

Estudo da interação da fosfatase alcalina com a membrana plasmática obtida de tecido ósseo de frangos de corte

Luiz Flávio José dos Santos

<http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Joao Martins Pizauro Junior

<http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um nutriente essencial para os seres vivos, desempenhando papéis fundamentais em diversos processos biológicos, como a composição dos ácidos nucleicos, do ATP, de fosfolipídios de membranas celulares, na regulação da atividade enzimática e em proteínas transportadoras. É considerado o segundo mineral mais abundante no organismo animal, com especial relevância na calcificação biológica e na fisiologia do tecido ósseo (GONÇALVES et al., 2015; PIZAURO et al., 1998). Os mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas são cruciais para a regulação de eventos celulares, incluindo divisão, diferenciação, desenvolvimento, morte celular, expressão gênica e transporte celular (AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases, enzimas classificadas como fosfomono-hidrolases, atuam hidrolisando fosfomonoésteres e estão amplamente distribuídas em animais, vegetais e microrganismos. Podem ser divididas em três grupos principais: fosfatases alcalinas, ácidas e proteínas fosfatases (AOYAMA et al., 2003). As proteínas fosfatases, por sua vez, subdividem-se em serina/treonina fosfatases e tirosina fosfatases, de acordo com o resíduo aminoacídico específico que hidrolisam (AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases ácidas atuam em pH em torno de 5,0 e hidrolisam compostos de baixa massa molecular. No tecido ósseo de mamíferos, destacam-se as formas tartarato-sensível (associada a lisossomos) e tartarato-resistente (presente em osteoclastos, ligada ou não à membrana) (MINKIN, 1982). A fosfatase ácida tartarato-resistente,

também conhecida como fosfatase ácida púrpura, possui coloração característica devido à presença de íons ferro em seu sítio ativo (GUDDAT et al., 1999; SCHENK et al., 2013).

Já as fosfatases alcalinas atuam em pH básico e estão frequentemente associadas à membrana plasmática por meio de uma âncora de fosfatidilinositol, embora também existam isoformas solúveis (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995; SHARMA; PAL; PRASAD, 2014). Em humanos, são classificadas de acordo com o tecido de expressão em: células germinativas, placentária, intestinal e tecido não-específico (fígado, osso e rim) (SHARMA; PAL; PRASAD, 2014). Essas enzimas são metaloenzimas homodiméricas, dependentes de íons Zn^{2+} e Mg^{2+} para atividade catalítica e manutenção da conformação estrutural (LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; MILLÁN, 2006).

Além da classificação pelo pH ótimo, as fosfatases podem ser constitutivas ou induzidas por fosfato, sendo estas últimas sintetizadas apenas em condições de limitação desse nutriente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004). A atividade enzimática é influenciada por fatores como concentração de substrato e enzima, pH, temperatura, presença de íons e inibidores (NELSON; COX, 2014). O estudo de inibidores é fundamental para elucidar mecanismos de regulação enzimática e o papel de metais na estabilidade e atividade da enzima. A fosfatase alcalina, por exemplo, é inibida competitivamente pelo fosfato inorgânico (produto da reação) e regulada alostericamente por ATP (PIZAURO et al., 1987, 1988).

Ressalta-se a capacidade da fosfatase alcalina de hidrolisar ATP, liberando fosfato inorgânico, e sua regulação pelos níveis de pirofosfato (PPi) e fosfato inorgânico (Pi) no fluido extracelular, os quais influenciam processos de calcificação biológica (ZAKA et al., 2006; FOSTER et al., 2012).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a interação da fosfatase alcalina com a membrana plasmática obtida de tecido ósseo de frangos de corte, com ênfase nos aspectos estruturais, funcionais e regulatórios dessa associação.

