



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

Efeito da Anexina A5 na interação entre íons Ca^{2+} e membranas contendo DPPS

Claudio dos Reis Ferreira

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

2021



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

Efeito da Anexina A5 na interação entre íons Ca^{2+} e membranas contendo DPPS

Claudio dos Reis Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Co-orientadora: Dra. Maytê Bolean

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

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira, Claudio dos Reis

Efeito da Anexina A5 na interação entre íons Ca^{2+} e membranas contendo DPPS. Ribeirão Preto, 2021.

89 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; Co-orientadora: Bolean, Maytê

1. Anexina A5. 2. Cálcio. 3. DPPS.

Ao meu pai, Claudimiro, por me ensinar a sentir.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, e sobretudo pelo amparo nos momentos em que se falta algo no qual se possa agarrar.

Às mulheres da minha vida, minha mãe Solange e minhas irmãs, Letícia e Vitória, por serem tão fundamentais na minha vida, e por me ensinarem sobre as coisas que importam. Todo o amor no mundo é meu, pra vocês.

À minha tia Roseli, que me acolheu em sua casa desde a graduação até boa parte do mestrado, sempre muito bondosa e prestativa. Às minhas queridas primas, Rafaela e Graziela, por todos os momentos que tivemos, e ao meu tio Cleiton, pelas valiosas lições de vida que me passou. A todos vocês, minha eterna gratidão!

À Dona Maria e Sérgio, por me aceitarem em sua casa durante a graduação, e por terem me incluído na família de vocês. À Maria, obrigado por todas as longas conversas e por ser sempre solícita.

Ao meu orientador, Prof. Pietro, pela confiança e ótima convivência no dia-a-dia, isso fez e faz toda a diferença. Agradeço também por ser um exemplo de pessoa e de profissional, e por me mostrar as coisas que realmente importam e que valem a pena. À Maytê, pela co-orientação e aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, Luiz, Kel, Heitor, Bruno Favarin, Bruno Molero, Fábio e Jesaiás, pela convivência e pelos momentos de descontração. Obrigado por serem tão prestativos e dispostos a ajudar. Luiz, muito obrigado por ser um amigo tão presente e acolhedor. Sua alegria constante é (quase) sempre bem-vinda! Obrigado por sempre me acompanhar em tudo, você é luz! Kel, muito obrigado por todos os nossos passeios, cookies e por ser essa pessoa amável e solícita. Sou muito grato pela sua amizade!

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Físico-Química de Superfícies e Coloides, Marcos, Lucas, Larissa, Tamires, João Pedro e Camila. Cada um de vocês é um presente, e eu me sinto muito honrado em tê-los tão junto de mim. Muito obrigado pelos inúmeros momentos agradáveis que tivemos. Vocês são uma casa de afeto e amizade. Marcos, eu não tenho palavras para expressar o quão essencial você foi no decorrer de todo este trabalho. Muito obrigado pelas discussões e por me trazer de volta à realidade sempre que necessário. Você é admirável. Lucas, poucas pessoas são tão fiéis e amigas quanto você. Eu não paro de me deslumbrar com a forma com que você sempre se mostra um ser humano cada vez mais amável. Obrigado pela sua amizade. Larissa, você é toda feita de alegria, que prazer é ter a sua companhia. Obrigado pelo seu sorriso que melhora todas as manhãs. Tamires, o seu senso de humor e a sua sagacidade são essenciais para mim. Obrigado pelas músicas compartilhadas. João, que saudade do seu deboche e irreverência!

Camila, querida, obrigado por ser um exemplo para mim de pessoa e profissional, por me mostrar como as coisas são e, acima de tudo, como podem ser. Sempre aprendo muito com você.

Aos meus queridos amigos, Roberta, Luiz Fernando e Karmel. Muito obrigado por serem tão amáveis e gentis. Sou muito grato pela amizade de vocês, e por todos os momentos agradáveis que tivemos.

À Profa. Ana Paula, pelo suporte na realização e discussão dos experimentos e por sempre ver o lado bom das coisas.

Ao meu grande amigo Lucas Urbano, por sempre me ouvir, me socorrer e me respeitar. Eu não tenho palavras para expressar quão fundamental é a sua amizade na minha vida. Você é um tesouro do qual eu não abro mão. Obrigado por ser alguém em que eu possa me inspirar. Que renasçamos em Anarres, querido, para sempre.

À Gabriella, minha eterna Darling, pela amizade que construímos ao longo desses anos. Muito obrigado por ser parte da minha vida, e por me oferecer uma amizade tão leve, pura e verdadeira!

Ao Jesimiel, que em grande parte deste trabalho me motivou a continuar, a fazer acontecer. Obrigado por me aturar e por sempre me animar!

A todos os demais amigos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Não os citarei para que não me falte nenhum.

A todos os funcionários do Departamento de Química, pela simpatia no trato e por fornecerem as condições necessárias para que coisas pudessem ser criadas. Um obrigado especial à Rose e à Camila, pelo carinho fácil.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação profissional, e sobretudo, pessoal. Agradeço especialmente à Profa. Marcia Salustiano, por ser uma pessoa tão iluminada e marcante, e às Profas. Lílian Quintino, Regina Destro, Cintia Bazana e Sueli Silva, por me fazerem gostar de química a ponto de ter me graduado nisso!

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao leitor, pela paciência.

À ciência, pelo fascínio.

“O inferno não são os outros, pequena Halla. Eles são o paraíso, porque um homem sozinho é apenas um animal. A humanidade começa nos que te rodeiam, e não exatamente em ti. Ser-se pessoal implica a tua mãe, as nossas pessoas, um desconhecido ou a sua expectativa. Sem ninguém no presente nem no futuro, o indivíduo pensa tão sem razão quanto pensam os peixes. Dura pelo engenho que tiver e perece como um atributo indiferenciado do planeta. Perece como uma coisa qualquer”.

Trecho de *A desumanização*, de Valter Hugo Mãe

RESUMO

Ferreira, C. R. **Efeito da Anexina A5 na interação entre íons Ca^{2+} membranas contendo DPPS.** 2021. 89p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A mineralização do osso é um processo dirigido por vesículas da matriz (VMs), que produzem e liberam as primeiras partículas de mineral na matriz extracelular colagenosa. Acredita-se que a Anexina A5 (AnxA5) desempenhe um papel importante na nucleação de mineral dentro das VMs influenciada por cálcio e PS. O trabalho buscou avaliar a estabilidade de membranas compostas por DPPC e DPPS em meios contendo íons Ca^{2+} , assim como o efeito da AnxA5 sobre essa estabilidade e sua relevância para o processo de mineralização óssea. O efeito de íons Ca^{2+} sobre membranas constituídas por DPPC puro, 10%DPPS, 20%DPPS (porcentagens molares) e DPPS puro foi avaliado a partir de monocamadas de Langmuir (isotermas π -A e microscopia de fluorescência) e lipossomos (calorimetria de varredura diferencial, DSC; e espalhamento dinâmico de luz, DLS). Os dados obtidos por meio de DSC e DLS mostram que concentrações de cálcio na faixa de 0,5-2,0 mM induzem a formação de domínios lipídicos ricos em DPPS e que promovem a agregação/fusão de lipossomos. No entanto, o efeito fusogênico promovido pelos íons Ca^{2+} é minimizado na presença de AnxA5 (fusão que outrora ocorria em 0,5 mM passa a ocorrer a partir de 1,0 mM na presença da proteína). As imagens de microscopia mostram a formação de pequenos domínios lipídicos em monocamadas de DPPC puro em meio contendo íons Ca^{2+} , que se tornam maiores na presença de DPPS e ainda maiores na presença de AnxA5. Os resultados indicam que a AnxA5 pode ser fundamental para a nucleação de mineral dentro de VMs, atuando na estabilização de regiões abundantes em DPPS para que ocorra acúmulo suficiente de cálcio e fosfato, necessários para a formação e crescimento do mineral.

Palavras-chave: Anexina A5; Cálcio; DPPS

ABSTRACT

Ferreira, C. R. **Effect of Annexin A5 in the interaction between Ca^{2+} ions and DPPS-containing membranes.** 2021. 89p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The mineralization of bone is a process driven by matrix vesicles (MVs), which produce and release the first mineral particles into the collagenous extracellular matrix. Annexin A5 (AnxA5) is believed to play a crucial role in the mineral nucleation inside the MVs influenced by both calcium and PS. We aimed to evaluate the stability of membranes composed of DPPC and DPPS in a medium containing Ca^{2+} ions, as well as the role of AnxA5 in this phenomenon and its implication for the biomineralization process. We assessed the effect of calcium ions on the organization of membranes constituted by pure DPPC, 10%DPPS, 20%DPPS and pure DPPS (numbers depict molar percentage) formed both as bilayers (liposomes, characterized by differential scanning (DSC) and dynamic light scattering (DLS) and monolayers (Langmuir monolayers, characterized by π -A isotherms and fluorescence microscopy)). Our data revealed that calcium ions in the concentration range of 0.5-2.0 mM induced the formation of DPPS-enriched domains that make liposomes prone to vesicle fusion/aggregation, as observed by DSC and DLS measurements. However, in the presence of AnxA5, these domains are stabilized in such a way that the calcium fusogenic effect is retarded. In fact, fusion was observed only in concentrations higher than 1.0 mM Ca^{2+} while in the absence of protein it started at 0.5 mM Ca^{2+} . Microscopy images revealed the formation of small condensed lipid domains for pure DPPC, that became larger when DPPS was present and even larger when AnxA5 was present. We believe that this ternary behavior is central to the mineral nucleation inside the MVs that requires a significant amount of calcium and phosphate ions concentrated on a small region of the membrane, since the negatively charged DPPS-membrane associated to AnxA5 facilitates the nucleation, growth and release of mineral.

Keywords: Annexin A5; Calcium; DPPS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnxA5	Anexina A5
VMs	Vesículas da matriz
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPS	dipalmitoilfosfatidilserina
HBS	<i>Hepes Buffered Saline</i>
DSC	Calorimetria de varredura diferencial
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
AFM	Microscopia de força atômica
Tt	Temperatura de transição de fase
$t_{1/2}$	Unidade de cooperatividade
ΔH	Varição de entalpia
ΔG	Varição de energia livre de Gibbs

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 Estruturas mineralizadas em diferentes organismos.	13
Figura 02 Ossificação intramembranosa.	18
Figura 03 Ossificação endocondral.	20
Figura 04 Esquema geral de uma vesícula da matriz.	24
Figura 05 Estrutura tridimensional da AnxA5 humana.	27
Figura 06 Interação de AnxA5 com membranas negativamente carregadas.	28
Figura 07 Ação da AnxA5 no reparo de membranas.	30
Figura 08 Esquema de funcionamento de uma cuba de Langmuir.	33
Figura 09 Classificação de lipossomos baseada no tamanho e lamelaridade	35
Figura 10 Interação de DPPC e DPPS em monocamadas de Langmuir.	42
Figura 11 Análise do comportamento de mistura das monocamadas em tampão HBS.	46
Figura 12 Interação de DPPC e DPPS em monocamadas de Langmuir.	49
Figura 13 Análise do comportamento de mistura das monocamadas em água.	50
Figura 14 Interação de DPPC, DPPS e AnxA5 em monocamadas de Langmuir.	52
Figura 15 Análise do comportamento de mistura das monocamadas em tampão HBS na presença de AnxA5.	54
Figura 16 Estabilidade das monocamadas preparadas em tampão HBS.	57
Figura 17 Estabilidade das monocamadas preparadas em água pura	58
Figura 18 Estabilidade das monocamadas preparadas em tampão HBS na presença de AnxA5	59
Figura 19 Microscopia de fluorescência das monocamadas preparadas.	61
Figura 20 Avaliação do efeito da presença de DPPS e AnxA5 no comportamento termotrópico das vesículas na ausência e presença de cálcio.	65
Figura 21 Parâmetros de transição de fase lipídica dos lipossomos e proteolipossomos obtidos por DSC.	66
Figura 22 Avaliação do efeito da presença de DPPS e AnxA5 na formação de domínios lipídicos nas vesículas.	69
Figura 23 Parâmetros de transição de fase lipídica dos termogramas deconvoluídos de lipossomos e proteolipossomos.	70
Figura 24 Análise de estabilidade coloidal dos lipossomos e proteolipossomos preparados. .	71
Figura 25 Ensaio de agregação por DLS dos lipossomos e proteolipossomos preparados.	73
Figura 26 Ensaio de agregação turbidimétrico dos lipossomos e proteolipossomos preparados.	74

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 BIOMINERALIZAÇÃO	13
1.2 MINERALIZAÇÃO ÓSSEA	14
1.3 VESÍCULAS DA MATRIZ.....	22
1.4 ANEXINA A5 E SEU PAPEL NA MINERALIZAÇÃO	25
1.5 MODELOS MIMÉTICOS DE MEMBRANA	32
2 OBJETIVOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 OBTENÇÃO DA PROTEÍNA.....	37
3.2 MONOCAMADAS	38
3.1.1 <i>Isotermas de pressão (π) x área molecular (A)</i>	38
3.1.2 <i>Estabilidade de monocamadas</i>	38
3.1.3 <i>Microscopia de fluorescência</i>	39
3.2 BICAMADAS	39
3.2.1 <i>Preparo de lipossomos (LUVs) e proteolipossomos</i>	39
3.2.2 <i>Calorimetria de varredura diferencial (DSC)</i>	40
3.2.3 <i>Ensaio de agregação por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e turbidimetria</i> ...	40
3.2.4 <i>Potencial zeta</i>	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 MONOCAMADAS	42
4.1.1 <i>Isotermas π x A</i>	42
4.1.2 <i>Estabilidade de monocamadas</i>	56
4.1.3 <i>Microscopia de fluorescência</i>	60
4.2 BICAMADAS	63
4.2.1 <i>Calorimetria de varredura diferencial (DSC)</i>	63
4.2.2 <i>Ensaio de agregação</i>	72
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6 REFERÊNCIAS	79

1 | INTRODUÇÃO

1.1 | Biomineralização

O termo *biomineralização* faz referência a todo e qualquer processo que resulte na formação de mineral por ação de um organismo. Este processo leva à formação de uma grande variedade de biominerais que permeia todos os cinco reinos de seres vivos (**Figura 01**) (LOWENSTAM; WEINER, 1989). Acredita-se que as primeiras estruturas mineralizadas tenham surgido no período Pré-Cambriano, como resultado do intenso movimento das placas tectônicas, que promoveu um aumento expressivo da concentração de minerais solúveis nos mares (MURSHED, 2018). A supersaturação atingida em presença de biomacromoléculas é a condição essencial para a precipitação de biominerais. Dessa forma, organismos marinhos teriam desenvolvido exoesqueletos primitivos constituídos principalmente de carbonato e fosfato de cálcio, que por sua vez, permitiram que tais organismos apresentassem melhores condições de sobrevivência.

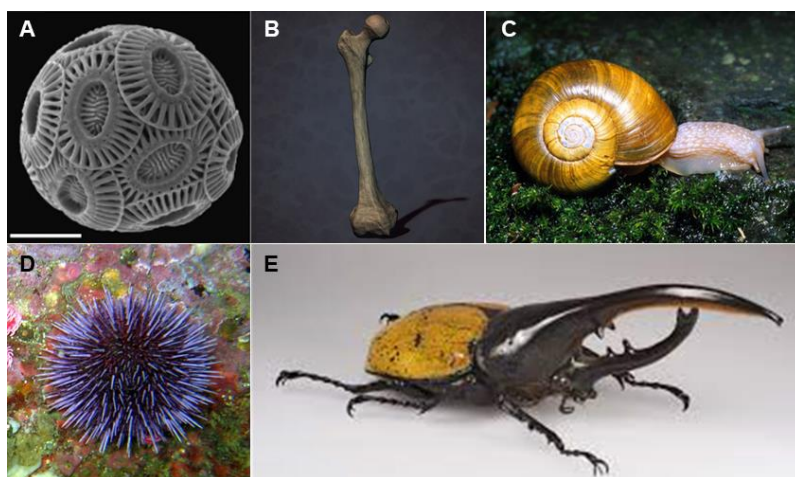


Figura 01 | Estruturas mineralizadas em diferentes organismos. (A) Imagem do coccolitóforo *Emiliana huxleyi* (alga unicelular) obtida por microscopia eletrônica de transmissão, barra de escala igual a 3µm; (B) Ilustração de fêmur humano; (C) Exemplo de estrutura mineralizada em moluscos; (D) Ilustração de um ouriço-do-mar, cujas espículas são mineralizadas; (E) Ilustração de um besouro-hércules (*Dynastes hercules*), cujo exoesqueleto é revestido por uma membrana mineralizada. Fonte: Google Imagens e (BROWNLEE; WHEELER; TAYLOR, 2015).

1 | INTRODUÇÃO

Por outro lado, revestimentos mineralizados também impunham algumas limitações aos organismos, frequentemente relacionadas aos seus tamanhos, grau de locomoção e sensibilidade superficial. Assim, a internalização de estruturas mineralizadas por parte dos organismos emergiu como uma vantagem adaptativa central, estabelecendo um marco fundamental na evolução do esqueleto, especialmente sobre os organismos que deram origem aos vertebrados, uma vez que o surgimento de um endoesqueleto possibilitou o desenvolvimento de estruturas musculares fortes, além de viabilizar a presença de superfícies externas sensíveis ao ambiente (WAGNER; ASPENBERG, 2011).

1.2 | Mineralização óssea

O processo de (bio)mineralização óssea pode ser definido como a sequência de eventos bioquímicos e biofísicos necessários à calcificação da matriz orgânica do tecido ósseo, ocorrendo em todos os vertebrados. Esse processo inicia com a síntese de matriz extracelular rica em colágeno a partir de células osteogênicas (*e.g.* osteoblastos e condrócitos), que também secretam proteoglicanos e proteínas não-colagenosas que participam da regulação do processo (LACRUZ et al., 2017; MURSHED, 2018; WEINER; WAGNER, 1998).

A condição basal para a formação de mineral ósseo é a presença de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato (Pi) em quantidades adequadas na matriz extracelular. Ambos são espécies fundamentais no metabolismo de todos os tipos celulares, atuando em vias de sinalização, regulação e metabolismo energético (GIORGI; MARCHI; PINTON, 2018; MICHIGAMI et al., 2018). Em função disso, não é surpreendente que estes íons estejam distribuídos em concentrações significativas por todo o organismo. De fato, fluidos circulantes de pessoas saudáveis e com nutrição adequada são ricos em Ca^{2+} e Pi, o que implica a necessidade de um mecanismo de inibição sistêmica para controle de mineralização no organismo. Assim, a formação óssea em tecidos duros

1 | INTRODUÇÃO

ocorre por meio da remoção local controlada de inibidores de mineralização (REZNIKOV et al., 2020).

Um dos principais inibidores sistêmicos da precipitação de fosfato de cálcio no organismo é o pirofosfato (PPi) que, além do papel inibitório, também atua como reserva de Pi, juntamente com polifosfatos (poliPi), que são polímeros maiores de fosfato capazes de quelar íons Ca^{2+} (REZNIKOV et al., 2016). Na matriz extracelular do osso, proteínas não-colagenosas inibem localmente a formação de mineral, com destaque para a osteopontina (OPN) e fetuína A (que também ocorre significativamente na corrente sanguínea). O poder inibitório da OPN está associado à presença de resíduos de aminoácidos cujas cadeias laterais são fosforiladas, enquanto a fetuína A inibe a nucleação de mineral a partir do sequestro de íons Ca^{2+} e Pi, que são imobilizados na forma de complexos coloidais (REZNIKOV et al., 2016).

Após a síntese da matriz extracelular, as células osteogênicas ativam mecanismos de quebra da barreira inibitória da mineralização, comumente tratada como razão Pi/PPi, cujo valor pode determinar o tipo de mineral formado, variando de apatita/fosfato de cálcio, para razões maiores que 140, a minerais de pirofosfato de cálcio, para razões abaixo de 6 (THOUVEREY et al., 2009). Tais mecanismos se baseiam na degradação enzimática de PPi (que aumenta a relação Pi/PPi, favorecendo o mineral adequado) e inibidores proteicos. A partir do controle inibitório, a formação adequada de mineral pode ocorrer na matriz que, à essa altura, apresenta arranjos densos estruturalmente hierárquicos de fibrilas de colágeno, fundamentais para a deposição e direcionamento do mineral.

Além de orientar a deposição do mineral, a estrutura suprafibrilar da matriz de colágeno configura um ambiente tridimensional altamente complexo, que proporciona ambientes confinados determinantes de características do mineral como tamanho, estrutura e distribuição, por exemplo (WANG et al., 2012). Com relação ao mineral propriamente dito, ainda não foram totalmente compreendidas todas as

1 | INTRODUÇÃO

suas características estruturais e de composição no osso maduro, apesar de ser consensual que o mineral final assume estrutura cristalina semelhante à da hidroxiapatita (HAp), porém deficiente em íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} , que são substituídos por íons Na^+ e Mg^{2+} ; e íons HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} e Cl^- , respectivamente, de forma que foi consolidada na literatura especializada a referência ao mineral do osso como apatita carbonatada, ou apatita biológica (VON EUW et al., 2019).

A associação extremamente organizada entre a matriz orgânica do osso e a fase mineral confere a esse tecido as propriedades notáveis de resistência, rigidez e flexibilidade observadas (MORGAN; UNNIKRISSAN; HUSSEIN, 2018). Na descrição mais recente da estrutura do osso, foi sugerida uma organização hierárquica de doze níveis, que abarcam desde a escala nanométrica de estruturamento, onde triplas-hélices de colágeno se arranjam em fibrilas e o mineral surge de modo a formar agregados orientados, até o nível micrométrico e milimétrico, onde arranjos concêntricos de estruturas densas de colágeno mineralizado formam os ósteons, que determinam ranhuras macroscópicas na superfície do osso (REZNIKOV et al., 2018). Essa complexidade estrutural reforça a ideia de que apesar da dificuldade de entender como o osso se constitui como tal, nada ocorre a esmo, e tudo, por mais desconexo que possa parecer, especialmente neste campo de pesquisa, que é permeado por diversos modelos e hipóteses, está relacionado em maior ou menor grau.

Além das condições extracelulares, a formação óssea é altamente regulada a nível celular, cuja divisão se dá em dois processos: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. O primeiro é o processo pelo qual o osso é formado diretamente, a partir de um tecido conectivo primitivo de origem mesenquimal, que comumente forma ossos chatos como a mandíbula, a maxila e os ossos do crânio; enquanto o segundo é o processo em que o tecido ósseo substitui um molde cartilaginoso pré-formado (SETIAWATI; RAHARDJO, 2019). Em ambos os

1 | INTRODUÇÃO

processos, os mesmos tipos celulares controlam a formação dos ossos. As células envolvidas na osteogênese são os osteoblastos, osteócitos e condrócitos, que são responsáveis principalmente pela formação de ossos e cartilagem e possuem origem mesenquimal, ao passo que as células responsáveis pela reabsorção óssea, os osteoclastos, possuem origem hematopoiética (SALHOTRA et al., 2020).

Os osteoblastos são as células que iniciam a formação do osso, sendo responsáveis pela síntese da matriz extracelular (rica em colágeno do tipo I, bem como em proteínas não-colagenosas que regulam a formação de mineral na matriz). A diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos começa a partir da expressão de SOX9, que determina o seu compromisso com uma linhagem osteoprogenitora (SALHOTRA et al., 2020). A expressão desse fator de transcrição também estimula a diferenciação de células mesenquimais em condrócitos, que são células encontradas em cartilagem saudável e que produzem matriz cartilaginosa (colágeno tipo II e proteoglicanos). A expressão dos fatores de transcrição RUNX2, e posteriormente, OSX (ou SP7), induz a diferenciação de células osteoprogenitoras em uma linhagem pré-osteoblástica e finalmente, osteoblástica (SOLTANOFF et al., 2009). A síntese de matriz extracelular pelos osteoblastos faz com que parte deles sejam embebidos dentro dessa matriz, tornando-se osteócitos, que coordenarão a manutenção da integridade óssea por meio da interação com osteoblastos e osteoclastos (COMPTON; LEE, 2014).

O processo de ossificação intramembranosa é iniciado a partir de uma população de células mesenquimais que se mobilizam de modo a formar o que é conhecido como blastema ósseo. As células nessa região se diferenciam em osteoblastos (RUNX2) e passam a produzir matriz extracelular e, portanto, estabelecem um centro de ossificação primária, que é justamente o local em que o crescimento do osso irá ocorrer (ALLEN; BURR, 2019). A matriz óssea inicial é produzida muito rapidamente, de modo que o osso formado nesse estágio é pouco

1 | INTRODUÇÃO

organizado e deve ser posteriormente substituído por osso mais estruturalmente organizado que é chamado de osso lamelar (PERCIVAL; RICHTSMEIER, 2013). Alguns ossos formados por esse processo de ossificação podem apresentar cavidades medulares para que haja nutrição adequada dos osteócitos aprisionados na matriz óssea, como observado na mandíbula, por exemplo (ALLEN; BURR, 2019). A **Figura 02** abaixo ilustra o processo de ossificação intramembranosa.

