

UNICAMP

Uso de um modulador da atividade de PTKs como estratégia de diferenciação de osteoblastos: uma possível aplicação na osteoporose



Juliana Yumi Miyabara, Willian Fernando Zambuzzi

Departamento de Bioquímica, Laboratório de Enzimologia, Instituto de Biologia/UNICAMP

Agência Financiadora: SAE/UNICAMP

Palavras-chave: Osteoblastos, Diferenciação, PP1, Gleevec, Src, ALP

RESUMO

Recentemente, mostramos o envolvimento da LMW-PTP durante a diferenciação de osteoblastos, a qual está relacionada com o controle da atividade de Src durante este processo. Baseado nestes resultados, nosso objetivo agora foi avaliar o efeito de inibidores específicos ou não de Src, como o PP1 e Gleevec, respectivamente no processo de diferenciação de osteoblastos. Como modelo biológico, nós utilizamos a linhagem MC3T3-E1, cultivadas em meio α -MEM. Previamente, foram realizados ensaios de citotoxicidade através da redução de MTT e observou-se que ambos os compostos interferiram na atividade dos osteoblastos, atingindo um IC_{50} aproximado de 2,5 μ M para o Gleevec e 20 μ M para o PP1. A partir deste ensaio, nós tratamos as células com diferentes concentrações sub-tóxicas das drogas e avaliamos seu potencial em promover a diferenciação de osteoblastos, através da monitoração da atividade de ALP. Interessantemente, nossos dados suportam que os inibidores de Src utilizados são capazes de diferenciação osteoblastos *in vitro*. Além disso, mostramos que gleevec é capaz de modular positivamente a atividade de rhLMW-PTP. Concluimos que o tratamento com inibidores de Src são capazes de promover a diferenciação de osteoblastos.

METODOLOGIA

- **Cultura de células:** as células foram cultivadas em α MEM, contendo 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino.
- **Viabilidade Celular:** As células foram devidamente tratadas e pós incubadas com 1 mL de MTT (1mg/mL) por poço a 37°C por um período de 3 horas. Após esse período o corante foi ressuspensionado em 100 μ l de DMSO e a leitura feita em espectrofotômetro (570 nm).
- **Atividade de ALP:** Todos os procedimentos foram realizados como descritos previamente (Zambuzzi et al., 2009).
- **Quantificação da atividade de LMWPTP:** A atividade enzimática foi avaliada na presença (ou não) de PP1 e gleevec em meio de reação (volume final de 1 mL) contendo 100 mM de tampão acetato (pH 5.5), 5.0 mM de *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) e extrato celular. Após 30 minutos de incubação a 37°C a reação será paralisada com a adição de 1 mL de NaOH (1M). A quantidade de *p*NPP liberada será medida em 405 nm.
- **Imunoblotting:** Todos os procedimentos foram realizados como descritos previamente (Zambuzzi et al., 2009).

CONCLUSÃO

Baseado em nossos resultados podemos concluir que:

- Gleevec e PP1 interferem no metabolismo de osteoblastos;
- Gleevec e PP1 modulam negativamente a fosforilação de Src;
- Gleevec e PP1 promovem uma maior atividade de ALP;
- Gleevec modula positivamente a atividade de LMWPTP;

Suporte financeiro:



RESULTADOS

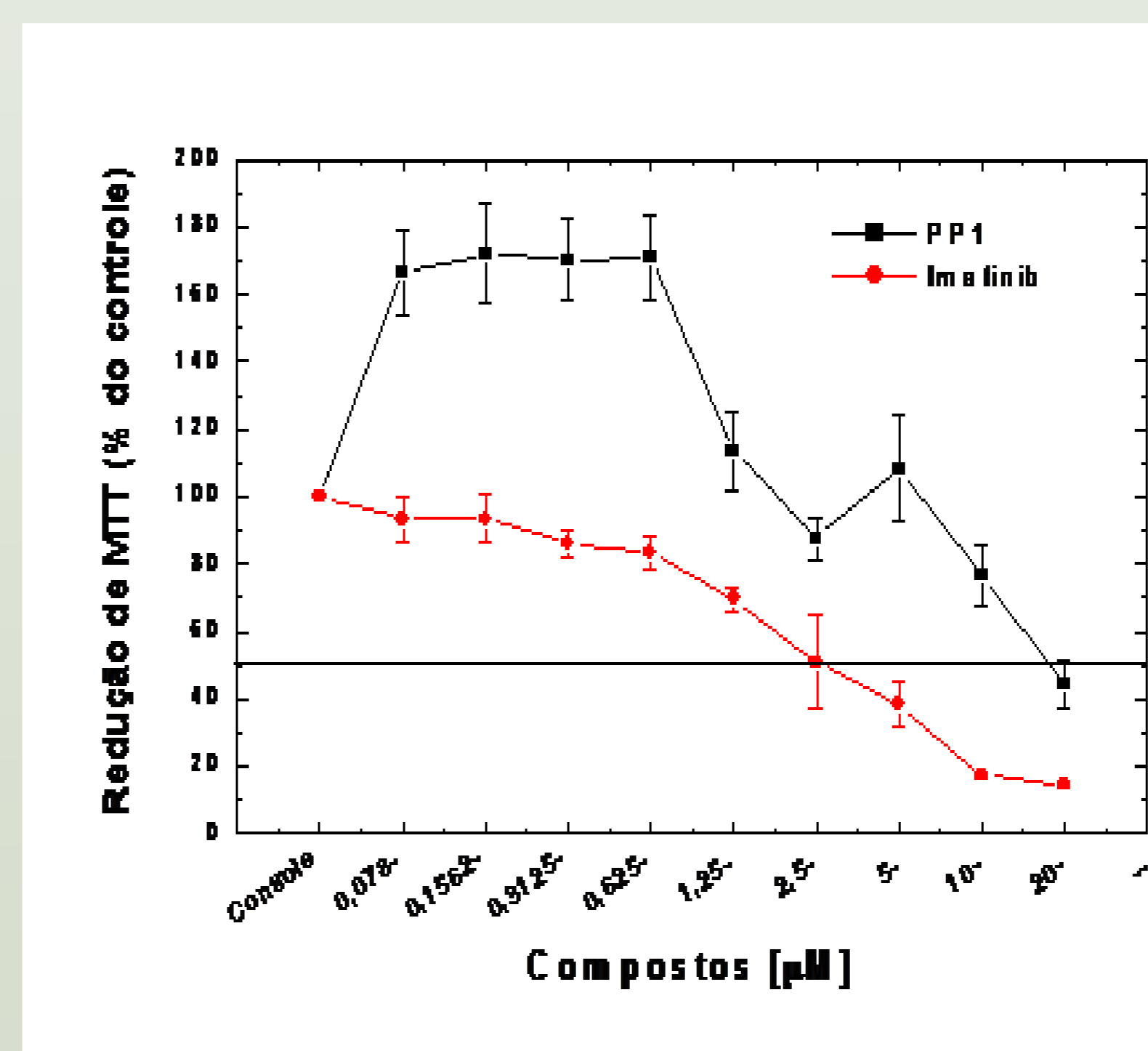


Figura 1: Efeito da concentração dos inibidores de PTKs na viabilidade de MC3T3-E1.