2 METODOLOGIA

Obtenção dos animais e critérios éticos: Frangos de corte machos da linhagem Cobb-500, com 21 dias de idade, foram obtidos de incubatório comercial. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV (Protocolo nº 021238/13), em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal. As aves foram mantidas em condições termoneutras, com luz contínua de 24 horas, em boxes com cama de maravalha. Receberam ração formulada conforme Rostagno et al. (2011) e água ad libitum. Para garantir a homogeneidade dos grupos, realizou-se diagnóstico de discondroplasia tibial (DT) utilizando aparelho de raio-X portátil (Lixiscope), classificando as lesões em escores de 1 (sem lesão) a 4 (lesão severa). Foram selecionados sete frangos normais (score 1) e sete com DT score 4.

Coleta e preparação de amostras: As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical. As tíbias foram coletadas, limpas de tecidos moles, envoltas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C para processamento posterior.

Preparação do extrato enzimático: As epífises tibiais foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,5) contendo MgCl_2 2 mM e NaCl 150 mM, na proporção de 1 g de tecido para 5 mL de tampão, utilizando homogeneizador Turrax. O homogeneizado foi centrifugado a $15.000 \times g$ por 10 min a 4°C . O sobrenadante (Extrato Bruto, EB) foi submetido à ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 2 h a 4°C . O sobrenadante (S1) foi reservado, e o precipitado (P1), contendo a fração membranaar, foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 5 mM (pH 7,25) com ZnCl_2 1 μM e MgCl_2 2 mM, utilizando homogeneizador Potter (Figura 1).

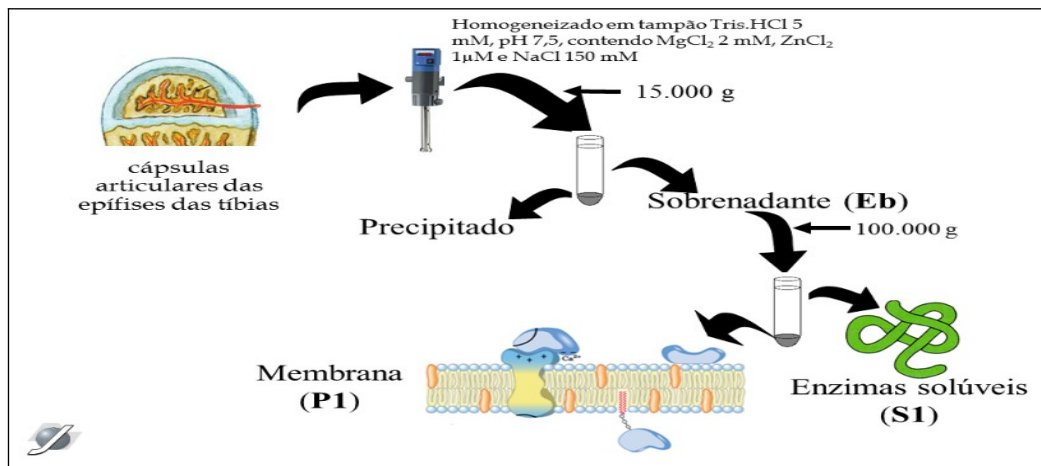
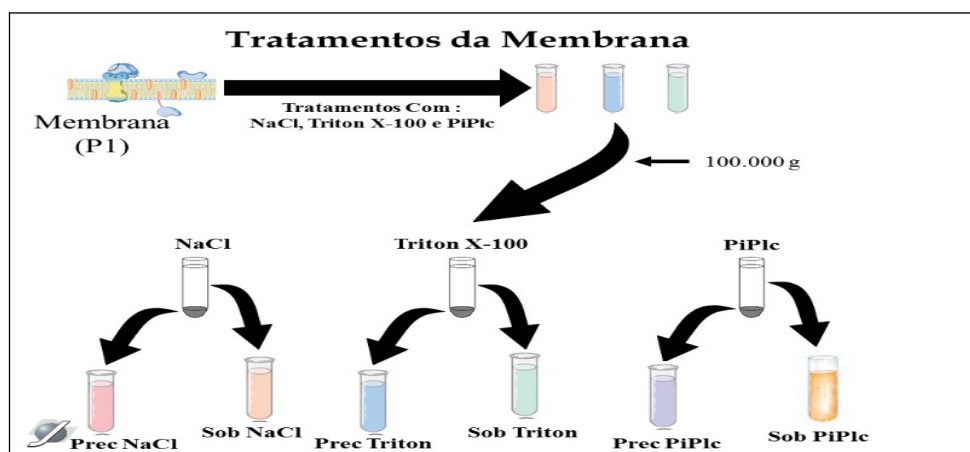


