pi (e menores de PPi) durante a mineralização (em Resultados e Discussão 4.3 e 4.4), resultando em minerais com qualidades semelhantes aos obtidos por TNAP-proteolipossomos.

5. Conclusões

No presente trabalho utilizamos proteolipossomos como modelos de MV para investigar a iniciação/propagação da mineralização. A partir da padronização da reconstituição de TNAP e NPP1 em membranas de proteolipossomos previamente descrita por Simao et al. (2010) e Ciancaglini et al. (2010), foi possível dar este avanço inédito para estudar o comportamento cinético de duas enzimas associadas a via de mineralização, a fim de avaliar as atividades sinérgicas e/ou antagônicas de produção de Pi e PPi empregando-se um substrato fisiológico relevante como o ATP.

NPP1 não parece usar ATP de forma eficiente, pois atua concomitantemente como fosfomonohidrolase e fosfodiesterase, mas claramente tem um papel na geração de PPi em MV (Figura 29). Em vez disso, é a TNAP que tem um papel importante como ATPase e ADPase e, portanto, participa do processo de mineralização tanto pela redução da concentração de PPi quanto contribuindo simultaneamente para a quantidade de Pi disponível para mineralização por meio de sua ação enzimática no ATP (nas condições do ensaio ADP e PPi apresentam concentrações muito baixas para serem utilizadas pela enzima).

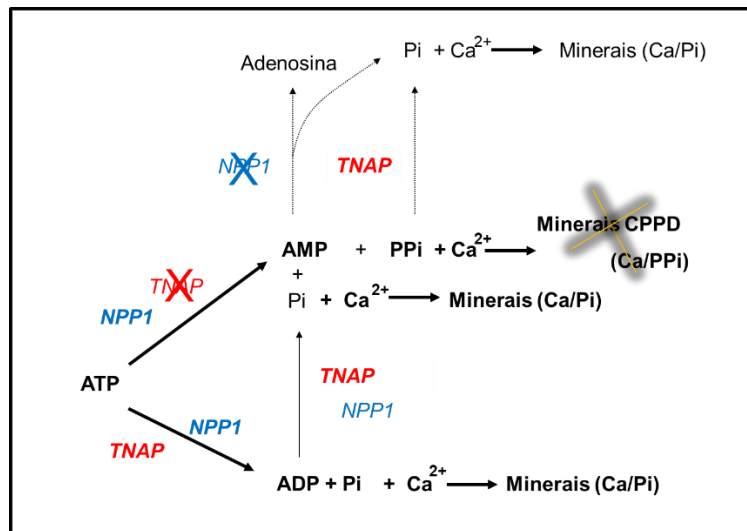


Figura 29. Representação de todas as possíveis reações enzimáticas simultâneas (vias que culminam na mineralização do substrato) durante a hidrólise de ATP por TNAP-, NPP1- e NPP1:TNAP-proteolipossomos. As vias que apresentam as etapas determinantes de hidrólise realizada pelos proteolipossomos estão indicadas em negrito.

A cooperatividade e competição de TNAP e NPP1 por esses substratos e em condições de biomineralização proporcionam um nível adicional de regulação do fluxo de metabólitos para controle do processo de mineralização. O esquema na Figura 29 mostra todas as reações e vias possíveis para a formação mineral em proteolipossomos que abrigam NPP1 e/ou TNAP. Assim, o TNAP é o maior responsável pelo fornecimento de Pi na mineralização e quando os níveis de PPI são produzidos por NPP1, a biomineralização só ocorre quando o equilíbrio Pi/PPI é restabelecido (confirmado pela curva de 2 estágios na mineralização com apenas NPP1-proteolipossoma por capacidade desta enzima de produzir tanto Pi quanto PPI por hidrólise de ATP).

Assim, este microambiente lipídico contendo as enzimas, substratos, inibidores e moduladores na interface, permitiram o estudo de catálise e mineralização mediada por enzimas de uma maneira mais correta do que com proteínas solubilizadas. Também esperamos que a continuidade desse modelo experimental *in vitro* permita a reconstrução de proteolipossomos mais complexos contendo outras proteínas presentes em MV (BOLEAN et al., 2020; CRUZ et al., 2020; VESCHI et al. et al., 2020; RAMOS et al., 2021) com o objetivo de replicar *in vitro* os eventos que levam ao início da formação de minerais derivados de MV.

6. Referências

- ALLEN, M. R.; BURR, D. B. Chapter 5 - Bone Growth, Modeling, and Remodeling. **Basic and Applied Bone Biology (Second Edition)**, Academic Press, (2019). 85-100.
- ANDERSON, H. C.; LOTFI, A.; WESTPHAL, L. C. Functional Equivalence Between Radial Basis Function Networks and Fuzzy Inference Systems. **IEEE Trans. Neural Netw.** (1998), 9, 1529-1532.
- BAQI, Y.; LEE, S. Y.; IQBAL J.; RIPPHAUSEN, P.; LEHR, A; SCHEIFF, A. B.; ZIMMERMANN, H.; BAJORATH, J., MULLER, C. E. Development of Potent and Selective Inhibitors of ecto-50-Nucleotidase Based on an Anthraquinone Scaffold. **J. Med. Chem.** (2010), 53, 2076–2086.
- BECK, G. R.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, (2000), 97, 8352-8357.
- BERZINA-CIMDINA, L e BORODAJENKO, N. Chapter 6 - Research of Calcium Phosphates Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy **Materials Science, Engineering and Technology**. Prof. Theophanides Theophile, InTech Europe, (2012). 123-148.
- BOHM, G. e JAENICKE, R. Correlation functions as a tool for protein modeling and structure analysis. **Protein Sci.** (1992), 1, 1269-1278.
- BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; FAVARIN, B. Z.; MILLAN J. L.; CIANCAGLINI, P. The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes **Biophys. Chem.** (2010), 152, 74–79.
- BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; FAVARIN, B. Z.; MILLAN J. L.; CIANCAGLINI, P. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase **Biophys. Chem.** (2011), 158, 111–118.

BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; KIFFER-MOREIRA, T.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; ITRI, R.; CIANCAGLINI, P. Proteoliposomes with the ability to transport Ca^{2+} into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface **Arch. Biochim. Biophys.** (2015), 584, 79-89.

BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; BARIONI, M. B.; FAVARIN, B. Z.; SEBINELLI, H. G.; VESCHI, E. A.; JANKU, T. A. B.; BOTTINI, M.; HOYLAERTS, M. F.; ITRI, R.; MILLAN J. L.; CIANCAGLINI, P. Biophysical aspects of biomineralization **Biophys Rev.** (2017a), 9, 747–760.

BOLEAN, M.; BORIN, I. A.; SIMAO, A. M. S.; BOTTINI, M.; BAGATOLLI, L. A.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Topographic analysis by atomic force microscopy of proteoliposomes matrix vesicle mimetics harboring TNAP and AnxA5 **Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.** (2017b), 1859, 1911–1920.

BOLEAN, M.; IZZI, B.; VAN KERCKHOVEN, S.; BOTTINI, M.; RAMOS, A. P.; MILLAN, J. L.; HOYLAERTS, M. F.; CIANCAGLINI, P. Matrix vesicle biomimetics harboring Annexin A5 and alkaline phosphatase bind to the native collagen matrix produced by mineralizing vascular smooth muscle cells **Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.** (2020), 1864, 1-9.

BOLLEN, M.; GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; STEFAN, C. Nucleotide Pyrophosphatases/Phosphodiesterases on the Move **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** (2000),35, 393-432;

BOTTINI, M.; MABAREK, S.; ANDERSON, A. L.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; BOZTCKI, L.; SIMAO, A. M. S.; BOLEAN, M.; CIANCAGLINI, P.; PIKULA, J. B.; PIKULA, S.; MAGNE, D.; VOLKMANN, N.; HANEIN, D.; MILLAN, J. L.; BUCHET, R. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models **Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.** (2018), 1862, 532-546.

BUSS, D. J.; KROGER, R.; MCKEE, M. D.; REZNIKOV, N. Hierarchical organization of bone in three dimensions: A twist of twists **J. Struct. Biol. X.** (2022),6, 1-10.

CAMOLEZI, F. L.; DAGHASTANLI, K. R. P.; MAGALHAES, P. P.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Construction of an alkaline phosphatase–liposome system: a tool for biomineralization study **Int. J. Biochem. Cell Biol.** (2002), 34, 1091–1101;

CERNESCU, A.; SZUWARZYNNSKI, M.; KWOLEK, U.; WYDRO, P.; KEPCZYNSKI, M.; ZAPOTOCZNY, S.; NOWAKOWSKA, M.; QUARONI, L. Label-Free Infrared Spectroscopy and Imaging of Single Phospholipid Bilayers with Nanoscale Resolution **Anal. Chem.** (2018), 90, 10179–10186.

CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; REZENDE, A. A.; REZENDE, L. A.; LEONE, F. A. Solubilization of Membrane-Bound Matrix-Induced Alkaline Phosphatase with Polyoxyethylene 9-Lauryl Ether (polidocanol): Purification and Metalloenzyme Properties **Int. J. Biochem.** (1990), 22, 385-392.

CIANCAGLINI, P.; SIMAO, A. M. S.; CAMOLEZI, F. L.; MILLAN, J. L.; PIZAURO, J. M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation **Braz. J. Med. Biol. Res.** (2006), 39, 603-610.

CIANCAGLINI, P.; YADAV, M. C.; SIMAO, A. M. S.; NARISAWA, S.; PIZAURO, J. M.; FARQUHARSON, C.; HOYLAERTS, M. F; MILLAN, J. L. Kinetic Analysis of Substrate Utilization by Native and TNAP-, NPP1-, or PHOSPHO1-Deficient Matrix Vesicles **J. Bone Miner. Res.** (2010), 25, 716–723.

CIANCAGLINI, P.; SIMAO, A. M.S; BOLEAN, M.; MILLAN, J. L.; RIGOS, C. F.; YONEDA, J. S.; COLHONE, M. C.; STABELI, R. G. Proteoliposomes in nanobiotechnology **Biophys. Rev.** (2012), 4, 67–81

CRUZ, M. A. E.; TOVANI, C. B.; FAVARIN, B. Z.; SOARES, M. P. R.; FUKADA, S. Y.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Synthesis of Sr–morin complex and its in vitro response: decrease in osteoclast differentiation while sustaining osteoblast mineralization ability **J. Mater. Chem. B.** (2019), 7, 823-829

CRUZ, M. A. E.; FERREIRA, C. R.; TOVANI, C. B.; OLIVEIRA, F. A.; BOLEAN, M.; CASELI, L.; MEBAREJ, S.; MILLAN, J. L.; BUCHET, R.; BOTTINI, M.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Phosphatidylserine controls calcium phosphate nucleation and growth on lipid monolayers: A physicochemical understanding of matrix vesicle-driven biomineralization **J. Struct. Biol.** (2020), 212, 1-10.

