

**RAFAEL RODRIGUES COLOSIO**

**Caracterização cinética da fosfatase alcalina durante o processo  
de ossificação em *Lithobates catesbeianus***

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro  
Junior

**Araraquara  
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

C718c Colosio, Rafael Rodrigues  
Caracterização cinética da fosfatase alcalina durante o processo de ossificação em *Lithobates catesbeianus* / Rafael Rodrigues Colosio. – Araraquara : [s.n.], 2019  
63 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Instituto de Química  
Orientador: João Martins Pizauro Junior

1. Osso e ossos. 2. Calcificação. 3. Fosfatases. 4. Rã-touro.  
5. Metamorfose. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

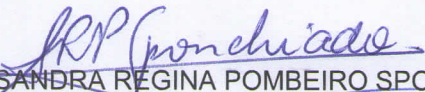
TÍTULO DA TESE: "Caracterização cinética da fosfatase alcalina durante o processo de ossificação em *Lithobates catesbeianus*"

**AUTOR: RAFAEL RODRIGUES COLOSIO**

**ORIENTADOR: JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR  
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

  
Profª. Drª. SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO  
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

  
Dr. LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS  
Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal

  
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES  
Departamento de Biologia / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP - Ribeirão Preto

  
Prof. Dr. MARCIO HIPOLITO  
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal / Instituto Biológico - São Paulo

Araraquara, 27 de fevereiro de 2019

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: Rafael Rodrigues Colosio

Nome em citações bibliográficas: COLOSIO, R. R.; COLOSIO, RAFAEL R.

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Departamento de Tecnologia.

Via de Acesso Paulo Donato Castellane – s/n, Zona Rural, 14884-900, Jaboticabal, SP – Brasil.

### FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Doutorado em Biotecnologia (2015-2019).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Caracterização cinética da fosfatase alcalina durante o processo de ossificação em *Lithobates catesbeianus*

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Mestrado em Biotecnologia (2013-2015).

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

Título: Atividade de enzimas relacionadas ao processo de ossificação em girinos de *Lithobates catesbeianus*

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Graduação em Ciências Biológicas (2009-2012).

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal, FCAVJ - UNESP, Brasil

Título: Estudo da atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo de *Lithobates catesbeianus*, durante o período de desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

### ESTÁGIO DE DOCÊNCIA

Estágio de Docência em Ensino Superior junto à disciplina “**Fundamentos de Bioquímica**” do Curso de Engenharia Química, UNESP-IQ. 2016.

Estágio de Docência em Ensino Superior junto à disciplina “**Laboratório de Química Geral**” do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UNESP-IQ. 2017.

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. GONÇALVES, ADRIANO M.; SANTOS, LUIZ F. J.; SANTANA, CAROLINE C.; **COLOSIO, RAFAEL R.**; PIZAURO, JOÃO M. Activity of Tail Phosphatases: A Study during Growth and Metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. Copeia, v. 103, p. 634 - 638, 2015.

### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Can Phosphatases Participate of Cell Death and Nutrient Release in *L. catesbeianus* During Metamorphosis? In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. **Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2017.
2. OLIVEIRA, G. M.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; MEDEIROS, A. S. R.; GONÇALVES, A. M.; LEITAO, N. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Opsonization and activation of the classic complement pathway of Nile tilapia on the neutralization of *Streptococcus agalactiae* in vitro. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. **Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2017.
3. ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; COLOSIO, R. R.; MEDEIROS, A. S. R.; MORAES, A. C.; PRADO, E. J. R.; OLIVEIRA, G. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; LEITAO, N. J.; SAMARA, S. I.; BELO, M. A. A.; PIZAURO, J. M. Validation of IgY in Diagnosis of Endocarditis and Bacterial Meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia. In: XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2017, Águas de Lindóia. **Anais da XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2017.
4. FREITAS, T. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M.; PORTELLA, M. C. Digestive enzymatic activity on *Piaractus mesopotamicus* larvae during early life stage and under different rearing protocols. In: Aquaculture America 2016, 2016, Las Vegas. **Anais do Aquaculture America 2016**, 2016.
5. GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; OLIVEIRA, G. M.; VIEIRA, V. I.; FERREIRA, G. C.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; PIZAURO, J. M. Identification and kinetic characterization of phosphatases isozymes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles tail during metamorphosis. In: XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal. **Anais da XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2016.
6. FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Método imunoenzimático de ELISA utilizando IgY para a detecção de proteínas microbianas de células bacterianas de *Streptococcus agalactiae*. In: I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016, Jaboticabal. **Anais do I Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental**, 2016.
7. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. A study of tail's acid and alkaline phosphatases during bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) larval development. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015.

8. SANTANA, C. C.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; **COLOSIO, R. R.**; OLIVEIRA, G. M.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Alkaline phosphatase LPS dephosphorylase activity during bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) metamorphosis. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015.
9. PAVARINA, G. C.; SANTANA, C. C.; SANTOS, L. F. J.; **COLOSIO, R. R.**; PIZAURO, J. M. Caracterização cinética parcial da LPS-defosforilase da fosfatase alcalina intestinal. In: XXVII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2015, Jaboticabal. **Anais do XXVII CIC - Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2015.
10. NEIRA, L. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; **COLOSIO, R. R.**; BUZOLLO, H.; SANDRE, L. C. G.; NASCIMENTO, T. M. T.; PIZAURO, J. M.; CARNEIRO, D. J. Eletrophoresis as a tool to estimate the polypeptide chain in tilapia waste hydrolysate. In: Aquaculture America 2015, 2015, New Orleans. **Anais do Aquaculture America 2015**, 2015.
11. **COLOSIO, R. R.**; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases activities during the bone formation process in *Lithobates catesbeianus*. In: 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015.
12. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; MENEZES, M. P.; PIZAURO, J. M. Bone nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase and alkaline phosphatase activities during *Lithobates catesbeianus* limbs development. In: 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2014.
13. BALDISSERA, G.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; LUNEDO, R.; **COLOSIO, R. R.** Efeito da restrição alimentar quantitativa e qualitativa sobre a atividade da  $\alpha$ -amilase de frangos de corte. In: XXVI CIC - Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2014, Jaboticabal. **Anais do XXVI CIC - Congresso de Iniciação Científica da Unesp**, 2014.
14. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; BALDISSERA, G.; PIZAURO, J. M. Membrane interaction study of acid and alkaline phosphatases from bull frog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles tail. In: 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2014.
15. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. PC-1, alkaline and acid phosphatases activities in normal

and affected by tibial dyschondroplasia chickens. In: 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2014.

16. MENEZES, M. P.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B.; PIZAURO, J. M. Seminal evaluation and determination of protein concentration present in seminal plasma of two species of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira* and *M. nemorivaga*) maintained in captivity. In: 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da 43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2014.

17. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of acid and alkaline phosphatase present in the bone tissue of *Lithobates catesbeianus* during the limbs development period. In: 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2013, Foz do Iguaçu. **Anais da 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2013.

18. SANTANA, C. C.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of phosphomonohydrolases present in the liver of bullfrog's tadpoles during metamorphosis. In: 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2013, Foz do Iguaçu. **Anais da 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2013.

19. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. Pyrophosphatase and ATPase activities from bull frog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles tail during development and metamorphosis. In: 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2013, Foz do Iguaçu. **Anais da 42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2013.

20. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. Partial characterization of intestinal alkaline phosphatase from tadpoles bull frog (*Lithobates catesbeianus*). In: 41st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2012, Foz do Iguaçu. **Anais da 41st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2012.

21. SANTANA, C. C.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Partial kinetic characterization of acid and alkaline phosphatases from different tissue of bull frog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). In: 41st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2012, Foz do Iguaçu. **Anais da 41st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2012.

22. COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax. In: 40th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, Foz do Iguaçu. **Anais da 40th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2011.

23. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Partial characterization of phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* tail during metamorphosis. In: 40th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2011, Foz do Iguaçu. **Anais da 40th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2011.

24. COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Acid and alkaline phosphatases activities of *Lithobates catesbeianus* forelimbs during metamorphosis. In: 39th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da 39th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2010.

25. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Activities of phosphomonohydrolase from *Lithobates catesbeianus* tail during metamorphosis. In: 39th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da 39th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2010.

#### **Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)**

1. SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R. Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes em fígados de girinos de rã-touro. In: XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal. **Anais do XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2012.

2. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C. Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo dos membros de girinos de rã-touro. In: XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal. **Anais do XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2012.

3. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; HARNICH, F. A. R. Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus* durante o clímax metamórfico. In: XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal. **Anais do XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2011.

4. SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; HARNICH, F. A. R. Relação entre a atividade da fosfatase alcalina e a massa da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose. In: XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal. **Anais do XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2011.

5. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus*. In: XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010, Jaboticabal. **Anais do XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2010.

6. GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R. Caracterização da atividade de fosfomono-hidrolases da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose. In: XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010,



Jaboticabal. Anais do XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010.

#### **Apresentação de trabalho e palestra**

1. GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; OLIVEIRA, G. M.; VIEIRA, V. I.; FERREIRA, G. C.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; PIZAURO, J. M. **Identification and kinetic characterization of phosphatases isozymes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles tail during metamorphosis**, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
2. GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; FERREIRA, G. C.; PAVARINA, G. C.; OLIVEIRA, G. M.; NEIRA, L. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; VIEIRA, V. I.; PIZAURO, J. M. **A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura**, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)
3. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; PIZAURO, J. M. **Hydrolases activities during the bone formation process in *Lithobates catesbeianus***, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; MENEZES, M. P.; PIZAURO, J. M. **Bone nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase and alkaline phosphatase activities during *Lithobates catesbeianus* limbs development**, 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. **Criação, Ecologia e Conservação de Anuros**, 2014. (Outra, Apresentação de Trabalho)
6. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. **Activity of acid and alkaline phosphatases present in the bone tissue of *Lithobates catesbeianus* during the limbs development period**, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
7. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C. **Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo dos membros de girinos de rã-touro**, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PEREIRA, M. C. **Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação**, 2012. (Outra, Apresentação de Trabalho)
9. COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. **Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax**, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
10. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; HARNICH, F. A. R. **Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus* durante o clímax metamórfico**, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

11. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PEREIRA, M. C. **Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação**, 2011. (Outra, Apresentação de Trabalho)

12. COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. **Acid and alkaline phosphatases activities of *Lithobates catesbeianus*' forelimbs during metamorphosis**, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

13. COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. **Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus***, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

## EVENTOS

### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2017. (Congresso)

Validation of IgY in Diagnosis of Endocarditis and Bacterial Meningitis caused by *Streptococcus agalactiae* in Nile Tilapia.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **45th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2016. (Congresso)

Identification and kinetic characterization of phosphatases isozymes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles tail during metamorphosis.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2015. (Congresso)

Hydrolases activities during the bone formation process in *Lithobates catesbeianus*.

4. **VI Bionativa**, 2015. (Outra)

A utilização de sapos, rãs e pererecas em pesquisas científicas e alimentação humana: desconstruindo preconceitos da ordem anura.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **43rd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2014. (Congresso)

Bone nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase and alkaline phosphatase activities during *Lithobates catesbeianus* limbs development.

6. **V Bionativa**, 2014. (Outra)

Criação, ecologia e conservação de anuros.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **42nd Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2013. (Congresso)

Activity of acid and alkaline phosphatases present in the bone tissue of *Lithobates catesbeianus* during the limbs development period.

8. **41st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2012. (Congresso)

9. Apresentação Oral no(a) **III Bionativa**, 2012. (Outra)  
Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação.
10. **XI Jornada Anual Biológica da UNESP - JABU**, 2012. (Outra)
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2012. (Congresso)  
Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo dos membros de girinos de rã-touro.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **40th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2011. (Congresso)  
Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax.
13. Apresentação Oral no(a) **II Bionativa**, 2011. (Outra)  
Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação.
14. **IV Saída de Campo da Biologia - Visita ao Instituto Butantan**, 2011. (Outra)
15. **VII Colóquio sobre Educação da Biologia - CEBIO**, 2011. (Outra)
16. **X Jornada Anual Biológica da UNESP - JABU**, 2011. (Outra)
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2011. (Congresso)  
Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus* durante o clímax metamórfico.
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **39th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq)**, 2010. (Congresso)  
Acid and alkaline phosphatases activities of *Lithobates catesbeianus*' forelimbs during metamorphosis.
19. **IX Jornada Anual Biológica da UNESP - JABU**, 2010. (Outra)
20. **VI Colóquio sobre Educação da Biologia - CEBIO**, 2010. (Outra)
21. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2010. (Congresso)  
Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus*.
22. **V Colóquio sobre Educação da Biologia - CEBIO**, 2009. (Outra)
23. **VIII Jornada Anual Biológica da UNESP - JABU**, 2009. (Outra)

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e à Gaby, minha namorada, por todo o incentivo, pela compreensão e paciência, e por toda a crença em minha capacidade para realizar mais esta etapa de minha longa caminhada.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Deus por tornar possível minha trajetória e me mostrar que tudo o que acontece na vida tem um propósito, e que quando as coisas parecem não fazer sentido, em algum momento tudo se encaixa e melhora o que parecia não ter mais conserto.