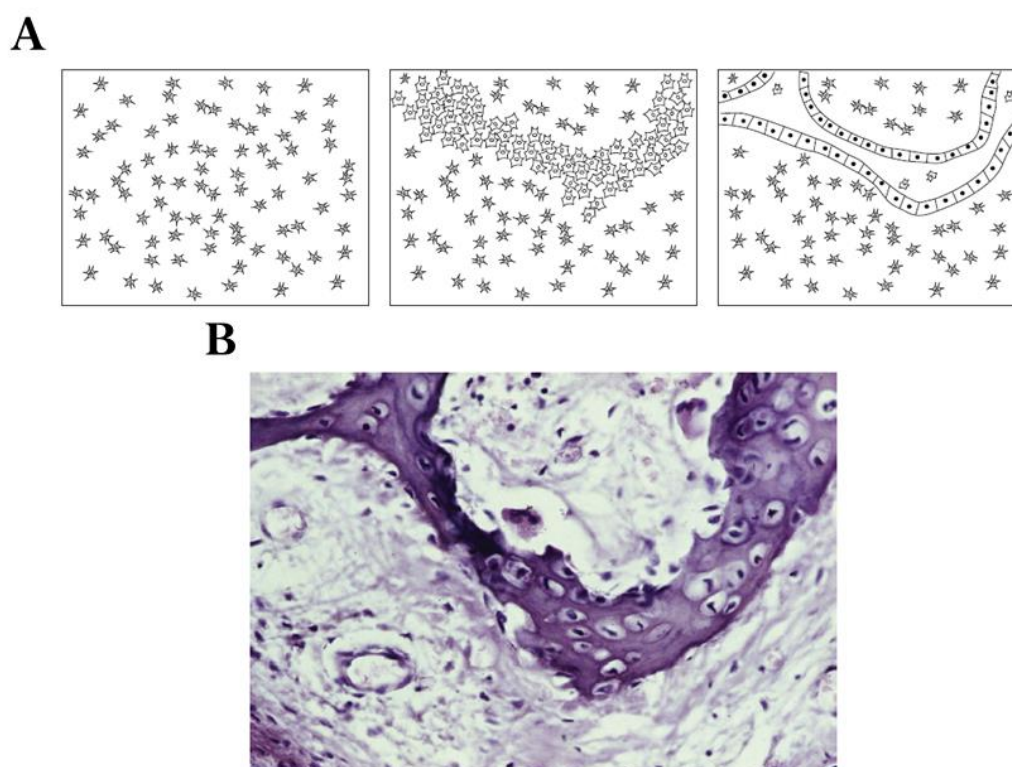


Figura 02 | Ossificação intramembranosa. (A) O processo inicia com o agrupamento de células mesenquimais e sua posterior diferenciação em osteoblastos, que secretam matriz extracelular e constituem o blastema ósseo. (B) Micrografia óptica de uma ilha óssea em formação por ossificação intramembranosa (coloração realizada com Hematoxilina-Eosina). Fonte: Adaptado de (ALLEN; BURR, 2019).

Os ossos longos são tipicamente formados por meio do processo de ossificação endocondral, que envolve a criação de um molde de cartilagem hialina que determina o formato do osso final. Esse processo também inicia com a condensação de células mesenquimais, no entanto, são diferenciadas a condroblastos (estímulo de SOX9), e não osteoblastos, como na ossificação intramembranosa (MACKIE et al., 2008).

1 | INTRODUÇÃO

Os condroblastos produzem matriz cartilaginosa que, assim como na ossificação intramembranosa, aprisiona algumas células, que são diferenciadas a condrócitos. Esse molde cartilaginoso é revestido por uma membrana fibrosa/celular chamada pericôndrio, cujas células são diferenciadas a osteoblastos (estímulo por RUNX2) de modo que a primeira formação óssea observada nesse molde ocorre na forma de uma circunferência localizada na porção central do molde (diáfise), denominada colar ósseo (ALLEN; BURR, 2019).

O colar ósseo é constituído por osso lamelar e, uma vez formado, estimula a proliferação de células osteoprogenitoras nos seus arredores e o pericôndrio passa a ser chamado de periósteo. A presença e desenvolvimento do colar ósseo limita a difusão de nutrientes no interior da matriz, promovendo sua calcificação. Esse fenômeno limita ainda mais a nutrição dos condrócitos que estão retidos no interior do molde cartilaginoso, que podem até morrer. Essa sequência de eventos sinaliza a necessidade de invasão vascular do colar ósseo e estimula sua penetração por vasos sanguíneos que adentram a matriz calcificada e restabelecem o suprimento de nutrientes para as células da matriz. Além disso, a vascularização abre caminho para a entrada de osteoclastos que reabsorvem a matriz calcificada, dando origem ao canal medular e constituindo o centro de ossificação primária, que é um sítio de atividade celular coordenada responsável pelo desenvolvimento posterior do osso (MACKIE et al., 2008).

A ossificação por esse mecanismo ocorre do centro do molde em direção às suas extremidades, no entanto, a maioria dos ossos formam centros de ossificação secundária nessas extremidades (epífises), de modo muito semelhante ao que foi descrito para a formação do centro de ossificação primária diafisário. Esses ossos podem formar um ou dois centros de ossificação secundária.

À medida que o centro de ossificação primária se expande axialmente, estendendo o canal medular ao longo do eixo do osso em formação, ele chega a

1 | INTRODUÇÃO

calcificar cerca de um terço do osso, enquanto os centros de ossificação secundária se expandem radialmente para formar osso nas extremidades do molde. Eventualmente, os centros de ossificação secundária ficam separados do centro primário por uma camada de cartilagem que recebe o nome de disco epifisário ou placa de crescimento, que é responsável pelo crescimento longitudinal do osso até atingir seu tamanho final, que é atingido somente na fase adulta (ALLEN; BURR, 2019). A **Figura 03** abaixo ilustra um osso formado pelo processo de ossificação endocondral com destaque para a placa de crescimento.

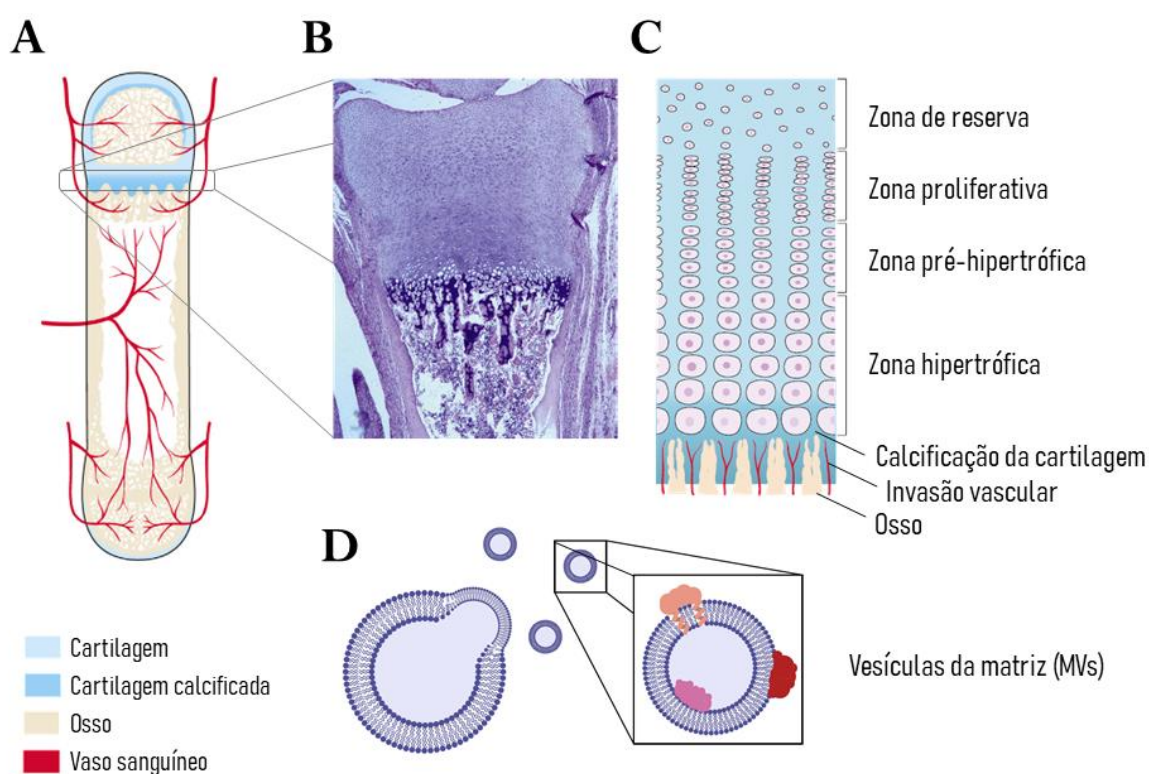


Figura 03 | Ossificação endocondral. (A) Esquema de ossificação endocondral em estágio avançado, onde uma das placas de crescimento já está completamente mineralizada, substituída por linha epifisária. (B) Micrografia óptica de uma placa de crescimento ósseo. (C) Esquema da constituição das diferentes zonas celulares observadas em placas de crescimento ósseo. (D) Vesículas da matriz são liberadas a partir de brotamento da membrana plasmática de condrócitos hipertróficos e promovem a mineralização da matriz extracelular na zona hipertrófica da placa de crescimento ósseo. Fonte: Adaptado e traduzido livremente de (ALLEN; BURR, 2019).

A placa de crescimento é composta por cinco zonas morfologicamente distintas e que são classificadas de acordo com os principais eventos celulares de cada

1 | INTRODUÇÃO

uma. Estas zonas são divididas em: zona de reserva, zona proliferativa, zona hipertrófica, zona de cartilagem calcificada e zona de ossificação (**Figura 03**).

A zona mais distante do centro de ossificação primária é chamada de *zona de reserva* e é caracterizada pela presença de condroblastos e matriz cartilaginosa de hialina. Essas células produzem continuamente a matriz extracelular rica em colágeno do tipo II, que aprisiona algumas dessas células no processo (tornam-se condrócitos, porém continuam produzindo matriz). Os condrócitos dessa região são morfológicamente similares a condrócitos encontrados em outras regiões do corpo (EMONS et al., 2011).

A segunda zona é chamada de *zona proliferativa* e é caracterizada por uma intensa atividade mitótica de condrócitos. A divisão celular dessas células parece ocorrer ao longo de eixos longitudinais paralelos ao comprimento do osso, de modo que essa região é facilmente identificada pelo aspecto oval e empilhado das células. Além disso, as células continuam produzindo matriz extracelular, em quantidade que podem chegar até cerca do dobro do volume celular (EMONS et al., 2011).

A terceira zona, a *zona hipertrófica*, pode ser subdividida em outras duas, a zona pré-hipertrófica, em que os condrócitos cessam a divisão celular acelerada e passam a aumentar de tamanho, até que finalmente chegam ao seu tamanho final na zona hipertrófica (em torno de 10x o tamanho original) e morrem. A hipertrofia estimula ainda mais a produção de matriz extracelular, que é inicialmente rica em colágeno do tipo II, porém passa a ser abundante em colágeno do tipo X quando os condrócitos se tornam hipertróficos. Uma consequência importante da diferença entre o colágeno produzido por condrócitos hipertróficos do colágeno produzido antes desse estágio é que o colágeno do tipo X forma fibras (LUO et al., 2017). Assim, a matriz extracelular nessa região passa a ser mais densa e a difusão de nutrientes se torna mais difícil, além da estrutura fibrilar tornar a mineralização mais “rígida”.

1 | INTRODUÇÃO

A quarta zona, onde calcificação da cartilagem pode ser observada, é chamada de *zona de calcificação da cartilagem*, e é caracterizada pela presença de condrócitos mortos ou em processo de apoptose decorrente da falta de nutrientes. A calcificação da cartilagem ocorre a partir de vesículas que são liberadas pelos condrócitos hipertróficos e que possuem fosfatase alcalina, ATPases e outras enzimas que clivam cálcio e fosfato do ambiente ao redor (ANDERSON; GARIMELLA; TAGUE, 2005; GOLUB, 2009).

A calcificação da cartilagem intensifica a perda celular e, portanto, estimula a vascularização da região adjacente e reabsorção da cartilagem calcificada por condroclastos, que atuam como os osteoclastos, porém são específicos para a remoção de cartilagem calcificada. A última zona observada é a *zona de ossificação*, onde o osso final é inicialmente formado. Essa região envolve a ação de osteoblastos que sintetizam osso com baixa organização estrutural (imaturo) que é posteriormente substituído por osso lamelar com auxílio de osteoclastos.

Uma vez que o osso atinge seu tamanho final, ocorre senescência das células que constituem a zona de reserva e o crescimento do osso cessa. Após essa parada, a placa de crescimento sofre ossificação, deixando apenas uma região mineralizada em forma de disco que separa a epífise da diáfise, conhecida como linha epifisária (ALLEN; BURR, 2019).

1.3 | Vesículas da matriz

Uma das teorias de mineralização do tecido ósseo admite que a formação do mineral é iniciada no interior de vesículas extracelulares que são secretadas na matriz extracelular por células osteogênicas tanto em condições de mineralização saudável (*e.g.* condrócitos, osteoblastos, odontoblastos), quanto ectópica (como ocorre em células vasculares de músculo liso). Essas vesículas são conhecidas como vesículas da matriz (VMs) e foram primeiramente identificadas por Anderson e Bonucci,

1 | INTRODUÇÃO

concomitantemente, no final da década de 60 (ANDERSON, 1967; BONUCCI, 1967; PLAUT et al., 2019).

As VMs possuem diâmetro que varia entre 100-300 nm e surgem por brotamento a partir da membrana plasmática de células mineralizantes, sendo, portanto, frequentemente classificadas como microvesículas, em oposição a exossomos, ambos grupos de vesículas extracelulares (BOTTINI et al., 2018; VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Particularmente, as VMs se destacam pela sua elevada afinidade por colágeno e capacidade de induzir mineralização *in vitro* (BOTTINI et al., 2018; PLAUT et al., 2019), o que indica seu papel na mineralização.

As células que secretam VMs o fazem em seus estágios finais de desenvolvimento. De fato, observa-se que apenas osteoblastos que atingiram maturidade liberam estas vesículas, da mesma forma que condrócitos só passam a secretá-las quando alcançam o estado de hipertrofia, característica que marca o prelúdio da apoptose nestas células (WUTHIER et al., 1985). É comumente aceito que as VMs são liberadas a partir de regiões específicas da membrana plasmática das células, em razão do contraste observado entre a composição lipídica e proteica das vesículas e suas células progenitoras. Vesículas da matriz possuem abundância de colesterol (Chol), esfingomiéline (SM) e fosfatidilserina (PS), o que sugere seu brotamento a partir de regiões especializadas da membrana associadas à formação de *lipid rafts*, cuja constituição é abundante em Chol e SM, conferindo grande afinidade para o recrutamento de proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (SIMÃO et al., 2019), como é o caso da fosfatase alcalina de tecido não-específico (TNAP), presente em concentração 10x maior em vesículas da matriz quando comparado à membrana plasmática das células progenitoras (ANDERSON; GARIMELLA; TAGUE, 2005).

1 | INTRODUÇÃO

As VMs são responsáveis por fornecer as condições espaço-temporais adequadas para que ocorra acúmulo suficiente de íons cálcio (Ca^{2+}) e fosfato inorgânico (P_i), resultando na posterior precipitação de mineral. Para isso, dispõem de um maquinário bioquímico sofisticado que regula tanto a captação de íons quanto a nucleação primária do mineral. A **Figura 04** esquematiza a constituição geral de uma vesícula da matriz.

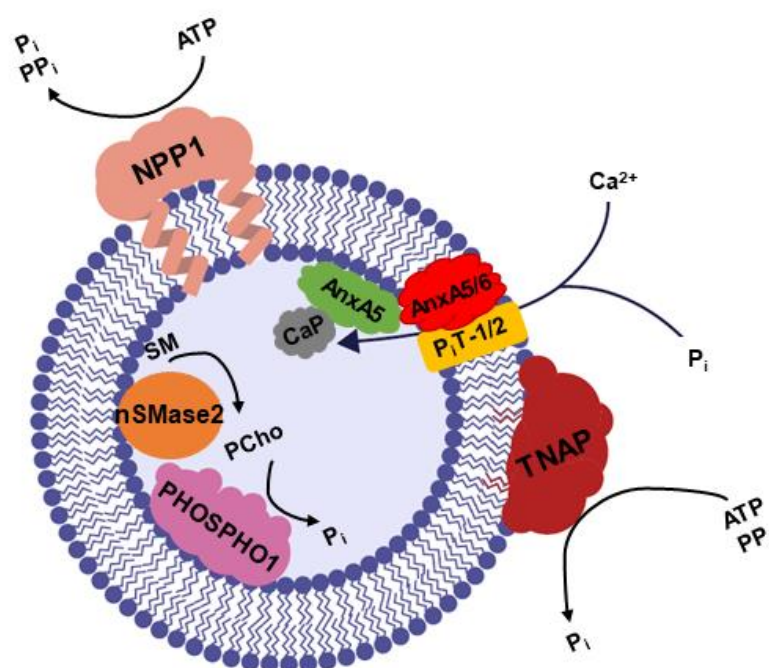


Figura 04 | Esquema geral de uma vesícula da matriz. As enzimas NPP1, TNAP e PHOSPHO1 participam da homeostase de fosfato na vesícula. AnxA6 pode favorecer o influxo de cálcio para o seu lúmen, juntamente com transportadores de cálcio não-identificados. AnxA5 promove entrada de Ca^{2+} e a nucleação de mineral por permitir a sua concentração local. A atividade da nSMase2 gera fosfocolina a partir da degradação enzimática da esfingomiéline, que é uma fonte de fosfato intravesicular. PiT-1 e PiT-2 são transportadores de fosfato presentes em VMs. Fonte: Autoria própria.

Como mencionado anteriormente, a matriz orgânica do osso apresenta grande quantidade de inibidores de mineralização, dentre os quais destaca-se o PP_i . Um papel fundamental das VMs, especialmente em estágios iniciais da mineralização, é exercer controle sobre a razão P_i/PP_i de forma a vencer essa barreira inibitória. Tal regulação é desempenhada por ectoenzimas chaves dessas vesículas: a TNAP catalisa

1 | INTRODUÇÃO

a reação que cliva monoésteres de fosfato, como ATP e PPI, gerando Pi; em contrapartida, a ectonucleotídeo fosfatase/fosfodiesterase 1 (NPP1/ENPP1) cliva ATP para gerar PPI e Pi (BOTTINI et al., 2018; FAVARIN et al., 2020). Ambas atuam de modo a gerar Pi que é transportado para o lúmen das vesículas por transportadores específicos (PiT-1 e PiT-2) (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011), e provavelmente exercem controle de promoção de mineral na segunda fase da mineralização, em que o mineral deixa o meio intravesicular e passa a ser submetido às condições bioquímicas/biofísicas da matriz extracelular.

A respeito do cálcio, o protagonismo proteico é atribuído às anexinas (especialmente à anexina A5, AnxA5), que constituem uma família de proteínas com a capacidade de se ligar a fosfolipídeos ácidos, como é o caso da fosfatidiserina (PS), de forma dependente de cálcio (BOLEAN et al., 2015, 2017). Assim, a AnxA5 (~35 kDa), pode mobilizar cálcio em regiões das VMs ricas em PS, o que reforça seu envolvimento na nucleação de mineral intravesicular, além de um possível canal de cálcio (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011). Recentemente foi sugerido que a anexina A6 (AnxA6, ~68 kDa) também pode participar na nucleação de mineral e na homeostase de cálcio das VMs, por meio de um mecanismo que envolve a translocação da proteína pela membrana de forma sensível ao pH local (VESCHI et al., 2020).

1.4 | Anexina A5 e seu papel na mineralização

As anexinas constituem uma família de proteínas que devem desempenhar duas características principais: primeiro, uma anexina deve ser capaz de se ligar a fosfolipídeos negativamente carregados de forma dependente de íons Ca^{2+} ; segundo, uma anexina deve possuir um domínio estrutural conservado (denominado de repetição de anexina, em tradução livre), de cerca de 70 resíduos de aminoácidos,

1 | INTRODUÇÃO

que aparece em 4 repetições, na maioria dos casos (GEISOW et al., 1986; SWAIRJO; SEATON, 1994).

Essa família de proteínas possui diversos membros, cuja identificação ocorreu principalmente nas décadas de 1970 e 1980, como resultado de uma intensa busca por proteínas que pudessem atuar como “pontes” (GERKE; MOSS, 2002). As anexinas receberam diversos nomes não-relacionados durante esse período de descobrimento, já que não havia uma relação direta traçada entre os diferentes componentes dessa família, e a maioria desses nomes fazia referência às propriedades bioquímicas dessas proteínas, como *synexin* (agregação de grânulos (CREUTZ; PAZOLES; POLLARD, 1978), *chromobindins* (proteínas que se ligam a grânulos cromafins (CREUTZ et al., 1987), *calcimedins* (proteínas mediadoras de sinais de cálcio (MOORE; KRAUS-FRIEDMANN; DEDMAN, 1984), *lipocortins* (inibidores de lipase induzidos por esteroide (FLOWER, 1986) e *calpactins* (proteínas que se ligam a íons Ca^{2+} , fosfolipídeos e actina (GLENNEY; TACK; POWELL, 1987).

Assim, o termo anexina foi cunhado para descrever uma família de proteínas multigênicas capaz de unir estruturas biológicas, especialmente membranas. De fato, *annex* tem origem grega e remete ao ato de “agrupar, unir e manter unido” (GERKE; MOSS, 2002). As anexinas ocorrem amplamente nos eucariotos, sendo que 12 tipos foram identificadas em humanos (AnxA1-A13, já que nenhuma proteína é atribuída ao gene A12), desempenhando papéis importantes no ciclo celular, excitose e apoptose (MIRSAEIDI et al., 2016).

Estruturalmente, as anexinas possuem o motivo conservado de ~70 resíduos de aminoácidos que se repete 4 vezes em cada uma das proteínas (exceção é a AnxA6, que possui 8 repetições), e que é altamente conservado, mas também possuem uma região N-terminal (frequentemente referida como cauda) altamente variável em sequência de aminoácidos e comprimento da cadeia, que confere a identidade de cada membro da família [(SWAIRJO; SEATON, 1994).

1 | INTRODUÇÃO

A primeira anexina a ter sua estrutura cristalina elucidada foi a Anexina A5 humana (AnxA5), cuja estrutura foi determinada por Huber e colaboradores (1990) (HUBER; RÖMISCH; PAQUES, 1990). A **Figura 05** que segue ilustra a estrutura tridimensional da AnxA5. Observa-se que a proteína apresenta quatro domínios equivalentes que são conservados e comuns a todos os membros da família. Além disso, estes domínios se arranjam de forma que a proteína apresenta uma conformação planar-curvada, com uma face côncava e outra convexa (GERKE; MOSS, 2002).

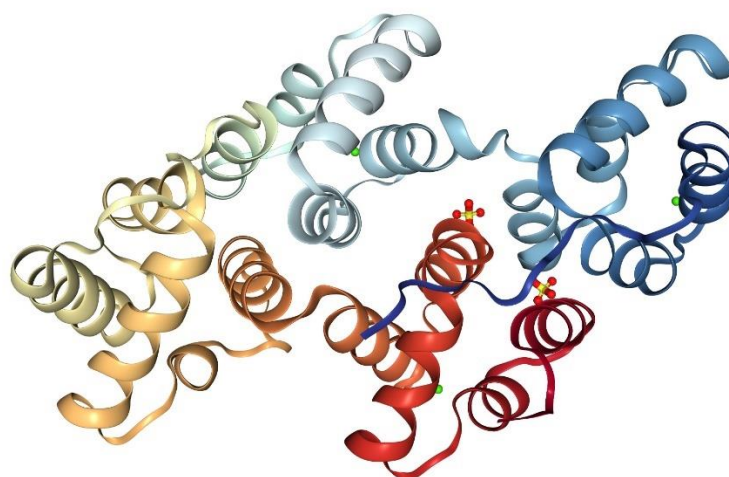


Figura 05 | Estrutura tridimensional da AnxA5 humana. A estrutura foi obtida por meio de difração de raios-X e depositada por Huber e colaboradores no Protein Data Bank em out/1991. Quatro domínios estruturais característicos de anexinas são observados, arranjados de forma a permitir um espaço central hidrofílico na estrutura da proteína. Fonte: Protein Data Bank.

Já foi observado que esta conformação de “disco dobrado” da proteína faz com que todos os sítios de interação com cálcio fiquem voltados para o lado convexo da estrutura (os domínios conservados são predominantemente hidrofóbicos) e que, portanto, pode mediar a interação da AnxA5 com membranas, e a região N-terminal, voltada para o lado côncavo. Além disso, análises cristalográficas sugerem que a porção N-terminal da proteína afeta consideravelmente a conformação e propriedades dos domínios conservados, o que indica um papel altamente regulatório dessa porção no que diz respeito à estrutura e função da proteína (LIZARBE et al.,

1 | INTRODUÇÃO

2013). Por fim, um poro hidrofílico parece emergir da estrutura enovelada da proteína, e muitos autores sugerem que esse poro seria o responsável pelo transporte de íons Ca^{2+} através da membrana, conferindo-a uma função adicional de canal (HUBER; RÖMISCH; PAQUES, 1990).

Além das características estruturais notáveis observadas em moléculas individuais de AnxA5, observa-se que a associação dessas moléculas com membranas negativamente carregadas ocorre de modo extremamente organizado.

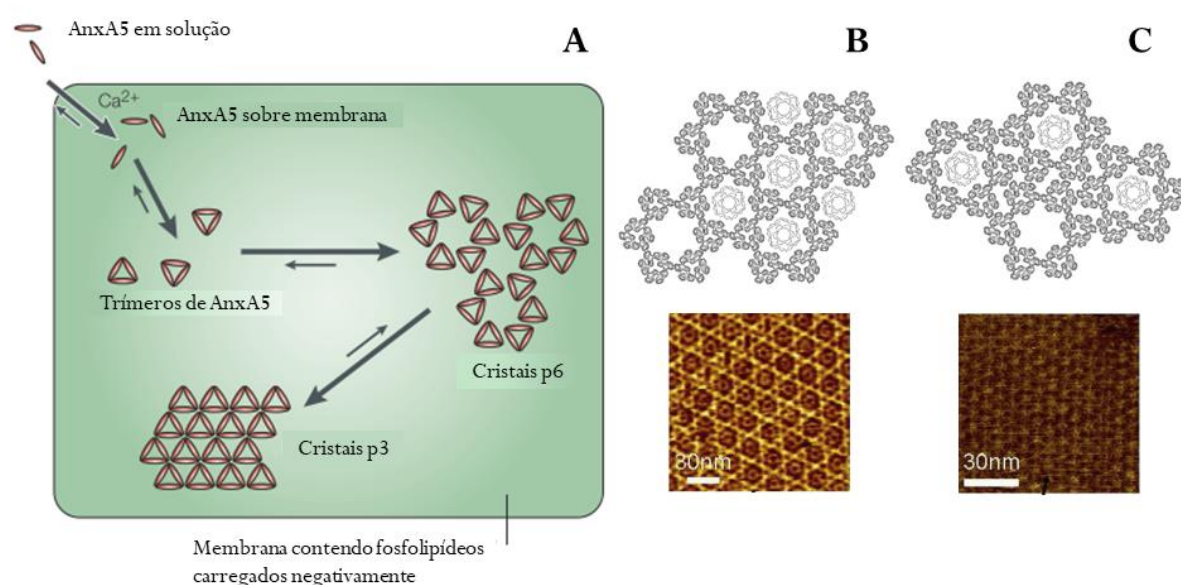


Figura 06 | Interação de AnxA5 com membranas negativamente carregadas. (A) Monômeros de AnxA5 em solução se associam em trimeros sobre a membrana a partir da interação com íons Ca^{2+} . A cristalização pode seguir duas simetrias distintas, a depender das condições do meio. (B) Esboço da organização cristalina p6 (superior) e sua visualização por microscopia de força atômica (AFM). (C) Esboço da organização cristalina p3 e sua visualização por AFM. Fonte: Adaptado e traduzido livremente de (BOUTER et al., 2015; GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005; OLING; BERGSMA-SCHUTTER; BRISSON, 2001).