CRUZ, M. A. E.; FERREIRA, C. R.; NOGUEIRA, L. F. B.; ANDRILLI, L. H. S.; SANTOS, A. L. N.; MACEDO, J. M. M.; VESCHI, E. A.; FAVARIN, B. Z.; SEBINELLI, H. G.; BOLEAN, M.; RAMOS, A. P.; CIANCAGLINI, P. Aspectos Químicos Da Biomineralização Óssea **Quim. Nova.**; 2022. (Aceito para publicação, DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170851>)

DAY, F. T.; GUO, X.; GARRETT-BEAL, L.; YANG, Y. Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis **Dev. Cell.** (2005), 8, 739–750.

DENNIS, M. L.; NEWMANN, J.; DOLEZAL, O.; HATTARKI, M.; SURJADI, R., N; NUTTALL, S. D.; PHAM, T.; NEBL, T.; CAMERINO, M.; KHOO, P. S.; MONAHAN, B. J.; PEAT, T. S. Crystal structures of human ENPP1 in apo and bound forms **Acta. Crystallogr. D. Struct. Biol.** (2020), 76, 889–898.

DESTAINVILLE, A.; CHAMPION, E.; BERNACHE-ASSOLLANT, D.; LABORDE, E. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate **Mater. Chem. Phys.** (2003), 80, 269–277.

DIMITRIADIS, G. J. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes **Nature.** (1978), 274, 923-924.

DOHERTY, A. H.; GHALAMBOR, C. K.; DONAHUE, S. W. Evolutionary Physiology of Bone: Bone Metabolism in Changing Environments **Physiology (Bethesda).** (2015), 30, 17–29.

DU, M. H. L. e MILLAN, J. L. Structural Evidence of Functional Divergence in Human Alkaline Phosphatases **J. Biol. Chem.** (2002), 277, 49808-49814.

DY, P.; WANG, W.; BHATTARAM, P.; WANG, Q.; WANG, L.; BALLOCK, T.; LEFEBVRE, V. Sox9 Directs Hypertrophic Maturation and Blocks Osteoblast Differentiation of Growth Plate Chondrocytes **Dev. Cell.** (2012), 22, 597–609.

EAMES, B. F.; SHARPE, P. T.; HELMS, J. A. Hierarchy revealed in the specification of three skeletal fates by Sox9 and Runx2 **Dev. Biol.** (2004), 274, 188–200.

EAMES, B. F.; AMORES, A.; YAN, Y.; POSTLETHWAIT, J. H. Evolution of the osteoblast: skeletogenesis in gar and zebrafish **BMC Evol. Biol.** (2012), 12, 12-27.

EANES, E. D e HAILER A. W. Liposome-Mediated Calcium Phosphate Formation in Metastable Solutions **Calcif. Tissue Int.** (1985), 37, 390-394.

ERCEG, I.; KONTREC, J.; STRASSER, V.; SELMANI, A.; JURASIN, D. D.; CURLIN, M.; DZAKULA, B. N.; MLINARIC, N. M.; SEGOTA, S.; LYONS, D. M.; KRALJ, D.; SIKIRIC, M. D. Precipitation of Calcium Phosphates and Calcium Carbonates in the Presence of Differently Charged Liposomes **Minerals** (2022), 2, 1-20.

FAVARIN, B. Z.; ANDRADE, M. A. R.; BOLEAN, M.; SIMAO, A. M. S.; RAMOS, A. P.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Effect of the presence of cholesterol in the interfacial microenvironment on the modulation of the alkaline phosphatase activity during in vitro mineralization **Colloids. Surf. B. Biointerfaces.** (2017), 155, 466–476.

FAVARIN, B. Z.; BOLEAN, M.; RAMOS, A. P.; MAGRINI, A.; ROSATO, N.; MILLAN, J. L.; BOTTINI, M.; COSTA-FILHO, A. J.; CIANCAGLINI, P. Lipid composition modulates ATP hydrolysis and calcium phosphate mineral propagation by TNAP-harboring proteoliposomes **Arch Biochem Biophys.** (2020), 691, 1-10.

FLEISCH, H.; RUSSEL, R. G. G.; STRAUMANN, F. Effect of Pyrophosphate on Hydroxyapatite and Its Implications in Calcium Homeostasis **Nature.** (1966), 212, 901-903.

GADALETA, S. J.; PASCHALIS, E. P.; BETTS, F.; MENDELSON, R.; BOSKEY, A. L. Fourier Transform Infrared Spectroscopy of the Solution-Mediated Conversion of Amorphous Calcium Phosphate to Hydroxyapatite: New Correlations Between X-Ray Diffraction and Infrared Data **Calcif Tissue Int.** (1996), 58, 9-16.

GALEA, G. L.; ZEIN, M. R.; ALLEN, S.; FRANCIS-WEST, P. Making and shaping endochondral and intramembranous bones **Dev. Dyn.** (2021), 250, 414-449

GALPERIN, M. Y.; BATROCH, A.; KOONIN, E. V. A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases **Protein Sci.** (1998), 7, 1829-1835.