Aos meus pais, José Antônio e Edilene, por todo o suporte oferecido ao longo desta caminhada chamada vida, por terem me ensinado as coisas mais importantes que uma pessoa deve aprender. Vocês me ensinaram a amar acima de qualquer diferença, a perdoar mesmo quando não te pedem perdão, a respeitar todos e tudo, independentemente de quem ou o que seja, a ser honesto e correto mesmo nas situações mais difíceis e complicadas, a ajudar a quem estiver ao nosso alcance, nem que seja com uma palavra ou com um simples gesto. Agradeço ainda por tudo o que fizeram, fazem e ainda farão em nome da minha felicidade, eu amo vocês mais do que qualquer coisa nessa vida.

Aos meus irmãos, Guilherme, Alene e Henrique, por serem meus mais fiéis companheiros, fazendo com que eu me sinta seguro sempre, sabendo que independente do que acontecer em nossas vidas, vocês jamais deixarão de me apoiar e de estarem comigo em qualquer situação, é bom demais ter vocês para poder compartilhar os momentos mais importantes de minha vida. Agradeço também por me ensinarem a ser forte quando precisam de mim, a ser compreensivo e paciente nos momentos de discussão e por me proporcionarem momentos inesquecíveis de descontração e boas risadas, vocês são os melhores irmãos e os melhores amigos do mundo, eu amo muito vocês, nunca duvidem disso.

À minha namorada Gaby, pelo carinho, pelas conversas e por todo o apoio e compreensão, por ser essa menina/mulher incrível, uma companheira maravilhosa, sensível e forte, determinada e batalhadora, sonhadora e realista, isso tudo estimula o melhor de mim. Agradeço demais por estar, presente em minha vida todos os dias, desde que nos conhecemos, seja por uma mensagem de texto, por uma ligação, ou pessoalmente, me incentivando, acreditando e me fazendo acreditar que eu consigo e devo me superar a cada dia, não só nos estudos, mas em tudo na vida. Você trouxe a felicidade que eu não sabia que faltava em mim, eu amo você demais.

Aos meus avós, aos meus tios e aos meus primos por todas as orações, pensamentos positivos e por acreditarem em minha competência e responsabilidade para a realização dos meus estudos.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, pela dedicação e paciência durante a orientação neste trabalho, pelas conversas, discussões e momentos de descontração, e por ser, além de Orientador, um amigo que me ajudou bastante dentro e fora do laboratório.

A todos que fizeram e/ou ainda fazem parte do LEIA (Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas), que sempre me auxiliaram, tanto na parte prática quanto na parte teórica da pesquisa. Além das conversas, das discussões, das trocas de experiências de vida, sempre de forma descontraída, o que permitiu uma boa convivência no local de trabalho, porém sem que a pesquisa deixasse de ser levada a sério. Vocês são, além de companheiros de laboratório, grandes amigos com quem tive o prazer de conviver durante anos e pretendo continuar convivendo nos mais diversos ambientes, seja para trabalho e/ou diversão. Um agradecimento sincero por fazerem parte da minha vida, vocês são sensacionais.

Aos meus amigos mais próximos por toda a crença, todo o apoio e todo o desejo de que tudo dê certo na minha vida independentemente das minhas escolhas.

Aos integrantes da Seção Técnica de Pós-graduação e da Biblioteca do Instituto de Química, que cumprem seu trabalho de forma competente e compreensiva.

Aos integrantes da Banca Examinadora, por terem aceito o convite de participar de minha defesa, enriquecendo o presente trabalho com seus elogios, críticas e sugestões.

À professora Marta por permitir gentilmente, e ao técnico Márcio por auxiliar na coleta dos girinos e das rãs, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho. E ao ranário Ranamat, pela cessão complementar de animais quando houve necessidade.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento concedido para realização do presente trabalho.

Por fim agradeço a todas as pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, auxiliaram na construção deste trabalho e/ou participaram da minha formação pessoal, sejam amigos, colegas ou apenas conhecidos.

“Lute, se esforce, vença e continue lutando. Assim como as lutas não tem fim, a vitória pode ser sem limites.”

Aleff Lavoisier

## RESUMO

Os processos de formação, crescimento, remodelação e, quando necessário, reparo do tecido ósseo ocorrem pela ação coordenada e regulada dos eventos químicos e fisiológicos que participam das ossificações intramembranosa e endocondral, sendo assim, o desequilíbrio das biomoléculas envolvidas no processo, pode levar ao desenvolvimento de patologias ósseas. Durante a metamorfose dos anuros, ocorrem acentuadas e perceptíveis alterações morfológicas que possibilitam a transição do animal do ambiente aquático para o terrestre, sendo a remodelação do esqueleto uma das transformações mais notáveis. Dentre as formas de se estudar o mecanismo de calcificação biológica, as enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida tartarato-resistente são utilizadas por serem consideradas marcadores bioquímicos da ação dos osteoblastos e dos osteoclastos, respectivamente. Neste sentido, foram realizados estudos em girinos e rãs de *Lithobates catesbeianus* com o objetivo de se compreender melhor tais processos de ossificação. A média da atividade específica para a hidrólise do *p*NFF (pH=10,5) pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfatidilinositol fosfolipase C-específica (PIPLC) de *Bacillus cereus*, entre as diferentes regiões ósseas nas diferentes idades do animal, foi de 1142,57 U.mg<sup>-1</sup>, enquanto que para a hidrólise do PPi (pH=8,0) foi de 1433,82 U.mg<sup>-1</sup>. Dentre os compostos testados sobre a atividade enzimática, aquele que mais influenciou foi o EDTA, com aproximadamente 67% de inibição para a atividade de *p*NFFase, e 77% para a de PPase. No caso dos parâmetros cinéticos, a enzima apresentou comportamento “Michaeliano” para a hidrólise do *p*NFF, bem como para o PPi. O valor de  $K_m$  ficou em torno de 0,6 mM para a atividade de *p*NFFase e variou de 0,01 a 0,11 para a atividade de PPase, indicando que a enzima possui maior afinidade por este substrato. O estudo da hidrólise do *p*NFF e do PPi pela enzima revelou que o pH ótimo de atuação para o *p*NFF foi de 10,5, enquanto o do PPi, o qual é considerado o verdadeiro substrato da fosfatase alcalina, foi de 8,0, próximo ao fisiológico. Os resultados obtidos mostram que independentemente do tipo de ossificação que ocorre, trata-se da mesma enzima ou isoenzimas atuando nas diferentes regiões ósseas e nas diferentes fases de vida dos anuros. Além disso, o início da formação do osso ocorre na diáfise até o final da metamorfose e segue em direção às epífises quando o animal atinge a fase adulta. Tal fato pode ser explicado porque na fase aquática os ossos não necessitam ser tão rígidos quanto na terra, onde o efeito do impacto direto sobre este tecido provoca uma adaptação mecânica devido ao estímulo externo, logo, o animal precisará de membros reforçados para poder se locomover através de saltos. A semelhança dos resultados com trabalhos realizados com outros vertebrados



demonstra que os anfíbios podem ser considerados ótimos modelos animais para o estudo da calcificação biológica.

**Palavras-chave:** Tecido Ósseo, Calcificação Biológica, Fosfomonohidrolases, Rã-touro, Metamorfose.

## ABSTRACT

The processes of formation, growth, remodeling and, when necessary, repair of the bone tissue occur through the coordinated and regulated action of the chemical and physiological events that participate in the intramembranous and endochondral ossifications, thus, the imbalance of the biomolecules involved in the process, may lead to the development of bone pathologies. During anuran's metamorphosis, there are marked and perceptible morphological changes that allow the transition of the animal from the aquatic to the terrestrial environment, and the skeleton remodeling is one of the most remarkable transformations. Among the ways to study the mechanism of biological calcification, the enzymes alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase are used as biochemical markers of the action of osteoblasts and osteoclasts, respectively. In this sense, studies were carried out on tadpoles and frogs of *Lithobates catesbeianus* in order to better understand such ossification processes. The mean of the specific activity for the hydrolysis of *p*NPP (pH=10.5) by the alkaline phosphatase solubilised by *Bacillus cereus* phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) between the different bone regions at different ages of the animal was 1142.57 U.mg<sup>-1</sup>, while for the hydrolysis of PPi (pH=8.0) was 1433.82 U.mg<sup>-1</sup>. Among the compounds tested on the enzymatic activity, the one that most influenced was EDTA, with approximately 67% inhibition for *p*NPPase activity, and 77% for PPase. In the case of kinetic parameters, the enzyme presented "Michaelian" behavior for the hydrolysis of *p*NPP, as well as for PPi. The K<sub>m</sub> value was around 0.6 mM for *p*NPPase activity and ranged from 0.01 to 0.11 for PPase activity, indicating that the enzyme has higher affinity for this substrate. The study of the hydrolysis of *p*NPP and PPi by the enzyme revealed that the optimum pH for *p*NPP was 10.5, while that for PPi, which is considered the natural substrate of alkaline phosphatase, was 8.0, being closer to the physiological. The obtained results show that, regardless of the ossification type that occurs, it is the same enzyme or isoenzymes acting in different bone regions and in the different life phases of the anurans. In addition, the beginning of bone formation occurs in the diaphysis until the metamorphosis end and, follows towards the epiphysis when the animal reaches the adult phase. This fact can be explained because in the aquatic phase the bones do not need to be so rigid as in land, where the effect of the direct impact on this tissue causes a mechanical adaptation due to the external stimulus, so the animal will need reinforced limbs to be able to move through jumps. The similarity of the results to studies with other vertebrates shows that amphibians can be considered good animal models for the study of biological calcification.

**Keywords:** Bone Tissue, Biologic Calcification, Phosphomonohydrolases, Bullfrog, Metamorphosis.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Metamorfose em anuros</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 Processos de Ossificação</b> .....	<b>25</b>
<b>2.3 Calcificação Biológica</b> .....	<b>28</b>
<b>2.4 Fosfomonohidrolases</b> .....	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Animais experimentais</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Classificação dos girinos</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3 Obtenção dos extratos enzimáticos</b> .....	<b>36</b>
<b>4.4 Centrifugação Diferencial para obtenção das membranas celulares</b> .....	<b>37</b>
<b>4.5 Remoção das proteínas ligadas à membrana celular através da “âncora” de fosfatidilinositol</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6 Determinação da atividade de <i>p</i>-nitrofenilfosfatase (<i>p</i>NFFase) da fosfatase alcalina (FAL), da fosfatase ácida (FAC) e da fosfatase ácida tartarato-resistente (FACTR)..</b>	<b>38</b>
4.6.1 Efeito do pH sobre a atividade de <i>p</i> NFFase das fosfatases alcalina e ácida na fração SPIPLC .....	39
4.6.2 Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de <i>p</i> NFFase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC .....	39
4.6.3 Ação de compostos sobre a atividade de <i>p</i> NFFase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC .....	39
<b>4.7 Determinação da atividade de Pirofosfatase (PPase) da fosfatase alcalina</b> .....	<b>40</b>
4.7.1 Efeito do pH sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC..	40
4.7.2 Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC .....	40
4.7.3 Ação de compostos sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC .....	41
<b>4.8 Dosagem de proteína</b> .....	<b>41</b>
<b>4.9 Análise dos resultados</b> .....	<b>41</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A classe Amphibia é dividida em três linhagens diferentes, de acordo com o modo de locomoção de seus representantes. Os animais da ordem Gymnophiona (cecílias), são ápodes, e movem-se de forma parecida com as cobras; os Urodela (salamandras e tritões) possuem patas dianteiras e traseiras do mesmo tamanho e movimentam-se por ondulações laterais combinadas com movimentos das patas; enquanto que os Anura (sapos, pererecas e rãs) apresentam patas traseiras maiores do que as dianteiras, deslocando-se através de saltos (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Algumas especializações do sistema locomotor são utilizadas para diferenciar os vários tipos de anuros. Existem os que são terrestres, de porte maior, possuem cabeça áspera e patas traseiras relativamente curtas (saltos curtos). As espécies arborícolas geralmente apresentam cabeça e olhos grandes, cintura fina, patas traseiras longas (saltos longos), e discos digitais (possibilitam escalada). E os anuros semiaquáticos são moderadamente hidrodinâmicos e apresentam membranas interdigitais nas patas traseiras, auxiliando a natação (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Dentre os semiaquáticos destaca-se a rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) (Figura 1), originária da América do Norte, a qual se adaptou muito bem às condições climáticas brasileiras. Estes animais são predadores generalistas, sendo considerados fortes competidores tanto na fase larval quanto na fase adulta (BOTH et al., 2011). Além disso, apresentam alta fecundidade (alto número de ovos por desova), precocidade (crescimento rápido) e rusticidade (facilidade de manejo). Devido a essas características, seu desempenho produtivo em criações comerciais, com o objetivo de fornecer carne para o consumo humano, é maior quando comparado ao de espécies nativas do Brasil, como a rã-pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) e a rã-manteiga (*Leptodactylus ocellatus*) (RODRIGUES et al., 2010).

