

Avaliação bioquímica de xenoinplantes em subcutâneo de rato *Biochemical analysis of xenografts implants in rat subcutaneous*

Willian Fernando ZAMBUZZI

Thelma Lopes da SILVA

Doutorando – Programa de Pós-Graduação – Biologia Funcional e Molecular do Instituto de Biologia da UNICAMP – Campinas – SP

Rodrigo Cardoso de OLIVEIRA

Professor Assistente – Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP – Bauru – SP – Brasil

José Mauro GRANJEIRO

Professor Adjunto – Departamento de Biologia Celular e Molecular – Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense – UFF – RJ

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das fosfatases ácidas como biomarcadores da resposta tecidual ao implante de osso medular inorgânico bovino. Cápsulas de colágeno foram utilizadas como carreadores de partículas macro (1000 a 2000 μm) e microgranulares (200 a 600 μm) e implantados em subcutâneo de 60 ratos Wistar, divididos aleatoriamente em 3 grupos: Grupo I (cápsula de colágeno vazia), Grupo II (macrogranular) e Grupo III (microgranular). Decorridos 10, 20, 30 e 60 dias pós-cirúrgico, os animais foram mortos para a remoção do tecido reacional de onde se obteve o extrato. As atividades específicas (AE) das fosfatases ácidas total (FAT), lisossomal (FAL) e a de baixo peso (FABMr) foram realizadas no pH 5,0 utilizando o p-nitrofenilfosfato como substrato, na presença de inibidores específicos para cada enzima; a atividade tirosina (Tyr-P) fosfatase foi obtida nas mesmas condições utilizando a tirosina fosfato como substrato. No Grupo I observou-se que a atividade da FAT e FAL não variaram significativamente ao longo dos períodos experimentais, entretanto ambas as enzimas apresentaram atividades significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo II que no grupo III na maioria dos períodos avaliados. A FABMr no grupo I foi menor ($p < 0,001$) que nos grupos II (aos 10 e 30 dias) e III (aos 10 dias), mas nos períodos de 20 e 60 dias a FABMr foi maior ($p < 0,001$). A Tyr-P detectada nos períodos de 20 e 60 dias era cerca de 18 vezes maior que aos 10 e 30 dias. Concluiu-se que a atividade da fosfatase ácida total, e suas isoformas FAL, FABMr e Tyr-P é significativamente modulada durante a resposta tecidual ao implante de osso medular inorgânico bovino, tanto em função do período como do tamanho da partícula.

UNITERMOS

Marcadores biológicos; medula óssea; bovino; fosfatase ácida; fosfotirosina proteína fosfatase

INTRODUÇÃO

Diversos processos fisiológicos e patológicos podem ser monitorados através de marcadores biológicos ou, em outras palavras, biomarcadores². Processos envolvendo a degradação ou remodelação tecidual frequentemente estão associados à atividade de lisossomos, os quais contêm 40 ou mais enzimas como fosfatase ácida, arilsulfatase, β -hexosaminidase e proteases. Fosfatases são enzimas que estão largamente

distribuídas na natureza e podem ser encontradas em muitas espécies animais e vegetais^{1,3}.

As fosfatases e enzimas lisossomais têm sido avaliadas como marcadores biológicos em diversas doenças^{2,3} como alteração dos níveis de reabsorção óssea⁵, artrite reumatóide¹¹, câncer cervical¹², entre outras, e também como ferramenta para se conhecer melhor os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na resposta à implantação de biomateriais seja através de métodos de imunohistoquímicos¹³ ou de

dosagem da atividade fosfatase nos tecidos reacionais adjacentes ao material implantado em complemento à análise histomorfométrica^{14,17,19}.

Com o intuito de compreender melhor as alterações moleculares envolvidas na resposta tecidual a xenoinxertos determinou-se o perfil da fosfatase ácida total e de duas isoformas, bem como da tirosina fosfatase, avaliando seu potencial uso como biomarcadores teciduais. A hipótese positiva deste estudo é que o perfil das fosfatases seja distinto em função dos materiais testados.

MATERIAL E MÉTODO

Material

O osso medular bovino inorgânico (0,1g), macro (1000 a 2000 µm) e microgranular (200 a 600 µm), desproteinizado a 100 °C (Gen-Ox®, Baumer S. A., Mogi Mirim, São Paulo, Brasil; MS n° 103.455.00001) foi acondicionado em cápsula de colágeno no 3 transparente (Farmacápsula S. A., Manizales, Colômbia). O osso bovino é submetido a tratamentos mecânicos e químicos para a remoção de tecidos moles, gorduras e células e, em seguida, submetido à sinterização para remoção da porção protéica.