A **Figura 06** ilustra o processo de ligação da AnxA5 com uma membrana modelo. Sob condições favoráveis, a saber presença de íons Ca^{2+} e membranas negativamente carregadas, as moléculas de AnxA5 podem se auto-organizar de modo a formar um arranjo cristalino bidimensional sobre estas membranas (BOUTER et al., 2015). Nesse processo, moléculas de AnxA5 se ligam à superfície dessas membranas na presença de íons Ca^{2+} e rapidamente se organizam em trimeros, que

1 | INTRODUÇÃO

são os blocos construtores do arranjo bidimensional da proteína, que por sua vez, pode apresentar duas simetrias principais: p6 e p3.

A simetria adotada pelo arranjo dos trómeros de AnxA5 é determinada pela concentração de cálcio no meio e pelo conteúdo de PS na membrana. Em baixas proporções de PS (5 – 20%), predomina o arranjo hexagonal p6, porém em altas proporções de PS ($\geq 40\%$) e altas concentrações de íons Ca^{2+} , a simetria p3 é favorecida (GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005). Estruturas auto-organizadas estão frequentemente associadas a construção de arranjos supramoleculares essenciais para o bom funcionamento celular, como membranas e o aparato envolvido no processo de divisão celular, por exemplo. Com a AnxA5 não foi diferente, já que vem sendo mostrado que o seu arranjo bidimensional cristalino é essencial no processo de reparo de membranas celulares.

As membranas celulares consistem em barreiras físicas que garantem a heterogeneia e especialização de espaços. De fato, a concentração de íons Ca^{2+} intracelular gira em torno de alguns μM , enquanto a concentração do mesmo íon extracelular é da ordem de mM. Assim, quando a membrana plasmática das células é lesionada, o primeiro evento a ocorrer é justamente o aumento na concentração de cálcio intracelular, que é o sinal para ativação de mecanismos de reparo celular (BOUTER et al., 2015).

Um dos primeiros estudos que associa a presença de AnxA5 ao reparo celular foi o realizado por Bouter e colaboradores (2011), que compararam a capacidade de células perivasculares murinas de reparar membranas danificadas quando essas células eram capazes de expressar ou não a AnxA5 (BOUTER et al., 2011). Os autores observaram que as células capazes de produzir a proteína eram bem-sucedidas no reparo dos defeitos de membrana induzidos, ao passo que as células incapazes de produzir AnxA5 não reparavam os mesmos defeitos. Além disso, a adição de AnxA5 no ensaio realizado com as células incapazes de reparar os defeitos fazia com que eles

1 | INTRODUÇÃO

começassem a sofrer reparação, e os autores observaram uma ligação preferencial da proteína nas áreas danificadas da membrana plasmática dessas células. Com base nessas observações, os autores propuseram um mecanismo de reparo de membrana mediado por AnxA5 que permanece relevante até os dias atuais. A **Figura 07** apresenta o referido mecanismo.

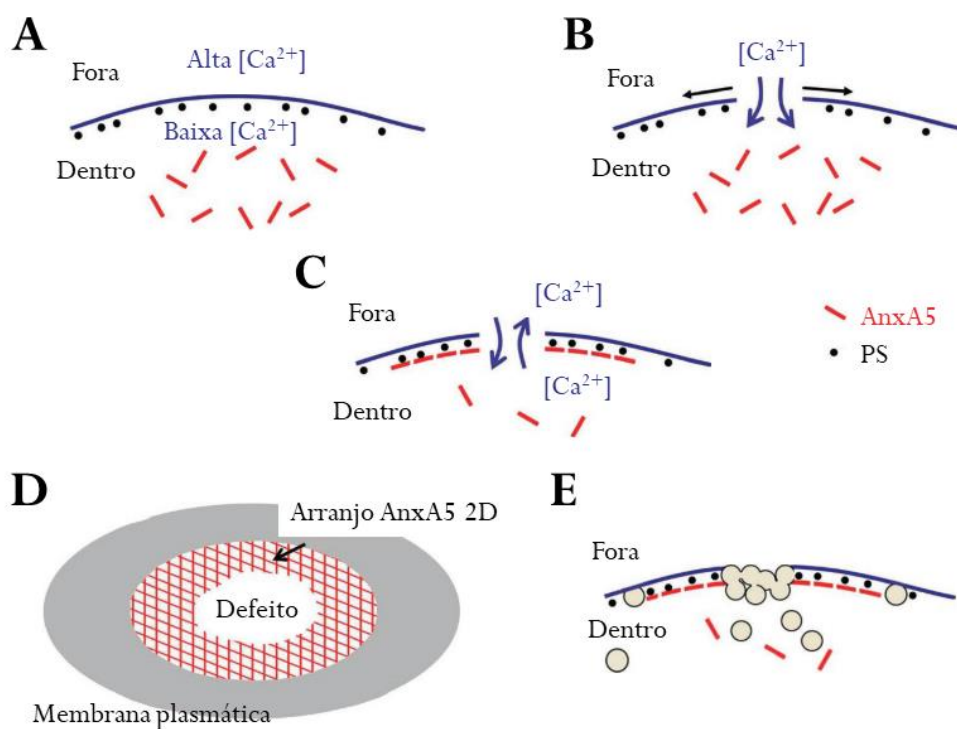


Figura 07 | Ação da AnxA5 no reparo de membranas. (A) Moléculas de AnxA5 permanecem no meio intracelular em condições normais. (B) Ruptura da membrana promove fluxo de íons Ca^{2+} para dentro da célula. (C) AnxA5 cristaliza nas bordas do defeito de membrana até (D) circundá-lo completamente. (E) Vesículas citoplasmáticas se fundem ao defeito para promover o reparo da membrana. Fonte: Adaptado e traduzido livremente de (BOUTER et al., 2011).

Inicialmente, as moléculas de AnxA5 encontram-se solúveis no citoplasma celular. A partir da ruptura da membrana, a concentração intracelular de íons Ca^{2+} aumenta, o que ativa a mobilização das moléculas da proteína, que passam a se arranjar na forma bidimensional nas redondezas do defeito. Bouter e colaboradores (2011) também observaram que células capazes de expressar AnxA5, porém incapazes de assumir a organização cristalina na membrana, não exerciam efeito de

1 | INTRODUÇÃO

reparo (BOUTER et al., 2011). A cristalização da proteína nas bordas do defeito promove uma redução da tensão gerada na membrana que tende a expandir esse defeito, portanto, o arranjo 2D exerce um efeito estabilizante (BOUTER et al., 2015). Por fim, vesículas citoplasmáticas são recrutadas para a área danificada, onde se fundem e selam a abertura.

Além desse papel no reparo de membranas, acredita-se que a AnxA5 desempenhe um papel importante na mineralização óssea mediada por VMs, em função da sua abundância nessas vesículas, e especialmente por ser a proteína mais abundante no centro de nucleação de VMs nativas (WU et al., 1997). Especula-se o seu papel tanto na primeira fase da mineralização, a nucleação de mineral no lúmen das VMs, quanto na segunda fase, a propagação de mineral na matriz extracelular (BOTTINI et al., 2018; PLAUT et al., 2019).

Como citado na seção anterior, acredita-se que a AnxA5 esteja envolvida na captação e acúmulo de íons Ca^{2+} no interior das vesículas da matriz, em função do poro hidrofílico observado na sua estrutura tridimensional. De fato, a presença da proteína aumenta a velocidade de formação de mineral induzido pelo centro de nucleação, inclusive independente da membrana de VMs ou de qualquer canal de cálcio, o que torna questionável a atuação da proteína como canal (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011). Wuthier e Lipscomb (2011) chamam atenção para o fato de que a AnxA5 não apresenta domínios estruturais característicos de porções transmembranas, e se mostra bem menos eficiente no transporte de íons Ca^{2+} quando comparada com ionóforos específicos para cálcio (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011). Unido a isso, a grande quantidade de AnxA5 encontrada em VMs (maior que qualquer outro transportador identificado nas vesículas) coloca em dúvida sua eficácia como canal de cálcio, caso esta seja sua principal função.

Por outro lado, as evidências de que a proteína estimula a formação de mineral são observadas em vários estudos dedicados à análise dos centros de nucleação

1 | INTRODUÇÃO

reconstituídos *in vitro* (GENGE; WU; WUTHIER, 2007, 2008). Isto sugere que a AnxA5 pode estimular a produção de mineral mesmo em um ambiente hostil para o seu crescimento, como é o caso da matriz extracelular óssea, que apresenta diversas barreiras inibitórias para a formação de fosfato de cálcio, como discorrido anteriormente.

As especulações a respeito de um possível papel da AnxA5 na propagação de mineral é embasada na afinidade por colágeno do tipo II e X observada para a proteína em ensaios *in vitro* (BOLEAN et al., 2020; KIM; KIRSCH, 2008; VON DER MARK; MOLLENHAUER, 1997). Uma vez que ambos os tipos de colágeno estão associados à formação de osso por meio de ossificação endocondral, a afinidade da AnxA5 por essas moléculas sugere que a proteína pode direcionar as vesículas da matriz para sítios específicos da matriz extracelular do osso, onde elas podem liberar o seu conteúdo mineral para que estes sejam propagados e cresçam de modo a dar origem ao osso propriamente dito.

1.5 | Modelos miméticos de membrana

Monocamadas são formadas de maneira espontânea quando moléculas anfifílicas insolúveis são dispersas em um meio aquoso. O controle desse fenômeno foi inicialmente proposto a partir de uma metodologia desenvolvida por Irving Langmuir no início do século XX (LANGMUIR, 1917). A formação da monocamada ocorre na interface entre o ar e a fase aquosa, de modo que qualquer alteração físico-química nessa região influencia a sua formação. O que se entende por monocamada é o resultado da organização orientada das moléculas anfifílicas, em resposta ao aumento de sua concentração na interface, ou da redução da área total dessa interface. Monocamadas podem ser produzidas em um aparato elegante conhecido como cuba de Langmuir, em homenagem ao seu idealizador. Neste aparato, uma plataforma rasa e com área ampla serve de reservatório para o meio aquoso de interesse, a subfase.

1 | INTRODUÇÃO

Barreiras móveis controlam a área da interface, e conseqüentemente a organização da monocamada. Todo o processo é acompanhado por uma relação entre as tensões interfaciais (γ) da subfase pura e recoberta com os anfifílicos, que é traduzida em pressão superficial (π). A **Figura 08** abaixo ilustra o funcionamento de uma cuba de Langmuir, bem como os estágios de organização de moléculas anfifílicas insolúveis.

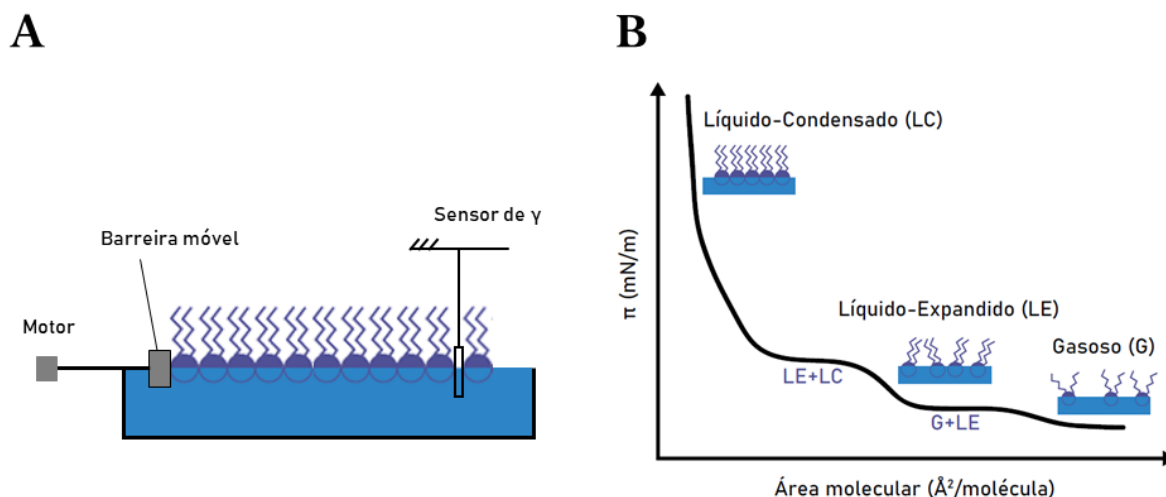


Figura 08 | Esquema de funcionamento de uma cuba de Langmuir. (A) Um motor movimenta a barreira móvel de modo que a área total da interface diminui, provocando aproximação e orientação das moléculas anfifílicas, cuja resposta reflete-se no aumento de pressão superficial, detectada por um sensor, chamado balança de Wilhelmy, previamente calibrado. (B) Diagrama de fases decorrente da organização dos anfifílicos na monocamada. A transição de fase ocorre a partir de uma organização análoga à gasosa G (pouquíssimas interações intermoleculares), que passa para fases mais condensadas e organizadas, como líquido expandido LE, líquido condensado LC e sólida S. LC+LE indica coexistência de fases, característica do comportamento de alguns anfifílicos. Fonte: Autoria própria.

Monocamadas de Langmuir são um modelo excelente para o estudo de fenômenos de membrana, pois permitem a construção de sistemas simplificados, que tornam possível o estudo focado em cada componente da interface. De fato, essas monocamadas são amplamente utilizadas em estudos de interação de lipídeos com peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos e outros compostos (CRUZ et al., 2019; DERRADI et al., 2019). O uso das monocamadas apresenta ainda como vantagem o detalhamento de dados termodinâmicos e de interação que podem ser

1 | INTRODUÇÃO

obtidos a partir de técnicas microscópicas e espectroscópicas facilmente acopladas à cuba de Langmuir (STEFANIU; BREZESINSKI; MÖHWALD, 2014).

Bicamadas lipídicas são modelos miméticos de membrana mais fiéis e sofisticados, constituídos pela associação de duas monocamadas lipídicas. Elas podem ser produzidas tanto na forma planar quanto na forma esférica. Bicamadas planares podem ser obtidas a partir de monocamadas pré-existentes, por meio da imersão e emersão de um suporte sólido perpendicularmente ao plano da monocamada (MONTAL; MUELLER, 1972).

Na sua forma esférica, bicamadas são vesículas por excelência, uma vez que isolam uma parte do meio aquoso do restante. Essas vesículas podem ser produzidas em laboratório por diversos métodos (hidratação de filme, injeção etanólica, sonicação etc.), que determinam tanto o número de lamelas (*i.e.*, a quantidade de “bicamadas” que a vesícula possui) quanto o tamanho da vesícula (HAS; SUNTHAR, 2020; PATIL; JADHAV, 2014). Em termos de número de lamelas, as vesículas são classificadas em unilamelares e multilamelares e, de acordo com o seu tamanho, são classificadas como pequenas, grandes ou gigantes (AKBARZADEH et al., 2013). A **Figura 09** que segue esboça as diferentes classes de vesículas. Uma das principais vantagens das vesículas sintéticas é a possibilidade de se estudar processos biológicos em membranas que se encontram totalmente imersas em um meio aquoso. Assim, além da curvatura, essas membranas mimetizam um microambiente mais próximo do biológico, a partir de uma interface totalmente líquida, diferente das monocamadas, cuja interface é partilhada entre um meio líquido e o ar.

1 | INTRODUÇÃO

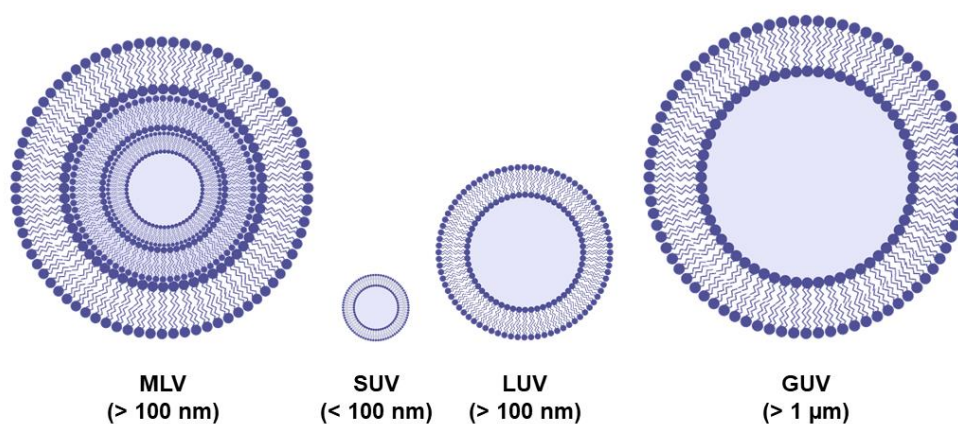


Figura 09 | Classificação de lipossomos baseada no tamanho e lamelaridade. Vesículas com mais de uma bicamada lipídica são ditas multilamelares, ao passo que as que possuem uma única bicamada são classificadas como unilamelares. De acordo com o tamanho, as vesículas podem ser classificadas como pequenas (< 100 nm), grandes (> 100 nm) ou gigantes (> 1000 nm). Da esquerda para a direita: vesícula multilamelar (MLV), vesícula unilamelar pequena (SUV), vesícula unilamelar grande (LUV) e vesícula unilamelar gigante (GUV). Fonte: Autoria própria

2 | OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a relevância da AnxA5 como componente chave na mediação da formação intravesicular de mineral nas vesículas da matriz. Com intuito de atingir esse objetivo, o trabalho foi dividido nos seguintes objetivos específicos:

- Estudar o efeito de íons Ca^{2+} sobre membranas de composição simplificada semelhante à de vesículas da matriz (fosfatidilcolina e fosfatidilserina);
- Estudar o efeito da AnxA5 sobre essas membranas e sua relação com o efeito exercido pelos íons Ca^{2+} ;
- Avaliar a relevância da AnxA5 como estabilizante de domínios lipídicos ricos em fosfatidilserina e sua implicação no processo de biomineralização óssea.

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 01 abaixo, salvo quando mencionados durante a descrição de algum procedimento.

Tabela 01 | Relação dos principais reagentes utilizados.

Reagente	Origem	Pureza
HEPES	SIGMA	> 99,5%
NaCl	Merck	> 99,5%
CaCl ₂ .2H ₂ O	Spectrum	> 99,0%
DPPC	SIGMA	≥ 99,0%
DPPS	SIGMA	≥ 99,0%
Clorofórmio	SIGMA-Aldrich	≥ 99,0%
Metanol	J. T. Baker	99,9 %

3.1 | Obtenção da proteína

A Anexina A5 humana foi expressa de acordo com procedimento descrito por Logue e colaboradores (2009) e padronizado em nosso laboratório (BOLEAN et al., 2020; LOGUE; ELGENDY; MARTIN, 2009). O plasmídeo utilizado (pProEx.Htb.annexinV) foi gentilmente cedido pelo Prof. Seamus J. Martin (Dublin, Irlanda) e expresso em *E. coli*. A quantificação de proteína foi realizada de acordo com protocolo estabelecido por Hartree (1972) na presença de 2% de SDS (HARTREE, 1972).

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

3.2 | Monocamadas

3.1.1 | Isotermas de pressão (π) versus área molecular (A)

As monocamadas lipídicas foram produzidas em uma cuba de Langmuir (Insight®, Brasil, com área superficial de 216 cm² e volume aproximado de 130 mL) a 25 °C. Soluções lipídicas de DPPC e DPPS foram preparadas a partir da dissolução dos lipídeos em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1) de modo a resultar em uma concentração de 0,5 mM. As composições lipídicas utilizadas foram: DPPC puro, DPPC:DPPS (9:1), DPPC:DPPS (8:2) e DPPS puro, sendo as proporções mistas referentes a número de mol. Volumes de 50 µL de solução lipídica foram espalhados na interface ar/água consistindo de tampão 50 mM HEPES pH 7,4 contendo 150 mM NaCl (tampão HBS), suplementado com cálcio quando necessário (5 mM). Deixou-se evaporar o solvente orgânico por 5 min antes de iniciar as medidas. As compressões foram realizadas de forma mecânica por uma barreira móvel com velocidade de 0,42 mm/s. A coleta de dados ocorreu em intervalos de 2s, e a isoterma $\pi \times A$ foi registrada. Isotermas na presença de AnxA5 também foram produzidas, de modo que a proteína foi misturada à subfase antes da dispersão dos lipídeos, numa proporção 1:100 de proteína:lipídeo, em número de mol.

3.1.2 | Estabilidade de monocamadas

Os ensaios de estabilidade de monocamadas foram realizados com monocamadas pré-formadas com pressão superficial inicial de 30 mN/m (mesmo procedimento de preparo descrito na seção anterior). Neste ensaio, a barreira móvel da cuba de Langmuir comprime a monocamada até a pressão desejada e cessa seu movimento, de modo que a pressão a partir deste ponto é monitorada no decorrer do tempo (SANTANA; CASELI, 2021). Os ensaios foram realizados na ausência e presença de cálcio (5 mM), utilizando-se as composições citadas na seção anterior. Para os ensaios na presença de proteína, fez-se sua adição na subfase (proporção 1:100

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

de proteína:lipídeo, em número de mol) após a monocamada atingir a pressão de 30 mN/m. A temperatura foi mantida em 25 °C.

3.1.3 | Microscopia de fluorescência

Para a obtenção das imagens de microscopia de fluorescência das monocamadas utilizou-se um microscópio Olympus BX50 acoplado a uma cuba de Langmuir. O preparo das monocamadas seguiu o mesmo procedimento descrito na seção 3.1.1 acima, utilizando-se as mesmas proporções lipídicas e condições de cálcio e proteína. A adição de 1% (em mol) de uma sonda fluorescente NBD-HPC (Sigma-Aldrich) foi feita a fim de distinguir entre regiões condensadas e fluidas das monocamadas (OKONOGI; MCCONNELL, 2004). A pressão superficial utilizada foi de aproximadamente 10 mN/m. As imagens foram obtidas por uma câmera digital após 5 minutos do preparo das monocamadas, para garantir a evaporação completa do solvente.

3.2 | Bicamadas

3.2.1 | Preparo de lipossomos (LUVs) e proteolipossomos

Foram preparados lipossomos consistindo nas seguintes composições: DPPC puro; DPPC:DPPS (9:1) e DPPC:DPPS (8:2), sendo todas as proporções em número de mol. Massas pré-determinadas dos lipídeos foram solubilizadas em uma mistura de clorofórmio:metanol (3:1) e misturadas nas proporções especificadas, quando necessário. As soluções lipídicas resultantes foram secas sob fluxo contínuo de nitrogênio e agitação constante. Os filmes resultantes da secagem foram armazenados em dessecador sob vácuo por um período de, no mínimo, 1 hora, para garantir a evaporação total do solvente. Os filmes lipídicos foram então ressuspensos em tampão HBS pH 7,4 levando à formação de vesículas multilamelares grandes (MLVs). A ressuspensão foi realizada a 70 °C, por um período de 1 hora, com

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

agitação periódica em intervalos de 10 minutos. Posteriormente, a suspensão de MLVs foi submetida à extrusão mecânica (Avanti) através de membrana de policarbonato de porosidade 100 nm (Avanti), para gerar vesículas unilamelares grandes (LUVs), a partir daqui tratadas simplesmente como lipossomos (BOLEAN et al., 2017). A adição de cálcio nas amostras, quando necessária, foi feita após extrusão das vesículas.

A interação de lipossomos com AnxA5 foi realizada a partir da mistura de ambos os componentes de acordo com a proporção proteína:lipídeo de 1:100, em número de mol. Essas misturas serão referidas a partir daqui como proteolipossomos, e foram preparadas tanto na ausência de cálcio quanto na presença de 0,5 mM de CaCl_2 . As amostras foram analisadas imediatamente após o seu preparo.

3.2.2 | Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

Os ensaios de DSC dos lipossomos e proteolipossomos foram realizados em um N-DSC II: *Differential Scanning Calorimeter* (Calorimetry Sciences Corporation). A referência utilizada foi tampão HBS pH 7,4, suplementado com 0,5 mM, 2 mM ou 5 mM CaCl_2 , quando necessário. O tampão utilizado foi previamente desaerado por 20 minutos. A concentração de amostra utilizada foi de 0,6 mg/mL. Os parâmetros de varredura utilizados foram: velocidades de aquecimento e resfriamento iguais a 0,5 °C/min, num intervalo de temperatura de 10 a 70 °C. A pressão utilizada foi de 3 atm (BOLEAN et al., 2011).