**Figura 1** – Indivíduos da espécie *Lithobates catesbeianus* nas fases larval (A) e adulta (B.1; B.2).



A) Indivíduos em diferentes estádios de desenvolvimento (GOSNER, 1960); B.1) Indivíduo adulto com membros relaxados; B.2) Indivíduo adulto com membros contraídos.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Metamorfose em anuros

O processo de transformação dos anfíbios, denominado de metamorfose, é caracterizado por mudanças morfofisiológicas marcantes, possibilitando ao animal a transição do ambiente aquático para o terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003). Geralmente os anuros apresentam uma fase larval aquática e uma fase pós-metamórfica terrestre, sendo assim, os girinos diferem, morfológica e ecologicamente, dos adultos. Majoritariamente, os girinos de anuros são classificados como herbívoros filtradores, tornando-se carnívoros quando adultos, logo, o animal explora diferentes recursos durante suas fases de vida (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; SANTOS et al., 2016).

O fenômeno da metamorfose é principalmente endócrino, regulado pelos hormônios tireoidianos. A função deles nesse processo foi demonstrada em alguns estudos (DUELLMAN; TRUEB, 1994). Gudernatsch (1912 apud DUELLMAN; TRUEB, 1994), por exemplo, alimentou girinos de *Rana temporaria* com extrato de glândulas tireoides de cavalos e notou que a metamorfose foi acelerada.

No decorrer do processo metamórfico, mudanças comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas podem ser observadas como resultado de grandes transformações pós-embrionárias. Esse fenômeno caracteriza-se por três alterações notáveis: (1) regressão de estruturas e suas respectivas funções necessárias somente aos girinos; (2) transformações de algumas estruturas larvais em estruturas necessárias aos adultos, e (3) desenvolvimento de estruturas e suas respectivas funções essenciais somente ao animal adulto (McDIARMID; ALTIG, 1999).

As alterações bioquímicas que ocorrem nos anuros, durante a metamorfose, são menos notáveis, ocorrendo aumento na produção de proteínas séricas, mudanças no metabolismo do ferro, no tipo de hemoglobina e no ciclo da ureia, bem como alterações na expressão de DNA e síntese de RNA (DUELLMAN; TRUEB, 1994; JUST; ATKINSON, 1972; MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; THEIL, 1973; WEBER, 1996).

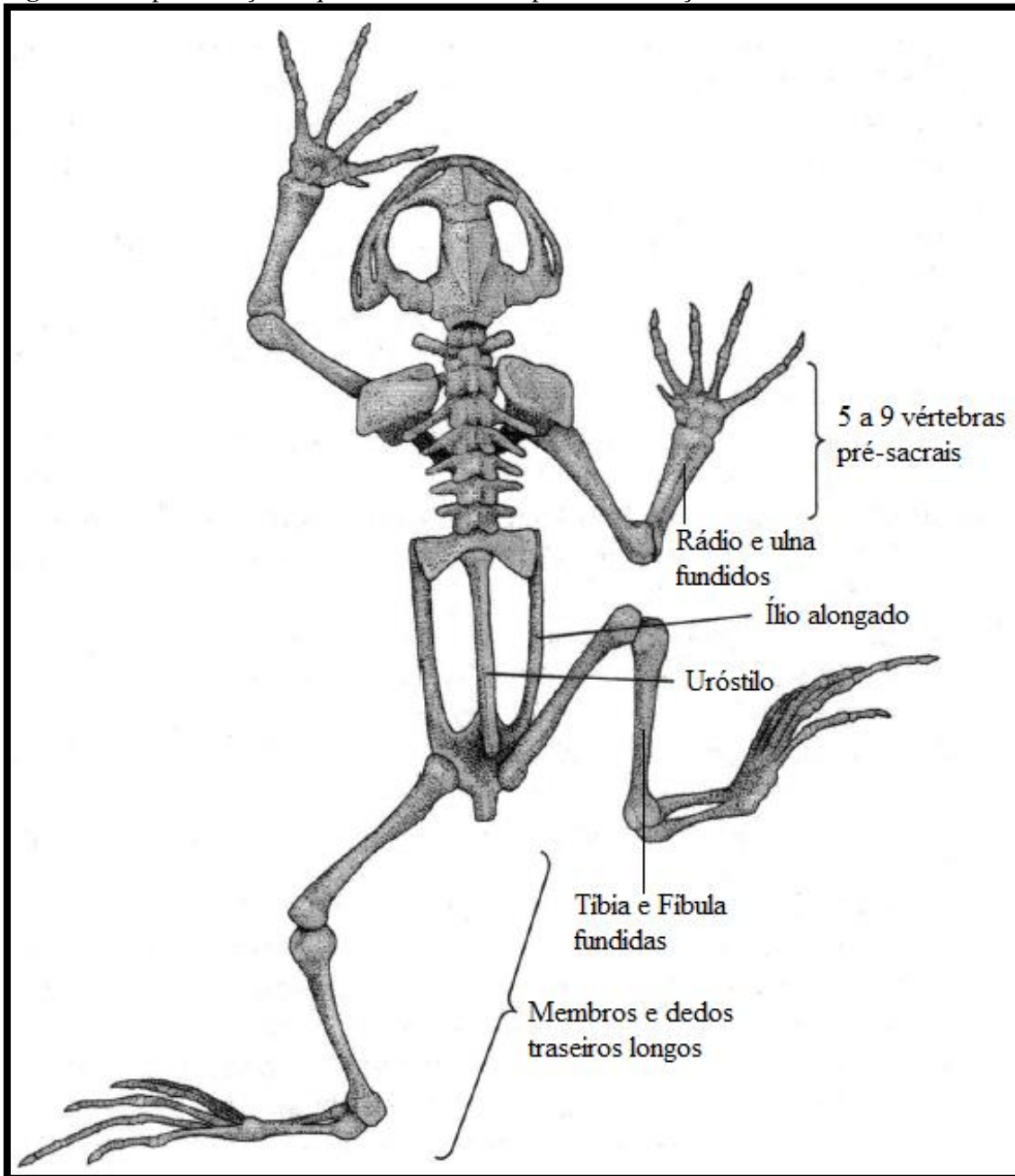
Por outro lado, as modificações morfológicas são mais perceptíveis. Inicialmente, o trato gastrointestinal dos girinos é formado por um estômago rudimentar e um intestino longo, entretanto, no clímax metamórfico, há uma redução de 75% do intestino e o desenvolvimento de vilosidades, enquanto que o estômago é remodelado e desenvolve

novas glândulas secretoras (ISHIZUYA-OKA; SHI, 2005; OLIVEIRA-BAHIA et al., 2005). Ocorre também a regressão da cauda (GONÇALVES et al., 2015), alterações nos olhos (HOSKINS, 1986; MANN; HOLT, 2001), narinas (HIGGS; BURD, 2001), fígado (ATKINSON; WARKMAN; CHEN, 1998), glândula pituitária (BUCKBINDER; BROWN, 1993; HUANG et al., 2001; KIKUYAMA et al., 1993), na pele (YOSHIZATO, 1996) e nos diferentes órgãos do sistema respiratório (DODD; DODD, 1976), e nos sistemas nervoso (KOLLROS, 1981), imunológico (ROLLINS-SMITH, 1998), hematopoiético (WEBER, 1996) e esquelético (TRUEB; HANKEN, 1992).

A característica esquelética mais perceptível dos anuros é a especialização do corpo para se deslocar por meio de saltos, no qual os membros posteriores, juntamente com os músculos, formam um sistema de alavanca que proporciona ao animal a capacidade de dar grandes saltos. Associados a este tipo de locomoção, pode-se citar alguns aperfeiçoamentos morfológicos (Figura 2), como: tíbia e fíbula fundidas e patas traseiras alongadas; presença de uma pélvis resistente, ligada fortemente a uma coluna vertebral curta e enrijecida (fator que restringe a flexão lateral) com apenas cinco ou nove vértebras pré-sacrais e vértebras caudais fundidas, sendo as últimas, formadoras do uróstilo, o qual é acompanhado por ílios alongados. Os membros anteriores são fortes, apresentando rádio e ulna fundidos, e a cintura peitoral é flexível, para absorver o impacto da aterrissagem (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).



**Figura 2** – Especialização esquelética dos anuros para a locomoção através de saltos.



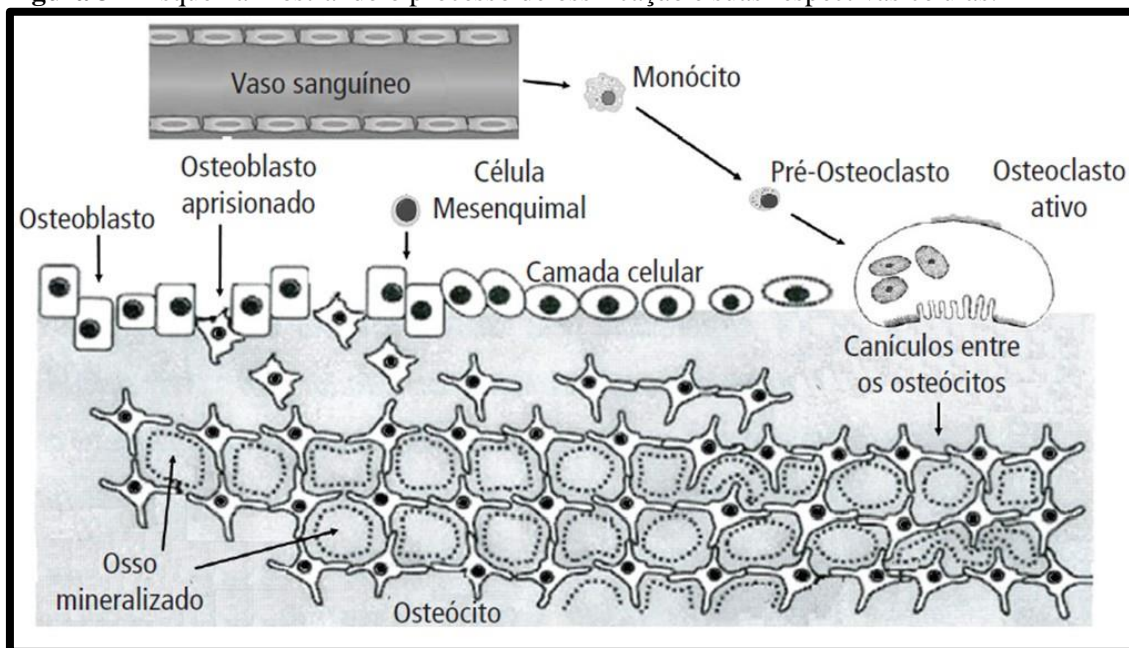
Fonte: Pough; Janis; Heiser (2008, p. 230) – modificado pelo autor.

## 2.2 Processos de Ossificação

O esqueleto é composto principalmente pelo tecido ósseo, atuando como suporte para os tecidos moles e protegendo os órgãos vitais (interior das caixas craniana e torácica) e o canal vertebral. Confere sustentação aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis, além de ampliar a força gerada na contração muscular devido ao seu sistema de alavancas. Em seu interior está presente a medula óssea, local de formação das células sanguíneas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Os ossos servem, ainda, como um reservatório de cálcio e fósforo, minerais que podem ser mobilizados durante distúrbios da homeostase (PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, que além de multifuncional, é metabolicamente muito ativo. Esse tecido é composto por matriz óssea (material extracelular calcificado) e uma população heterogênea de células (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) (Figura 3). Os osteoblastos são responsáveis pela formação do tecido ósseo que ocorre através da síntese e mineralização da matriz orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanos e glicoproteínas), e estão presentes na superfície do tecido ósseo até o momento em que são aprisionados por sua própria matriz recém-sintetizada, diferenciando-se, a partir daí, em osteócitos. Os osteócitos comunicam-se através dos chamados canalículos, pelo fato de estarem localizados no interior da matriz óssea, e são essenciais para sua manutenção, remodelando o osso de acordo com as necessidades fisiológicas do animal. Os osteoclastos localizam-se na periferia da superfície óssea, são multinucleados, móveis e responsáveis pela reabsorção do osso, participando do processo de remodelação do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

**Figura 3** – Esquema mostrando o processo de ossificação e suas respectivas células.



**Fonte:** Pizauro; Santos; Gonçalves (2017, p. 494).

As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, formando, respectivamente, o endóstio e o perióstio, revestimentos responsáveis pela manutenção do tecido. As células do perióstio diferenciam-se muito facilmente em osteoblastos, possuindo um importante papel no crescimento dos ossos e na reparação de fraturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Histologicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) e secundário (maduro ou lamelar). Como os próprios nomes sugerem, o primário é aquele que se forma inicialmente, tanto no desenvolvimento embrionário quanto na reparação de fraturas, sendo temporário e apresentando fibras colágenas dispostas de forma desorganizada. Por outro lado, o secundário substitui o primário e apresenta suas fibras de colágeno organizadas em lâminas (lamelas ósseas) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