Preparo dos animais e procedimentos cirúrgicos

A pesquisa foi realizada segundo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo que o trabalho foi aprovado pelo Conselho Comitê de Ética em pesquisa animal da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo.

Um total de 60 ratos com aproximadamente 200g de peso, albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos machos, foram divididos em 3 grupos: **Grupo I** – Controle (cápsula de colágeno vazia), **Grupo II** – osso medular bovino inorgânico macrogranular (cápsula de colágeno contendo 0,1g do material) e **Grupo III** - osso medular bovino inorgânico microgranular (cápsula de colágeno contendo 0,1g do material). Na região dorsal dos animais, seguindo a linha sagital, foram realizadas a tricotomia e anti-sepsia com gaze embebida em álcool iodado. Após anestesia em ambiente saturado com éter etílico foi realizada uma incisão reta e divulsão do tecido subcutâneo para estabelecimento de uma loja cirúrgica onde a cápsula contendo o material (cápsula vazia no grupo controle) foi implantada. Logo após a implantação procedeu-se

a sutura descontínua seguida pela anti-sepsia com gaze embebida em solução de álcool iodado. Durante todo o período experimental os animais receberam dieta normal *ad libitum* composta de ração e água.

Decorridos os períodos experimentais de 10, 20, 30 e 60 dias, os animais foram anestesiados com éter etílico (como descrito anteriormente) e em seguida mortos por deslocamento cervical. Por palpitação, uma pequena peça na região dorsal, contendo os materiais e os tecidos circunjacentes, foi localizada, removida e imediatamente congelada a -20°C até a realização das dosagens enzimáticas.

Determinação da Atividade Enzimática

A peça depois foi descongelada, homogeneizada em tampão acetato 0,1 M, pH 5, contendo ácido etilendiaminotetracético (EDTA) e β-mercaptoetanol 1 mM e centrifugada a 20.000 rpm durante 30 minutos. O sobrenadante constituiu o extrato que foi utilizado para a quantificação de proteína segundo Hartree⁹ (1972). Resumidamente, a reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da amostra. Após 10 min, adicionamos 0,2 mL do Reagente de Folin (1:1). A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm após 30 min de espera a temperatura ambiente (espectrofotômetro Ultrospec II, Pharmacia). A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

As atividades da fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida lisossomal (FAL), fosfatase de baixa massa molecular relativa (FABMr) e fosfotirosina proteína fosfatase (Tyr-P) foram determinadas através da inibição diferencial por tartarato, fluoreto, e p-hidroximercuribenzoato (pHMB), como descrito anteriormente^{4,7,8}. As atividades de todas as enzimas descritas acima foram feitas em triplicata.

A atividade da fosfatase ácida total (FAT) foi determinada em um volume final de 1,0 mL. A reação foi iniciada pela adição de 0,05 mL do extrato a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5 mM do substrato pNPP (p-nitrofenil fosfato). A paralisação ocorreu pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 M, após incubação por 10 minutos a 37°C. Nos controles a enzima foi adicionada após o NaOH. A medida da absorção foi feita a 405nm, $\epsilon = 18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da fosfatase ácida lisossomal (FAL) foi determinada como descrito acima, exceto pela adição de p-hidroximercuribenzoato (pHMB) 1 mM, um potente inibidor da fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa (FABMr). A fração da atividade fosfatase inibida pelo pHMB corresponde à atividade da FABMr.

A atividade tirosina fosfatase (Tyr-P) foi determinada nas mesmas condições descritas acima, pelo método direto, exceto pela utilização da tirosina fosfato (5 mM) como substrato e pela presença de 10 mM de NaF e tartarato (inibidores da fosfatase ácida lisossomal). O produto formado (tirosina) foi quantificado através da leitura da absorbância em 293 nm ($\epsilon=2.411 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)⁷.

Uma unidade de atividade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de produto por minuto, sendo expressa como unidade de atividade enzimática por miligrama de proteína (AE=UE/mg).