3.2.3 | Ensaios de agregação por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e turbidimetria

Testes de agregação/fusão de lipossomos por ação de íons Ca^{2+} foram realizados na presença e ausência de AnxA5. Para isso, lipossomos preparados de acordo com a seção 3.2.1, numa concentração de 20 μM foram incubados com íons

3 | MATERIAIS E MÉTODOS

Ca^{2+} (concentração na faixa de 0 – 2 mM) e imediatamente submetidos à análise de espalhamento dinâmico de luz e turbidimetria. A adição de proteína foi realizada numa proporção lipídeo:proteína de 100:1. As medidas de diâmetro hidrodinâmico foram realizadas em triplicata em um Nano Zetasizer (Malvern Instruments), ângulo de incidência do *laser* de 173°, comprimento de onda de 532 nm (BOLEAN et al., 2010). As medidas de turbidez foram realizadas em um leitor de placas SpectraMax M3 (Molecular Devices), em comprimento de onda de 340 nm.

3.2.4 | Potencial zeta

Medidas de potencial zeta dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas em água por meio de um Nano Zetasizer (Malvern Instruments). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 | Monocamadas

4.1.1 | Isotermas $\pi \times A$

As características da interação entre DPPC e DPPS na presença e ausência de íons Ca^{2+} foram primeiramente determinadas a partir do monitoramento da variação de pressão superficial de monocamadas produzidas nestas condições de interesse. A **Figura 10** abaixo apresenta as isotermas $\pi \times A$ obtidas para os ensaios de interação.

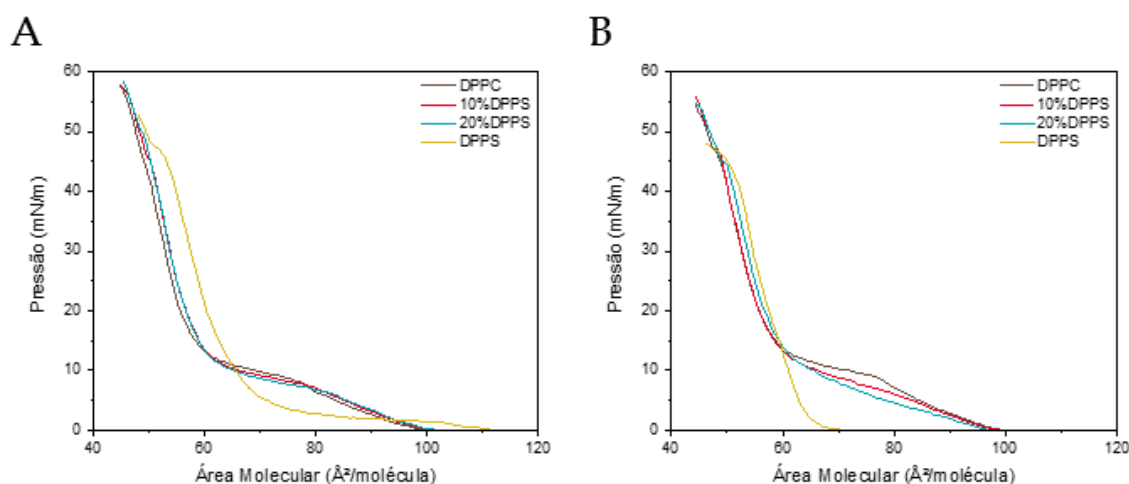


Figura 10 | Interação de DPPC e DPPS em monocamadas de Langmuir. Isotermas $\pi \times A$ de DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em subfase de tampão HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl) na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 . Fonte: Autoria própria.

À medida que a monocamada é formada, as moléculas dispersas na interface são constantemente aproximadas umas às outras devido à redução total da área interfacial, o que implica um maior número de interações intermoleculares e permite a transição entre os diferentes níveis de organização molecular.

A partir dos gráficos dispostos acima observa-se o comportamento padrão para o DPPC puro, que consiste no aparecimento de uma região de platô (em torno de 10-12 mN/m), atribuída ao estágio de transição de uma organização menos compacta (líquido-expandido, le) para uma organização mais compacta (líquido-condensado,

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

lc), sendo, por isso, denominado de região de coexistência das fases le-lc (MCCONLOGUE; VANDERLICK, 1997). Esse comportamento do DPPC é bastante estabelecido na literatura e vários estudos já mostraram a influência de diversos íons, surfactantes, nanopartículas e biomoléculas (proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos) sobre este estágio de organização, sugerindo uma sensibilidade que o torna relevante para a avaliação da interação do DPPC com qualquer outra espécie com que esteja em contato (JAVANAINEN et al., 2020; MCCONLOGUE; MALAMUD; VANDERLICK, 1998; ROSS et al., 2001; SANTANA; CASELI, 2021; SHIGENOBU; MCNAMEE, 2012).

Ainda, pelo gráfico da **Figura 10** pode-se observar pouca diferença para o comportamento do DPPC comparando-se a subfase desprovida de íons Ca^{2+} e a subfase contendo 5 mM Ca^{2+} . Um estudo recente de Javanainen e colaboradores (2020) mostrou, por meio de simulações de dinâmica molecular e espectroscopia vibracional de monocamadas, que a presença de íons Na^+ na interface não afeta significativamente o estruturamento da monocamada, ao passo que a presença de íons Ca^{2+} exerce um efeito relevante em vários aspectos, como o grau de empacotamento e a conformação adotada pelos lipídeos (JAVANAINEN et al., 2020). É válido ressaltar que a faixa de concentração de Ca^{2+} utilizada no estudo se encontra na ordem de centenas de milimolar (300~800 mM), muito maior que a utilizada neste trabalho, no entanto, as conclusões acerca dos mecanismos de interação entre Ca^{2+} e DPPC são pertinentes e serão adotadas aqui.

Os autores observaram que a presença de íons Ca^{2+} promove uma redução de pressão superficial na região de coexistência da isoterma, além de uma contração geral da monocamada, *i.e.*, os íons Ca^{2+} podem induzir um empacotamento mais compacto dos lipídeos, provavelmente por meio da associação de grupos polares carregados de vários lipídeos (JAVANAINEN et al., 2018, 2020). Além disso, considerando-se a diferença de concentração entre os cátions Na^+ (150 mM) e Ca^{2+}

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

(5 mM) na subfase, era esperado que qualquer efeito proveniente da interação específica dos íons Ca^{2+} com a monocamada seria atenuado ou até mesmo blindado pela presença massiva de íons Na^+ , que pode dificultar o acesso aos sítios de interação na monocamada devido ao seu excesso, de forma que diferenças em termos de pressão da monocamada seriam dificilmente notadas, como observado a partir dos perfis das isotermas expressos na **Figura 10**.

A **Figura 10** mostra que, na ausência de íons Ca^{2+} , a presença de DPPS nas monocamadas mistas exerce pouca influência no perfil da isoterma em comparação com a de DPPC puro, para as proporções de DPPS utilizadas. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato de que ambos os tipos lipídicos possuem cadeias carbônicas saturadas e de mesmo comprimento, de modo que obstáculos estéricos quanto ao empacotamento dos lipídeos durante a compressão da monocamada são minimizados, e o fator mais relevante na sua organização, nessas condições, torna-se a natureza das suas porções polares. Os grupos químicos mais determinantes do caráter polar destes fosfolipídeos são o grupo fosfato, que participa da ligação fosfosdiéster que une a porção polar à cadeia carbônica das moléculas, e os grupos que conferem sua identidade lipídica, a saber colina no caso do DPPC e serina no caso do DPPS. O grupo colina apresenta carga líquida positiva, que é contrabalanceada pela carga líquida negativa do grupo fosfato de modo que as moléculas de DPPC possuem carga líquida residual próxima da neutralidade na interface, onde existem na forma *zwitteriônica*. Já o grupo serina apresenta carga líquida negativa e, portanto, as moléculas de DPPS na interface possuem carga líquida residual negativa, como será observado em dados de potencial zeta apresentados mais adiante.

Uma diminuição da pressão superficial na região de coexistência de fases, isto é, uma redução de tensoatividade da monocamada, é observado na presença de íons Ca^{2+} . Além disso, este efeito parece estar diretamente associado à quantidade de DPPS na monocamada, já que maiores proporções de DPPS implicam maiores

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

reduções de pressão superficial nessa região das isotermas. Essas observações estão de acordo com o que a literatura descreve, que íons Ca^{2+} e moléculas de DPPS apresentam uma afinidade de interação bastante significativa em comparação com DPPC, devido à diferença de carga líquida que as moléculas apresentam na interface (MELCROVÁ et al., 2016). Apesar de complexa, a interação entre fosfolipídeos e íons Ca^{2+} é bastante estudada, em virtude da sua relevância em processos biológicos. Melcrová e colaboradores (2016) propuseram um esquema de ligação entre Ca^{2+} e porções de fosfatidilcolina e fosfatidilserina, no qual assumem que os sítios mais determinantes nesta interação são o grupo fosfato, no caso da fosfatidilcolina, e os grupos fosfato e carboxilato, no caso da fosfatidilserina (MELCROVÁ et al., 2016). Além disso, Adams e colaboradores (2016) observaram que a interação entre íons Ca^{2+} e DPPC em concentrações relativamente altas de cálcio provocam condensação da monocamada, que é acompanhada por uma diminuição na pressão superficial da região de coexistência de fases. Eles assumem que os íons Ca^{2+} promovem a desidratação dos lipídeos e formam complexos onde um íon Ca^{2+} age como ponte entre duas moléculas de DPPC e causa reorientação dessas moléculas, que podem assumir um arranjo mais compacto (ADAMS; CASPER; ALLEN, 2016). A partir desse raciocínio, seria razoável pensar em um mecanismo de interação similar para os casos em que DPPS está presente, e o fato da redução da pressão superficial ser evidente nestes casos pode ser consequência da maior afinidade desse lipídeo pelos íons Ca^{2+} , que se mostra significativa mesmo na concentração relativamente baixa de cálcio utilizada.

Numa tentativa de se compreender melhor a interação dos lipídeos com íons Ca^{2+} e seu efeito sobre a organização da monocamada, foram analisadas as variações de energia livre de mistura e de área molecular média a partir das isotermas dispostas na **Figura 10**. Os gráficos que contêm esses parâmetros estão agrupados na **Figura 11**, que segue.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

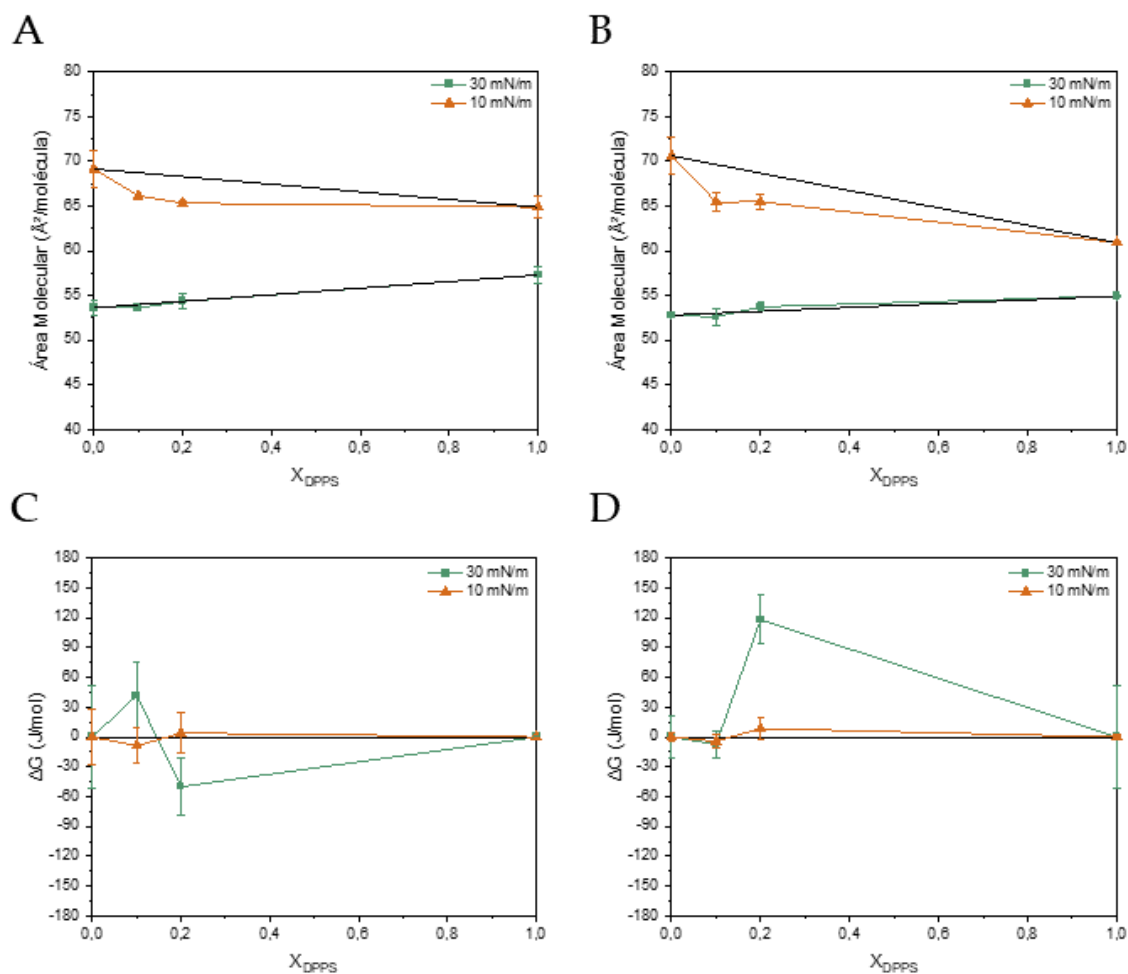


Figura 11 | Análise do comportamento de mistura das monocamadas em tampão HBS. Áreas moleculares médias em função da fração molar de DPPS para as monocamadas analisadas nas pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (A) e presença (B) de 5 mM de CaCl_2 . Energia livre de mistura para as monocamadas analisadas em função da fração molar de DPPS utilizada, para as pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (C) e presença (D) de 5 mM de CaCl_2 . A subfase consistiu em tampão HBS pH 7,4. Em todos os casos, retas em preto denotam comportamento ideal. Fonte: Autoria própria.

Em condições ideais, tanto a área quanto a contribuição energética que os componentes isolados fornecem para a mistura é proporcional à fração molar de cada componente (GRADELLA VILLALVA et al., 2016). Assim, a área molecular média para misturas ideais é calculada de acordo com a **Equação 1** abaixo.

$$A_{12}^{ideal} = X_1 A_1 + X_2 A_2 \quad (1)$$

A partir da mesma premissa, a energia livre de excesso de mistura é calculada de acordo com a **Equação 2** que segue.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

$$\Delta G_{exc} = \int_0^\pi A_{12} d\pi - X_1 \int_0^\pi A_1 d\pi - X_2 \int_0^\pi A_2 d\pi \quad (2)$$

A literatura discorre sobre a possibilidade de se identificar desvios de idealidade da mistura de componentes em monocamadas a partir da comparação do comportamento misto aferido experimentalmente com uma extrapolação realizada a partir da obtenção do comportamento empírico dos componentes puros, utilizando-se as **Equações 1 e 2**. Além disso, relata-se ainda a possibilidade de identificar a natureza do efeito que provoca um determinado desvio de idealidade observado, *i. e.*, quais interações predominam entre os componentes da monocamada, com base no tipo de desvio observado em relação ao comportamento ideal (GRADELLA VILLALVA et al., 2016).

Os desvios observados em relação ao comportamento ideal (linear) predito podem ser negativos ou positivos. Desvios positivos correspondem a valores de área molecular média maiores do que seus correspondentes ideais, e sugerem a formação de agregados bidimensionais e/ou domínios caracterizados por interações repulsivas entre os componentes da monocamada. Desvios negativos correspondem a valores de área molecular menores do que seus correspondentes ideais, e, portanto, indicam interações atrativas entre os componentes da monocamada (GRADELLA VILLALVA et al., 2016; REHMAN et al., 2017).

Analogamente, desvios de idealidade da mistura podem ser avaliados pela variação de energia livre de excesso de mistura, ΔG_{exc} . Uma mistura ideal deve apresentar um valor de ΔG igual a 0, que significa que nenhum tipo de interação entre os componentes é mais ou menos favorável que outro tipo, sendo todas as interações equivalentes. Se $\Delta G < 0$, interações atrativas ocorrem entre os componentes da mistura, ao passo que $\Delta G > 0$ denota interações repulsivas entre os componentes da mistura. Dessa forma, ΔG_{exc} fornece informação acerca da

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

estabilidade termodinâmica de monocamadas mistas (DE PAULA RIGOLETTO et al., 2011; GRADELLA VILLALVA et al., 2016).

A partir dos gráficos apresentados na **Figura 11A e 11B**, observa-se um desvio negativo de área para a monocamada em 10 mN/m, e um comportamento muito próximo da idealidade na pressão de 30 mN/m, tanto na presença quanto na ausência de íons Ca^{2+} . Essas observações sugerem interações atrativas entre as moléculas constituintes da monocamada em 10 mN/m, o que é razoável, dado que esta pressão corresponde a região de coexistência de fases e espera-se uma aproximação entre moléculas, que podem ou não se associar de modo atrativo. A proximidade do comportamento observado para a pressão de 30 mN/m do comportamento ideal torna difícil qualquer consideração acerca das interações predominantes entre as moléculas no plano da monocamada, e, portanto, passamos à análise das variações de energia livre de excesso de mistura. Neste caso, o cenário se inverte, e os desvios na pressão de 10 mN/m tornam-se inconclusivos. Entretanto, um desvio positivo bastante pronunciado é observado na pressão de 30 mN/m quando a monocamada é formada na presença de íons Ca^{2+} . O desvio positivo sugere a predominância de interações repulsivas entre os lipídeos, que podem ser atribuídas as interações DPPS-DPPS, em razão da sua carga líquida negativa.

Um desvio positivo nessas condições pode indicar que mesmo em baixas proporções de DPPS na monocamada (10-20%), a presença de íons Ca^{2+} induz certo ordenamento e agrupamento destes lipídeos. Assim, para avaliar de forma mais assertiva esse efeito, optou-se pelo preparo das monocamadas em água pura, uma vez que a alta concentração salina do tampão HBS pode mascarar o efeito do cálcio, como já mencionado anteriormente.

A **Figura 12** abaixo apresenta as isotermas $\pi \times A$ obtidas para os ensaios de interação nas monocamadas em subfase de água pura.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

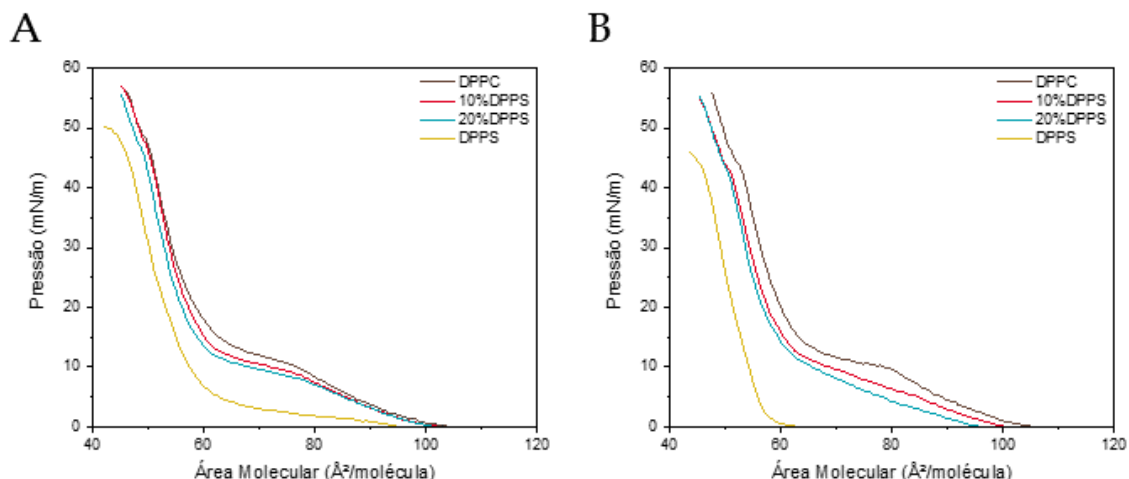


Figura 12 | Interação de DPPC e DPPS em monocamadas de Langmuir. Isothermas $\pi \times A$ de DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em subfase de água, na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 . Fonte: Autoria própria.

Comparando-se a **Figura 12** com a **Figura 10** observa-se um deslocamento das isothermas para a esquerda, que parece estar associado à quantidade de DPPS presente na monocamada, sugerindo que a presença de DPPS, por si só, promove contração da monocamada em água pura. Este fenômeno muito provavelmente foi mascarado pela alta força iônica do tampão HBS, o que explica sua ausência na **Figura 10**. Além disso, observa-se também que a contração da monocamada é mais evidente na presença de íons Ca^{2+} , indicando um possível efeito cumulativo/sinérgico de DPPS e Ca^{2+} sobre a sua organização.

Adams e colaboradores (2016) mostraram que íons Na^+ promovem expansão de monocamadas constituídas por DPPC, assim como íons K^+ e Mg^{2+} , ao passo que íons Ca^{2+} promovem contração nas mesmas condições (ADAMS; CASPER; ALLEN, 2016). Este estudo vai ao encontro com o demonstrado por Javanainen e colaboradores (2020), cujo estudo, como mencionado, mostra pouca influência de íons Na^+ sobre o estruturamento da monocamada de DPPC, porém tal efeito é também de expansão, ainda que em menor extensão (JAVANAINEN et al., 2020). Dessa forma, pode-se assumir que há uma competição entre íons Ca^{2+} e Na^+ pelos

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

sítios de interação na monocamada, que resulta nas isotermas apresentadas na **Figura 10**, como consequência da maior quantidade de íons Na^+ na subfase.

A análise de mistura também foi realizada para as monocamadas preparadas em água pura, e os gráficos que correspondem a essa avaliação estão dispostos na **Figura 13** que segue.

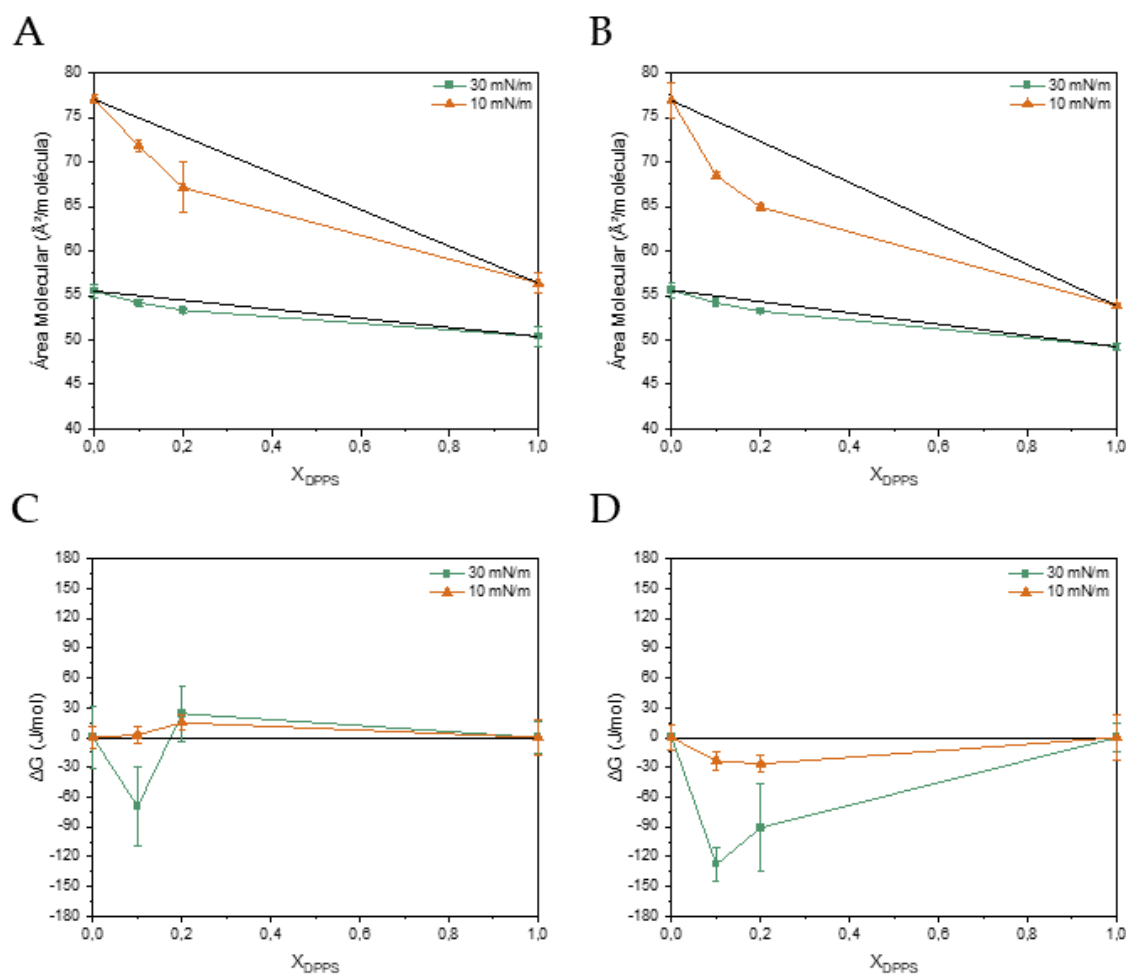


Figura 13 | Análise do comportamento de mistura das monocamadas em água. Áreas moleculares médias em função da fração molar de DPPS para as monocamadas analisadas nas pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (A) e presença (B) de 5 mM de CaCl_2 . Energia livre de mistura para as monocamadas analisadas em função da fração molar de DPPS utilizada, para as pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (C) e presença (D) de 5 mM de CaCl_2 . A subfase consistiu em água pura. Em todos os casos, retas em preto denotam comportamento ideal. Fonte: Autoria própria.

Novamente, observa-se desvios negativos de área molecular na pressão de 10 mN/m, tanto na presença quanto na ausência de íons Ca^{2+} , para as monocamadas preparadas em água pura. Adicionalmente, observa-se um ligeiro desvio negativo de

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

área molecular na pressão de 30 mN/m, em ambas as condições empregadas. Os desvios negativos estão associados com um maior empacotamento lipídico da monocamada, o que é bastante razoável nessas condições, em que a presença exclusiva de íons Ca^{2+} promove uma contração da monocamada (área molecular máxima na **Figura 12** é reduzida de aproximadamente $104 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para valores entre 96 e $100 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$). Analogamente, o perfil de desvios de idealidade observados na **Figura 11** para as monocamadas preparadas na presença de íons Na^+ reflete o efeito destes íons, isto é, de expansão da monocamada, e, portanto, redução dos desvios negativos de idealidade associados a um maior empacotamento lipídico.