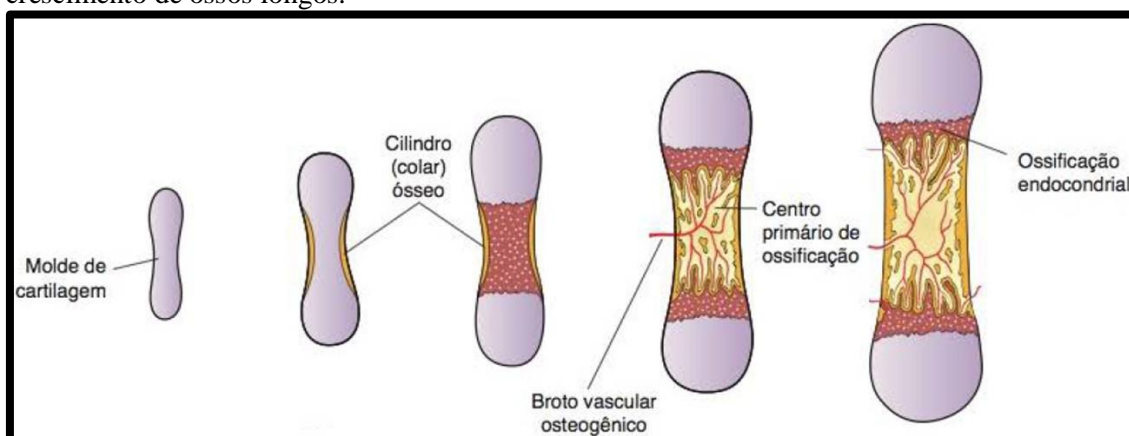
Morfologicamente e independentemente do mecanismo pelo qual ocorre a sua formação, o tecido ósseo apresenta-se nas formas de osso compacto (cortical) ou de osso esponjoso (trabecular). O compacto não apresenta cavidades visíveis, sendo responsável pela função mecânica e pela proteção, enquanto que o esponjoso possui muitas cavidades comunicantes (matriz porosa) e apresenta função metabólica (presença da medula óssea) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

A formação dos ossos ocorre por meio dos processos denominados de ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. A intramembranosa ocorre no interior das

membranas do tecido conjuntivo (endósteo e periósteo), por um processo direto de diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos. Tal processo é responsável pela formação dos ossos da abóbada craniana, alguns ossos faciais, partes da mandíbula e clavícula, contribuindo também para o crescimento dos ossos curtos e crescimento em espessura dos ossos longos. Na endocondral, ocorre um processo indireto no qual um molde cartilaginoso é progressivamente substituído por tecido ósseo, sem que haja a transformação de um tecido no outro. Esse processo é responsável pelo crescimento em extensão dos ossos longos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Em caso de fratura óssea, para que ocorra sua reparação, forma-se no local um tecido abundante em células osteoprogenitoras, surgindo tecido ósseo tanto pela ossificação intramembranosa, como pela ossificação endocondral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; SONG; LI; STOCUM, 2010).

A formação dos ossos longos, dos membros de mamíferos e aves, ocorre a partir da combinação dos dois mecanismos de osteogênese (Figura 4). Primeiramente, as células mesenquimais se condensam, formando um modelo de cartilagem que é circundado por periósteo, no qual as células osteoprogenitoras se diferenciam diretamente em osteoblastos, formando uma camada de células semelhante a um “colar” ao redor da região mediana (diáfise) do molde cartilaginoso do futuro tecido ósseo. Esse processo de ossificação intramembranosa é denominado de osteogênese periosteal (pericondral). Em seguida, o modelo de cartilagem é substituído por osso através da osteogênese endocondral, na qual ocorre hipertrofia e apoptose dos condrócitos, invasão dos capilares periosteais, trazendo células hematopoiéticas, que vão formar osteoclastos responsáveis pela degradação da matriz calcificada, e células osteoprogenitoras, que vão se diferenciar em osteoblastos e substituir o local antes ocupado pelos condrócitos. Todo esse processo começa no centro do osso (diáfise) e progride em direção às extremidades (epífises), formando, assim, a cartilagem epifisária, onde ocorre o processo de ossificação endocondral responsável pelo crescimento do animal (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017; SONG; LI; STOCUM, 2010).

**Figura 4** – Esquema mostrando a interação entre as ossificações periosteal e endocondral no crescimento de ossos longos.



Fonte: Junqueira; Carneiro (2013, p. 140).

O desenvolvimento e o crescimento dos ossos longos em anfíbios ocorrem da mesma forma, porém, não há ossificação significativa até a metamorfose (SONG; LI; STOCUM, 2010). Em rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), este processo ocorre essencialmente por ossificação periosteal, pois a calcificação da cartilagem hipertrófica e a formação de trabéculas ósseas estão presentes somente nos animais mais velhos (aproximadamente 2 anos de idade), fato que, provavelmente, está relacionado ao reforço das extremidades dos ossos devido ao ganho de peso do animal (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001).

### 2.3 Calcificação Biológica

Estudos de microscopia eletrônica mostraram que os primeiros cristais na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que precedem o crescimento de cristal extracelular, são encontrados dentro de pequenas vesículas de matriz extracelulares (VME), formadas por brotamento de regiões especializadas da membrana plasmática dos condrócitos, osteoblastos e odontoblastos. A geração dessas VME representa um mecanismo complexo, cuja função é a de realizar as etapas finais do processo de calcificação biológica em ambos os processos de ossificação. (ALI, 1976; ANDERSON, 1995; CUI et al., 2016; KIRSCH; WUTHIER, 1994; MARTINO; YEAGER; TAYLOR, 1979; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017; WUTHIER; LIPSCOMB, 2011).

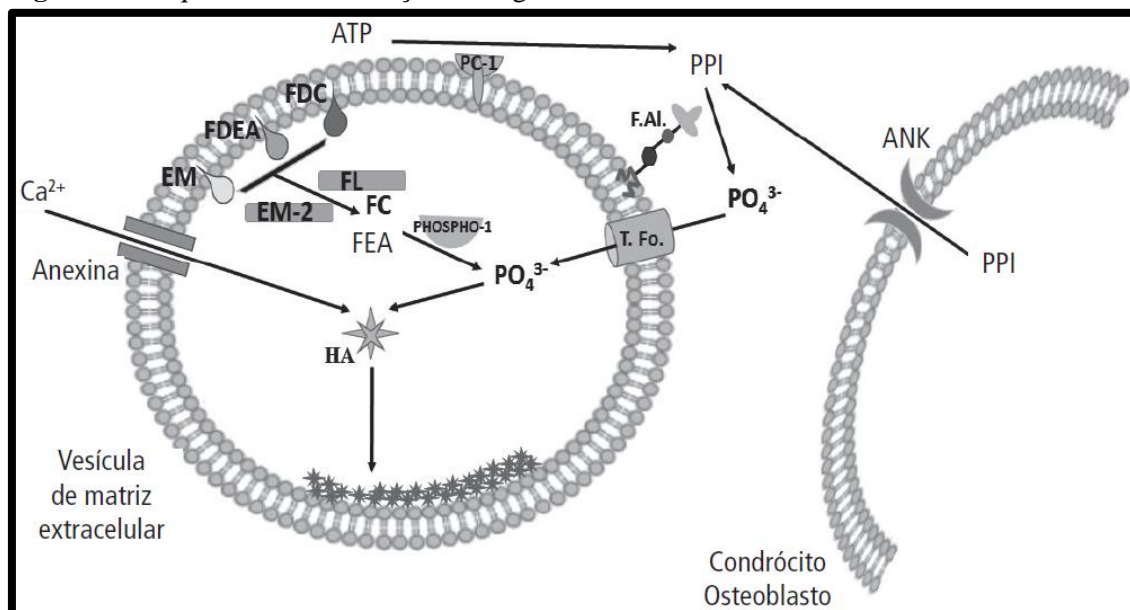
O papel dessas vesículas como mediadoras da deposição mineral é fortemente sugerido porque o local onde ocorrem os depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (ALI, 1976; ANDERSON, 1973; MARTINO; YEAGER;

TAYLOR, 1979), e porque os primeiros cristais foram detectados dentro dessas vesículas (ALI; EVANS, 1973; ANDERSON, 1973, 1976; 1995; BONUCCI, 1971; SELA et al., 2000; WUTHIER, 1977). Além disso, o interior das vesículas funciona como um microambiente, protegendo o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino mais solúvel, antes de se converter em cristais de hidroxiapatita; sendo verificado, ainda, que as vesículas isoladas apresentam também a capacidade de depositar sais de cálcio *in vitro* (ALI; EVANS, 1973; HSU; ANDERSON, 1977, 1978, 1986; REGISTER; WARNER; WUTHIER, 1984; WUTHIER; REGISTER, 1985).

Estudos realizados por vários pesquisadores, com o objetivo de determinar os tipos de lipídeos e de eletrólitos, e principalmente as enzimas presentes nas vesículas de matriz extracelular, tais como fosfatase alcalina, pirofosfatase (PPase), adenosina-5'-trifosfatase (ATPase), ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1), fosfatase órfã (PHOSPHO-1), dentre outros componentes que são importantes para o processo de calcificação biológica, como transportadores de cálcio (anexinas) e de fosfato para o interior das VME (ANDERSON, 1995; CASWELL; WHYTE; RUSSELL, 1986; GIJSBERS et al., 2001; JOHNSON et al., 2000; PIZAURO et al., 1998).

O modelo mais recente da calcificação (Figura 5) admite que, para haver a formação dos cristais de hidroxiapatita, faz-se necessário a liberação e transporte de fosfato inorgânico (Pi) para o interior das VME, processo realizado pela ação coordenada de enzimas. No interior da VME a produção inicial de Pi é realizada pela PHOSPHO1, que catalisa a hidrólise de fosfocolina e fosfoetanolamina liberando Pi. Tais substratos são formados a partir da hidrólise dos fosfolipídeos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomiéline, localizados no lado interno da membrana da vesícula, pela ação de fosfolipases e esfingomiélinase 2. Já no lado externo da VME, a PC-1 é responsável pela produção do substrato da fosfatase alcalina, o PPi, a partir da hidrólise do ATP, e a fosfatase alcalina hidrolisa o PPi liberando Pi. Finalmente, o cálcio é translocado para o interior da vesícula por anexinas, que atuam como canais de cálcio, enquanto o Pi é translocado para o interior das VME por transportadores. Deste modo, o aumento do produto iônico, cálcio versus fosfato, no interior das vesículas, acarreta a precipitação de fosfato de cálcio, levando à formação de cristais que perfuram a membrana da vesícula e extravasam, expondo hidroxiapatita pré-formada para o fluido extracelular, permitindo a propagação e deposição de hidroxiapatita nas fibras de colágeno presentes na matriz extracelular (MILLÁN, 2012; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

**Figura 5** – Esquema da Calcificação Biológica.



Esfingomielina (EM); Fosfatidiletanolamina (FDEA); Fosfatidilcolina (FDC); Fosfolipase (FL); Esfingomielinase-2 (EM-2); Fosfocolina (FC); Fosfoetanolamina (FEA); Fosfatase órfã (PHOSPHO-1); Fosfodiesterase Nucleotídeo Pirofosfatase (PC-1); Fosfatase Alcalina (F. Al.); Pirofosfato (PPI); Transportador de Fosfato (T. Fo.); Hidroxiapatita (HA).

**Fonte:** Pizauro; Santos; Gonçalves (2017, p. 510).

Estudos demonstraram que o PPI participa da regulação de vários eventos intra e extracelulares de uma grande variedade de tecidos, sugerindo que a regulação de sua síntese, degradação e transporte ocorrem através de mecanismos altamente especializados (ADDISON et al., 2007; LEONE et al., 1998; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997). O papel fisiológico do PPI extracelular tem sido bastante estudado, principalmente, com relação à mineralização biológica, verificando-se que ele é um potente inibidor deste processo (ADDISON et al., 2007). Segundo Addison et al. (2007) e Terkeltaub (2001), o PPI pode representar a molécula sinal responsável pelo controle da calcificação biológica tanto em condições normais como em patológicas, sugerindo que o aumento de sua concentração extracelular bloqueia o processo de calcificação (PIZAURO et al., 1988).

A fosfatase alcalina é a principal enzima responsável por regular a concentração de PPI extracelular, hidrolisando o pirofosfato, para manter a relação de PPI/Pi que permita a mineralização óssea normal. Além disso, a regulação da concentração do PPI também é realizada pela proteína transmembranar denominada ANK, que possui a habilidade de transportá-lo para o meio extracelular (MILLÁN, 2006, 2012).

Pesquisas demonstraram também que tanto a fosfatase alcalina como a PC-1 podem atuar nos papéis de ATPase e de PPase, em que, no caso, a fosfatase alcalina possui papel primário na liberação de Pi para a calcificação biológica, independentemente do

substrato, sendo a PC-1 uma enzima secundária nesses processos de hidrólise. Outro fator importante para o processo de calcificação é que a fosfatase alcalina é regulada alostericamente pelo ATP e inibida competitivamente pelo Pi (ANDERSON, 1995; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; MILLÁN, 2012; PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1993).