GARIMELLA, R. BI, X.; ANDERSON, H. C.; CAMACHO, N. P. Nature of phosphate substrate as a major determinant of mineral type formed in matrix vesicle-mediated in vitro mineralization: An FTIR imaging study **Bone.** (2006), 38, 811-817.

GENGE, B. R.; WU, L. N. Y.; WUTHIER, R. E. Kinetic analysis of mineral formation during in vitro modeling of matrix vesicle mineralization: Effect of annexin A5, phosphatidylserine, and type II collagen **Anal. Biochem.** (2007), 367, 159-166.

GHEISARI, H.; KARAMIAN, E.; ABDELLAHI, M. A novel hydroxyapatite –Hardystonite nanocomposite ceramic **Ceram. Int.** (2015), 41, 5967-5975.

GOLUB, E. E. Role of matrix vesicles in biomineralization **Biochim. Biophys. Acta.** (2009), 1790, 1592–1598.

GOODNOUGH, L. H.; DINUOSCIO, G. J.; FERGUSON, J. M.; WILLIAMS, T.; LANG, R. A.; ATIT, R. P. Distinct Requirements for Cranial Ectoderm and Mesenchyme-Derived Wnts in Specification and Differentiation of Osteoblast and Dermal Progenitors **PLoS Genet.** (2014), 10, 12-14.

GRAHAM, F. L.; VAN DER EB, A. J. A New Technique for the Assay of Infectivity Human Adenovirus 5 DNA **Virology.** (1973), 52, 456-467.

GRAS, P.; TEYCHENE, S.; REY, C.; CHARVILLAT, C.; BISCANS, B.; SARDA, S.; COMBRAS, C. Crystallisation of a highly metastable hydrated calcium pyrophosphate phase **Cryst. Eng. Comm.** (2013), 15, 2294-2300.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure **Nat. Protoc.** (2006); 1, 2876-2890.

HANCOCK, J. F. Chapter 14: COS Cell Expression **Methods Mol. Biol.** (2003), 8, 153-158.

HARIDY, Y.; OSENBURG, M.; HILGER, A.; MANKE, I.; DAVESNE, D.; WITZMANN, F. Bone metabolism and evolutionary origin of osteocytes: Novel application of FIB-SEM tomography **Sci. Adv.** (2021); 7, 1-12.

HARTREE, E. F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry a Linear Photometric Method That Gives Response **Anal. Biochem.** (1972), 48, 422-427.

HESSLE, L.; JOHNSON, K. A.; ANDERSON, H. C.; NARISAWA, S.; SALI, A.; GODING, J. W.; TERKELTAUB, R.; MILLAN, J. L. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (2002), 14, 9445-9449.

HIRASAWA, T. e KURATANI, S. Evolution of the vertebrate skeleton: morphology, embryology, and development **Zoological Lett.** (2015), 1, 1-17.

HOAC, B.; KIFFER-MOREIRA, T.; MILLAN, J. L.; MCKEE, M. D. Polyphosphates inhibit extracellular matrix mineralization in MC3T3-E1 osteoblast cultures **Bone.** (2013), 53, 478-486.

HOUSTON, B.; STEWART, A. J.; FARQUHARSON, C. PHOSPHO1—A novel phosphatase specifically expressed at sites of mineralisation in bone and cartilage **Bone.** (2004), 34, 629-637.

HSU, H. H. T. e ANDERSON, H. C. A Role for ATPase in the Mechanisms of ATP-dependent Ca and Phosphate Deposition by Isolated Rachitic Matrix Vesicles **Int J. Biochem. Cell Biol.** (1995), 27, 1349-1356.

HSU, H. H. T.; CAMACHO, N. P.; ANDERSON, H. C. Further characterization of ATP-initiated calcification by matrix vesicles isolated from rachitic rat cartilage Membrane perturbation by detergents and deposition of calcium pyrophosphate by rachitic matrix vesicles **Biochim. Biophys. Acta.** (1999), 1416, 320-332.

HUANG, R.; ROSENBAACH, M.; VAUGHN, R.; PROVVEDINI, D.; REBBE, N.; HICKMAN, S.; GODING, J.; TERKELTAUB, R. Expression of the Murine Plasma Cell Nucleotide Pyrophosphohydrolase PC-1 Is Shared by Human Liver, Bone, and Cartilage Cells Regulation of PC-1 Expression in Osteosarcoma Cells by Transforming Growth Factor- β **J. Clin. Invest.** (1994), 94, 560-567.

IQBAL, J.; LEVESQUE, S. A.; SEVIGNY, J.; MULLER, C. E. A highly sensitive CE-UV method with dynamic coating of silica-fused capillaries for monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase reactions **Electrophoresis.** (2008), 29, 3685-3693.

JANSEN, S.; PERRAKIS, A.; ULENS, C.; WINKLER, C.; ANDRIES, M.; JOOSTEN, R. P.; VAN ACKER, M.; LUYTEN, F. P.; MOOLENAAR, W. H.; BOLLEN, M. Structure of NPP1, an Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase Involved in Tissue Calcification **Structure.** (2012), 20, 1948–1959.