Com relação às variações de energia livre de excesso (**Figura 13C e 13D**), observa-se um desvio geral levemente positivo na pressão de 10 mN/m para as monocamadas preparadas na ausência de íons Ca^{2+} , e um desvio de idealidade inconclusivo para a pressão de 30 mN/m, como ocorrido na **Figura 11C**. Esse desvio positivo na pressão de 10 mN/m indica que de fato a monocamada apresenta interações repulsivas significativas, sugerindo proximidade de moléculas de DPPS no plano da monocamada, sem cátions para mediar suas interações. Na presença de íons Ca^{2+} observa-se desvios de idealidade definitivamente negativos, que corroboram ensaios prévios de interação de monocamadas contendo DPPS com íons Ca^{2+} presentes na interface (ADAMS; CASPER; ALLEN, 2016). Esses desvios ressaltam a prevalência de interações atrativas entre os componentes da monocamada, tanto na pressão de 10 mN/m quanto na pressão de 30 mN/m, indicando que os íons Ca^{2+} exercem efeito de estabilização das interações entre moléculas de DPPS tanto em baixas pressões quanto em pressões típicas de bicamadas/membranas biológicas (MELCROVÁ et al., 2016). Esse fenômeno é especialmente relevante no contexto da mineralização mediada por vesículas da matriz, que envolve grande quantidade de íons Ca^{2+} associada a regiões da membrana vesicular com abundância de DPPS (GENGE; WU; WUTHIER, 2008; WU et al., 1996)].

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por fim, o efeito da AnxA5 sobre a organização das monocamadas foi avaliado. Neste contexto, optou-se pela subfase constituída por tampão HBS pH 7,4, uma vez que o seu teor salino favorece a permanência da proteína em solução, disponível para interação com a monocamada. A **Figura 14**, a seguir, expressa as isotermas $\pi \times A$ para as monocamadas preparadas com AnxA5 na subfase, tanto na ausência quanto na presença de 5 mM Ca^{2+} .

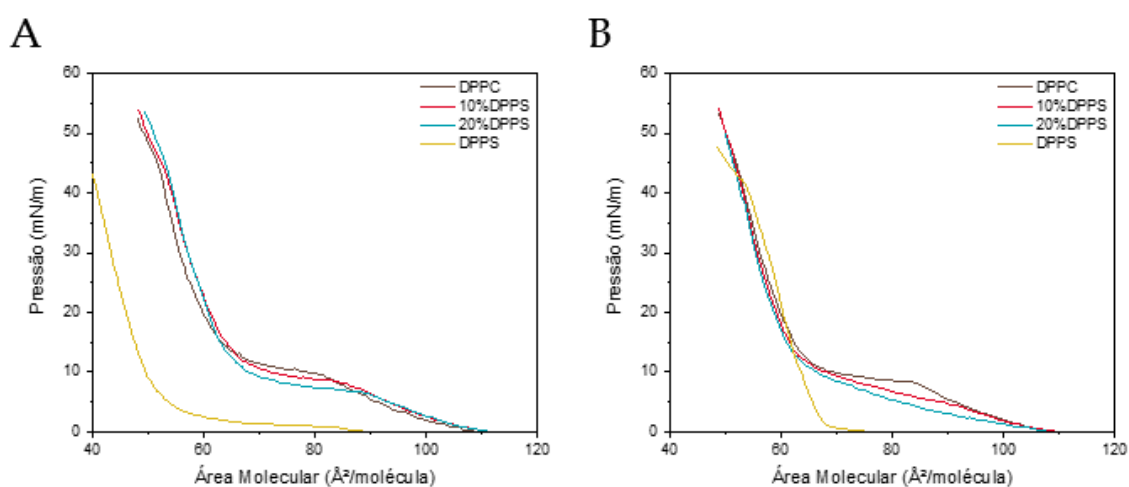


Figura 14 | Interação de DPPC, DPPS e AnxA5 em monocamadas de Langmuir. Isotermas $\pi \times A$ de DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em subfase de tampão HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl) na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 , e presença de AnxA5 (proporção molar LIPÍDEO:PROTEÍNA 100:1). Fonte: Autoria própria.

As isotermas apresentadas na **Figura 14** possuem um perfil bastante similar ao das isotermas obtidas para as monocamadas preparadas em tampão HBS na ausência de proteína, no entanto, observa-se um deslocamento para a direita, indicando expansão das monocamadas preparadas na presença de AnxA5. Baseado no que foi discutido para as monocamadas preparadas em tampão HBS e água, observa-se uma provável influência dos íons Na^+ sobre a organização da monocamada, que torna complicado a identificação dos efeitos decorrentes da presença da proteína, que pode também exercer um efeito sobre a monocamada similar ao efeito dos íons Na^+ . Na presença de íons Ca^{2+} é possível observar uma influência sobre a tensoatividade da região de coexistência de fases que parece ser intermediária entre a observada para as

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 10 e **Figura 12**. Isto indica que de alguma forma a presença de AnxA5 intensifica o efeito provocado por íons Ca^{2+} sobre a organização da monocamada, muito provavelmente devido à sua afinidade por esse cátion em detrimento de íons Na^+ . De fato, Mukhopadhyay e colaboradores (1996) observaram que a interação de AnxA5 com monocamadas aniônicas exerce um efeito sobre a pressão superficial muito semelhante ao efeito exercido a partir da interação das mesmas monocamadas com íons Ca^{2+} (MUKHOPADHYAY; CHO, 1996). Apesar da interação de monocamadas com AnxA5 em subfase aquosa contendo apenas CaCl_2 não ter sido avaliada neste trabalho, a interação de membranas mistas de fosfatidilcolina e fosfatidilserina com AnxA5 em interfaces contendo apenas sal de cálcio foi recentemente investigada por Ma e colaboradores (2020) por meio de espectroscopia vibracional (MA et al., 2020). Neste estudo, os autores demonstraram que o mecanismo pelo qual a proteína interage com a membrana aniônica na ausência de íons Ca^{2+} é distinto do mecanismo de interação na presença desses íons. Assim, não se descarta a possibilidade de comportamento semelhante ocorrer na interface constituída por tampão HBS, ainda que em menor escala.

Os valores de área molecular média e energia livre de excesso de mistura para as monocamadas preparadas na presença de AnxA5 estão apresentados na **Figura 15**, a seguir.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

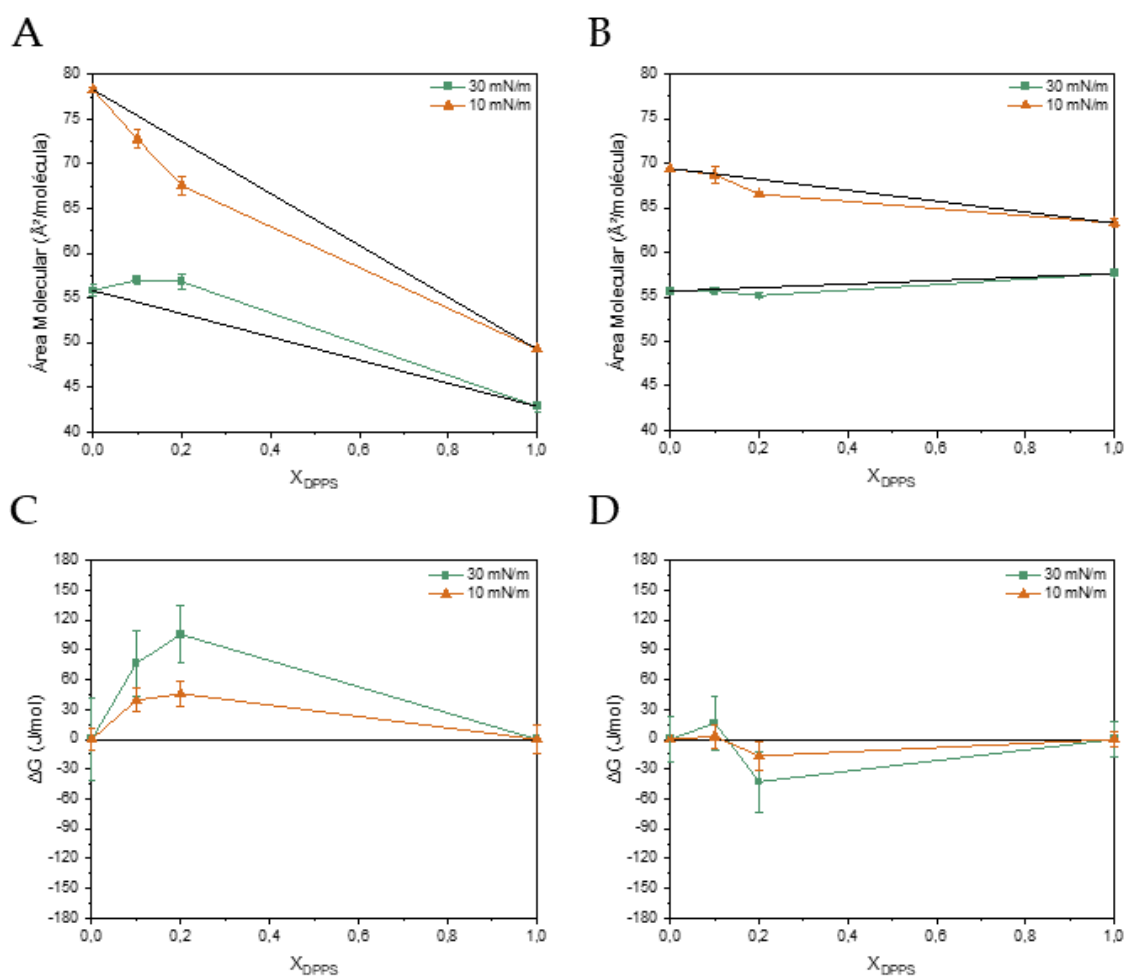


Figura 15 | Análise do comportamento de mistura das monocamadas em tampão HBS na presença de AnxA5. Áreas moleculares médias em função da fração molar de DPPS para as monocamadas analisadas nas pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (A) e presença (B) de 5 mM de CaCl_2 , e presença de AnxA5 (proporção molar LIPÍDEO:PROTEÍNA de 100:1). Energia livre de mistura para as monocamadas analisadas em função da fração molar de DPPS utilizada, para as pressões de 10 mN/m e 30 mN/m, na ausência (C) e presença (D) de 5 mM de CaCl_2 , e presença de AnxA5 (proporção molar LIPÍDEO:PROTEÍNA de 100:1). A subfase consistiu em tampão HBS pH 7,4. Em todos os casos, retas em preto denotam comportamento ideal. Fonte: Autoria própria.

A **Figura 15A** mostra que, diferentemente das situações anteriores, ou seja, monocamadas preparadas em tampão HBS e água, a presença da AnxA5 provoca uma inversão no desvio observado para os valores de área molecular média na pressão de 30 mN/m, enquanto o desvio negativo observado para a pressão de 10 mN/m, que sugere compactação lipídica por meio de interações atrativas, está de acordo com o obtido para as demais condições. Na presença de íons Ca^{2+} , observa-se a mesma

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

tendência de desvio negativo das condições anteriores, reforçando o papel do cálcio na condensação lipídica das monocamadas contendo DPPC e DPPE.

Esse comportamento oposto observado para a interação da AnxA5 com as monocamadas mistas na ausência e presença de íons Ca^{2+} na pressão de 30 mN/m sugere uma possível diferença na forma como a proteína interage com a monocamada nos dois casos. Como já dito anteriormente, Ma e colaboradores (2020) observaram diferenças no mecanismo de interação da AnxA5 com membranas constituídas por dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) e dioleoilfosfatidilserina (DOPS) na ausência e presença de íons Ca^{2+} (MA et al., 2020). Os autores propuseram que, na ausência de íons Ca^{2+} , as moléculas de AnxA5 são adsorvidas de modo desordenado sobre a membrana, e que a adição posterior de íons Ca^{2+} promove reorganização da proteína, que adota uma orientação mais estável a partir da formação de complexos AnxA5- Ca^{2+} -PS. Na presença de íons Ca^{2+} , as moléculas de AnxA5 já se organizam na forma mais estável, por meio da formação direta dos mesmos complexos AnxA5- Ca^{2+} -PS, sem passar por um estágio de organização intermediário (MA et al., 2020).

Outros trabalhos discorrem sobre a complexação de íons Ca^{2+} em membranas sintéticas contendo fosfatidilserina, na ausência de proteína. Sinn e colaboradores (2006), em um estudo bastante cuidadoso de adsorção de íons Ca^{2+} sobre membranas mistas contendo fosfatidilcolina e fosfatidilserina, observaram que a ligação de cálcio a essas membranas ocorre de forma espontânea e endotérmica, indicando um processo entropicamente dirigido (SINN; ANTONIETTI; DIMOVA, 2006). Além disso, Melcrová e colaboradores (2016) observaram que os sítios de ligação na membrana são dependentes tanto quantitativamente (número de sítios) quanto qualitativamente (localização/natureza dos sítios) da concentração de cálcio. Em baixas concentrações de cálcio ($\sim 0,1$ M), os sítios preferenciais de ligação nas membranas mistas são os grupos COO^- ($n = 0,58$), seguidos por PO_4^{3-} ($n = 0,38$) e C=O ($n = 0,34$), sendo \underline{n} o número de coordenação de íons Ca^{2+} em cada um dos

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

grupos. Em altas concentrações de cálcio ($\sim 0,7$ M), uma alteração nos números de coordenação é observada, e estes tornam-se $n = 0,68$, $n = 0,98$ e $n = 0,60$ para COO^- , PO_4^{3-} e C=O , respectivamente (MELCROVÁ et al., 2016). Os autores atribuem essa alteração nos números de coordenação à localização dos íons Ca^{2+} na monocamada, que é determinada pelo grau de hidratação da monocamada que, por sua vez, depende da concentração de cálcio na interface.

Os gráficos de energia livre de excesso de mistura dispostos na **Figura 15C** e **15D** denotam comportamentos opostos em relação a presença de íons Ca^{2+} na interface. Na ausência de cálcio, desvios positivos são observados, indicando predominância de interações repulsivas. Para a pressão de 30 mN/m, observa-se concordância com o desvio de área molecular média, porém, para a pressão de 10 mN/m o comportamento é oposto ao desvio de área, indicando que, apesar de domínios condensados se formarem nesse estágio de organização da monocamada, as interações predominantes são repulsivas devido à uma provável proximidade entre moléculas de DPPS, mesmo na presença de proteína. Na presença de íons Ca^{2+} , predominam as interações atrativas, que se mostram mais intensas com o aumento da quantidade de DPPS na monocamada e na pressão de 30 mN/m, indicando que não só a presença simultânea de cálcio e AnxA5 de fato reduzem a repulsão entre moléculas de DPPS, mas que, além disso, a predominância de interações atrativas na pressão de 30 mN/m pode decorrer de um arranjo distinto e mais favorável das moléculas de AnxA5 na interface.

4.1.2 | Estabilidade de monocamadas

A estabilidade das monocamadas preparadas foi avaliada a partir da variação da pressão superficial no decorrer do tempo. As **Figura 16**, **Figura 17** e **Figura 18** que seguem ilustram a estabilidade das monocamadas preparadas em tampão HBS.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

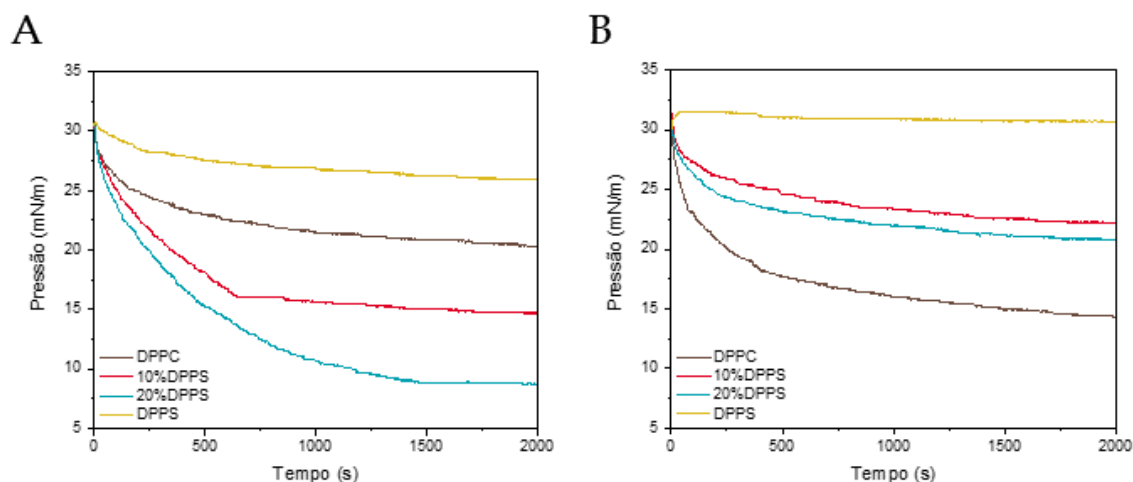


Figura 16 | Estabilidade das monocamadas preparadas em tampão HBS. Variação da pressão superficial (mN/m) em função do tempo (s) das monocamadas constituídas por DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em subfase de tampão HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl) na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 . Fonte: Autoria própria.

A **Figura 16** mostra que, tanto na ausência quanto na presença de íons Ca^{2+} , a monocamada constituída exclusivamente por DPPS se apresenta como a mais estável, já que apresenta o menor declínio de pressão superficial, observado na ausência de cálcio. Na presença de cálcio, a monocamada de DPPS puro se mantém com pressão praticamente constante durante o todo o intervalo de tempo empregado no ensaio, sugerindo que a diminuição da pressão observada na ausência de íons Ca^{2+} se deve a repulsão entre moléculas de DPPS, que são minimizadas na presença de cálcio.

A respeito das composições mistas pode-se inferir que a repulsão entre moléculas de DPPS também é um fator determinante da diminuição de pressão superficial observada para essas monocamadas. Além disso, nota-se que uma diminuição mais acentuada da pressão superficial ocorre na monocamada que apresenta maior quantidade de DPPS na sua constituição e, novamente, a presença de cálcio estabiliza ambas as monocamadas.

No caso da monocamada de DPPC, observa-se que, na ausência de cálcio ela se apresenta mais estável do que as mistas, reforçando o efeito desestabilizante

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

desempenhado pelas moléculas de DPPS. Na presença de cálcio, observa-se uma redução da estabilidade da monocamada, diferente do que ocorre com as demais composições, evidenciando uma interação oposta dos íons Ca^{2+} com DPPC e DPPS. De fato, o efeito exercido pelo cálcio sobre as monocamadas de DPPC puro é de expansão, ao passo que o efeito observado sobre as monocamadas de composição mista é de contração, como se pode notar a partir das isoterms apresentadas na **Figura 12**, e em menor escala, na **Figura 10**.

A **Figura 17** exibe o mesmo padrão de estabilidade observado na **Figura 16**, porém o decaimento das curvas de estabilidade se dá de forma menos suave, indicando quedas bruscas de estabilidade, que podem estar associadas a menor força iônica da subfase, que não promove efeito de minimização de repulsão de cargas entre as moléculas no plano da monocamada. Assim como na **Figura 16**, a presença de íons Ca^{2+} na subfase estabiliza as composições contendo DPPS ao passo que desestabiliza a monocamada formada por DPPC puro, reforçando o efeito distinto exercido sobre estas composições.

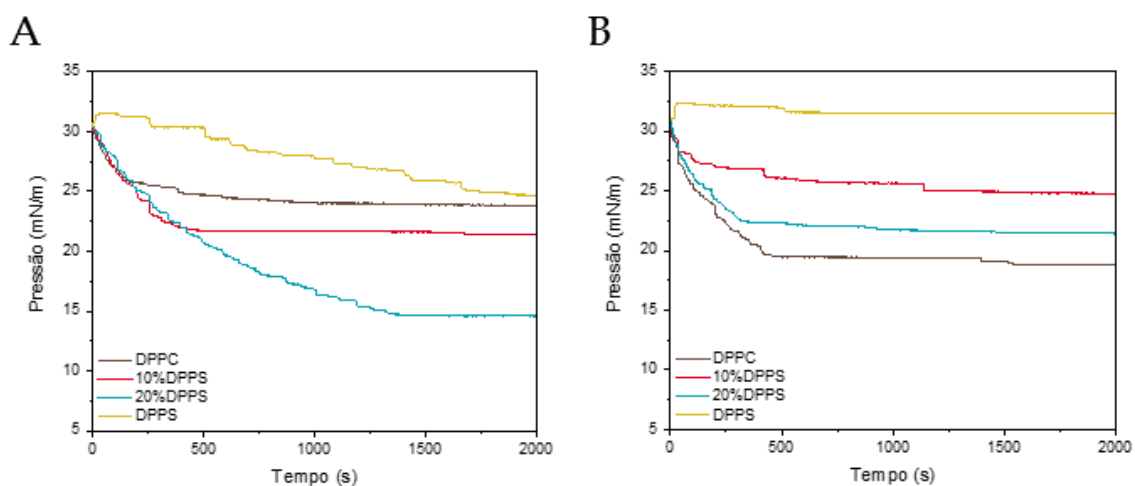


Figura 17 | Estabilidade das monocamadas preparadas em água pura. Variação da pressão superficial (mN/m) em função do tempo (s) das monocamadas constituídas por DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em água na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 . Fonte: Autoria própria.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por fim, a **Figura 18** apresenta o efeito da AnxA5 sobre a estabilidade das monocamadas estudadas. Nota-se que, na ausência de íons Ca^{2+} , as monocamadas contendo DPPS se mostram mais estáveis que a de DPPC puro, sugerindo que a proteína interage preferencialmente com DPPS de modo a estabilizar essas monocamadas, mesmo sem o intermédio do cálcio. Entretanto, a presença de íons Ca^{2+} promove um maior relaxamento das monocamadas, o que vai de encontro com o observado nas condições anteriores, em que estes íons tornavam as monocamadas mais estáveis durante o intervalo de tempo observado.

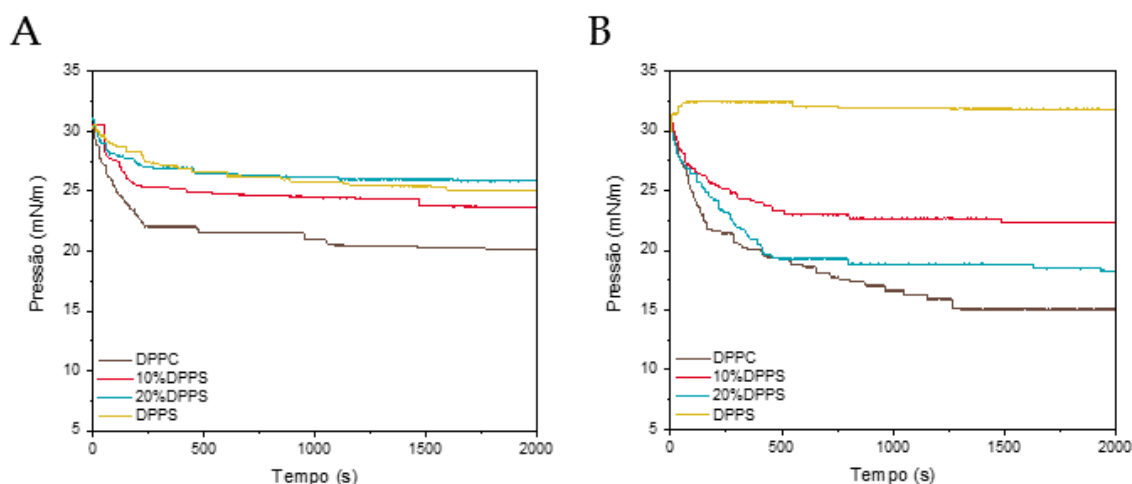


Figura 18 | Estabilidade das monocamadas preparadas em tampão HBS na presença de AnxA5. Variação da pressão superficial (mN/m) em função do tempo (s) das monocamadas constituídas por DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em subfase de tampão HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl) contendo AnxA5 na proporção proteína:lipídeo 1:100 (em número de mol), na ausência (A) e presença (B) de 5 mM CaCl_2 . Fonte: Autoria própria.

Com isso pode-se notar que, em termos gerais, na ausência de cálcio a AnxA5 promove uma ligeira estabilidade das monocamadas mistas, indicando interação significativa com DPPS nessas condições, porém na presença de íons Ca^{2+} a proteína não afeta significativamente a estabilidade das mesmas monocamadas, assim como a presença de íons Na^+ não parece exercer grande influência, ao menos não o bastante para que seja detectada por meio desta análise.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.3 | Microscopia de fluorescência

Numa tentativa de se compreender melhor como os lipídeos poderiam estar organizados nas diferentes condições empregadas, imagens de microscopia de fluorescência no estágio de coexistência de fases le-lc das monocamadas foram obtidas. A **Figura 19** a seguir apresenta imagens referentes a todas as condições empregadas. A sonda utilizada (NBD-HPC) permite a distinção entre regiões compactas (líquido-condensado, áreas escuras) e fluidas (líquido-expandido, áreas claras) da monocamada, uma vez que a sua fluorescência é suprimida em microambientes condensados (OKONOGI; MCCONNELL, 2004).

Na ausência de íons Ca^{2+} , observa-se uma distribuição homogênea de domínios circulares para a monocamada de DPPC puro, que está de acordo com resultados previamente relatados para imagens obtidas no ponto inicial da região de coexistência de fases (MCCONLOGUE; VANDERLICK, 1997; ROSS et al., 2001; SHIEH; ZASADZINSKI, 2015). Para as composições mistas, observa-se que a presença de DPPS exerce pouco efeito sobre a formação desses domínios, entretanto, na presença de 20%DPPS eles parecem possuir um diâmetro ligeiramente menor em relação aos observados para DPPC puro. Por fim, para DPPS puro observa-se um aumento no diâmetro dos domínios lipídicos em relação às outras composições. Estas observações sugerem que a presença de DPPS de fato pode alterar o modo como a transição de fase ocorre nas monocamadas, no entanto, esse efeito só deve ser significativo em composições de DPPS maiores que as utilizadas nas monocamadas mistas apresentadas neste trabalho.