Além disso, algumas enzimas podem fornecer importantes informações sobre a atividade metabólica do tecido ósseo, por se tratarem de marcadores específicos destas células. Nesse sentido, a fosfatase ácida tartarato-resistente tem sido amplamente utilizada como um marcador específico de osteoclastos, enquanto a fosfatase alcalina tem sido usada como marcador de osteoblastos (GIJSBERS et al., 2001; JOHNSON et al., 2000).

## **2.4 Fosfomonohidrolases**

Além de possuir um importante papel na calcificação biológica e na fisiologia do tecido ósseo, o fósforo participa na composição dos ácidos nucleicos, do ATP, dos fosfolípidios da membrana celular, da regulação da atividade enzimática e de proteínas transportadoras, dentre outros processos, apresentando-se, portanto, como um nutriente essencial para os seres vivos, sendo considerado o segundo mineral mais abundante no organismo animal (GONÇALVES et al., 2015; PIZAURO et al., 1998).

Os mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas servem de base para controlar diversos eventos biológicos, como a regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento e morte celular, a expressão gênica, o transporte celular e a modulação de atividades enzimáticas (AOYAMA et al., 2003).

As enzimas denominadas fosfatases são fosfomonohidrolases que utilizam fosfomonoésteres como substratos e encontram-se amplamente distribuídas em animais, vegetais e microrganismos. Essas podem ser classificadas em 3 grupos principais: alcalinas, ácidas e proteínas fosfatases (AOYAMA et al., 2003).

As proteínas fosfatases podem ser divididas em dois grupos, as proteínas serina/treonina fosfatases e as proteínas tirosina fosfatases, de acordo com o resíduo de aminoácido do qual hidrolisam um fosfato (AOYAMA et al., 2003).

As fosfatases ácidas apresentam pH de atuação em torno de 5,0, e apresentam como substrato, compostos de baixa massa molecular (AOYAMA et al., 2003). No tecido ósseo de mamíferos podem ser encontradas a forma tartarato-sensível, geralmente associada aos



lisossomos das células ósseas, e a tartarato-resistente, presente somente nos osteoclastos, podendo estar ligada ou não à sua membrana (MINKIN, 1982). A fosfatase ácida tartarato-resistente é conhecida também como fosfatase ácida púrpura, pois apresenta esta coloração característica em solução concentrada, devido à presença de íons de ferro em seu sítio ativo (GUDDAT et al., 1999; SCHENK et al., 2013).

As fosfatases alcalinas atuam em pH básico e geralmente estão ligadas à membrana plasmática, através de uma “âncora” de fosfatidilinositol, porém isoformas solúveis já foram mencionadas por pesquisadores (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995; SHARMA; PAL; PRASAD, 2014). Nos seres humanos, estas enzimas são divididas em pelo menos quatro isoenzimas de acordo com o tecido em que são expressas, podendo ser classificadas em fosfatase alcalina de células germinativas, fosfatase alcalina placentária, fosfatase alcalina intestinal, e fosfatase alcalina do fígado/osso/rim, também conhecida como fosfatase alcalina tecido não-específico (SHARMA; PAL; PRASAD, 2014).

As fosfatases alcalinas são metaloenzimas homodiméricas (LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997). A presença de dois íons  $Zn^{2+}$  e um íon  $Mg^{2+}$  em cada subunidade é essencial para sua atividade enzimática e contribuem para a conformação monomérica, além de regular indiretamente as interações entre as subunidades (MILLÁN, 2006; SHARMA; PAL; PRASAD, 2014).

Além das classificações apontadas acima, as fosfatases podem ser constitutivas ou induzidas por fosfato, sendo as induzidas as que são sintetizadas apenas na presença de concentrações limitantes de fosfato e as constitutivas as sintetizadas independentemente da composição do meio em que atuam (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

A catálise enzimática é caracterizada pela interação entre substrato e sítio ativo. Uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, a temperatura, o pH, inibidores, a presença ou ausência de íons, entre outros, interferem na atividade enzimática (NELSON; COX, 2014).

O estudo dos inibidores possibilita investigar o mecanismo de atuação e de regulação da atividade enzimática, além de contribuir para a compreensão do papel de íons metálicos na manutenção, configuração nativa da molécula proteica, de sua estabilidade, atividade enzimática e a presença de isoenzimas. Nesse sentido, tem sido verificado que a fosfatase alcalina de diferentes origens é inibida competitivamente pelo fosfato inorgânico, um dos produtos da reação. Diversos inibidores da fosfatase alcalina são conhecidos e amplamente utilizados para a caracterização enzimática (PIZAURO et al., 1988).

O centro ativo é constituído por grupos funcionais, como cadeias laterais de aminoácidos específicos, íons metálicos e coenzima, importantes para a ligação do substrato ao sítio catalítico por interações iônicas, ligações de hidrogênio e posicionamento preciso para otimização da energia de ligação no estado de transição. A presença de metais na molécula enzimática é essencial tanto para a preservação da estrutura como para sua atividade máxima, auxiliando na orientação e/ou estabilização dos estados de transição (NELSON; COX, 2014).

Dentro desse contexto, a utilização de girinos e rãs da espécie *Lithobates catesbeianus* como modelo de estudo para os processos de ossificação dos membros, através da caracterização cinética da fosfatase alcalina e da atividade das fosfatases ácida e ácida tartarato-resistente, podem contribuir para a compreensão e futuras aplicações no mecanismo da reparação de fraturas e na prevenção de patologias relacionadas ao tecido ósseo, não somente em anuros, mas também nos demais vertebrados.

### 3 OBJETIVOS

Caracterizar cineticamente a fosfatase alcalina durante o processo de ossificação em *Lithobates catesbeianus*.

Estudar as atividades das fosfatases ácida e ácida tartarato-resistente associada aos processos de calcificação, remodelação e formação do tecido ósseo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), e no Laboratório de Enzimologia e Imunoquímica Aplicadas (LEIA) do Departamento de Tecnologia da UNESP, Campus de Jaboticabal – São Paulo.

### 4.1 Animais experimentais

Os procedimentos com animais, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCAV, protocolo nº 10315/15 (ANEXO A), estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

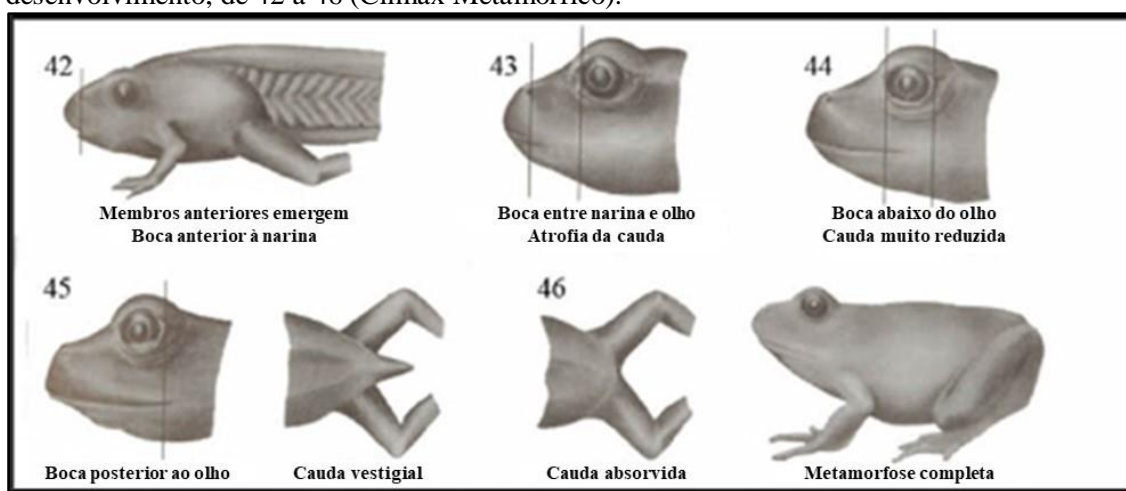
Os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros e a densidade utilizada foi de um girino para cada dois litros, com temperatura média de 27°C. Para alimentação foi fornecida ração comercial para peixes, constituída por aproximadamente 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de fibra bruta, fornecida três vezes ao dia até aparente saciação. Foram realizadas coletas dos girinos entre os estádios 42 e 46 (Clímax Metamórfico), segundo a tabela de Gosner (1960), período em que ocorre o maior desenvolvimento dos membros do animal. Devido à falta de animais no setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), também foram realizadas coletas dos girinos no ranário Ranamat, em Matão, São Paulo.

As rãs foram alojadas em baias de aproximadamente 12 m<sup>2</sup>, contendo locais para abrigo, calha de água central e alimentadores vibratórios dispostos linearmente. Foi fornecido fluxo contínuo de água a partir de um poço artesiano. Para alimentação foi fornecida ração comercial extrusada, constituída por aproximadamente 40% de proteína bruta, 10% de matéria mineral e 5% de fibra bruta. De acordo com as necessidades do experimento foram coletadas rãs, em fase de crescimento, com aproximadamente seis meses após a metamorfose (9 meses a 1 ano de idade).

## 4.2 Classificação dos girinos

Os girinos foram classificados, em estádios, segundo a tabela de Gosner (1960) (Figura 6), que classifica o desenvolvimento dos girinos baseada nas alterações morfológicas que ocorrem neste período, sendo esta classificação dividida em 46 estádios de desenvolvimento.

**Figura 6** – Parte da Tabela de Gosner (1960) para classificação dos girinos em estádios de desenvolvimento, de 42 a 46 (Clímax Metamórfico).



Fonte: Gosner (1960) – modificado pelo autor.

## 4.3 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, os animais foram dessensibilizados em água com gelo a 4°C, sendo os girinos (aproximadamente 500) guilhotinados (CZESNIK et al., 2006), separando-se a cabeça do corpo, e as rãs (aproximadamente 50) submetidas à concussão da medula espinhal. Em seguida, os membros posteriores foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C, separadamente.

Após o descongelamento, os tecidos moles e aderentes foram removidos dos fêmures com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas. Em seguida, os fêmures foram divididos em epífise e diáfise, moídos, separadamente, em aparelho tipo moinho, marca TECNAL, modelo TE 631, e depois foram homogeneizados em aparelho tipo TURRAX, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão TRIS.HCl 5 mM, pH 7,5 contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e ZnCl<sub>2</sub> 1 μM, na proporção de 1 grama de tecido para 5 mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C (Figura 7). Em seguida, uma quantidade pré-determinada do sobrenadante (SEB) foi alíquotada, congelada em

nitrogênio líquido e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ , para a utilização em ensaios posteriores. O restante do SEB foi utilizado na centrifugação diferencial.

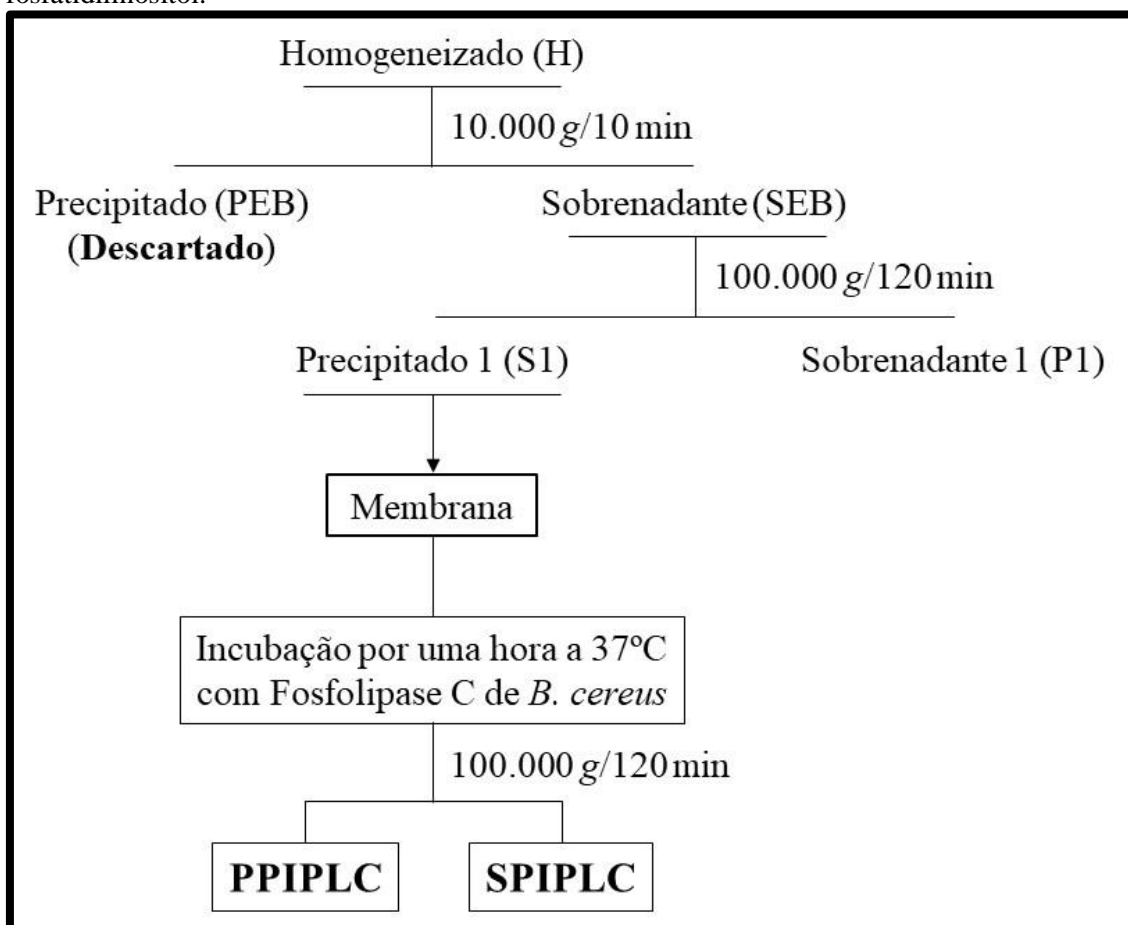
#### **4.4 Centrifugação Diferencial para obtenção das membranas celulares**

O sobrenadante (SEB) foi novamente centrifugado a  $100.000\text{ g}$  por 2 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, o sobrenadante (S1) foi aliqotado, e o precipitado (P1) foi solubilizado em homogeneizador tipo POTTER com tampão TRIS.HCl  $5\text{ mM}$ , pH 7,5 contendo  $\text{MgCl}_2$   $2\text{ mM}$  e  $\text{ZnCl}_2$   $1\text{ }\mu\text{M}$ . Uma quantidade pré-determinada do P1 foi aliqotada e o restante foi utilizado nos próximos passos da purificação (Figura 7).