Figura 1: Protocolo de extração e separação de frações da enzima.

Fonte: Próprio autor

Tratamentos da membrana: Para investigar o modo de interação da fosfatase alcalina à membrana, três tratamentos foram realizados:

- Tratamento com PiPlc (fosfolipase C de *B. thuringiensis*): Incubação a 37°C por 1 h, seguida de ultracentrifugação (100.000 $\times$ g, 2 h, 4°C). O sobrenadante (Sob PiPlc) e o precipitado (Prec PiPlc) foram coletados.
- Tratamento com Triton X-100: Adição de 100 μ L de Triton X-30% por mL de amostra, incubação em banho de gelo ($\approx$ 7°C) por 1 h, seguida de ultracentrifugação. Sobrenadante (Sob Triton) e precipitado (Prec Triton) foram obtidos.
- Tratamento com NaCl 2 M: Incubação com volume igual de NaCl 2 M em tampão Tris-HCl (pH 7,25) com $MgCl_2$ e $ZnCl_2$, por 1 h à temperatura ambiente, seguida de ultracentrifugação. Sobrenadante (Sob NaCl) e precipitado (Prec NaCl) foram coletados (Figura 2).



P1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob NaCl - Sobrenadante do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Prec NaCl - Precipitado do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Sob Triton - Sobrenadante do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Prec Triton - Precipitado do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Sob PiPlc - Sobrenadante do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação, Prec PiPlc - Precipitado do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação.

Figura 2: Tratamentos da membrana biológica.

Fonte: Próprio autor

Ensaio enzimático: A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (*p*-NFFásica) da fosfatase alcalina foi determinada a 37°C, quantificando a liberação de *p*-nitrofenolato a 410 nm ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, pH 13). O meio de reação continha AMPOL 100 mM (pH 9,4), MgCl_2 2 mM, ZnCl_2 1 μM e PNFF 1 mM. A reação foi iniciada pela adição da enzima e interrompida com NaOH 1 M. Uma unidade de atividade (U.mg^{-1}) foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 nmol de *p*-nitrofenolato por minuto por mg de proteína.

Dosagem de proteína e eletroforese: A concentração proteica foi determinada pelo método de Hartree (1972), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Eletroforese em gel de poliacrilamida: A separação de proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), conforme Laemmli (1970), utilizando 30 μg de proteína por amostra e padrões de massa molecular da Bio-Rad. Os géis de separação (9%) e empilhamento (5%) foram preparados com soluções apropriadas de acrilamida, Tris-SDS e catalisadores (APS/TEMED). A eletroforese foi conduzida a 200 V por aproximadamente 40 min.

Análise estatística: Os dados foram analisados no programa SAS 9.0. Após testes de normalidade e homocedasticidade, aplicou-se ANOVA e teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, com três repetições por tratamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados demonstraram a eficiência do protocolo de purificação e dos tratamentos aplicados para estudar a interação da fosfatase alcalina com a membrana plasmática de tecido ósseo de frangos (Tabela 1). A ultracentrifugação e

os tratamentos subsequentes permitiram a separação das frações enzimáticas com diferentes graus de purificação. A concentração proteica no sobrenadante do tratamento com fosfolipase C (PiPlc) foi aproximadamente sete vezes menor que a do extrato bruto (0,27 mg/mL vs. 1,89 mg/mL), indicando uma significativa purificação. O maior fator de purificação foi observado para a fosfatase alcalina no sobrenadante do tratamento com PiPlc (7,54).