A partir do extrato dos tecidos de cinco animais foram realizadas as dosagens enzimáticas em triplicata. A média e desvios padrão obtidos a partir das dosagens foram submetidas à Análise de Variância a um critério e Teste de Múltiplas Comparações de Bonferroni (Instat, GraphPad Inc.), considerando significativas as diferenças se $p<0,05$.

RESULTADO

A atividade específica (AE) da FAT, FAL, FABMr e Tyr-P foi determinada no extrato do tecido reacional obtido dos animais que receberam implantes de cápsula de colágeno vazia (grupo I, controle), osso bovino medular inorgânico macro (grupo II) e microgranular (grupo III), resumidas na Figura 1. As médias e desvios padrão obtidos foram submetidos à análise de variância visando identificar diferença significativa na atividade específica das enzimas em função do tempo experimental (Tabela 1) e dos diferentes tratamentos (Tabela 2).

A atividade específica da FAT e da FAL não apresentaram variação significativa em quaisquer dos períodos estudados para o grupo I, mantendo-se entre 15,8 e 19,2 nmol/min.mg (FAT) e 8,9 e 9,0 nmol/min.mg (FAL). Observando a Figura 1 e a Tabela 1 nota-

se que a presença do material promoveu a variação significativa na AE da FAT e FAL nos grupos II e III ao longo do tempo. A AE da FABMr e Tyr-P também sofreram variação significativa ao longo do tempo (Figura 1, Tabela 1).

A comparação entre os grupos permitiu constatar que a FAT e FAL foram significativamente menores no grupo I em relação aos grupos II e III, exceto para a FAT entre os grupos I e III nos períodos de 20 e 60 dias (Figura 1, Tabelas 1 e 2). A FAL no grupo II foi maior que no grupo III aos 10 ($p<0,05$) e 60 dias ($p<0,001$), mas não aos 20 e 30 dias. Não se observou diferença significativa para a FAT nos grupos I e II entre o primeiro e último período experimental, mas para o grupo III a AE da FAT e FAL diminuíram de 30,7 e 21,8 para 18,5 e 13,5 ($p<0,001$), respectivamente (Tabelas 1 e 2).

A FABMr no grupo I foi significativamente menor ($p<0,001$) que nos grupos II (aos 10 e 30 dias) e III (aos 10 dias), mas nos períodos de 20 e 60 dias a FABMr foi maior ($p<0,001$). A FABMr para o osso bovino microgranular (grupo III) foi menor que nos grupos I e II nos períodos de 20 a 60 dias. Aos 20 e 60 dias a FABMr foi significativamente maior ($p<0,001$) no grupo I que nos outros grupos.

A Tyr-P para o grupo I foi máxima nos períodos de 20 e 60 dias, sendo aproximadamente 18 vezes maior que nos outros períodos. Comparando-se os períodos iniciais e finais, no Grupo II não houve diferença significativa (Tabela 1), mas no grupo III a redução foi de 1,9 vezes ($p<0,001$). Ainda, comparando-se os grupos macro e microgranular a Tyr-P foi maior no grupo III que no grupo II ($p<0,001$), exceto aos 10 dias ($p>0,05$) e aos 60 dias, quando ocorreu o inverso.

Considerando-se cada período experimental e a FAT, FAL e FABMr, pode-se constatar que o grupo macrogranular induz os maiores valores de AE que o microgranular.