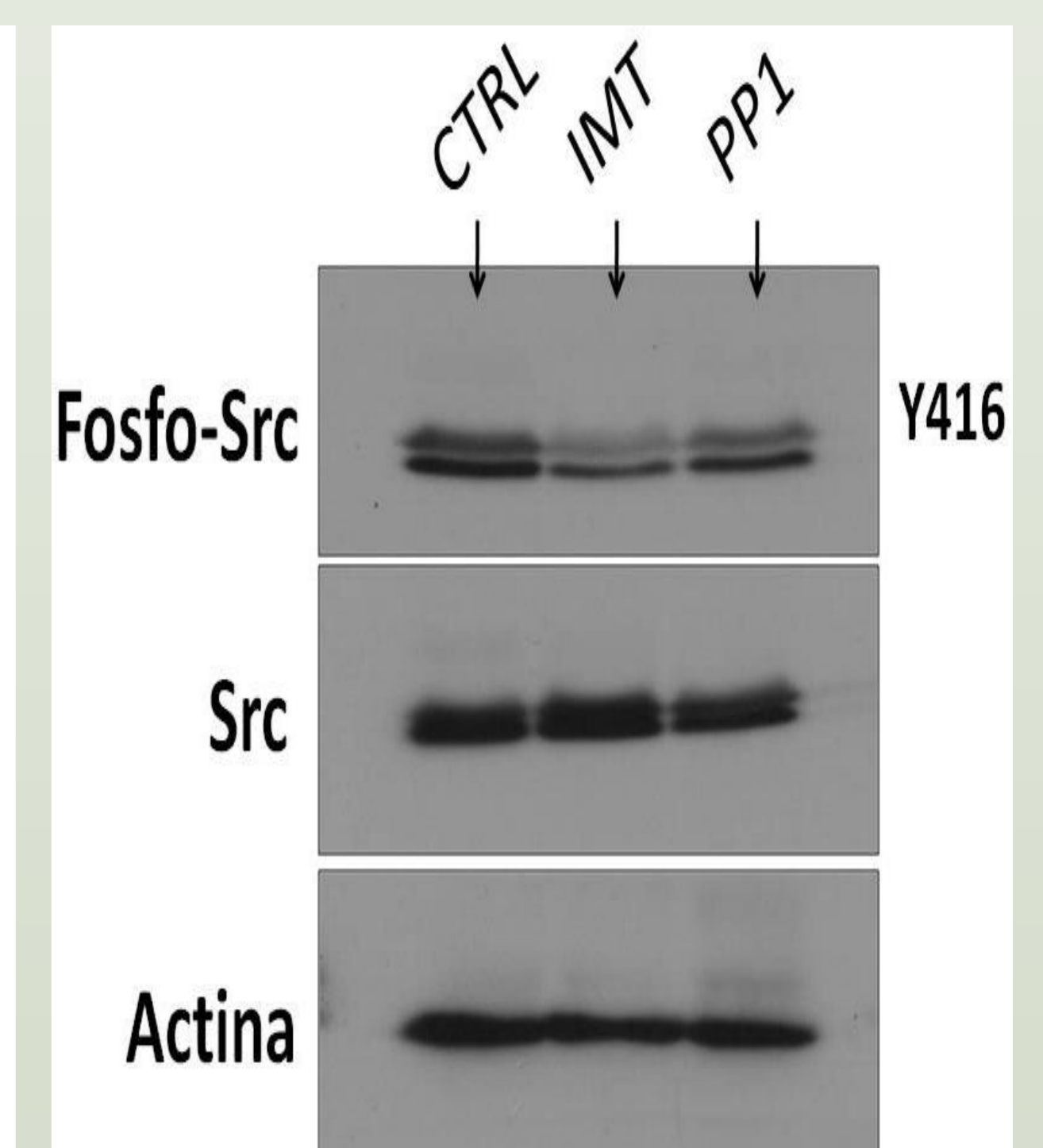


Figura 3: Efeito dos inibidores de PTKs sobre a fosforilação de Src – Y416.