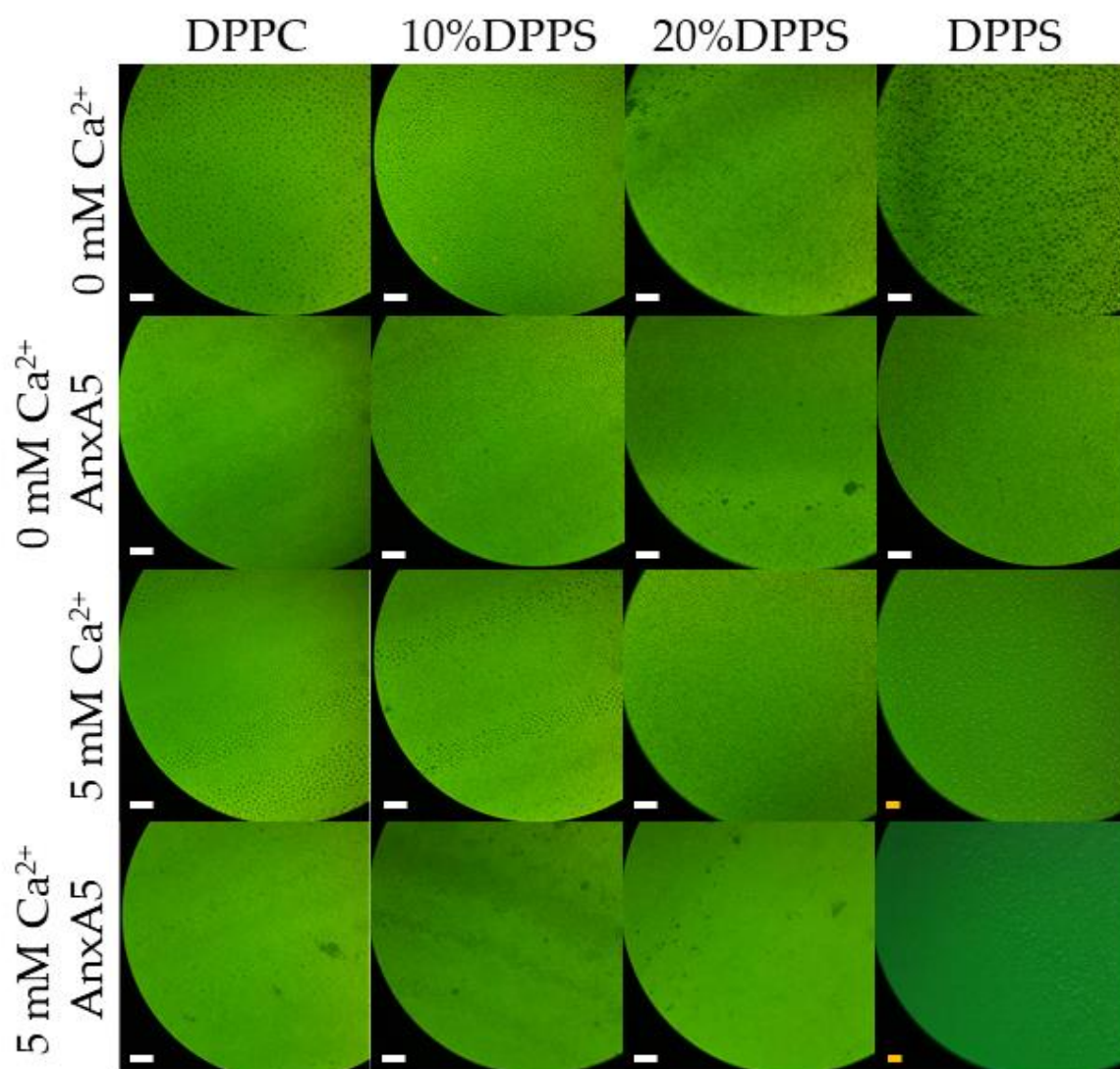


Figura 19 | Microscopia de fluorescência das monocamadas preparadas. Imagens de fluorescência das monocamadas compostas por DPPC puro, 10%DPPS, 20%DPPS e DPPS puro, na ausência e presença de 5 mM Ca²⁺ e AnxA5 (proporção molar LIPÍDEO:PROTEÍNA de 100:1), na pressão de 10 mN/m (região de coexistência de fases). Barras de escala brancas correspondem a 160 nm (lente objetiva de 40x), ao passo que barras de escala laranjas correspondem a 100 nm (lente objetiva de 20x). Fonte: Autoria própria.

A presença de AnxA5 na ausência de cálcio exerce pouca influência sobre a formação dos domínios observados. De fato, apenas uma ligeira perda de homogeneidade dos domínios formados em DPPC puro foi observada, sem grandes flutuações quanto aos seus diâmetros. Os domínios formados na presença de íons Ca²⁺ se mostram ainda bastante semelhantes aos observados nas condições anteriores, sem grandes perturbações. Entretanto, a presença de cálcio alterou

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

significativamente os domínios formados em DPPS puro, que se mostraram como um emaranhado de regiões condensadas de difícil visualização, de modo que a sua captura só foi possível com nitidez razoável pela lente objetiva de 20x.

Por fim, a presença simultânea de AnxA5 e íons Ca^{2+} levou à uma quebra da homogeneidade dos domínios lipídicos típicos observados, na qual domínios maiores passaram a ser formados com tamanhos diferentes. As composições mistas parecem ter apresentado um maior número destes domínios maiores em detrimento dos observados para DPPC puro. No caso do DPPS puro, o mesmo padrão de regiões condensadas emaranhadas foi observado, com a mesma dificuldade de captura apresentada pela condição anterior.

A partir das imagens obtidas, algumas considerações podem ser feitas acerca dos possíveis motivos das tendências observadas. Na ausência de AnxA5, observou-se pouca interferência sobre a organização típica de DPPC na região de coexistência de fases para as composições mistas, sugerindo que, apesar das moléculas de DPPS exercerem influência sobre a variação de pressão superficial que acompanha o processo de transição de fase lipídica da monocamada, nenhum efeito significativo parece ocorrer sobre a morfologia e dimensão da fase condensada formada inicialmente, tanto na presença quanto na ausência de cálcio. Uma vez que a proteína é inserida no sistema, mudanças significativas a respeito da dimensão e, em menor grau, morfologia dos domínios lipídicos são observadas na presença de cálcio, reforçando a afinidade de interação entre DPPS, íons Ca^{2+} e AnxA5, que provavelmente reconfiguram o padrão de formação dos domínios lipídicos pela associação em complexos DPPS- Ca^{2+} -AnxA5, como discutido na seção 4.2.1.

A associação de DPPS, íons Ca^{2+} e AnxA5 são a base para a formação da estrutura cristalina bidimensional da proteína já descrita em ensaios de interação com membranas (BOLEAN et al., 2015, 2017; OLING; BERGSMA-SCHUTTER; BRISSON, 2001). Assim, esse ordenamento pode ser a chave para a geração dos

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

domínios maiores observados, que podem inclusive apresentar uma quantidade de DPPS diferente dos domínios típicos formados nas demais condições, em virtude da necessidade de moléculas de DPPS para a geração de complexos com cálcio e proteína.

A partir dos resultados discutidos até aqui, observou-se que a presença concomitante de íons Ca^{2+} e AnxA5 exerce um efeito distinto e específico sobre a organização das monocamadas contendo DPPS nas condições trabalhadas. Foi possível avaliar, até certo grau, como tal organização se dá em baixas pressões superficiais (~ 10 mN/m), no entanto, uma abordagem mais profunda é necessária para entender o processo em pressões maiores (~ 30 mN/m), dado que membranas biológicas tipicamente apresentam pressão lateral em torno deste valor (MARSH, 1996), e as técnicas empregadas no estudo de monocamadas neste trabalho carecem de sensibilidade para estudos em pressões desta magnitude. Sendo assim, optou-se por prosseguir a investigação do comportamento de interação entre DPPS, Ca^{2+} e AnxA5 em lipossomos, que são passíveis de análises sensíveis a respeito de sua constituição lipídica, e além disso, exibem pressão típica de membranas biológicas, tornando-os extremamente úteis para as avaliações pretendidas.

4.2 | Bicamadas

4.2.1 | Calorimetria de varredura diferencial (DSC)

O comportamento térmico dos lipossomos constituídos pelas misturas em questão, bem como proteolipossomos contendo AnxA5 incorporada foi avaliado por DSC, na presença e ausência de cálcio, de modo a fornecer informações quanto ao efeito de íons Ca^{2+} na organização lipídica, bem como da proteína, e de ambos cálcio e proteína combinados. Os resultados estão apresentados na **Figura 20**, e os parâmetros de transição obtidos a partir dos termogramas estão ilustrados na **Figura 21**.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando a **Figura 20A** nota-se que o lipossomo de DPPC puro na ausência de cálcio e proteína expressa o padrão típico de transição para DPPC, com uma região de pré-transição bastante clara, em torno de 30-32 °C. Com relação à temperatura de transição do pico principal (T_t), observa-se uma redução em comparação com a temperatura de transição típica para DPPC, que é de 41 °C (CHEN et al., 2018). Esse efeito deve-se ao estresse osmótico que decorre da presença de grande concentração salina nas vesículas, que surge a partir da transição da fase gel para uma fase de organização intermediária (*ripple phase*) entre gel e líquido-cristalino, atingida durante a pré-transição, onde o volume das vesículas diminui, aumentando assim a concentração salina intravesicular e deslocando a transição principal para temperaturas menores (PERKINS et al., 1997).

Na presença de proteína, observa-se o desaparecimento da região de pré-transição e a temperatura de transição do pico principal é deslocada de volta para um valor próximo à temperatura de transição do DPPC, indicando que de alguma forma a proteína inibe a formação da fase de organização intermediária (*ripple*), reduzindo o estresse osmótico sofrido pelas vesículas.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

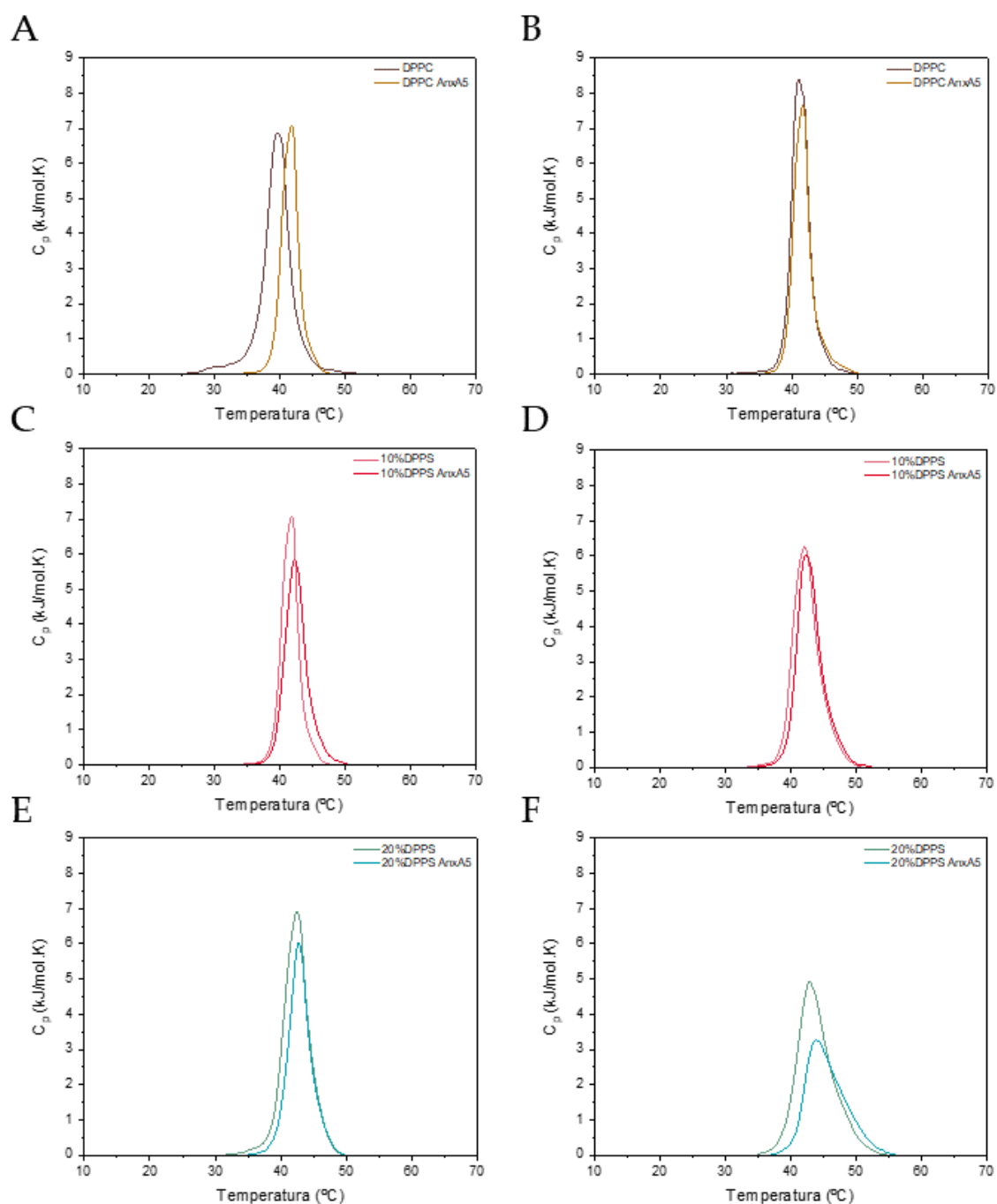


Figura 20 | Avaliação do efeito da presença de DPPS e AnxA5 no comportamento termotrópico das vesículas na ausência e presença de cálcio. Termogramas dos lipossomos e proteolipossomos constituídos por DPPC puro, mistura de DPPC:DPPS em proporções molares de 9:1 e 8:2 (10%DPPS e 20%DPPS, respectivamente) em tampão HBS (10 mM HEPES pH 7,4, 150 mM NaCl) na ausência (A, C, E) e presença (B, D, F) de 0,5 mM Ca^{2+} . Fonte: Autoria própria.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

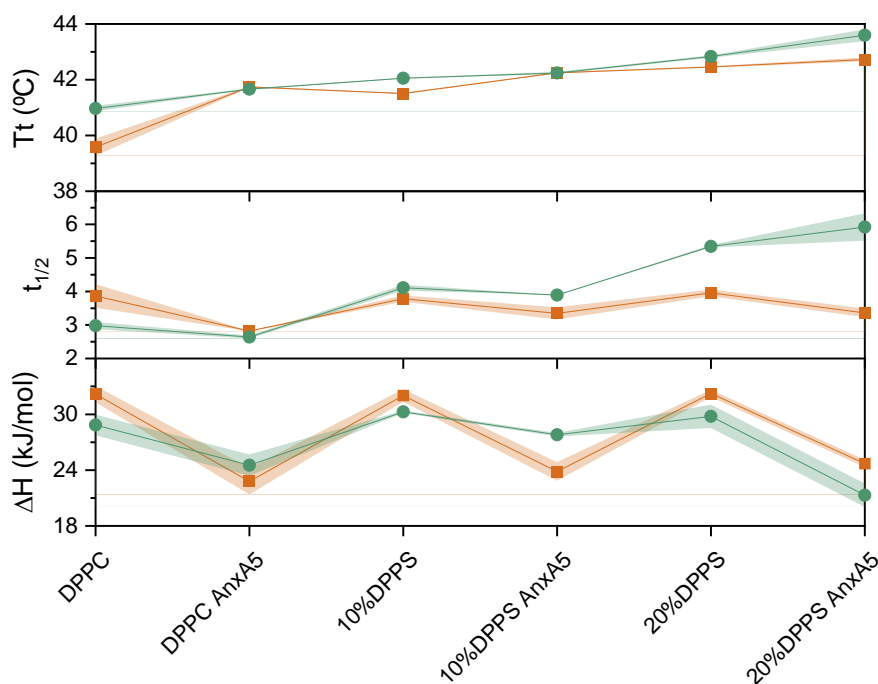


Figura 21 | Parâmetros de transição de fase lipídica dos lipossomos e proteolipossomos obtidos por DSC. Variação de entalpia de transição de fase, valores de cooperatividade e temperatura de transição de fase de lipossomos e proteolipossomos (AnxA5) constituídos de DPPC puro, 10%DPPS, 15%DPPS e 20%DPPS são representados na ausência (laranja) e presença (verde) de 0,5 mM de cálcio. Fonte: Autoria própria.

Nota-se que os valores de entalpia (ΔH) e cooperatividade ($t_{1/2}$) da **Figura 21** relacionados à transição de fase do DPPC sofrem diminuições quando a proteína está presente, indicando que a transição de fase ocorre de maneira mais cooperativa, em uma temperatura maior. Na presença de cálcio (**Figura 20B**), observa-se que sem a AnxA5 o sistema passa por um processo de transição semelhante ao de quando a proteína está presente na ausência de cálcio, sugerindo que os íons Ca^{2+} e AnxA5 exercem, isoladamente, um efeito similar sobre as vesículas. De fato, a presença de cálcio minimiza a pré-transição e desloca a transição principal para valores maiores de temperatura. Na presença de AnxA5 ocorre redução dos valores de ΔH , porém para valores pouco maiores que os observados para o proteolipossomo sem cálcio, e o valor de $t_{1/2}$ também diminui, para um valor próximo ao do proteolipossomo sem cálcio. Assim, a presença simultânea de AnxA5 e cálcio no sistema parece acrescentar um pequeno obstáculo energético para que a transição ocorra.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os sistemas contendo DPPS, observa-se a redução da região de pré-transição em todos os sistemas, com deslocamento das temperaturas de transição para valores iguais ou maiores que a do DPPC, decorrente da influência do DPPS na transição, que puro apresenta um valor de T_t de 55°C (GAESTEL et al., 1983). Pelos valores de ΔH na **Figura 21** nota-se que a energia necessária para promover a transição de fase é menor para lipossomos na presença de cálcio, e menor ainda quando há a presença simultânea de cálcio e AnxA5, de modo que na composição de 20%DPPS estes valores são sempre menores em comparação com os respectivos sistemas na ausência de cálcio.

A partir dos valores de temperatura de transição de fase e unidade de cooperatividade dispostos na **Figura 21**, observa-se um aumento gradativo na temperatura de transição conforme a quantidade de DPPS nas vesículas aumenta, que está de acordo com o que já é relatado para misturas lipídicas, onde a temperatura de transição é deslocada no sentido da transição do componente puro mais abundante (WODLEJ et al., 2019). A unidade de cooperatividade, ou simplesmente cooperatividade, é dada pela largura a meia altura dos picos nos termogramas e está relacionada com a quantidade de moléculas de lipídeo que participam conjuntamente na transição, sendo as transições mais cooperativas aquelas que possuem menores valores de $t_{1/2}$ (HEIMBURG, 2007). Assim, nota-se o aumento gradual nos valores de cooperatividade para os sistemas contendo DPPS na presença de cálcio, ao passo que na ausência de íons Ca^{2+} os sistemas apresentam flutuações em torno de um mesmo valor, de modo que não há indícios de variações significativas do parâmetro. Sendo assim, conforme a quantidade de DPPS aumenta, menos moléculas participam simultaneamente da transição, sugerindo que a transição ocorre a partir de diferentes populações lipídicas, reforçando a ideia de que domínios ricos em DPPS são induzidos pela presença de íons Ca^{2+} , uma vez que o alargamento do pico ocorre no sentido de maior temperatura.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor visualização das transições e para facilitar a observação de transições múltiplas, fez-se a deconvolução de todos os termogramas apresentados na **Figura 20**, de modo que os picos deconvoluídos, juntamente com os respectivos picos originais estão apresentados na **Figura 22** que segue. A **Figura 23** expressa os parâmetros de transição obtidos a partir das deconvoluções.

Na deconvolução apresentada na **Figura 22A** observa-se dois picos, sendo que o pico mais escuro corresponde à pre-transição do DPPC na ausência de cálcio. Observa-se também a redução desse pico quando a proteína está presente, como já descrito, e também condizente com a **Figura 23A**. Na **Figura 22B**, que expressa lipossomo de DPPC na presença de cálcio, nota-se a presença de um pequeno pico centrado próximo a uma temperatura de 45°C, e que, portanto, não representa uma situação de pré-transição lipídica. Assim, acredita-se que esse pico remeta a algum tipo de ordenamento mais rígido das moléculas de DPPC induzido por íons Ca^{2+} , que se intensifica na presença da proteína, sugerindo que ela possa apresentar maior afinidade por esse tipo de organização.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

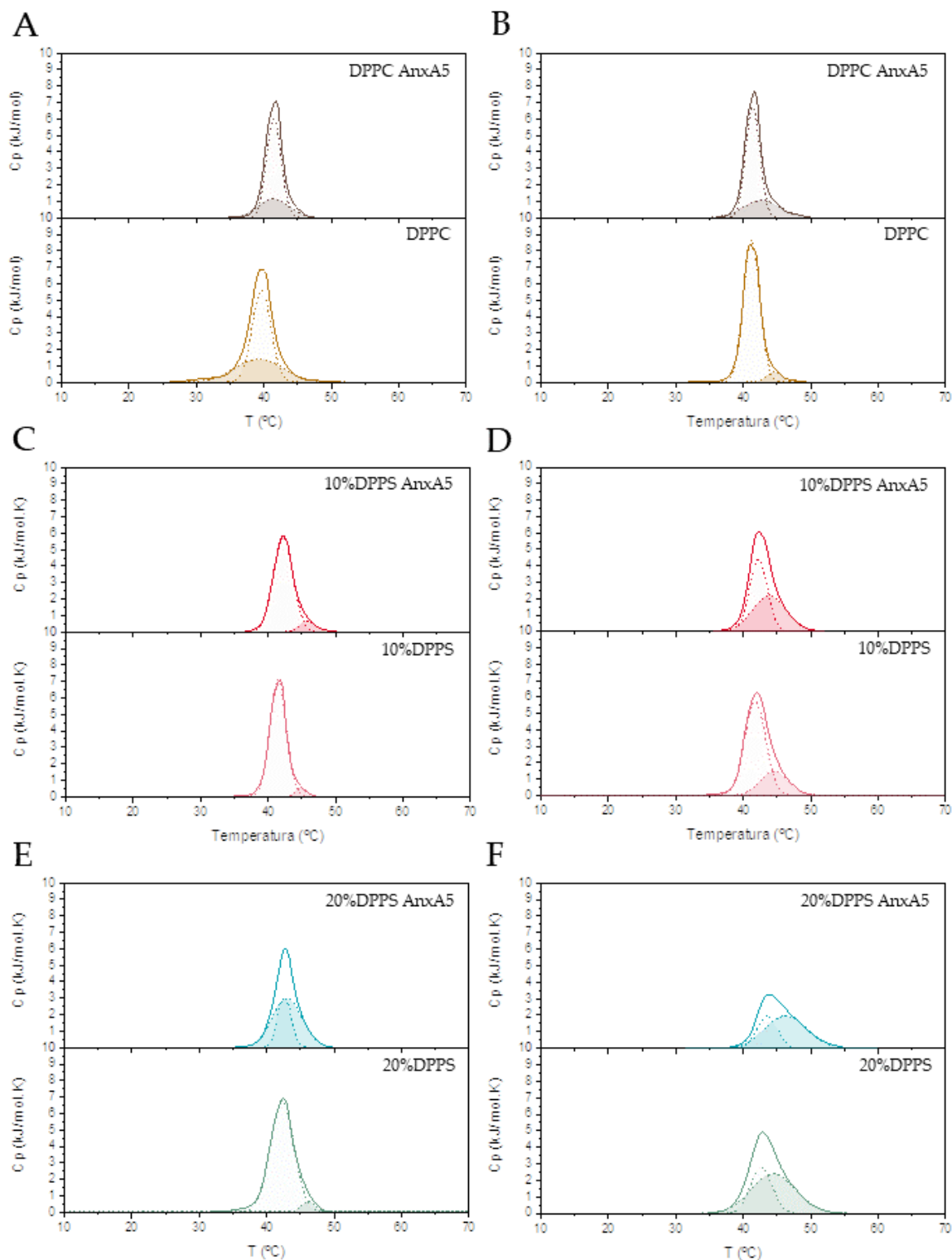


Figura 22 | Avaliação do efeito da presença de DPPS e AnxA5 na formação de domínios lipídicos nas vesículas. Deconvoluções dos termogramas apresentados na Figura 20 para proteolipossomos (gráficos superiores) e lipossomos (gráficos inferiores) na ausência (A, C, E) e presença (B, D, F) de 0,5 mM Ca^{2+} . Fonte: Autoria própria.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

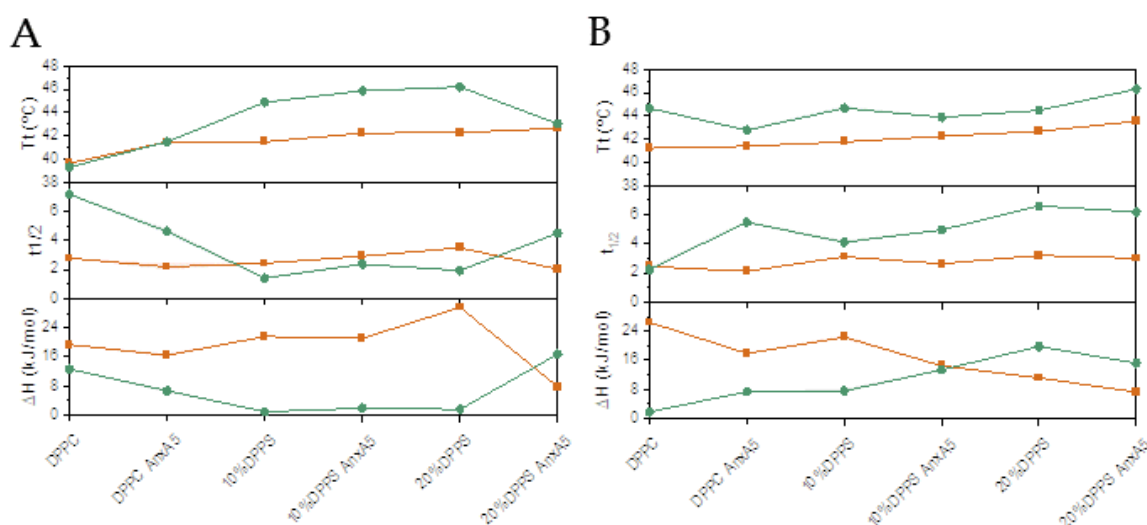


Figura 23 | Parâmetros de transição de fase lipídica dos termogramas deconvoluídos de lipossomos e proteolipossomos. Os picos principais (preenchimento mais claro na **Figura 22** são representados em laranja, enquanto os picos secundários (preenchimento mais escuro na **Figura 22** são representados em verde. Os sistemas são representados na ausência (A) e presença (B) de 0,5 mM de cálcio. Fonte: Autoria própria.