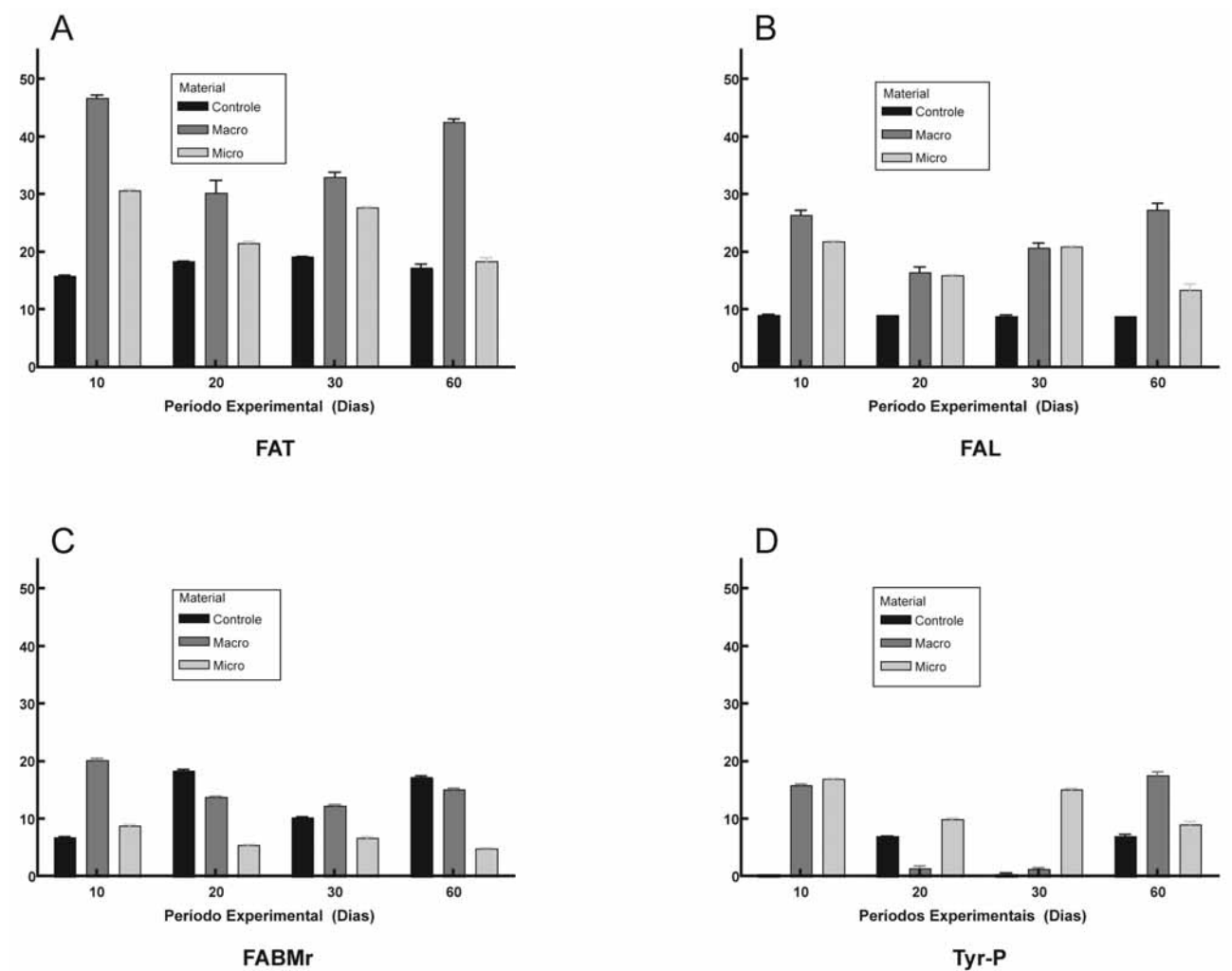


FIGURA 1 – Gráficos mostrando o perfil da atividade enzimática para o osso medular macrogranular e microgranular e grupo controle: a) Fosfatase ácida total; b) fosfatase ácida lisossomal; c) fosfatase ácida de baixa massa molecular; d) tirosina fosfatase. As colunas representam a média de triplicatas (n=5) e as barras o desvio padrão.

Tabela 1 – Efeito do Tempo na Atividade Enzimática. Análise de Variância a um critério e Teste de Múltiplas Comparações de Bonferroni (Instat, GraphPad Inc.) dos grupos controle (C) e teste (M=macrogranular; m=microgranular) em função dos períodos experimentais (10, 20, 30 e 60 dias) para a fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida lisossomal (FAL), fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa (FABMr) e tirosina fosfatase (Tyr-P). As médias e desvios padrões (n=5, em triplicata) apresentados na Figura 1 foram utilizados para a análise estatística

| Comparação | Enzimas | | | |
|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| | FAT ¹ | FAL ² | FABMr ³ | Tyr-P ⁴ |
| C10 vs C20 | ns | ns | p<0,001 | p<0,001 |
| C10 vs C30 | ns | ns | p<0,001 | ns |
| C10 vs C60 | ns | ns | p<0,001 | p<0,001 |
| C20 vs C30 | ns | ns | p<0,001 | p<0,001 |
| C20 vs C60 | ns | ns | ns | ns |
| C30 vs C60 | ns | ns | p<0,001 | p<0,001 |
| M10 vs M20 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 |
| M10 vs M30 | p<0,001 | p<0,01 | p<0,001 | p<0,001 |
| M10 vs M60 | ns | ns | p<0,001 | ns |
| M20 vs M30 | ns | ns | p<0,05 | ns |
| M20 vs M60 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,05 | p<0,001 |
| M30 vs M60 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 |
| m10 vs m20 | p<0,001 | p<0,01 | p<0,001 | p<0,001 |
| m10 vs m30 | ns | ns | p<0,001 | ns |
| m10 vs m60 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 |
| m20 vs m30 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,05 | p<0,001 |
| m20 vs m60 | ns | ns | ns | ns |
| m30 vs m60 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 | p<0,001 |