#### **4.5 Remoção das proteínas ligadas à membrana celular através da “âncora” de fosfatidilinositol**

A amostra P1 foi incubada com fosfolipase C (PIPLC) em tampão TRIS.HCl  $5\text{ mM}$ , pH 7,5, contendo  $\text{MgCl}_2$   $2\text{ mM}$  e  $\text{ZnCl}_2$   $1\text{ }\mu\text{M}$ , a  $37^{\circ}\text{C}$  durante uma hora, mantida sob agitação constante (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995). Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a  $100.000\text{ g}$  durante duas horas, a  $4^{\circ}\text{C}$  (Figura 7). O sobrenadante obtido foi congelado e armazenado. O precipitado foi solubilizado em homogeneizador tipo POTTER, utilizando-se o mesmo volume inicial do tampão TRIS.HCl  $5\text{ mM}$ , pH 7,5, contendo  $\text{MgCl}_2$   $2\text{ mM}$  e  $\text{ZnCl}_2$   $1\text{ }\mu\text{M}$  (PIZAURO et al., 1988). O precipitado e o sobrenadante foram utilizados para avaliar o tipo de interação da enzima com a membrana.

**Figura 7** – Esquema para purificação de proteínas ligadas à membrana pela “âncora” de fosfatidilinositol.



H: Homogeneizado; PEB: Precipitado do Extrato Bruto; SEB: Sobrenadante do Extrato Bruto; P1: Precipitado 1, após primeira ultracentrifugação; S1: Sobrenadante 1, após primeira ultracentrifugação; PPIPLC: Precipitado após incubação com Fosfolipase C e segunda ultracentrifugação; SPIPLC: Sobrenadante após incubação com Fosfolipase C e segunda ultracentrifugação.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

#### 4.6 Determinação da atividade de *p*-nitrofenilfosfatase (*p*NFFase) da fosfatase alcalina (FAL), da fosfatase ácida (FAC) e da fosfatase ácida tartarato-resistente (FACTR)

A atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da formação do íon *p*-nitrofenolato ( $\epsilon=17600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH 13), nos tampões AMPOL 100 mM, pH 10,5, contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, ou Acetato 100mM, pH 5,0, ambos contendo *p*NFF 1 mM em um volume de 1 mL. No caso da FACTR, foi adicionado Tartarato de Sódio (100mM) no tampão Acetato. A reação foi sempre iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 1 M em tempos previamente estabelecidos. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro da marca Hitachi®, modelo U-2000, a 410 nm.

As determinações foram realizadas em triplicatas sendo que as velocidades iniciais permaneceram constantes durante pelo menos 90 minutos, com menos de 5% do substrato sendo hidrolisado. Em cada experimento foram incluídos controles sem a adição da enzima para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), nas condições padrões de ensaio.

#### 4.6.1 Efeito do pH sobre a atividade de *p*NFFase das fosfatases alcalina e ácida na fração SPIPLC

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatase alcalina e fosfatase ácida foi estudado utilizando-se as soluções tampão: Acetato (pH 4,5-6,5), TRIS.HCl (pH 6,5-8,5) e AMPOL (pH 8,5-11,0), na concentração de 100mM.

#### 4.6.2 Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC

O efeito de hidrólise do *p*NFF pela fosfatase alcalina solubilizada foi estudado utilizando-se AMPOL 100 mM, pH 10,5, contendo 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , variando-se a concentração de *p*NFF de 0,01 mM a 20 mM. O pH de cada mistura de reação foi medido antes e imediatamente após a reação, não sendo observado variações maiores que 0,05 unidades. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e a atividade de *p*NFFase foi determinada conforme descrito no item 4.6.

#### 4.6.3 Ação de compostos sobre a atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC

O estudo do efeito de diferentes compostos (levamisol, teofilina, zinco, fosfato e EDTA) sobre a atividade das fosfatases foi realizado utilizando-se concentrações compreendidas entre 100 $\mu\text{M}$  e 100mM, dependendo do composto.



#### 4.7 Determinação da atividade de Pirofosfatase (PPase) da fosfatase alcalina

A atividade de PPase da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente a 37°C, através da dosagem do fosfato liberado segundo o método descrito por Heinonen e Lahti (1981). A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação contendo tampão TRIS.HCl 100 mM, pH 8,0, em um volume final de 1 mL. Em tempos pré-estabelecidos a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução gelada de TCA 30% (p/v) e alíquotas de 0,5 mL foram utilizadas para a dosagem do fosfato inorgânico liberado. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro da marca Hitachi®, modelo U-2000, a 355 nm.

Em cada experimento foram incluídos controles, sem a enzima, para se estimar a hidrólise espontânea do substrato. As determinações foram feitas em triplicatas, sendo que as velocidades iniciais permaneceram constantes durante pelo menos 90 minutos, com menos de 5% do substrato sendo hidrolisado. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo 1 nmol de fosfato liberado por minuto por miligrama de proteína (U.mg<sup>-1</sup>), nas condições padrões de ensaio.

##### 4.7.1 Efeito do pH sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC

O efeito do pH sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina foi estudado utilizando-se as soluções tampão: TRIS.HCl (pH 6,5-8,5) e AMPOL (pH 8,5-11,0), na concentração de 100mM.

##### 4.7.2 Efeito da concentração do substrato sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC

O efeito de hidrólise do PPi pela fosfatase alcalina solubilizada foi estudado utilizando-se TRIS.HCl 100 mM, pH 8,0, variando-se a concentração de PPi de 0,001 mM a 2 mM. O pH de cada mistura de reação foi medido antes e imediatamente após a reação, não sendo observado variações maiores que 0,05 unidades. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e a atividade de PPase foi determinada conforme descrito no item 4.7.

#### 4.7.3 Ação de compostos sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC

O estudo do efeito de diferentes compostos (levamisol, teofilina, zinco e EDTA) sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina foi realizado utilizando-se concentrações compreendidas entre 100 $\mu$ M e 100mM, dependendo do composto.

#### 4.8 Dosagem de proteína

A concentração de proteína (mg/mL) foi determinada pelo método proposto por Bradford (1976) utilizando um kit comercial da Bio-Rad<sup>®</sup>, seguindo as especificações do fabricante, utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão proteico.

#### 4.9 Análise dos resultados

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2016). Todos os resultados foram submetidos a análises de variância. A normalidade dos erros foi avaliada (Kolmogorov-Smirnov) para assegurar a pressuposição das análises. Após a interação significativa entre os fatores foi realizado o desdobramento. Observado diferença significativa entre as variáveis analisadas, as médias dos desdobramentos foram comparadas por meio do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pesquisas acerca do papel das enzimas envolvidas no processo de ossificação de girinos e rãs são escassos na literatura e/ou ainda não estão muito bem estabelecidas, o que torna necessária a comparação dos resultados com outros animais, ou com outros tecidos (GONÇALVES, 2015; PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995; SIMÃO et al., 2007). A fosfatase alcalina está presente em vários tecidos de anfíbios que foram estudados, sendo suas características similares às de muitos invertebrados e vertebrados (McWHINNIE; OELTGEN; STILES, 1971).

Durante o período de metamorfose dos Anuros, ocorre a formação e em seguida o crescimento dos membros do animal, sendo verificado a presença dos dois processos de ossificação (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001). Já no caso das aves e dos mamíferos, quando o animal nasce, os membros já estão formados, observando-se somente crescimento dos ossos (PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017). Por este fato os girinos e rãs da espécie *Lithobates catesbeianus* foram escolhidos como modelo para estudar a ossificação periosteal e a endocondral, processos requeridos não somente durante o desenvolvimento e crescimento do tecido ósseo, mas também durante o reparo de fraturas (SONG; LI; STOCUM, 2010). Além disso, a compreensão do papel dessas enzimas pode auxiliar na prevenção e/ou cura de determinadas patologias ósseas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

Estudos demonstraram que a fosfatase alcalina é ligada à membrana biológica das vesículas de matriz extracelular (VME) produzidas pelos condrócitos, pelos osteoblastos e pelos osteócitos, através da “âncora” de fosfatidilinositol (PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017), e que a enzima fosfatidilinositol fosfolipase C específica (PIPLC) de *B. cereus* é capaz de hidrolisar essa molécula e liberar a fosfatase alcalina para o meio, sendo assim possível recuperar a enzima para o estudo das suas características cinéticas (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

O estudo da atividade da fosfatase alcalina, foi realizado nas diferentes regiões anatômicas do fêmur, diáfise e epífise, e nas diferentes fases de vida do animal, larval e adulta, com o objetivo de se acompanhar e compreender os processos de ossificação desde o início da formação até o crescimento em espessura e comprimento dos ossos dos membros da espécie *Lithobates catesbeianus*.

A tabela 1 apresenta a concentração de proteína (mg/mL), o fator de recuperação (FR) e as atividades enzimáticas (ATV), em todas as frações durante a purificação de proteínas.

**Tabela 1.** Concentração de proteína, atividades enzimáticas (U.mg<sup>-1</sup>) e fatores de recuperação nas frações da purificação de proteínas, na epífise e diáfise de girinos e rãs de *Lithobates catesbeianus*.

Regiões/ Frações	Proteína (mg/mL)	<i>p</i> NFFase		PPase		FAC		FACTR		
		ATV	FR	ATV	FR	ATV	FR	ATV	FR	
<i>Epífise de girinos</i>										
SEB	4,13±0,13	94,42±3,97	1,00	47,00±1,36	1,00	45,65±1,35	1,00	22,90±0,94	1,00	
S1	3,84±0,01	42,31±0,25	0,45	20,64±0,68	0,44	19,91±0,45	0,44	7,15±0,18	0,31	
P1	0,35±0,02	622,01±24,07	6,59	408,29±13,18	8,69	305,28±11,26	6,69	190,78±3,53	8,33	
SPIPLC	0,06±0,00	675,98±19,44	7,16	685,56±15,03	14,59	32,77±0,48	0,72	ND	ND	
PPIPLC	0,25±0,00	794,23±11,83	8,41	428,30±33,54	9,11	348,06±7,76	7,63	213,68±4,69	9,33	
<i>Diáfise de girinos</i>										
SEB	3,40±0,26	124,90±2,20	1,00	77,68±2,69	1,00	35,85±1,48	1,00	16,57±0,52	1,00	
S1	3,14±0,12	52,98±1,74	0,42	39,04±1,78	0,50	20,78±1,30	0,58	6,62±0,38	0,40	
P1	0,15±0,01	1249,12±19,42	10,00	736,45±27,17	9,48	248,92±14,15	6,94	115,99±9,51	7,00	
SPIPLC	0,03±0,00	1028,08±15,43	8,23	1632,94±23,53	21,02	29,59±0,84	0,83	21,59±1,83	1,30	
PPIPLC	0,07±0,00	1911,16±11,19	15,30	1532,56±20,13	19,73	222,83±5,56	6,22	116,56±14,02	7,03	
<i>Epíffises de rãs</i>										
SEB	0,68±0,03	221,45±7,29	1,00	219,14±0,77	1,00	38,25±1,42	1,00	20,03±1,33	1,00	
S1	0,58±0,01	80,34±2,48	0,36	68,62±0,83	0,31	23,99±0,67	0,63	15,63±0,58	0,78	
P1	0,05±0,00	2174,30±57,59	9,82	1327,37±6,15	6,06	113,86±4,54	2,98	37,42±12,43	1,87	
SPIPLC	0,03±0,00	1723,65±30,31	7,78	1982,97±83,96	9,05	13,27±0,88	0,35	ND	ND	
PPIPLC	0,04±0,00	2742,73±19,23	12,39	1072,35±14,07	4,89	109,94±4,81	2,87	32,87±8,01	1,64	
<i>Diáfise de rãs</i>										
SEB	0,17±0,03	0,819±0,10	1,00	ND	ND	3,644±0,06	1,00	1,146±0,09	1,00	
S1	0,15±0,01	0,470±0,03	0,57	ND	ND	3,423±0,09	0,94	1,058±0,05	0,92	
P1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
SPIPLC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
PPIPLC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

*p*NFFase = Atividade de *p*-nitrofenilfosfatase da Fosfatase alcalina; PPase = Atividade de Pirofosfatase da Fosfatase Alcalina; FAC = Fosfatase ácida; FACTR = Fosfatase ácida tartarato-resistente; ATV = Atividade Enzimática; FR = Fator de Recuperação; ND = Não Detectado.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

A concentração de proteína e o fator de recuperação (FR) durante a purificação de proteínas, mostra que a enzima de interesse foi parcialmente purificada, pois nota-se diminuição de proteína na amostra e aumento do fator de recuperação a cada etapa, bem como aumento da atividade enzimática na fração de interesse (Tabela 1).