Tabela 2: Atividades da enzima Fosfatase Alcalina presente no disco de crescimento de frangos de corte, após diferentes tratamentos.

Fração	Concentração de Proteínas	Fosfatase Alcalina	Fator de Purificação
EB	1,89	81,07	1,00
Sob 1	2,36	45,59	0,56
Prec 1	1,41	130,71	1,61
Sob NaCl	0,32	8,74	0,11
Prec NaCl	0,50	98,12	1,21
Sob Triton	0,59	320,32	3,95
Prec Triton	0,66	10,92	0,13
Sob PiPlc	0,27	610,92	7,54
Prec PiPlc	1,23	28,55	0,35

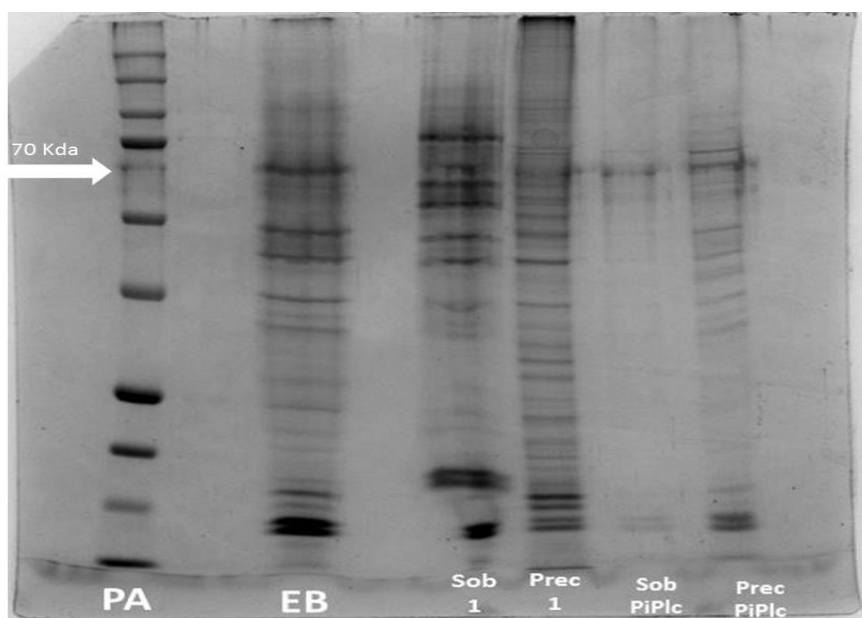
EB – Extrato Bruto, Sob 1 – Sobrenadante da primeira ultracentrifugação, Prec 1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob NaCl - Sobrenadante do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Prec NaCl - Precipitado do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Sob Triton - Sobrenadante do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Prec Triton - Precipitado do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Sob PiPlc - Sobrenadante do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação, Prec PiPlc - Precipitado do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação.

A liberação eficiente da fosfatase alcalina pela ação da PiPlc sugere que a enzima está ancorada à membrana via glicosilfosfatidilinositol (GPI), consistente com relatos anteriores para enzimas de tecidos mineralizados (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995). A não liberação por soluções salinas ou agentes caotrópicos (CYBORON; WUTHIER, 1981; CURTI et al., 1986) e a solubilização eficaz por detergentes suportam a natureza integral dessa associação membrana. A fosfatase alcalina solubilizada exibiu atividade multifuncional, hidrolisando não apenas *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF), mas também pirofosfato (PPi; 12,52 U/mg) e ATP (29,78 U/mg), reforçando seu papel no metabolismo de fosfatos no tecido ósseo.