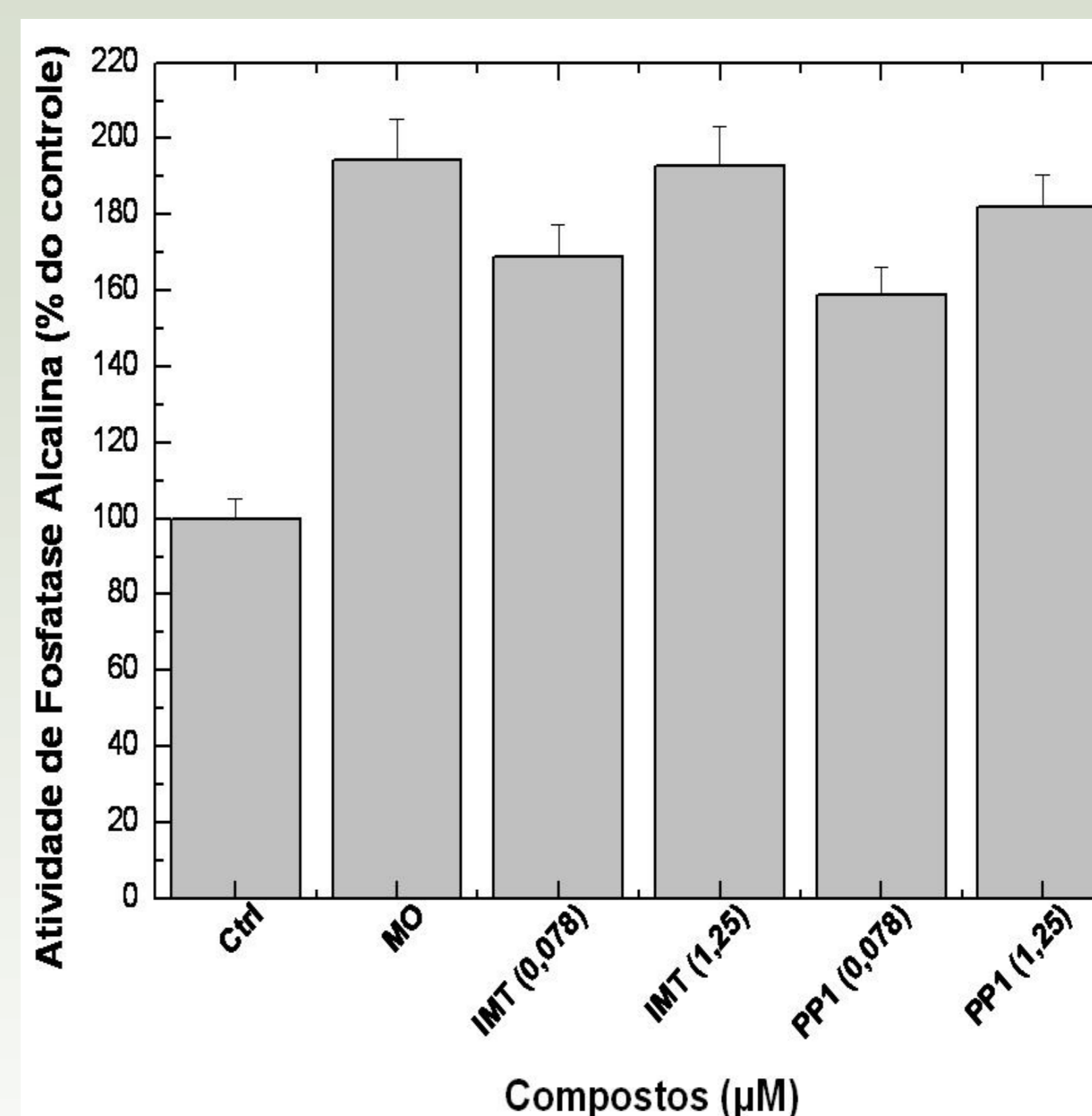


Figura 2: Efeito dos inibidores de PTKs sobre a atividade de ALP.