JOHNSON, K.; MOFFA, A.; CHEN, Y.; PRITZKER, K.; GODING, J.; TERKELTAUB, R. Matrix Vesicle Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 Regulates Mineralization by Murine Osteoblastic MC3T3 Cells **J. Bone Miner. Res.** (1999), 14, 883-892.

JOHNSON, K.; HASHIMOTO, S.; LOTZ, M.; PRITZKER, K.; GODING, J.; TERKELTAUB, R. Up-Regulated Expression of the Phosphodiesterase Nucleotide Pyrophosphatase Family Member PC-1 Is a Marker and Pathogenic Factor for Knee Meniscal Cartilage Matrix Calcification **Arthritis. Rheum.** (2001), 44, 1071-1081.

JONES, A. C.; CHUCK, A. J.; ARIE, E. A.; GREEN, D. J.; DOHERTY, M. Diseases associated with calcium pyrophosphate deposition disease **Semin. Arthritis. Rheum.** (1992), 22, 188-202.

JOSEPH, S. M.; PIFER, M. A.; PRZYBYLSKI, R. J.; DUBYAK, G. R. Methylene ATP analogs as modulators of extracellular ATP metabolism and accumulation **Br. J. Pharmacol.** (2004), 142, 1002-1014.

KAWASAKI, K.; SUZUKI, T.; WEISS, K. M. Genetic basis for the evolution of vertebrate mineralized tissue **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (2004), 101, 11356-11361.

KELLY, S. M.; JES, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism **Biochim. Biophys. Acta.** (2005), 1751, 119–139.

KHANAL, R. C. e NEMERE, I. Endocrine Regulation of Calcium Transport in Epithelia **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** (2008) 35, 1277-1287.

KIRSCH, T.; NAH, H. D.; DEMUTH, D. R.; HARRISON, G.; GOLUB, E. E.; ADAMS, S. L.; PACIFICI, M. Annexin V-Mediated Calcium Flux across Membranes Is Dependent on the Lipid Composition: Implications for Cartilage Mineralization **Biochemistry.** (1997), 36, 3359-3367.

KOZHEMYAKINA, E.; LASSAR, A. B.; ZELZER, E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation **Development.** (2015), 142, 817-831.

KWON, S.; JUN, Y.; HONG, S.; KIM, H. Synthesis and dissolution behavior of b-TCP and HA/ β -TCP composite powders **J. Eur. Ceram. Soc.** (2003) 23 1039-1045.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 **Nature.** (1972), 227, 680-685

LAKETA, D.; BJELOBABA, I.; SAVIC, J.; LAVRNJA, I.; STOJILJKOVIC, M.; RAKIC, L.; NEDELJKOVIC, N. Biochemical characterization of soluble nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activity in rat serum **Mol Cell Biochem.** (2010), 339, 99-106.

LAOHAVISUTI, N.; BOONCHOM, B.; BOONMEE, W.; CHAISEEDA, K.; SEESANONG, S. Simple recycling of biowaste eggshells to various calcium phosphates for specific industries **Sci. Rep.** (2021) 11, 1-11.

LEE, J. C e VOLPICELLI, E. J. Bioinspired Collagen Scaffolds in Cranial Bone Regeneration: From Bedside to Bench **Adv Healthc. Mater.** (2017), 6, 1-17.

LEE, S. Y.; LEVESQUE, S. A.; SEVIGNY, J.; MULLER, C. E. A highly sensitive capillary electrophoresis method using p-nitrophenyl 5'-thymidine monophosphate as a substrate for the monitoring of nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase activities **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.** (2012) 911, 162-169.

LEE, S. Y.; SARKAR, S.; BHATTARAI, S.; NAMASIVAYAM, V.; DE JONGHE, S.; STEPHAN, H.; HERDEWIJN, P.; EL-TAYEB, A.; MULLER, C. E. Substrate-Dependence of Competitive Nucleotide Pyrophosphatase/ Phosphodiesterase1 (NPP1) Inhibitors **Front. Pharmacol.** (2017), 8, 1-7.

LEE, S. Y. e MULLER, C. E. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) and its inhibitors **MedChemComm.** (2017), 8, 823-841.

LEFEBVRE, V. e SMITS, P. Transcriptional Control of Chondrocyte Fate and Differentiation **Birth Defects. Res. C Embryo Today** (2005), 75, 200-212.

LIU, C.; ANGELOZZI, M.; HASEEB, A.; LEFEBVRE, V. SOX9 is dispensable for the initiation of epigenetic remodeling and the activation of marker genes at the onset of chondrogenesis **Development.** (2018), 145, 1-15.

LOWE, M.; STRAUSS, A. W.; ALPERS, R.; SEETHARAM, S.; ALPERS, D. H. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase **Biochim. Biophys. Acta.** (1990), 1037, 170-177.

MAHAMID, J.; ADDADI, L.; WEINER, S. Crystallization Pathways in Bone **Cells Tissues Organs.** (2011), 194, 92-97

MANGIAVINI, L.; PERETTI, G. M.; CANCIANI, B.; MAFFULLI, N. Epidermal growth factor signalling pathway in endochondral ossification: an evidence-based narrative review **Ann. Med.** (2022), 54, 37-50.

MAROVIC, D.; TARLE, Z.; HILLER, K. A.; MULLER, R.; RISTICS, M.; ROSENTRITT, M.; SKRTIC, D.; SCHMALZ, G. Effect of silanized nanosilica addition on remineralizing and mechanical properties of experimental composite materials with amorphous calcium phosphate **Clin. Oral. Investig.** (2014), 18,783-792.