Com relação aos sistemas que possuem DPPS na sua composição, nota-se a presença de pequenos picos em temperaturas maiores que o pico de transição principal, tanto na ausência quanto na presença de cálcio. Isso sugere que se tratam de domínios ricos em DPPS, pois os mesmos não aparecem na deconvolução do DPPC puro. Ademais, observa-se uma tendência de aumento na área desses picos na presença de cálcio (como verificado a partir dos valores de ΔH na **Figura 23B**), indicando que ocorre uma intensificação da formação desses domínios induzidos pelo íon. Ressalta-se ainda que o aumento de área dos picos secundários parece se alinhar à quantidade de DPPS presente no sistema, já que a composição de 10%DPPS apresenta os menores picos enquanto a composição de 20%DPPS apresenta os maiores. Adicionalmente, a presença de AnxA5 promove um novo aumento desses picos, corroborando a hipótese previamente levantada de que eles correspondam à domínios mais ricos em DPPS, uma vez que a proteína apresenta alta afinidade de interação por DPPS na presença de cálcio (BOLEAN et al., 2015, 2017; LIZARBE et al., 2013). Por fim, o alargamento pronunciado desses picos (representadas por

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

$t_{1/2}$ na **Figura 23A**) reflete o fato de que essas transições representam organizações distintas da organização predominante (que se dá provavelmente entre moléculas de DPPC na sua maioria), fazendo com que a transição secundária se estenda por um amplo intervalo de temperatura.

Foi avaliado também o tamanho e o potencial zeta dos proteolipossomos formados na presença e ausência de cálcio, a fim de observar se houve influência da proteína nesses parâmetros. A **Figura 24** que segue expressa os resultados obtidos.

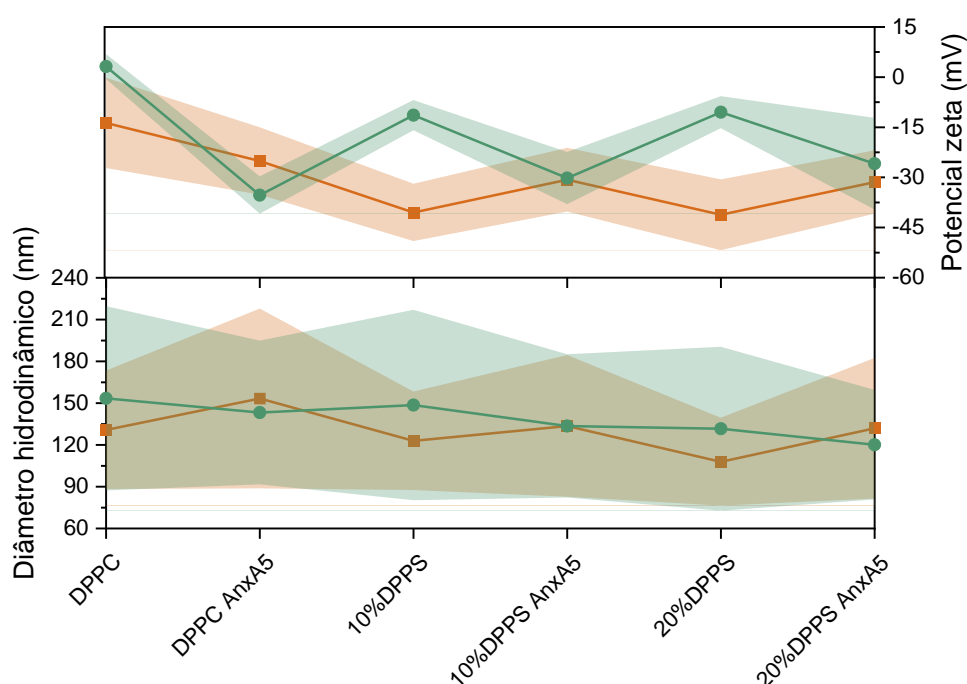


Figura 24 | Análise de estabilidade coloidal dos lipossomos e proteolipossomos preparados. Diâmetros hidrodinâmicos (inferior) e potenciais zeta (superior) dos proteolipossomos estão representados juntamente com seus respectivos lipossomos (DPPC puro, 10%DPPS, 15%DPPS e 20%DPPS). Denota-se ainda a ausência (laranja) e presença (verde) de 0,5 mM de cálcio. Fonte: Autoria própria.

A partir da **Figura 24** observa-se um leve aumento dos proteolipossomos em relação aos lipossomos na ausência de cálcio, ao passo que na presença de cálcio não houve variação significativa do tamanho das vesículas. Nota-se ainda uma diminuição do potencial zeta dos proteolipossomos com relação aos respectivos lipossomos. Isso sugere a interação da proteína com as vesículas, uma vez que o potencial zeta da proteína livre em pH 7,4 apresenta valor negativo da ordem de -25 mV (não

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

mostrado). Na ausência de cálcio, o comportamento é o oposto, havendo um aumento do potencial zeta dos proteolipossomos em relação aos lipossomos. Esse efeito pode ser decorrente de uma baixa interação com a proteína, que apresenta uma interação com membranas muito mais intensa na presença de cálcio (GERKE; CREUTZ; MOSS, 2005; MA et al., 2020).

4.2.2 | Ensaio de agregação

Após a caracterização dos lipossomos e proteolipossomos a respeito da organização das membranas lipídicas frente a presença de íons Ca^{2+} , realizou-se o estudo da estabilidade dessas vesículas em solução, por meio de medidas de tamanho de partícula e variações de turbidez das suspensões nas condições de interesse. As **Figura 25** e **Figura 26** que seguem expressam os resultados obtidos para as medidas de diâmetro médio e turbidez das suspensões de vesículas em diferentes concentrações de cálcio.

A partir da **Figura 25**, nota-se que o lipossomo constituído por DPPC puro se mantém estável em toda a faixa de concentração de cálcio utilizada, sem agregação significativa, ao passo que ambas as composições contendo DPPS apresentam clara agregação, que se torna mais evidente à medida que a concentração de cálcio aumenta. Este efeito desestabilizador sobre vesículas contendo DPPS foi observado e avaliado por Marr e colaboradores (2012), cujo trabalho mostra que os íons Ca^{2+} exercem um efeito significativo sobre o tamanho efetivo de moléculas de DPPS em bicamadas ao mesmo tempo que pouco efeito é observado sobre moléculas de DPPC (MARR et al., 2012). Os autores propuseram um modelo que prevê a ruptura de vesículas contendo DPPS a partir da energia livre associada ao diâmetro dessas vesículas. Além disso, atribuem o fenômeno de ruptura/fusão das bicamadas a um aumento da tensão lateral dos lipídeos resultante da ligação de íons Ca^{2+} . Essas observações estão de acordo com o que foi discutido neste trabalho, cujas

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

observações apontam para um acúmulo localizado de DPPS nas membranas preparadas quando submetidas à presença de cálcio.

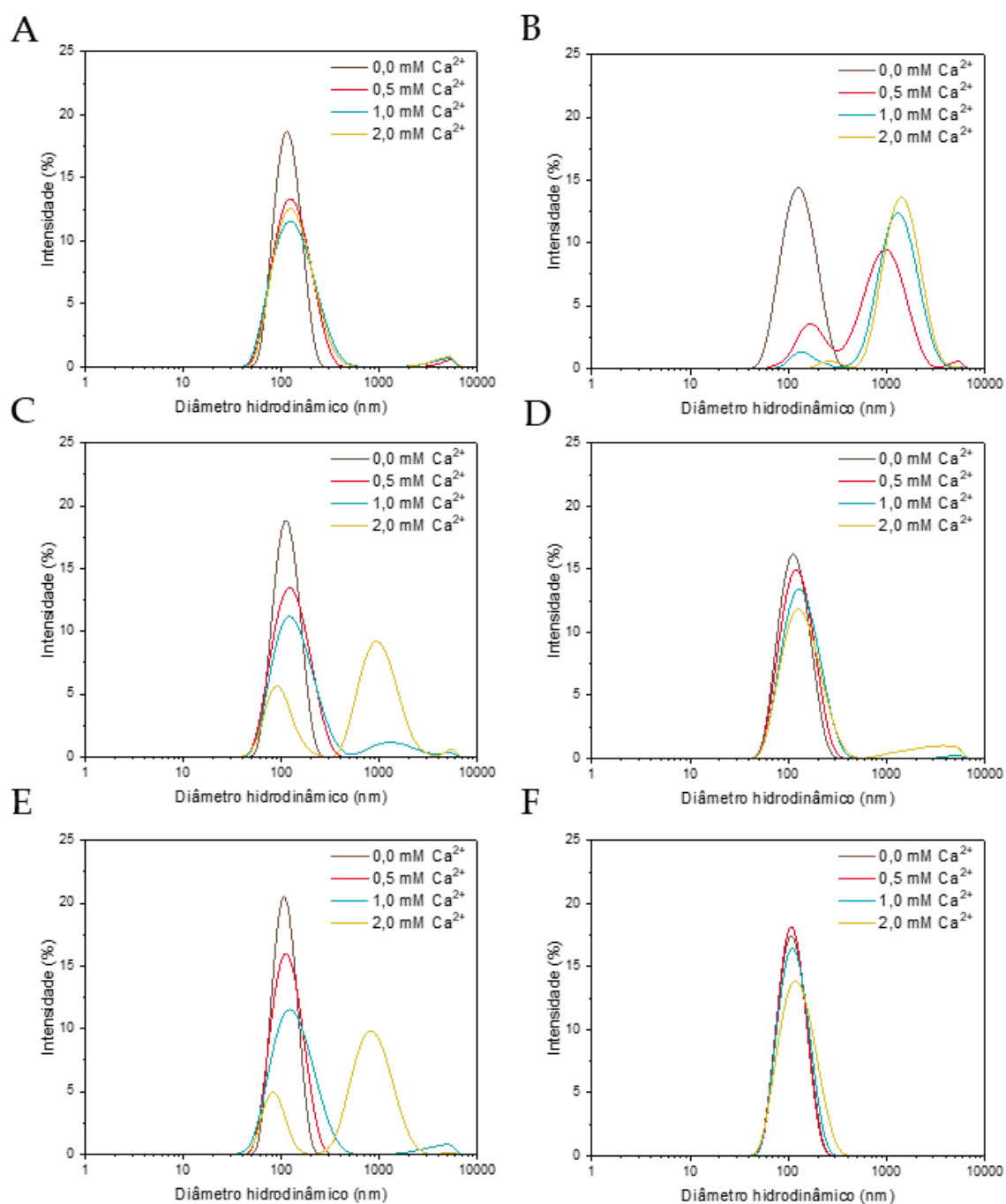


Figura 25 | Ensaio de agregação por DLS dos lipossomos e proteolipossomos preparados. Distribuição de diâmetros hidrodinâmicos de lipossomos e proteolipossomos (AnxA5) constituídos por DPPC puro (A e B, respectivamente), 10%DPPS (C e D, respectivamente) e 20%DPPS (E e F, respectivamente) na faixa de concentração de íons Ca²⁺ de 0,0 – 2,0 mM. Fonte: Autoria própria.

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

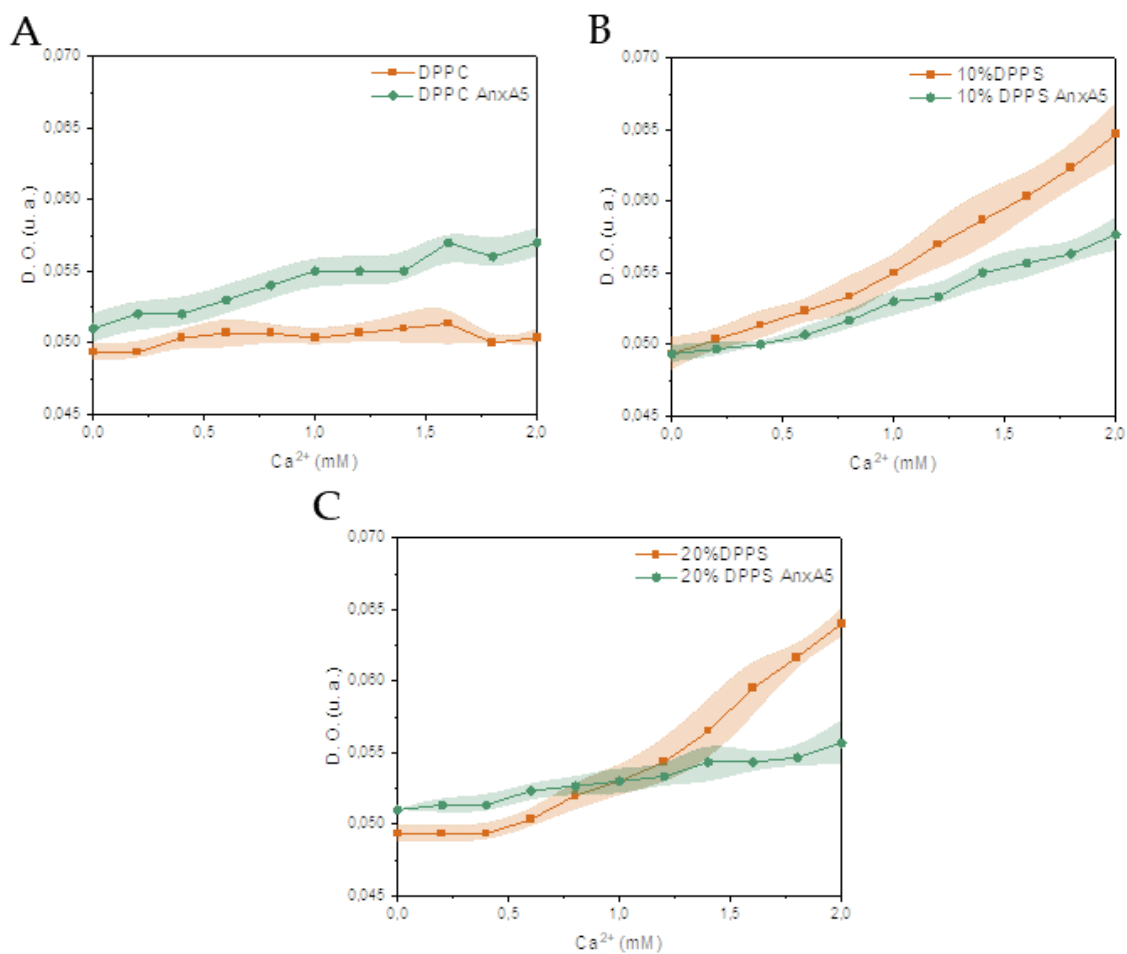


Figura 26 | Ensaio de agregação turbidimétrico dos lipossomos e proteolipossomos preparados. Curvas de densidade ótica em função da concentração de íons Ca^{2+} para as composições DPPC puro, 10%DPPS e 20%DPPS (percentuais molares) na ausência (em laranja) e presença (em verde) de AnxA5 (proporção proteína:lipídeo 1:100). Fonte: Autoria própria.

Na presença da proteína, observa-se agregação das vesículas compostas por DPPC puro, e uma redução marcante da agregação sofrida pelas vesículas contendo DPPS. A agregação observada para as vesículas formadas por DPPC puro sugere que possa ter havido associação de moléculas de proteínas adsorvidas em vesículas distintas, o que levaria à fusão dessas vesículas. Além disso, ressalta-se ainda o fato de que a agregação observada em todos os casos (lipossomos e proteolipossomos) corresponde ao estágio inicial do fenômeno, já que um número pequeno de vesículas está, de fato, sofrendo agregação, como observado a partir da distribuição do número de vesículas em função dos diâmetros hidrodinâmicos (não mostrado).

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de AnxA5 foi capaz de estabilizar as vesículas de composição mista, apresentando um retardo expressivo de agregação na faixa de concentração de cálcio utilizada. Essa observação sugere que a proteína de alguma forma é capaz de reduzir a tensão lateral da membrana, responsável pela ruptura e fusão das vesículas. De fato, esse dado está em boa concordância com outras observações realizadas a respeito da implicação da presença da proteína no reparo de defeitos de membrana, sugerindo que o efeito da proteína vai além da estabilização da membrana (LIN; CHIPOT; SCHEURING, 2020; MIYAGI et al., 2016).

Bouter e colaboradores (2011) observaram que a presença de AnxA5 era essencial para o reparo da membrana plasmática de células perivasculares e, além disso, a capacidade de assumir a organização bidimensional característica dessa proteína era requisito para o processo de reparo (BOUTER et al., 2011). Os autores relatam que o arranjo bidimensional da proteína, juntamente com o fluxo de íons Ca^{2+} através das regiões danificadas da membrana plasmática das células, é essencial para promover a redução da tensão na membrana, fazendo com que a ruptura não se torne propague, e permitindo que mecanismos adicionais de reparo sejam executados (BOUTER et al., 2015). Um trabalho recente de Robinson e colaboradores (2020) mostrou que membranas mistas de DOPC (80% mol) e DOPS (20% mol) submetidas à danificação optotermal tiveram seus defeitos reparados por meio da ligação de AnxA5 na presença de íons Ca^{2+} . Além disso, a organização cristalina da proteína foi detectada durante os ensaios realizados, reforçando sua importância na contenção da progressão do defeito.

Os gráficos dispostos na **Figura 26** expressam uma tendência muito semelhante a observada na **Figura 25**, já que a turbidez aumenta (indicando agregação) para o proteolipossomo contendo DPPC, ao passo que tende a diminuir para os proteolipossomos que apresentam DPPS na sua constituição. De fato, o efeito de diminuição da turbidez em suspensões de vesículas contendo PS por AnxA5 é tão

4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

consolidado e característico da interação com essa proteína, que esse tipo de ensaio é inclusive empregado para se avaliar a integridade e identidade da proteína, já que as outras proteínas da família das anexinas exibem comportamentos tipicamente diferentes (BLACKWOOD; ERNST, 1990).

Com base nos resultados apresentados e discutidos para as bicamadas, nota-se que a presença de íons Ca^{2+} realmente promove uma distribuição heterogênea das moléculas de DPPS, com um provável agrupamento dessas moléculas que aumenta a tensão lateral da membrana. A AnxA5, por sua vez, atua de modo a estabilizar essa distribuição, diminuindo a tensão da membrana por meio de um mecanismo de interação que, apesar de ainda carecer de detalhes, depende da organização bidimensional da proteína.

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de interação com monocamadas de Langmuir mostram que a presença de cálcio é capaz de induzir mudanças na organização de monocamadas contendo DPPS, tanto pelo observado a partir dos gráficos π x área molecular e análise de miscibilidade, quanto por meio das imagens de fluorescência, ainda que em menor grau. Além disso, observou-se que a estabilidade desses domínios é maior na presença de íons Ca^{2+} , sugerindo ligação desses íons de modo a minimizar a repulsão de cargas entre moléculas de DPPS.

A presença de AnxA5 nas monocamadas reforça a interação de íons Ca^{2+} com moléculas de DPPS, pelos mesmos parâmetros avaliados, e parece intensificar a heterogeneia de organização lipídica induzida, como observado nas imagens de fluorescência, que pode estar relacionada inclusive com o arranjo bidimensional da proteína, capaz de estabilizar domínios negativamente carregados (BOUTER et al., 2015, 2011).

Em pressões de relevância biológica (30 mN/m), mimetizadas por meio de lipossomos, observou-se que a presença de cálcio de fato induz a formação de domínios lipídicos enriquecidos em DPPS, e que a formação desses domínios desestabiliza as vesículas a ponto de causar a sua agregação ou fusão. A presença da proteína estabiliza esses domínios de modo que uma concentração maior de cálcio é necessária para causar o mesmo efeito fusogênico/de agregação. Assim, de posse de todos os resultados, conclui-se que os íons Ca^{2+} promovem a formação de domínios enriquecidos em DPPS, porém instáveis, enquanto a proteína estabiliza a sua existência na membrana.

Essas observações vão ao encontro do que tem sido relatado acerca do papel da AnxA5 no reparo celular, que admite o recrutamento e organização da proteína

5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

nas redondezas de defeitos de membrana. A presença de PS e íons Ca^{2+} são essenciais para desencadear esse fenômeno, e neste trabalho foi possível observar que as condições experimentais empregadas são suficientes para sustentar um fenômeno semelhante. A presença de cálcio, que induz o agrupamento de DPPS e aumenta a tensão lateral na membrana que é responsável por promover os eventos de agregação, é a mesma que fornece as condições para que a AnxA5 se ligue à membrana nas regiões de instabilidade e reduza a tensão lateral, retardando os mesmos eventos.

Pensando no contexto da biomineralização, esse comportamento desempenhado pela proteína pode ser essencial para a nucleação de mineral no interior das VMs. Já é reconhecida a importância de regiões abundantes em DPPS na membrana de VMs para a mineralização (CRUZ et al., 2020), por serem áreas de acúmulo de íons Ca^{2+} capazes de atuar como centros de nucleação. Dessa forma, em virtude da tendência de membranas ricas em DPPS serem rompidas na presença de concentrações significativas de cálcio, supõe-se que a AnxA5 atue de modo a prevenir este tipo de evento, garantindo o acúmulo suficiente de íons Ca^{2+} e PO_4^{3-} para que as partículas de mineral sejam formadas sem que a vesícula se rompa durante o processo. A abundância de AnxA5 nas vesículas da matriz sugere que o papel da proteína vai além de simplesmente promover um possível transporte de cálcio para o interior das vesículas, e essa consideração já foi feita por Wuthier e Lipscomb (2011), ambos grandes estudiosos dessas vesículas (WUTHIER; LIPSCOMB, 2011).

Assim, o presente trabalho, por meio desta nova abordagem, aponta na direção de estudos focados na formação de mineral em interfaces negativamente carregadas na presença e ausência de AnxA5, a fim de averiguar a consequência da organização lipídica e promoção de domínios lipídicos estáveis no acúmulo de íons Ca^{2+} e posterior estabilização de núcleos minerais em regiões específicas de membrana.

6 | REFERÊNCIAS

ADAMS, Ellen M.; CASPER, Clayton B.; ALLEN, Heather C. Effect of cation enrichment on dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) monolayers at the air-water interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 478, p. 353–364, 2016. DOI: 10.1016/j.jcis.2016.06.016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979716303757>.

AKBARZADEH, Abolfazl; REZAEI-SADABADY, Rogaie; DAVARAN, Soodabeh; JOO, Sang Woo; ZARGHAMI, Nosratollah; HANIFEHPOUR, Younes; SAMIEI, Mohammad; KOUHI, Mohammad; NEJATI-KOSHKI, Kazem. Liposome: classification, preparation, and applications. **Nanoscale Research Letters**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 102, 2013. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3599573/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24359573/).

ALLEN, Matthew R.; BURR, David B. Bone Growth, Modeling, and Remodeling. In: **Basic and Applied Bone Biology**. [s.l.] : Elsevier, 2019. p. 85–100. DOI: 10.1016/B978-0-12-813259-3.00005-1. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128132593000051>.

ANDERSON, H. Clarke. Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 81–101, 1967. DOI: 10.1083/jcb.35.1.81. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6061727/>.

ANDERSON, H. Clarke; GARIMELLA, Rama; TAGUE, Sarah E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, [S. l.], v. 10, n. 1–3, p. 822–37, 2005. DOI: 10.2741/1576. Disponível em: <http://www.bioscience.org/2005/v10/af/1576/list.htm>.

BLACKWOOD, R. A.; ERNST, J. D. Characterization of Ca²⁺-dependent phospholipid binding, vesicle aggregation and membrane fusion by annexins. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 266, n. 1, p. 195–200, 1990. DOI: 10.1042/bj2660195. Disponível em: <https://portlandpress.com/biochemj/article/266/1/195/24898/Characterization-of-Ca2dependent-phospholipid>.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A. M. ..; FAVARIN, B. Z.; MILLÁN, J. L.; CIANCAGLINI, P. The effect of cholesterol on the reconstitution of alkaline phosphatase into liposomes. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 152, n. 1–3, p. 74–79, 2010. DOI: 10.1016/j.bpc.2010.08.002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462210002115>.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A. M. S.; FAVARIN, B. Z.; MILLÁN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 158, n. 2–3, p. 111–118, 2011. DOI: 10.1016/j.bpc.2011.05.019. Disponível em:

6 | REFERÊNCIAS

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462211001876>.

BOLEAN, Maytê; BORIN, Ivana A.; SIMÃO, Ana M. S.; BOTTINI, Massimo; BAGATOLLI, Luis A.; HOYLAERTS, Marc F.; MILLÁN, José L.; CIANCAGLINI, Pietro. Topographic analysis by atomic force microscopy of proteoliposomes matrix vesicle mimetics harboring TNAP and AnxA5. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1859, n. 10, p. 1911–1920, 2017. DOI: 10.1016/j.bbamem.2017.05.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.010>.