A detecção das atividades das enzimas tanto no S1 quanto no P1, durante a purificação de proteínas, (Tabela 1) indica a presença de fosfatases alcalinas (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995, PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017; SIMÃO et al., 2007) e ácidas (GONÇALVES, 2017; MENZ et al., 1991; MINKIN, 1982; WIESE et al., 1996), na epífise e diáfise de girinos e na epífise de rãs, tanto solúveis quanto ligadas à membrana, destacando-se que todas as enzimas são mais encontradas ligadas de algum modo à membrana do que na forma solúvel, (Tabela 1). No caso da diáfise de rãs, não foi possível quantificar as proteínas e detectar atividade enzimática no P1 e nas frações dos processos subsequentes (SPIPLC e PPIPLC) (Tabela 1).

Com relação às frações SPIPLC e PPIPLC, nota-se que nem toda fosfatase alcalina foi liberada da membrana pela ação da PIPLC de *B. cereus*, porém os fatores de recuperação (FR) e as atividades de *p*NFFase e de PPase mostram que foram liberadas quantidades suficientes de fosfatase alcalina para que fossem realizados os estudos necessários com a fração SPIPLC. Pizauro, Ciancaglini e Leone (1995) mostraram em seu trabalho que a utilização da enzima PIPLC de *B. cereus* não era tão efetiva na clivagem da “âncora” de fosfatidilinositol quanto a PIPLC de *B. thuringiensis*, portanto, é provável que parte das atividades enzimáticas das fosfatases alcalinas na fração PPIPLC são das enzimas que permaneceram ligadas à membrana das VME (Tabela 1).

Comparando-se somente as fosfatases ácida e ácida tartarato-resistente, nas duas regiões ósseas e nas duas fases de vida do animal (Tabela 1), ambas relacionadas à reabsorção do tecido ósseo, nota-se maior atividade da primeira em relação à segunda, fato que pode ser explicado pela presença de fosfatase ácida nos osteoblastos, nos osteócitos e nos osteoclastos, geralmente associadas aos lisossomos, enquanto que a fosfatase ácida tartarato-resistente está presente somente nos osteoclastos, associadas ou não às membranas das células ósseas (MINKIN, 1982).

Analisando-se as atividades enzimáticas obtidas de girinos, em todas as frações da purificação de proteínas (Tabela 1), podemos verificar que as atividades de *p*NFFase e de PPase da fosfatase alcalina apresentam valores numericamente maiores do que as atividades das fosfatases ácida e ácida tartarato-resistente, tanto na epífise quanto na diáfise. Partindo do pressuposto de que a fosfatase alcalina é considerada um marcador bioquímico dos osteoblastos, células responsáveis pela formação do tecido ósseo, e que a fosfatase ácida

tartarato-resistente é considerada um marcador bioquímico dos osteoclastos, células responsáveis pela remodelação do tecido ósseo (GIJSBERS et al., 2001; JOHNSON et al., 2000; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017), pode-se afirmar que, nessa fase, ocorre maior crescimento ósseo do que reabsorção, tanto em espessura quanto em comprimento, pois os membros do animal estão no início do seu desenvolvimento (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Comparando-se somente as regiões ósseas dos girinos (Tabela 1), há maior atividade da fosfatase alcalina na diáfise em relação à epífise, enquanto que a atividade das fosfatases ácidas é maior na epífise do que na diáfise, confirmando que os ossos começam a ser formados pelo centro, seguindo em direção às extremidades (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; FLORENCIO-SILVA et al., 2015; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LONG; ORNITZ, 2013; PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017; SONG; LI; STOCUM, 2010; WU; CHEN; LI, 2016), possibilitando a formação, e o crescimento em espessura e comprimento pelos dois tipos de ossificação necessários para a transição do animal do ambiente aquático para o meio terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003).

No caso das rãs (Tabela 1), podemos verificar que, na epífise, as atividades das enzimas seguem o mesmo padrão encontrado nos girinos, com as atividades da fosfatase alcalina mais altas do que as das fosfatases ácidas. Já na diáfise, os valores das atividades das fosfatases ácidas e da atividade de *pNFFase* da fosfatase alcalina são baixos nas frações SEB e S1, e não foram detectados nas frações P1, SPIPLC e PPIPLC. No caso da PPase, não foi detectada atividade em nenhuma das frações (Tabela 1).

O perfil das atividades enzimáticas nas duas regiões ósseas das rãs evidencia que, na fase adulta, os ossos trabeculares já estão formados e rígidos o suficiente para permitir que o animal se locomova através de saltos no ambiente terrestre (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Assim sendo, ainda é necessário que ocorra o crescimento longitudinal dos ossos longos, além da manutenção do seu diâmetro, possibilitando o crescimento do animal, bem como o aumento de sua massa corpórea (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Nesse sentido, estudos demonstraram que em regiões já mineralizadas, as atividades da fosfatase alcalina tendem a diminuir (McWHINNIE; OELTGEN; STILES, 1971), o que também pode ser observado no presente trabalho.

Após o tratamento das amostras com a PIPLC de *B. cereus*, o fator de recuperação (FR) na fração SPIPLC da fosfatase alcalina é maior para a atividade de PPase do que para a atividade de *pNFFase*. Ainda não temos uma explicação para esse fato, embora o pirofosfato seja

considerado o verdadeiro substrato da fosfatase alcalina durante o processo de calcificação *in vivo* (MILLÁN, 2006; REZENDE et. al., 1998).

Em contrapartida, o fator de recuperação das fosfatases ácidas na fração PPIPLC é muito maior do que na fração SPIPLC, indicando que elas permanecem em sua maioria ligadas à membrana biológica, sugerindo que tais enzimas não estão associadas à membrana pela “âncora” de fosfatidilinositol (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

As atividades de *p*NFFase são maiores que as atividades de PPase em todas as frações da purificação de proteínas, exceto na fração SPIPLC, que é a fração de interesse do trabalho, sugerindo que existem enzimas, além da fosfatase alcalina, que hidrolisam o *p*NFF, com exceção da pirofosfatase (LEONE et al, 1998).

O presente trabalho também teve como objetivo estudar cineticamente as atividades da fosfatase alcalina, logo, após a purificação de proteínas, foi utilizada a fração SPIPLC de cada amostra para dar continuidade aos estudos. Assim, pelo fato de não ter sido possível dosar as proteínas e nem detectar as atividades da fosfatase alcalina na fração SPIPLC da diáfise das rãs (Tabela 1), somente as outras três amostras foram utilizadas nos próximos ensaios.

As análises de variância dos tratamentos demonstram uma interação entre as enzimas e regiões ósseas (Tabela 2), os desdobramentos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2** – ANOVA e resultado da comparação de Médias da atividade específica de *p*NFFase e de PPase da fosfatase alcalina (nmol/min/mg), na fração SPIPLC da purificação de proteínas, das regiões ósseas de girinos (epífise e diáfise) e de rãs (epífise).

Fatores		
Atividades enzimáticas	Regiões ósseas	Atividade específica (nmol/min/mg)
<i>p</i> NFFase		1142,57
PPase		1433,82
	<i>Epífise girinos</i>	680,77
	<i>Diáfise girinos</i>	1330,51
	<i>Epífise rãs</i>	1853,31
<i>Análise de variância: valores de p</i>		
	Enzimas	<0,001**
	Regiões ósseas	<0,001**
	Enzimas X Regiões ósseas	<0,001**
	CV%	3.07%

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade; CV% = coeficiente de variação.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.



**Tabela 3** – Desdobramentos das atividades da enzima e das regiões ósseas. Médias da atividade específica de *p*NFFase e de PPase da fosfatase alcalina (nmol/min/mg), na fração SPIPLC da purificação de proteínas, das regiões do tecido ósseo de girinos e rãs.

Atividades enzimáticas	Regiões ósseas		
	<i>Epífise girinos</i>	<i>Diáfise girinos</i>	<i>Epífise rãs</i>
<i>p</i> NFFase	675,98±19,44 <sup>C</sup>	1028,08±15,43 <sup>bB</sup>	1723,65±30,31 <sup>bA</sup>
PPase	685,56±15,03 <sup>C</sup>	1632,94±23,53 <sup>aB</sup>	1982,97±83,96 <sup>aA</sup>

Médias seguidas por letras iguais, maiúsculas na linha e minúscula na coluna, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

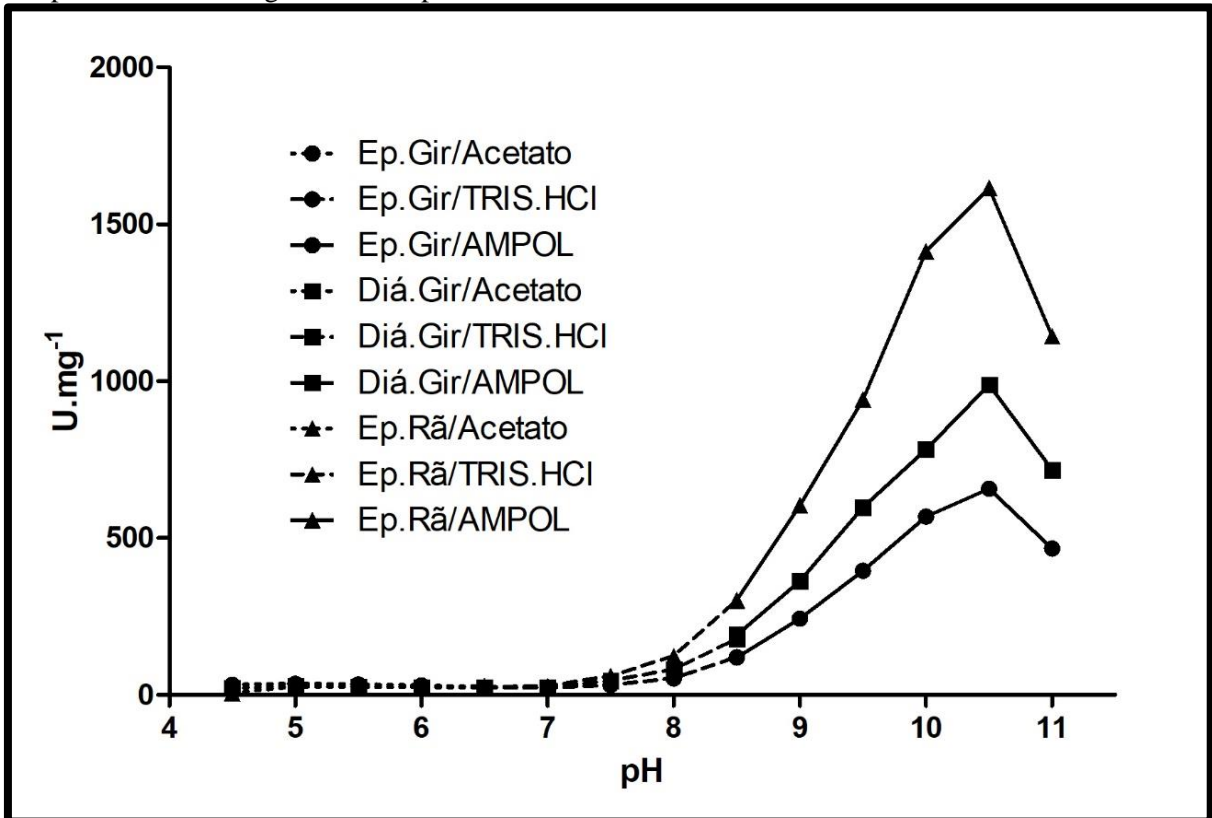
**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os resultados evidenciam diferenças estatísticas entre as enzimas (Tabela 3), indicando que a região óssea com valores significativamente maiores para ambas as enzimas é na epífise de rãs, seguido da diáfise dos girinos, e os menores valores são apresentados na epífise dos girinos. Isso ocorre provavelmente devido ao fato de que os ossos começam a ser formados pela região central e progridem no sentido das extremidades, na fase larval do animal, enquanto no animal adulto, os ossos encontram-se bem formados na região central e passam a crescer em extensão, processo que ocorre na epífise através da ossificação endocondral. (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017).