MASSE, K.; BHAMRA, S.; ALLSOP, G.; DALE, N.; JONES, E. A. Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase (Enpp) nucleotidases: cloning, conservation and developmental restriction **Int. J. Dev. Biol.** (2010), 54, 181-193.

MASUDA, I.; IYAMA, K.; HALLIGAN, B. D.; BARBIERI, J. T.; HAAS, A. L.; MCCARTY, D. J.; RYAN, L. M. Variations in Site and Levels of Expression of Chondrocyte Nucleotide Pyrophosphohydrolase with Aging **J. Bone Miner. Res.** (2001), 16, 868-875.

MCKEE, M. D.; YADAY, M. C.; FOSTER, B. L.; SOMERMAN, M. J.; FARQUHARSON, C.; MILLAN, J. L. Compounded PHOSPHO1/ ALPL Deficiencies Reduce Dentin Mineralization **J Dent. Res.** (2013), 92,721-727.

MCKEE, M. D.; BUSS, D. J.; REZNIKOV, N. Mineral tessellation in bone and the stenciling principle for extracellular matrix mineralization **J Struct. Biol.** (2022), 214, 1-7.

MILLAN, J. L. Alkaline Phosphatases Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes **Purinergic. Signal.** (2006), 2, 335-341.

MILLAN, J. L. The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization **Calcif. Tissue. Int.** (2013), 93, 299-306.

MILLAN, J. L.; WHYTE, M. P. Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia **Calcif Tissue. Int.** (2016), 98, 398-416.

MULLER, C. E.; IQBAL, J.; BAQI, Y.; ZIMMERMANN, H.; ROLLICH, A.; STEPHAN, H. Polyoxometalates-a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors **Bioorg. Med. Chem. Lett.** (2006), 16, 5943-5947.

NAKAMURA, T.; NAKAMURA, K.; STINSON, R. A. Release of Alkaline Phosphatase from Human Osteosarcoma Cells by Phosphatidylinositol Phospholipase C: Effect of Tunicamycin **Arch. Biochem. Biophys.** (1988), 265, 190-196.

NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J. M.; BEHRINGER, R. R.; DE CROMBRUGGHE, B. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation **Cell.** (2002), 108, 17-29.

NAMASIVAYAM, V.; LEE, S. Y.; MULLER, C. E. The promiscuous ectonucleotidase NPP1: molecular insights into substrate binding and hydrolysis **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.** (2017), 1861, 603-614.

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields **EMBO J.** (1982), 1, 841-845.

NGUYEN, J. K. B.; EAMES, B. F. Evolutionary repression of chondrogenic genes in the vertebrate osteoblast **FEBS J.** (2020), 287, 4354-4361.

NOGUEIRA, L. F. B.; MANIGLIA, B. C.; BUCHET, R.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P.; BOTTINI, M.; RAMOS, A. P. Three-dimensional cell-laden collagen scaffolds: From biochemistry to bone bioengineering **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.** (2021), 1, 1–17.

OKAWA, A.; NAKAMURA, I.; GOTO, S.; MORIYA, H.; NAKAMURA, Y.; IKEGAWA, S. Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine **Nat. Genet.** (1998), 19, 271-273.

OPDEBEECK, B.; NEVEN, E.; MILLAN, J. L.; PINKERTON, A. B.; D'HAESE, P. C. Chronic Kidney Disease-Induced Arterial Media Calcification in Rats Prevented by Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Substrate Supplementation Rather Than Inhibition of the Enzyme **Pharmaceutics.** (2021), 13, 1138-1144.

ORRISS, I. R. Extracellular pyrophosphate: The body's “water softener” **Bone.** (2020), 134, 1-9.

PEI, D.; SUN, J.; ZHU, C.; TIAN, F.; JIAO, K.; ANDERSON, M. R.; YIU, C.; HUANG, C.; JIN, C.; BERGERON, B. E.; CHEN, J.; TAY, F. R.; NIU, L. Contribution of Mitophagy to Cell-Mediated Mineralization: Revisiting a 50-Year-Old Conundrum **Adv. Sci (Weinh)**. (2018), 5, 1-12.

PERRONE JR, R. V.; WILLIAMS, J. L. The morphogenesis of porcine femoral head mammillary processes. A structural mechanism of biomechanical stability **Anat Rec (Hoboken)**. (2022), 305, 265-283.

PETERSEN, C. B.; NYGARD, S. B.; VIUFF, B.; FREDHOLM, M.; AASTED, B.; SALOMONSEN, J. Porcine Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 1 (NPP1/CD203a): Cloning, Transcription, Expression, Mapping, And Identification of An NPP1/CD203a Epitope for Swine Workshop Cluster 9 (SWC9) Monoclonal Antibodies **Dev. Comp. Immunol.** (2007), 31, 618–631.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Triton X-100 Solubilized Bone Matrix-Induced Alkaline Phosphatase **Comp. Biochem. Physiol. B.** (1987), 87, 921-926.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase **Biochim. Biophys. Acta.** (1993), 1202, 22-28.

PURCELL, D. F. J.; BROSCIUS, C. M.; VANIN, E. F.; BUCKLER, C. E.; NIENHUIS, A. W.; MARTIN, M. A. An Array of Murine Leukemia Virus-Related Elements Is Transmitted and Expressed in a Primate Recipient of Retroviral Gene Transfer **J. Virol.** (1996), 70, 887–897.