Entretanto, atividades ATPásica (8,51 U/mg) e pirofosfatásica (1,59 U/mg) residuais permaneceram associadas à fração membrana após o tratamento com PiPlc. Como praticamente toda a atividade *p*-NFFásica foi liberada, tais atividades provavelmente são atribuíveis a outra enzima, possivelmente a PC-1, que também

pode atuar como ATPase e pirofosfatase em vesículas da matriz extracelular, conforme proposto por Millan (2012) e Anderson (1995).

A análise por SDS-PAGE (Figura 3) revelou diferenças no perfil proteico entre as frações, com destaque para uma banda de ≈ 73 kDa no sobrenadante do tratamento com PiPlc, correspondente à massa molecular da fosfatase alcalina monomérica. Essa estimativa está de acordo com valores reportados para enzimas de outros tecidos e de mamíferos (FOSSET; CHAPPELET-TORDO; LAZDUNSKI, 1974; PIZAURO et al., 1987). Discrepâncias quanto à massa molecular (variando de 18 a 360 kDa) podem ser atribuídas a diferenças entre espécies, tecidos, métodos de extração ou presença de isoenzimas e proteases (HIWADA; WACHSMUTH, 1974; CYBORON; WUTHIER, 1981).



PA – Padrão de peso molecular, EB – Extrato Bruto, Sob 1 – Sobrenadante da primeira ultracentrifugação, Prec 1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob PiPlc - Sobrenadante do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação, Prec PiPlc - Precipitado do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação.

Figura 3. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (p/v) das frações do extrato de tíbia de frangos.

Fonte: Próprio autor

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados confirmam que a fosfatase alcalina óssea de frangos está firmemente ancorada à membrana via glicosilfosfatidilinositol e possui caráter multifuncional, participando ativamente no metabolismo local de fosfato e possivelmente na regulação da mineralização.

REFERÊNCIAS

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900. 2003.

CYBORON, G. W.; WUTHIER, R. E. Purification and initial characterization of intrinsic membrane bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 7262-7268, 1981.

CYBORON, G. W.; VEJINS, M. S.; WUTHIER, R. E. Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effects of its inhibitors at physiological pH. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 4141-4146, 1982.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUCS, 2004.

FOSSET, M.; CHAPPELET-TORDO, D.; LAZDUNSKI, M. Intestinal alkaline phosphatase: physical properties and quaternary structure. **Biochemistry**, v. 13, p. 1783-1787, 1974.

FOSTER, B. L.; NAGATOMO, K. J.; NOCITI, F. H. Jr.; FONG, H.; DUNN, D.; TRAN, A. B.; WANG, W.; NARISAWA, S.; MILLAN, J. L.; SOMERMAN, M. J. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038393.g013

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HEINONEN, J. K.; LAHTI, R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal. Biochem.**, v. 113, n. 2, p. 313-317, 1981.

HIWADA, K.; WACHSMUTH, E. D. Catalytic properties of alkaline phosphatase from pig kidney. **Biochem. J.**, v. 141, n. 1, p. 283-291, 1974.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 127, p. 680-685, 1970.

LEONE, F. A.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Effect of pH on the modulation of rat osseous plate alkaline phosphatase by metal ions. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 923-928, 1992.

LEONE, F. A.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. **Trends Comp. Biochem. Physiol.**, v. 3, p. 57-73, 1997.

MILLAN, J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcif. Tissue Int.**, v. 93, p. 299-306, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011. 1304 p.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismo de lesão e controle. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 3, n. 5, p. 169-185, 2002.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87, p. 921-926, 1987.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic properties of Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n. 5, p. 553-562, 1988.

PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1368, p. 108-114, 1998.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 252 p.

SAY, J. C.; FURRIEL, R. P. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1074, p. 256-262, 1991.

ZAKA, R.; STOKES, D.; DION, A. S.; KUSNIER, A.; HAN, F.; WILLIAMS, C. P5L mutation in ank results in an increase in extracellular inorganic pyrophosphate during proliferation and non mineralizing hypertrophy in stably transduced ATDC5 cells. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, p. 164-176, 2006.