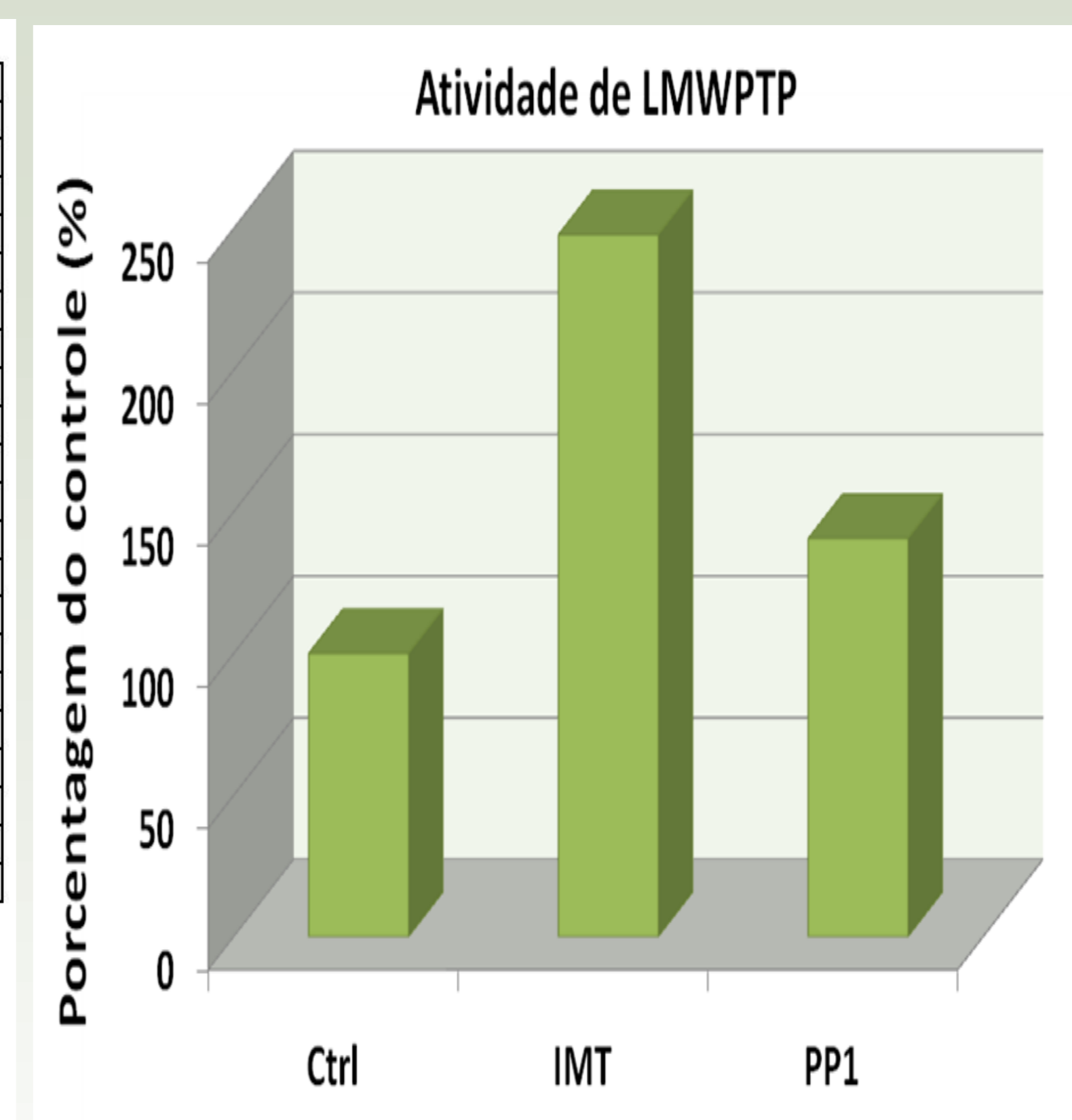


Figura 4: Efeito dos inibidores sobre a atividade de LMWPTP.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marzia M, Sims SA, Migliaccio S, Taranta A, Bernadini S, Faraggiana T, Yoneda T, Mundy GR, Boyce BF, Baron R, Teti A. (2000). Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Cell Biol.* 151(2):311-20.
2. de Souza Malaspina TS, Zambuzzi WF, dos Santos CX, Campanelli AP, Laurindo FR, Sogayar MC, Granjeiro JM. (2009). A possible mechanism of low molecular weight protein tyrosine phosphatase (LMW-PTP) activity modulation by glutathione action during human osteoblast differentiation. *Arch Oral Biol.* 54(7):642:50.