QUERIDO, W.; SHANAS, N.; BOOKBINDER, S.; OLIVEIRA-NUNES, M. C.; KRYNSKA, B.; PLESHKO, N. Fourier transform infrared spectroscopy of developing bone mineral: from amorphous precursor to mature crystal **Analyst.** (2020), 145, 764-776.

RAMOS, A. P.; BOLEAN, M.; CRUZ, M. A. E.; ANDRILLI, L. H. S.; NOGUEIRA, L. F. B.; SEBINELLI, H. G.; DOS SANTOS, A. L. N.; FAVARIN, B. Z.; MACEDO, J. M. M.; VESCI, E. A.; FERREIRA, C. R.; MILLAN, J. L.; BOTTINI, M. CIANCAGLINI, P. Langmuir monolayers and proteoliposomes as models of matrix vesicles involved in biomineralization **Biophys. Rev.** (2021), 1, 1-3.

RAYNAUD, S.; CHAMPION, E.; ASSOLLANT, D. B.; THOMAS, P. Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders **Biomaterials.** (2002), 23, 1065–1072.

REZENDE, A. A.; PIZAUROS, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate **Biochem. J.** (1994), 301, 517-522.

SANTOS, H. L.; LOPES, M. L.; MAGGIO, B.; CIANCAGLINI, P. Na,K-ATPase reconstituted in liposomes: effects of lipid composition on hydrolytic activity and enzyme orientation **Colloids. Surf. B Biointerfaces.** (2005), 41, 239-248.

SAUER, G. R.; WUTHIER, R. E. Fourier Transform Infrared Characterization of Mineral Phases Formed during Induction of Mineralization by Collagenase-released Matrix Vesicles in Vitro **J. Biol. Chem.** (1988), 263, 13718-13724.

SAVCHYN, P.; KARBOVNYK, I.; VISTOVSKYY, V.; VOLOSHINOVSKII, A.; PANKRATOV, V. Vibrational properties of LaPO₄ nanoparticles in mid- and far-infrared domain **Int. J. Appl. Phys.** (2012), 112, 1-7.

SEBINELLI, H. G.; BORIN, I. A.; CIANCAGLINI, P.; BOLEAN, M. Topographical and mechanical properties of liposomes surface harboring Na,K-ATPase by means of Atomic Force Microscopy **Soft. Matter.** (2019), 175, 1-12.

SELA, J.; GROSS, U. M.; KOHAVI, D.; SHANI, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Primary Mineralization at The Surfaces of Implants **Crit. Rev. Oral Biol. Med.** (2000), 11, 423-436.

SIMAO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L.; OLIVEIRA, P. T.; GRANJEIRO, J. M.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: A useful source of alkaline phosphatase **Cell Biol. Int.** (2007), 31, 1405-1413.

SIMAO, A. M. S.; YADAV, M. C.; NARISAWA, S.; BOLEAN, M.; PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CIANCAGLINI, P.; MILLAN, J. L. Proteoliposomes Harboring Alkaline Phosphatase and Nucleotide Pyrophosphatase as Matrix Vesicle Biomimetics **J. Biol. Chem.** (2010), 285, 7598–7609.

SIMAO, A. M. S.; BOLEAN, M.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Effects of pH on the Production of Phosphate and Pyrophosphate by Matrix Vesicles' Biomimetics **Calcif. Tissue Int.** (2013), 93, 222-232.

SIMAO, A. M. S.; BOLEAN, M.; FAVARIN, B. Z.; VESCHI, E. A.; TOVANI, C. B.; RAMOS, A. P.; BOTTINI, M.; BUCHET, R.; MILLAN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Lipid microenvironment affects the ability of proteoliposomes harboring TNAP to induce mineralization without nucleators **J. Bone Miner. Metab.** (2019), 37, 607-613.

SREERAMA, N. e WOODY, R. W. Estimation of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set **Anal. Biochem.** (2000), 287, 252-260.

SREERAMA, N. e WOODY, R. W. Computation and Analysis of Protein Circular Dichroism Spectra **Methods Enzymol.** (2004), 383, 318-351.

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity **Trends Biochem Sci.** (2005), 30, 542-550

STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPP-type ectophosphodiesterases **Purinergic Signal.** (2006), 2, 361-370.

SUN, Y.; MAUERHAN, D.; HONEYCUTT, P. R.; KNEISL, J. S.; NORTON, H. J.; ZINCHENKO, N.; HANLEY, E. N.; GRUBER, H. E. Calcium deposition in osteoarthritic meniscus and meniscal cell culture **Arthritis. Res. Ther.** (2010), 12, 1-9.

SUZUKI, A.; AMMANN, P.; NISHIWAKI-YASUDA, K.; SEKIGUCHI, S.; ASANO, S.; NAGAO, S.; KANEKO, R.; HIRABAYASHI, M.; OISO, Y.; ITOH, M.; CAVERZASIO, J. Effects of transgenic Pit-1 overexpression on calcium phosphate and bone metabolism **J Bone Miner. Metab.** (2010), 28,139-148.