BOLEAN, Maytê; IZZI, Benedetta; VAN KERCKHOVEN, Soetkin; BOTTINI, Massimo; RAMOS, Ana Paula; MILLÁN, José Luis; HOYLAERTS, Marc F.; CIANCAGLINI, Pietro. Matrix vesicle biomimetics harboring Annexin A5 and alkaline phosphatase bind to the native collagen matrix produced by mineralizing vascular smooth muscle cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1864, n. 8, p. 129629, 2020. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129629. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416520301410>.

BOLEAN, Maytê; SIMÃO, Ana Maria S.; KIFFER-MOREIRA, Tina; HOYLAERTS, Marc F.; MILLÁN, José Luis; ITRI, Rosangela; CIANCAGLINI, Pietro. Proteoliposomes with the ability to transport Ca²⁺ into the vesicles and hydrolyze phosphosubstrates on their surface. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 584, p. 79–89, 2015. DOI: 10.1016/j.abb.2015.08.018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986115300448>.

BONUCCI, Ermanno. Fine structure of early cartilage calcification. **Journal of Ultrastructure Research**, [S. l.], v. 20, n. 1–2, p. 33–50, 1967. DOI: 10.1016/S0022-5320(67)80034-0. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022532067800340>.

BOTTINI, Massimo et al. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1862, n. 3, p. 532–546, 2018. DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.11.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.11.005>.

BOUTER, A.; CARMEILLE, R.; GOUNOU, C.; BOUVET, F.; DEGRELLE, S. A.; EVAÏN-BRION, D.; BRISSON, A. R. Review: Annexin-A5 and cell membrane repair. **Placenta**, [S. l.], v. 36, n. S1, p. S43–S49, 2015. DOI: 10.1016/j.placenta.2015.01.193. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400415002234>.

BOUTER, Anthony et al. Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. **Nature Communications**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 270, 2011. DOI: 10.1038/ncomms1270. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/ncomms1270>.

BROWNLEE, Colin; WHEELER, Glen L.; TAYLOR, Alison R. Coccolithophore biomineralization: New questions, new answers. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S. l.], v. 46, p. 11–16, 2015. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.10.027. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115002244>.

CHEN, Wen; DUŠA, Filip; WITOS, Joanna; RUOKONEN, Suvi-Katriina;

6 | REFERÊNCIAS

WIEDMER, Susanne K. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 14815, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-33107-5. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-33107-5>.

COMPTON, Jocelyn T.; LEE, Francis Y. A Review of Osteocyte Function and the Emerging Importance of Sclerostin. **Journal of Bone and Joint Surgery**, [S. l.], v. 96, n. 19, p. 1659–1668, 2014. DOI: 10.2106/JBJS.M.01096. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25274791/>.

CREUTZ, C. E.; PAZOLES, C. J.; POLLARD, H. B. Identification and purification of an adrenal medullary protein (synexin) that causes calcium-dependent aggregation of isolated chromaffin granules. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 253, n. 8, p. 2858–2866, 1978. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40901-X. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002192581740901X>.

CREUTZ, C. E.; ZAKS, W. J.; HAMMAN, H. C.; CRANE, S.; MARTIN, W. H.; GOULD, K. L.; ODDIE, K. M.; PARSONS, S. J. Identification of chromaffin granule-binding proteins. Relationship of the chromobindins to calelectrin, synhibin, and the tyrosine kinase substrates p35 and p36. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 262, n. 4, p. 1860–1868, 1987. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)75719-6.

CRUZ, M. A. E.; SOARES, M. P. R.; PAZIN, W.; ITO, A. S.; FUKADA, S. Y.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Interface-driven Sr-morin complexation at Langmuir monolayers for bioactive coating design. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 181, p. 856–863, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.06.039. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777651930445X>.

CRUZ, Marcos A. E. et al. Phosphatidylserine controls calcium phosphate nucleation and growth on lipid monolayers: A physicochemical understanding of matrix vesicle-driven biomineralization. **Journal of structural biology**, [S. l.], v. 212, n. 2, p. 107607, 2020. DOI: 10.1016/j.jsb.2020.107607. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047847720301805>.

DE PAULA RIGOLETTO, Thais; ZANIQUELLI, Maria Elisabete Darbello; SANTANA, Maria Helena Andrade; DE LA TORRE, Lucimara Gaziola. Surface miscibility of EPC/DOTAP/DOPE in binary and ternary mixed monolayers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 83, n. 2, p. 260–269, 2011. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.11.030. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776510006612>.

DERRADI, R.; BOLEAN, M.; SIMÃO, A. M. S.; CASELI, L.; MILLÁN, J. L.; BOTTINI, M.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Cholesterol Regulates the Incorporation and Catalytic Activity of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in DPPC Monolayers. **Langmuir**, [S. l.], v. 35, n. 47, p. 15232–15241, 2019. DOI: 10.1021/acs.langmuir.9b02590. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

EMONS, Joyce; CHAGIN, Andrei S.; SÄVENDAHL, Lars; KARPERIEN, Marcel; WIT, Jan M. Mechanisms of Growth Plate Maturation and Epiphyseal Fusion. **Hormone Research in Paediatrics**, [S. l.], v. 75, n. 6, p. 383–391, 2011. DOI: 10.1159/000327788. Disponível em:

6 | REFERÊNCIAS

<https://www.karger.com/Article/FullText/327788>.

FAVARIN, B. Z.; BOLEAN, M.; RAMOS, A. P.; MAGRINI, A.; ROSATO, N.; MILLÁN, J. L.; BOTTINI, M.; COSTA-FILHO, A. J.; CIANCAGLINI, P. Lipid composition modulates ATP hydrolysis and calcium phosphate mineral propagation by TNAP-harboring proteoliposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 691, p. 108482, 2020. DOI: 10.1016/j.abb.2020.108482. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108482>.

FLOWER, R. J. Background and discovery of lipocortins. **Agents and Actions**, [S. l.], v. 17, n. 3–4, p. 255–262, 1986. DOI: 10.1007/BF01982616. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01982616>.

GAESTEL, Matthias; HERRMANN, Andreas; HEINRICH, Reinhart; PRATSCH, Lothar; LADHOFF, Axel-M.; HILLENBRECHT, Bärbel. Lateral lipid distribution and phase transition in phosphatidylethanolamine/phosphatidylserine vesicles. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 732, n. 2, p. 405–411, 1983. DOI: 10.1016/0005-2736(83)90057-3. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273683900573>.

GEISOW, Michael J.; FRITSCH, Ulrich; HEXHAM, J. Mark; DASH, Bret; JOHNSON, Tolu. A consensus amino-acid sequence repeat in Torpedo and mammalian Ca²⁺-dependent membrane-binding proteins. **Nature**, [S. l.], v. 320, n. 6063, p. 636–638, 1986. DOI: 10.1038/320636a0. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/320636a0>.

GENGE, Brian R.; WU, Licia N. Y.; WUTHIER, Roy E. In Vitro Modeling of Matrix Vesicle Nucleation. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 36, p. 26035–26045, 2007. DOI: 10.1074/jbc.M701057200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820745266>.

GENGE, Brian R.; WU, Licia N. Y.; WUTHIER, Roy E. Mineralization of Annexin-5-containing Lipid-Calcium-Phosphate Complexes. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 15, p. 9737–9748, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M706523200. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M706523200>.

GERKE, Volker; CREUTZ, Carl E.; MOSS, Stephen E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 449–461, 2005. DOI: 10.1038/nrm1661. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrm1661>.

GERKE, Volker; MOSS, Stephen E. **Annexins: From structure to function** *Physiological Reviews* American Physiological Society, , 2002. DOI: 10.1152/physrev.00030.2001.

GIORGI, Carlotta; MARCHI, Saverio; PINTON, Paolo. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 19, n. 11, p. 713–730, 2018. DOI: 10.1038/s41580-018-0052-8. Disponível em: www.nature.com/nrm.

GLENNEY, J. R.; TACK, B.; POWELL, M. A. Calpactins: two distinct Ca⁺⁺-regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. **The Journal of Cell Biology**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 503–511, 1987. DOI:

6 | REFERÊNCIAS

- 10.1083/jcb.104.3.503. Disponível em: /pmc/articles/PMC2114563/?report=abstract.
- GOLUB, Ellis E. Role of matrix vesicles in biomineralization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1790, n. 12, p. 1592–1598, 2009. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.09.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.09.006>.
- GRADELLA VILLALVA, Denise; DIOCIAIUTI, Marco; GIANSANTI, Luisa; PETACCIA, Manuela; BEŠKER, Neva; MANCINI, Giovanna. Molecular Packing in Langmuir Monolayers Composed of a Phosphatidylcholine and a Pyrene Lipid. **The Journal of Physical Chemistry B**, [S. l.], v. 120, n. 6, p. 1126–1133, 2016. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11836. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcc.5b11836>.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90094-2. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4115981>.
- HAS, C.; SUNTHAR, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. **Journal of Liposome Research**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 336–365, 2020. DOI: 10.1080/08982104.2019.1668010. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08982104.2019.1668010>.
- HEIMBURG, Thomas. **Thermal Biophysics of Membranes**. [s.l.] : Wiley, 2007. DOI: 10.1002/9783527611591. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527611591>.
- HUBER, Robert; RÖMISCH, J.; PAQUES, E. P. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. **The EMBO journal**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 3867–74, 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147412>.
- JAVANAINEN, Matti; HUA, Wei; TICHACEK, Ondrej; DELCROIX, Pauline; CWIKLIK, Lukasz; ALLEN, Heather C. Structural Effects of Cation Binding to DPPC Monolayers. **Langmuir**, [S. l.], v. 36, n. 50, p. 15258–15269, 2020. DOI: 10.1021/acs.langmuir.0c02555. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.langmuir.0c02555>.
- JAVANAINEN, Matti; LAMBERG, Antti; CWIKLIK, Lukasz; VATTULAINEN, Ilpo; OLLILA, O. H. Samuli. Atomistic Model for Nearly Quantitative Simulations of Langmuir Monolayers. **Langmuir**, [S. l.], v. 34, n. 7, p. 2565–2572, 2018. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02855. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.langmuir.7b02855>.
- KIM, Hyon Jong; KIRSCH, Thorsten. Collagen/Annexin V Interactions Regulate Chondrocyte Mineralization. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 283, n. 16, p. 10310–10317, 2008. DOI: 10.1074/jbc.M708456200. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820619974>.
- LACRUZ, Rodrigo S.; HABELITZ, Stefan; WRIGHT, J. Timothy; PAINE, Michael L. Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 939–993, 2017. DOI:

6 | REFERÊNCIAS

10.1152/physrev.00030.2016. Disponível em: /pmc/articles/PMC6151498/.

LANGMUIR, Irving. THE CONSTITUTION AND FUNDAMENTAL PROPERTIES OF SOLIDS AND LIQUIDS. II. LIQUIDS. 1. **Journal of the American Chemical Society**, [S. l.], v. 39, n. 9, p. 1848–1906, 1917. DOI: 10.1021/ja02254a006. Disponível em: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.

LIN, Yi-Chih; CHIPOT, Christophe; SCHEURING, Simon. Annexin-V stabilizes membrane defects by inducing lipid phase transition. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 230, 2020. DOI: 10.1038/s41467-019-14045-w. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41467-019-14045-w>.

LIZARBE, María; BARRASA, Juan; OLMO, Nieves; GAVILANES, Francisco; TURNAY, Javier. Annexin-Phospholipid Interactions. Functional Implications. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 2652–2683, 2013. DOI: 10.3390/ijms14022652. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1422-0067/14/2/2652>.

LOGUE, Susan E.; ELGENDY, Mohamed; MARTIN, Seamus J. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 4, n. 9, p. 1383–1395, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.143. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nprot.2009.143>.

LOWENSTAM, Heinz A.; WEINER, Steve. **On Biomineralization**. New York: Oxford University Press, 1989.

LUO, Yunyun; SINKEVICIUTE, Dovile; HE, Yi; KARSDAL, Morten; HENROTIN, Yves; MOBASHERI, Ali; ÖNNERFJORD, Patrik; BAY-JENSEN, Anne. The minor collagens in articular cartilage. **Protein & Cell**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 560–572, 2017. DOI: 10.1007/s13238-017-0377-7. Disponível em: /pmc/articles/PMC5546929/.

MA, Yong-Hao; LI, Bolin; YANG, Jingjing; HAN, Xiaofeng; CHEN, Zhan; LU, Xiaolin. Calcium-dependent and -independent annexin V binding: distinct molecular behaviours at cell membrane interfaces. **Chemical Communications**, [S. l.], v. 56, n. 11, p. 1653–1656, 2020. DOI: 10.1039/C9CC09184J. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/cc/c9cc09184j>.

MACKIE, E. J.; AHMED, Y. A.; TATARCZUCH, L.; CHEN, K. S.; MIRAMS, M. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 46–62, 2008. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.06.009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135727250700204X>.

MARR, James M.; LI, Frank; PETLICK, Alexandra R.; SCHAFER, Robert; HWANG, Ching-Ting; CHABOT, Adrienne; RUGGIERO, Steven T.; TANNER, Carol E.; SCHULTZ, Zachary D. The Role of Lateral Tension in Calcium-Induced DPPS Vesicle Rupture. **Langmuir**, [S. l.], v. 28, n. 32, p. 11874–11880, 2012. DOI: 10.1021/la301976s. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la301976s>.

MARSH, Derek. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, [S. l.], v. 1286, n. 3, p. 183–223, 1996. DOI: 10.1016/S0304-4157(96)00009-3. Disponível em:

6 | REFERÊNCIAS

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304415796000093>.

MCCONLOGUE, Cary W.; MALAMUD, Daniel; VANDERLICK, T. Kyl. Interaction of DPPC monolayers with soluble surfactants: electrostatic effects of membrane perturbants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1372, n. 1, p. 124–134, 1998. DOI: 10.1016/S0005-2736(98)00052-2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273698000522>.

MCCONLOGUE, Cary W.; VANDERLICK, T. Kyle. A Close Look at Domain Formation in DPPC Monolayers. **Langmuir**, [S. l.], v. 13, n. 26, p. 7158–7164, 1997. DOI: 10.1021/la970898e. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la970898e>.

MELCROVÁ, Adéla; POKORNA, Sarka; PULLANCHERY, Saranya; KOHAGEN, Miriam; JURKIEWICZ, Piotr; HOF, Martin; JUNGWIRTH, Pavel; CREMER, Paul S.; CWIKLIK, Lukasz. The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 38035, 2016. DOI: 10.1038/srep38035. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep38035>.

MICHIGAMI, Toshimi; KAWAI, Masanobu; YAMAZAKI, Miwa; OZONO, Keiichi. Phosphate as a Signaling Molecule and Its Sensing Mechanism. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 2317–2348, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00022.2017. Disponível em: www.prv.org.

MIRSAEIDI, Mehdi; GIDFAR, Sanaz; VU, Ann; SCHRAUFNAGEL, Dean. Annexins family: insights into their functions and potential role in pathogenesis of sarcoidosis. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 89, 2016. DOI: 10.1186/s12967-016-0843-7. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4830063/](http://pmc/articles/PMC4830063/).

MIYAGI, Atsushi; CHIPOT, Christophe; RANGL, Martina; SCHEURING, Simon. High-speed atomic force microscopy shows that annexin V stabilizes membranes on the second timescale. **Nature Nanotechnology**, [S. l.], v. 11, n. 9, p. 783–790, 2016. DOI: 10.1038/nnano.2016.89. Disponível em: www.nature.com/naturenanotechnology.

MONTAL, M.; MUELLER, P. Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers and a Study of Their Electrical Properties. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 69, n. 12, p. 3561–3566, 1972. DOI: 10.1073/PNAS.69.12.3561. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/69/12/3561>.

MOORE, P. B.; KRAUS-FRIEDMANN, N.; DEDMAN, J. R. Unique calcium-dependent hydrophobic binding proteins: possible independent mediators of intracellular calcium distinct from calmodulin. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 121–133, 1984. DOI: 10.1242/jcs.72.1.121. Disponível em: <https://journals.biologists.com/jcs/article/72/1/121/59547/Unique-calcium-dependent-hydrophobic-binding>.

MORGAN, Elise F.; UNNIKRISSAN, Ginu U.; HUSSEIN, Amira I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. **Annual Review of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 119–143, 2018. DOI: 10.1146/annurev-bioeng-062117-121139. Disponível em:

6 | REFERÊNCIAS

<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-bioeng-062117-121139>.

MUKHOPADHYAY, Suchetana; CHO, Wonhwa. Interactions of annexin V with phospholipid monolayers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1279, n. 1, p. 58–62, 1996. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00201-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005273695002014>.

MURSHED, Monzur. Mechanism of Bone Mineralization. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. a031229, 2018. DOI: 10.1101/cshperspect.a031229. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29610149/>.

OKONOGI, T. M.; MCCONNELL, H. M. Contrast Inversion in the Epifluorescence of Cholesterol-Phospholipid Monolayers. **Biophysical Journal**, [S. l.], v. 86, n. 2, p. 880–890, 2004. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74163-6. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S0006349504741636/fulltext>.

OLING, Frank; BERGSMA-SCHUTTER, Wilma; BRISSON, Alain. Trimers, Dimers of Trimers, and Trimers of Trimers Are Common Building Blocks of Annexin A5 Two-Dimensional Crystals. **Journal of Structural Biology**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. 55–63, 2001. DOI: 10.1006/jsbi.2000.4337. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11356064/>.

PATIL, Yogita P.; JADHAV, Sameer. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, [S. l.], v. 177, p. 8–18, 2014. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308413001497>.

PERCIVAL, Christopher J.; RICHTSMEIER, Joan T. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. **Developmental Dynamics**, [S. l.], v. 242, n. 8, p. 909–922, 2013. DOI: 10.1002/dvdy.23992. Disponível em: </pmc/articles/PMC3803110/>.

PERKINS, Walter R.; LI, Xingong; SLATER, James L.; HARMON, Paul A.; AHL, Patrick L.; MINCHEY, Sharma R.; GRUNER, Sol M.; JANOFF, Andrew S. Solute-induced shift of phase transition temperature in Di-saturated PC liposomes: adoption of ripple phase creates osmotic stress. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [S. l.], v. 1327, n. 1, p. 41–51, 1997. DOI: 10.1016/S0005-2736(97)00042-4. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273697000424>.

PLAUT, Justin S. et al. Quantitative atomic force microscopy provides new insight into matrix vesicle mineralization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 667, p. 14–21, 2019. DOI: 10.1016/j.abb.2019.04.003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611831049X>.

REHMAN, Jeveria; SOWAH-KUMA, David; STEVENS, Amy L.; BU, Wei; PAIGE, Matthew F. Mixing Behavior in Binary Anionic Gemini Surfactant–Perfluorinated Fatty Acid Langmuir Monolayers. **Langmuir**, [S. l.], v. 33, n. 39, p. 10205–10215, 2017. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b02585. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.langmuir.7b02585>.

REZNIKOV, N.; HOAC, B.; BUSS, D. J.; ADDISON, W. N.; BARROS, N. M.

6 | REFERÊNCIAS

T.; MCKEE, M. D. Biological stenciling of mineralization in the skeleton: Local enzymatic removal of inhibitors in the extracellular matrix. **Bone**, [S. l.], v. 138, p. 115447, 2020. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115447. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115447>.

REZNIKOV, N.; STEELE, J. A. M.; FRATZL, P.; STEVENS, M. M. A materials science vision of extracellular matrix mineralization. **Nature Reviews Materials**, [S. l.], v. 1, n. 8, p. 16041, 2016. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.41. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/natrevmats201641>.

REZNIKOV, Natalie; BILTON, Matthew; LARI, Leonardo; STEVENS, Molly M.; KRÖGER, Roland. Fractal-like hierarchical organization of bone begins at the nanoscale. **Science**, [S. l.], v. 360, n. 6388, 2018. DOI: 10.1126/science.aao2189. Disponível em: <http://science.sciencemag.org/>.

ROSS, Michaela; STEINEM, Claudia; GALLA, Hans-Joachim; JANSHOFF, Andreas. Visualization of Chemical and Physical Properties of Calcium-Induced Domains in DPPC/DPPS Langmuir–Blodgett Layers. **Langmuir**, [S. l.], v. 17, n. 8, p. 2437–2445, 2001. DOI: 10.1021/la001617x. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la001617x>.

SALHOTRA, Ankit; SHAH, Harsh N.; LEVI, Benjamin; LONGAKER, Michael T. Mechanisms of bone development and repair. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 696–711, 2020. DOI: 10.1038/s41580-020-00279-w. Disponível em: www.nature.com/nrm.

SANTANA, Heung Jin Alves; CASELI, Luciano. A bactericide peptide changing the static and dilatational surface elasticity properties of zwitterionic lipids at the air-water interface: Relationship with the thermodynamic, structural and morphological properties. **Biophysical Chemistry**, [S. l.], v. 277, p. 106638, 2021. DOI: 10.1016/j.bpc.2021.106638. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462221001204>.

SETIAWATI, Rosy; RAHARDJO, Paulus. Bone Development and Growth. *In: Osteogenesis and Bone Regeneration*. [s.l.] : IntechOpen, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.82452. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/64747>.

SHIEH, Ian C.; ZASADZINSKI, Joseph A. Visualizing monolayers with a water-soluble fluorophore to quantify adsorption, desorption, and the double layer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 8, p. E826–E835, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1419033112. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/112/8/E826>.

SHIGENOBU, Hayato; MCNAMEE, Cathy E. The interaction of insulin, glucose, and insulin–glucose mixtures with a phospholipid monolayer. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 388, n. 1, p. 274–281, 2012. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.08.015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979712009071>.

SIMÃO, Ana Maria Sper et al. Lipid microenvironment affects the ability of proteoliposomes harboring TNAP to induce mineralization without nucleators. **Journal**

6 | REFERÊNCIAS

of Bone and Mineral Metabolism, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 607–613, 2019. DOI: 10.1007/s00774-018-0962-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00774-018-0962-8>.

SINN, Cornelia G.; ANTONIETTI, Markus; DIMOVA, Rumiana. Binding of calcium to phosphatidylcholine–phosphatidylserine membranes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 282–283, p. 410–419, 2006. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2005.10.014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775705007351>.

SOLTANOFF, Carrie S.; YANG, Shuying; CHEN, Wei; LI, Yi-Ping. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 1–46, 2009. DOI: 10.1615/CritRevEukarGeneExpr.v19.i1.10. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3392028/](https://pmc/articles/PMC3392028/).

STEFANIU, Cristina; BREZESINSKI, Gerald; MÖHWALD, Helmuth. Langmuir monolayers as models to study processes at membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 208, p. 197–213, 2014. DOI: 10.1016/j.cis.2014.02.013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001868614000700>.

SWAIRJO, Manal A.; SEATON, Barbara A. Annexin Structure and Membrane Interactions: A Molecular Perspective. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 193–213, 1994. DOI: 10.1146/annurev.bb.23.060194.001205. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bb.23.060194.001205>.

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 and Cartilage**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 64–72, 2009. DOI: 10.1016/j.joca.2008.05.020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1063458408001805>.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. DOI: 10.1038/nrm.2017.125. Disponível em: www.nature.com/nrm.

VESCHI, Ekeveliny Amabile et al. Localization of Annexin A6 in Matrix Vesicles During Physiological Mineralization. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 1367, 2020. DOI: 10.3390/ijms21041367. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1367>.

VON DER MARK, K.; MOLLENHAUER, J. Annexin V interactions with collagen. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [S. l.], v. 53, n. 6, p. 539–545, 1997. DOI: 10.1007/s000180050069. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s000180050069>.

VON EUW, Stanislas; WANG, Yan; LAURENT, Guillaume; DROUET, Christophe; BABONNEAU, Florence; NASSIF, Nadine; AZAÏS, Thierry. Bone mineral: new insights into its chemical composition. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p.

6 | REFERÊNCIAS

8456, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-44620-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44620-6>.

WAGNER, Darja Obradovic; ASPENBERG, Per. Where did bone come from? **Acta Orthopaedica**, [S. l.], v. 82, n. 4, p. 393–398, 2011. DOI: 10.3109/17453674.2011.588861. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21657973/>.

WANG, Yan et al. The predominant role of collagen in the nucleation, growth, structure and orientation of bone apatite. **Nature Materials**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 724–733, 2012. DOI: 10.1038/nmat3362. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat3362>.

WEINER, S.; WAGNER, H. D. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. **Annual Review of Materials Science**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 271–298, 1998. DOI: 10.1146/annurev.matsci.28.1.271. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.matsci.28.1.271>.

WODLEJ, Christina; RIEDL, Sabrina; RINNER, Beate; LEBER, Regina; DRECHSLER, Carina; VOELKER, Dennis R.; CHOI, Jae-Yeon; LOHNER, Karl; ZWEYTICK, Dagmar. Interaction of two antitumor peptides with membrane lipids – Influence of phosphatidylserine and cholesterol on specificity for melanoma cells. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. e0211187, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0211187. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0211187>.

WU, Licia N. Y.; GENGE, Brian R.; SAUER, Glenn R.; WUTHIER, Roy E. Characterization and Reconstitution of the Nucleational Complex Responsible for Mineral Formation by Growth Plate Cartilage Matrix Vesicles. **Connective Tissue Research**, [S. l.], v. 35, n. 1–4, p. 309–315, 1996. DOI: 10.3109/03008209609029205. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9084669>.

WU, Licia N. Y.; GENGE, Brian R.; DUNKELBERGER, Dana G.; LEGEROS, Racquel Z.; CONCANNON, Breege; WUTHIER, Roy E. Physicochemical Characterization of the Nucleational Core of Matrix Vesicles. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 272, n. 7, p. 4404–4411, 1997. DOI: 10.1074/jbc.272.7.4404. Disponível em: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.272.7.4404>.

WUTHIER, Roy E.; CHIN, Jia E.; HALE, J. E.; REGISTER, Thomas C.; HALE, Laura V; ISHIKAWA, Y. Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. **The Journal of biological chemistry**, [S. l.], v. 260, n. 29, p. 15972–9, 1985. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905800>.

WUTHIER, Roy E.; LIPSCOMB, Guy F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 2812–902, 2011. DOI: 10.2741/3887. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622210>.