¹ Graus de liberdade = 59, F = 191,00

² Graus de liberdade = 59, F = 42,9

³ Graus de liberdade = 59, F = 344,22

⁴ Graus de liberdade = 59, F = 143,05

Tabela 2 – Efeito do Tratamento na Atividade Enzimática. Análise de Variância a um critério e Teste de Múltiplas Comparações de Bonferroni (Instat, GraphPad Inc.) entre os grupos controle (C) e teste (M=macrogranular; m=microgranular) nos diferentes períodos experimentais (10, 20, 30 e 60 dias) para a fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida lisossomal (FAL), fosfatase ácida de baixa massa molecular relativa (FABMr) e tirosina fosfatase (Tyr-P). As médias e desvios padrões (n=5, em triplicata) apresentados na Figura 1 foram utilizados para a análise estatística.

| Comparação | Enzimas | | | |
|-------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| | FAT ¹ | FAL ² | FABMr ³ | Tyr-P ⁴ |
| C10 vs M10 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C10 vs m10 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C20 vs M20 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C20 vs m20 | ns | <0,001 | <0,001 | <0,01 |
| C30 vs M30 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | ns |
| C30 vs m30 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C60 vs M60 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |
| C60 vs m60 | ns | <0,05 | <0,001 | ns |
| M10 vs m10 | <0,001 | <0,05 | <0,001 | ns |
| M20 vs m20 | <0,001 | ns | <0,001 | <0,001 |
| M30 vs m30 | ns | ns | <0,001 | <0,001 |
| M60 vs m60 | <0,001 | <0,001 | <0,001 | <0,001 |

¹ Graus de liberdade = 59, F = 191,00

² Graus de liberdade = 59, F = 42,9

³ Graus de liberdade = 59, F = 344,22

⁴ Graus de liberdade = 59, F = 143,05

DISCUSSÃO

Marcadores bioquímicos do remodelamento ósseo têm sido desenvolvidos há mais de vinte anos. Eles têm sido amplamente usados em pesquisas e triagens clínicas, bem como no desenvolvimento de novas terapias. Estes marcadores bioquímicos vêm sendo estudados por terem um valor considerável em conjunto aos dados de densidade óssea em mulheres pós-menopausa¹⁵, já que estas apresentam uma predisposição à osteoporose e riscos de fraturas ósseas^{6,16}.

Nossos resultados mostram que as fosfatases ácidas (total, lisossomal e de baixa massa molecular) e a tirosina fosfatase apresentam níveis de atividade que variam de intensidade em função do período analisado, em função do tamanho do grânulo e em relação ao grupo controle (Figura 1).

É interessante destacar que as partículas macrogranulares induziram atividades específicas superiores em todas as enzimas estudadas, exceto Tyr-P. Uma vez que a área de superfície tem um papel importante na resposta tecidual, poderia se esperar, inicialmente,

que as partículas microgranulares possibilitassem as maiores atividades específicas. Entretanto, o resultado obtido foi oposto e, possivelmente, está relacionado à origem do biomaterial, obtido da porção medular do osso bovino e naturalmente rico em poros. Durante o processo de moagem do material para a produção das partículas, os microgrânulos perdem os poros biológicos os quais se mantêm nas partículas macrogranulares que, assim, passam a apresentar maior área de superfície, favorecendo a migração e invasão do tecido circunjacente, bem como estabelecendo a celularização do material implantado^{14,18}. Segundo relatado por Sicca et al.¹⁷ (2000) o tamanho dos grânulos do material parecem nortear a resposta tecidual ao implante, tanto bioquimicamente (dosagem de enzimas) como histologicamente (infiltrado celular). No entanto esses mesmos autores, ao contrário dos resultados do presente trabalho, relatam que essas diferenças (enzimáticas e histológicas) diminuem de magnitude com o decorrer dos períodos, praticamente se igualando aos 60 dias. Uma possível explicação para esta diferença está relacionada à morfologia dos materiais. No presente trabalho utilizou-se partículas obtidas do osso medular, portanto contendo poros e concavidades, enquanto no trabalho citado¹⁷ foram avaliadas partículas de osso cortical, não poroso e de superfície arredondada. A presença de poros e a superfície menos regular dos materiais aqui testados proporcionaram uma área de superfície maior, intensificando a atividade celular. Tal efeito da área de superfície foi diversas vezes observado entre os grupos macro e microgranular aqui testados (Tabela 2).