SZERI, F.; NIAZIORIMI, F.; DONNELLY, S.; FAHIRA, N.; TERTYSHNAIA, M.; PATEL, D.; LUNDKVIST, S.; VAN DE WETERING, K. The mineralization regulator ANKH mediates cellular efflux of ATP, not pyrophosphate **J. Bone Miner. Res.** (2022) (DOI: 10.1002/jbmr.4528)

TERKELTAUB, R. ROSENBAACH, M. FONG, F.; GODING, J. Causal Link Between Nucleotide Pyrophosphohydrolase Overactivity and Increased Intracellular Inorganic Pyrophosphate Generation Demonstrated by Transfection of Cultured Fibroblasts and Osteoblasts with Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 **Arthritis Rheum.** (1994), 37, 934-941.

TERKELTAUB, R. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** (2001), 281, 1-11.

THOUVEREY, C.; BECHKOFF, G.; PIKULA, S.; BUCHET, R. Inorganic pyrophosphate as a regulator of hydroxyapatite or calcium pyrophosphate dihydrate mineral deposition by matrix vesicles **Osteoarthritis Cartilage.** (2009a), 17, 64-72.

THOUVEREY, C.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; BALCERZAK, M.; BUCHET, R.; PIKULA, S. Matrix Vesicles Originate from Apical Membrane Microvilli of Mineralizing Osteoblast-Like Saos-2 Cells **J. Cell. Biochem.** (2009b), 106, 127-138.

VESCHI, E. A.; BOLEAN, M.; STRZELECKA-KILISZEK, A.; PIKULA, J. B.; PIKULA, S.; GRANJON, T.; MEBAREK, S.; MAGNE, D.; RAMOS, A. P.; ROSATO, N.; MILLAN, J. L.; BUCHET, R.; BOTTINI, M.; CIANCAGLINI, P. Localization of Annexin A6 in Matrix Vesicles During Physiological Mineralization **Int. J. Mol. Sci.** (2020), 21, 1-16.

VON DER MARK, K.; MOLLENHAUER, J. Annexin V interactions with collagen **Cell. Mol. Life Sci.** (1997), 53, 539-545.

WAGNER, D. O. e ASPERNBERG, P. Where did bone come from? An overview of its evolution **Acta. Orthop.** (2011), 82, 393-398.

WANG, Y.; AZAIS, T.; ROBIN, M.; VALLEE, A.; CATANIA, C.; LEGRIEL, P.; PEHAU-ARNAUDET, G.; BABONNEAU, F.; GIRAUD-GUILLE, M. M.; NASSIF, N. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite **Nat. Mater.** (2012), 11, 724-733.

WHYTE, M. P.; ROCKMAN-GREENBERG, C.; OZONO, K.; RIESE, R.; MOSELEY, S.; MELIAN, A.; THOMPSON, D. D.; BISHOP, N.; HOFMANN, C. Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia **J. Clin. Endocrinol. Metab.** (2016), 101, 334-342.

WUTHIER, R. E. Lipids of mineralizing epiphyseal tissues in the bovine fetus **J. Lipid Res.** (1968),9, 68-78.

WUTHIER, R. E. Electrolytes of Isolated Epiphyseal Chondrocytes, Matrix Vesicles, and Extracellular Fluid **Calcif. Tissue. Res.** (1977), 23, 125-133.

WUTHIER, R. E.; CHIN, J. E.; HALE, J. E.; REGISTER, T. C.; HALE, L. V.; ISHIKAWA, Y. Isolation and Characterization of Calcium-accumulating Matrix Vesicles from Chondrocytes of Chicken Epiphyseal Growth Plate Cartilage in Primary Culture **J. Biol. Chem.** (1985), 260, 15972-15979.

WUTHIER, R. E. e LIPSCOMB, G. Matrix vesicles: Structure, composition, formation and function in calcification **Front. Biosci. (Landmark Ed).** (2011), 16, 2816-2902.

YADAV, M. C.; BOTTINI, M.; CORY, E.; BHATTACHARYA, K.; KUSS, P.; NARISAWA, S.; SAH, R. L.; BECK, L.; FADEEL, B.; FARQUHARSON, C.; MILLAN, J. L. Skeletal Mineralization Deficits and Impaired Biogenesis and Function of Chondrocyte-Derived Matrix Vesicles in Phospho1^{-/-} and Phospho1/Pit1 Double-Knockout Mice **J. Bone Miner. Res.** (2016), 31, 1275-1286.

YANG, M.; YOU, H.; JIA, G.; HUANG, Y.; SONG, Y.; ZHENG, Y.; LIU, K.; ZHANG, L. Selective synthesis of hexagonal and monoclinic LaPO₄:Eu³⁺ nanorods by a hydrothermal method **J. Cryst. Growth.** (2009), 311, 4753-4758.

YINGCHONCHAROEN, P.; KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come **Pharmacol. Rev.** (2016), 68, 701-787.

ZHANG, Y.; BROWN, M. A.; PEACH, C.; RUSSEL, G.; WORDSWORTH, B. P. Investigation of the role of ENPP1 and TNAP genes in chondrocalcinosis **Rheumatology (Oxford).** (2007), 46, 586-589.

ZHOU, G.; ZHENG, Q.; ENGIN, E.; MUNIVEZ, E.; CHEN, Y.; SEBALD, E.; KRAKOW, D.; LLE, B. Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** (2006), 103, 19004-19009.

ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases **Purinergic Signal.** (2012), 8,437-502.