A FAL é uma enzima lisossomal hidrolítica secretada por inúmeras células, incluindo células sanguíneas e ósseas¹⁰. Infiltrado inflamatório granulomatoso tipo corpo estranho, contendo células gigantes, ricas em partículas lisossomais, pode representar a origem da FAL. As células inflamatórias, entre elas as células gigantes multinucleadas, estão presentes em resposta ao material e objetivam sua degradação, o que não é possível em função das características minerais do material que não é absorvido em tecido subcutâneo¹⁴.

Zambuzzi et al.¹⁹ (2005) descreveram a resposta histológica frente ao implante do osso bovino medular

inorgânico microgranular, encontrando um fibrosamento com o decorrer do tempo. Através da microscopia eletrônica observou-se que os poros medulares, biologicamente desenhados, eram encontrados apenas no implante do material macrogranular. Em relação ao material microgranular, notou-se a ausência dos mesmos, já que estes não se preservam durante o preparo do material.

Outro aspecto intrigante revelado neste trabalho foi a diminuição da atividade da FABMr após dez dias da implantação no grupo de partículas macrogranulares. Uma vez que a FABMr reconhecidamente promove o controle negativo do ciclo celular¹, pode-se sugerir que nos períodos entre 20 e 60 dias a sinalização esteja voltada para o estímulo da proliferação celular, constituindo o granuloma reacional. Por outro lado, a atividade Tyr-P nos grupos II e III mostrou-se maior que no grupo controle na maioria dos períodos experimentais, sendo exceções no período de vinte dias, quando o grupo I é maior que o grupo II, e aos sessenta dias, onde a AE dessa enzima não é diferente nos grupos I e III. As tirosina-fosfatases podem ser divididas em quatro grupos distintos⁸, sendo que a Cdc25 promove o início do ciclo celular, favorecendo a divisão da célula, enquanto as outras diminuem a taxa de proliferação. Embora não tenha sido possível determinar a atividade de cada uma das tirosina-fosfatases, pode-se propor a hipótese de que a atividade Cdc25 esteja predominando no granuloma, reforçando o efeito causado pela diminuição da FABMr. Assim, nossos resultados sugerem que após dez dias da implantação dos materiais, os processos proliferativos predominam, o que está em acordo com o aumento da celularidade ao longo do tempo.

CONCLUSÃO

Desta maneira, com base nos resultados obtidos pode se concluir que a atividade das fosfatases ácidas e tirosina fosfatase são moduladas, tanto em função do tempo como do tamanho da partícula, durante a resposta tecidual ao osso medular inorgânico bovino implantado em subcutâneo de ratos. O exato papel de cada uma dessas enzimas nesta complexa cadeia de eventos deve, ainda, ser investigado.

ABSTRACT

The goal of this study was to assess the potential of acid phosphatases as biomarkers for tissue response to implants of anorganic cancellous bovine bone. Collagen capsules, containing macrogranular (1000-2000 μm) and microgranular particles (200-600 μm) were implanted in the subcutaneous tissue of 60 Wistar rats. These rats were randomly divided into 3 groups: Group I (empty capsule); Group II (macrogranular) and Group III (microgranular). 10, 20, 30, 60 days after surgery, rats were killed and tissue around the implant was removed. From this tissue, the extract was obtained. Specific activities (SA) of total acid phosphatase (TAP), lysosomal acid phosphatase (LAP) and low molecular weight phosphatase (LWP) were performed at pH 5.0, with specific inhibitors for each enzyme and using p-nitrophenylphosphate as substrate; tyrosine phosphatase activity was determined at the same conditions, but using tyrosine phosphate as substrate. In Group I, TAP and LAP did not change significantly throughout the experimental periods, but both enzymes showed in most experimental periods higher activities ($p < 0.05$) in the group II than in the group III. LWP activity was lower ($p < 0.001$) in the groups II (10 and 30 days) and III (10 days) than in the group I, but it was significantly higher at days 20 and 60 ($p < 0.001$). At days 20 and 60 tyrosine phosphatase detected was 18-fold higher than at days 10 and 30. In conclusion, the acid phosphatase activity, and its isoenzymes TAP, LAP, LWP and Tyr-P are significantly modulated in response to the implant of anorganic cancellous bovine bone, being affected by the particle size and duration of implantation period.

UNITERMS

Biological markers; bone marrow, bovine acid phosphatase, phosphotyrosine phosphatase

REFERÊNCIAS

- Aoyama H, Silva TMA, Miranda MA, Ferreira CV. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. Quim Nova. 2003; 26(6):896-900.
- Bassetto AP, Neves FTA, Toledo SF, Silva TL, Buzalaf MAR, Faria FAC, et al. Effect of cigarette smoke on sublingual gland and liver phosphotyrosine protein phosphatase and acid phosphatase activities. Rev Fac Odontol Bauru. 2001; 9(1/2):49-54.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid phosphatases. Mol Pathol. 2002 Apr.;55(2):65-72.
- Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Ferreira CV, Lourenção VA, Ortega MM, Poletto DW, et al. Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase. Exp Lung Res. 1998. May-June;24(3):269-72.
- Chen CJ, Chao TY, Janckila AJ, Cheng SN, Ku CH, Chu DM. Evaluation of the activity of tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b in normal Chinese children--a novel marker for bone growth. J Pediatr Endocrinol Metab. 2005 Jan.;18(1):55-62.
- Crofton PM, Kelnar CJ. Bone and collagen markers in paediatric practice. Int J Clin Pract. 1998 Nov/Dec.;52(8):557-65.
- Granjeiro JM, Ferreira CV, Jucá MB, Taga EM, Aoyama H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. Biochem Mol Biol Int 1997; 41:1201-06.
- Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. An Acad Bras Ci. 1997; 69:451-60.
- Hartree EF. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. Anal Biochem. 1972; 48: 422-7.
- Ishibashi M. Acid phosphatase, ACP (EC 3.1.3.2). Rinsho Byori. 2001 Nov.;116:100-9.
- Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK, Seelan RS, Hsueh YC, Rissanen J, et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. J Leukoc Biol. 2005 Feb;77(2):209-18.
- Markovic O, Markovic N. Cervical acid phosphatase: a biomarker of cervical dysplasia and a potential surrogate endpoint for colposcopy. Dis Markers. 2004;19(6):279-86.
- Ohnishi H, Fujii N, Futami T, Taguchi N, Kusakari H, Maeda T. A histochemical investigation of the bone formation process by guided bone regeneration in rats jaws. Effect of PTFE membrane application periods on newly formed bone. J Periodontol. 2000; 71(3):341-52.
- Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR, et al. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular: avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. Rev Fac Odontol Bauru. 1999; 7(3/4):85-93.
- Rahnama M, Swiatkowski W, Zareba S. Study of estrogen deficiency impact on manganese levels in teeth and mandible of rats after ovariectomy. Roczn Panstw Zakl Hig. 2003;54(1):33-8.
- Seibel MJ, Woitge HW. Basic principles and clinical applications of biochemical markers of bone metabolism: biochemical and technical aspects. J Clin Densitom. 1999 Fall;2(3):299-321.
- Sicca CM, Oliveira RC, Silva TL, Cestari TM, Oliveira DT, Buzalaf MAR et al., Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. Rev Fac Odontol Bauru. 2000, 8(1/2):1-10.
- Taga R, Cestari TM, Taga EM, Tavano O, Granjeiro JM. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. Revista Bras de Cirur Implan. 2000; 7(26):37-44.
- Zambuzzi WF, Oliveira RC, Alanis D, Menezes R, Letra A, Cestari TM, et al. Tissue response to porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. J App Oral Scienc. 2005 (in press).

Recebido em: 23/08/05

Aprovado em: 28/09/06

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro
Departamento de Biologia Celular e Molecular
Instituto de Biologia da
Universidade Federal Fluminense – UFF
jmgranjeiro@vm.uff.br
Fone: 55 21 2629 2324
Fax: 55 21 3701 1617
Outeiro de São João Baptista – s/n
Campus do Valonguinho
Centro – Niterói – RJ
24020-150