Quando as atividades são comparadas em relação aos diferentes substratos, os maiores valores foram os de PPase, exceto para a epífise de girinos, que não diferiu estatisticamente. Embora a atividade de PPase seja maior, é possível traçar um perfil de hidrólise e cinético da fosfatase alcalina utilizando-se o *p*NFF como substrato (LEONE et al, 1998).

O estudo do efeito do pH sobre a atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina, presente na fração SPIPLC (Figura 8), revelou que o pH ótimo aparente de hidrólise do *p*NFF, foi 10,5 tanto na epífise e na diáfise dos girinos, quanto na epífise das rãs, resultados semelhantes aos observados para fosfatase alcalina de outras origens (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979), como em ossos de *Rana pipiens*, com pH de 10,4 (McWHINNIE; OELTGEN; STILES, 1971), em ossos de ratos, com pH de 9,4 (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995), em VME artificiais, com pH de 10,0 (SIMÃO et al., 2010), e em cauda de girinos de *Lithobates catesbeianus*, com pH de 10,5 (GONÇALVES et al., 2015).

**Figura 8** – Efeito do pH sobre a atividade de pNFFase da fosfatase alcalina presente na fração SPIPLC da epífise e diáfise de girinos e da epífise de rãs.

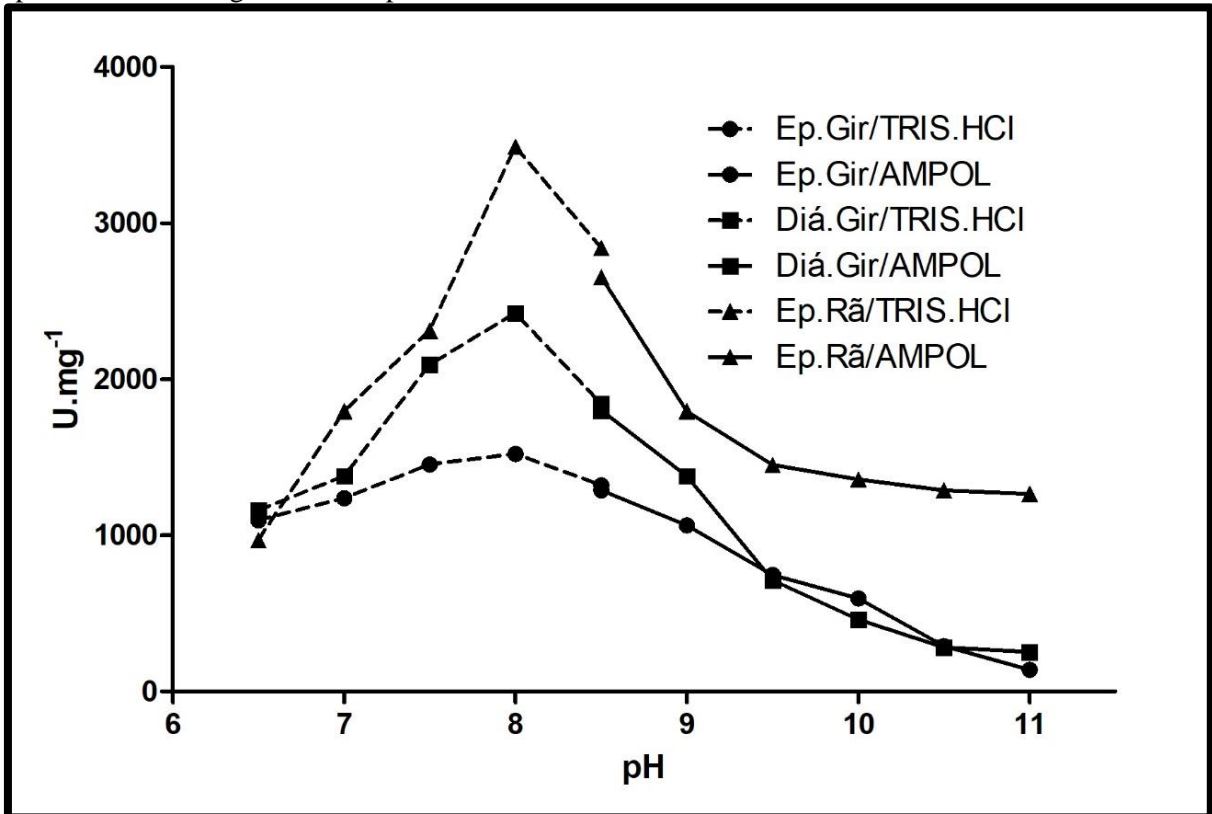


Ep. Gir – epífise de girinos; Diá. Gir – diáfise de girinos; Ep. Rã – epífise de rãs.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática de PPase da fosfatase alcalina presente na fração SPIPLC (Figura 9), revelou que o pH ótimo aparente de hidrólise do PPi, foi 8,0, tanto na epífise e diáfise dos girinos, quanto na epífise das rãs, resultados semelhantes aos obtidos em pesquisas que utilizaram o mesmo substrato, como em estudos com ossos de ratos, apresentando pH ótimo aparente também no valor 8,0 (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995; REZENDE et. al., 1998) e estudos com VME artificiais com valor de pH igual a 9,0 (SIMÃO et al., 2010).

**Figura 9** – Efeito do pH sobre a atividade de PPase da fosfatase alcalina presente na fração SPIPLC da epífise e diáfise de girinos e da epífise de rãs.



Ep. Gir – epífise de girinos; Diá. Gir – diáfise de girinos; Ep. Rã – epífise de rãs.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os resultados semelhantes de pH ótimo aparente de atuação da fosfatase alcalina entre as regiões ósseas nas diferentes fases de vida do animal, para cada substrato (Figuras 8 e 9), sugerem que, independentemente do tipo de ossificação que está ocorrendo, trata-se da atuação da mesma enzima ou de isoenzimas durante o processo (SHARMA, PAL, PRASAD, 2014). A diferença de pH de atuação entre os substratos deve-se ao fato de que o  $PPi$  é o provável substrato fisiológico da fosfatase alcalina, logo, a atividade fica mais próxima do pH fisiológico. Já a atuação sobre o  $pNFF$  em pH mais alcalino é similar aos resultados observados para a fosfatase alcalina de outros tecidos (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

O estudo do efeito de diferentes compostos sobre as atividades da fosfatase alcalina na fração SPIPLC (Tabela 4), apresentou comportamento similar quando se compara de forma independente a atividade residual de  $pNFFase$  e a de  $PPase$  nas diferentes regiões ósseas. Tal fato sugere que provavelmente trata-se da mesma enzima atuando nas diferentes regiões ósseas nas diferentes fases de vida do animal, independentemente do tipo de ossificação que ocorre.

**Tabela 4** – Estudo do efeito de diferentes compostos sobre as atividades de *p*NFFase e de PPase da fosfatase alcalina na fração SPIPLC.

Atividade Residual (%)	Inibidores					
	Controle	Levamisol (100mM)	Teofilina (1mM)	Zinco (100µM)	Fosfato (10mM)	EDTA (100mM)
<i>Epífise de girinos</i>						
<b><i>p</i>NFFase</b>	100	94,20 <sup>1</sup>	84,38	70,46	83,60	32,33
<b>PPase</b>	100	89,80	69,80	104,08 <sup>2</sup>	--- <sup>3</sup>	23,67
<i>Diáfise de girinos</i>						
<b><i>p</i>NFFase</b>	100	94,27 <sup>1</sup>	83,61	69,54	83,37	34,41
<b>PPase</b>	100	87,50	71,47	109,29 <sup>2</sup>	--- <sup>3</sup>	21,47
<i>Epífise de rãs</i>						
<b><i>p</i>NFFase</b>	100	97,48 <sup>1</sup>	87,30	72,88	88,04	33,68
<b>PPase</b>	100	85,63	70,99	100,28 <sup>2</sup>	--- <sup>3</sup>	25,35

<sup>1</sup> - No caso do Levamisol (100mM), não houve inibição da atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina, haja visto que foi considerado inibição somente valores acima de 5%.

<sup>2</sup> - No caso do Zinco (100µM), o valor maior do que o Controle apresentado pela atividade de PPase, não é considerado uma indução de atividade por ser um aumento sutil.

<sup>3</sup> - A atividade de PPase não pôde ser mensurada na presença de Fosfato (10mM) pelo fato de que a metodologia de determinação desta atividade enzimática é realizada através da Dosagem de Fosfato liberado em solução após a atividade da enzima.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Na presença de levamisol (100mM) não houve inibição (maior que 5%) na atividade de *p*NFFase da fosfatase alcalina dos ossos de girinos e rãs (Tabela 2), ao contrário do que foi demonstrado por Simão et al. (2007) em seus estudos com ossificação ectópica e medula óssea de ratos, em que este composto foi um dos que mais inibiu esta atividade enzimática. No caso da atividade de PPase, houve uma inibição de aproximadamente 12%, sugerindo que a ligação do substrato ao sítio catalítico da enzima não acarretou alteração conformacional que expusesse o sítio de ligação do inibidor (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

A teofilina é um análogo estrutural de aminoácidos, e pode ocupar um sítio de ligação que pode ser exposto quando a enzima reage com o *p*NFF (FARLEY; IVEY; BAYLINK, 1980). Na presença desse composto (1mM), a inibição da atividade de *p*NFFase foi de aproximadamente 15% (Tabela 4), valor relativamente baixo quando comparado com outros estudos (GONÇALVES, 2017; SIMÃO et al., 2007). Para a atividade de PPase, a teofilina apresentou uma inibição de aproximadamente 30%.

No que diz respeito à inibição, de aproximadamente 30%, pelo zinco (100µM) na atividade de *p*NFFase (Tabela 4), tem sido proposto que esse íon atua deslocando o magnésio do seu sítio catalítico, inibindo a atividade de fosfatase alcalina do tecido ósseo (PIZAURO et

al., 1998). Porém, no estudo da atividade de PPase, realizada na ausência de magnésio, não houve inibição, sugerindo que o verdadeiro substrato da enzima é o PPi e não o complexo PPi-Mg (LEONE et al., 1998).

No caso do fosfato inorgânico (10mM), houve inibição baixa (aproximadamente 15%) na atividade de *pNFFase* (Tabela 4), apesar de sua concentração apresentar um papel importante na regulação do processo de ossificação (MILLÁN, 2012). Não foi possível realizar o experimento para analisar a inibição desse composto na atividade de PPase, pois a metodologia utilizada quando se usa esse substrato dosa a quantidade de fosfato inorgânico liberada no meio de reação (HEINONEN; LAHTI, 1981).

A maior inibição das atividades enzimáticas ocorreu na presença de EDTA (100mM), sendo de aproximadamente 67% para a atividade de *pNFFase* e 77% para a de PPase (Tabela 4), sugerindo que a fosfatase alcalina dos ossos de girinos e rãs de *Lithobates catesbeianus* é uma metaloenzima (SHARMA, PAL, PRASAD, 2014), assim como proposto por Pizauro et al. (1998) em seus estudos com placa óssea de ratos, ou que o composto acarreta mudanças conformacionais através de interações com a molécula (CURTI et al., 1987).

O estudo do efeito da concentração dos substratos *pNFF* e PPi sobre a atividade da fosfatase alcalina foi realizado na fração SPIPLC da epífise e diáfise de girinos e da epífise de rãs (Tabela 5).

**Tabela 5** – Parâmetros cinéticos para as atividades ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1} \pm$  erro padrão da média) de *p*NFFase e de PPase da fosfatase alcalina presente na fração SPIPLC.

Parâmetros cinéticos				
	$V_{\max}$	$K_m$	$n_H$	$V_{\max}/K_m$
<i>Epífise de girinos</i>				
<b><i>p</i>NFFase</b>	800,20±2,82	0,63±0,009	1,04±0,012	1269,76
<b>PPase</b>	704,60±14,77	0,01±0,001	1,45±0,15	73480,03
<i>Diáfise de girinos</i>				
<b><i>p</i>NFFase</b>	1157,00±8,40	0,59±0,017	1,04±0,027	1960,68
<b>PPase</b>	2093,00±57,47	0,07±0,008	1,10±0,12	28916,83
<i>Epífise de rãs</i>				
<b><i>p</i>NFFase</b>	1885,00±9,54	0,60±0,012	1,01±0,019	3160,63
<b>PPase</b>	2248,00±96,32	0,11±0,017	1,00±0,16	20911,63

$V_{\max}$  = velocidade máxima;  $K_m$  = constante de Michaelis-Menten;  $n_H$  = coeficiente de Hill. As análises foram realizadas no GraphPad Prism versão 5.01, para estimar os valores de  $V_{\max}$  e  $K_m$  foi utilizado o modelo matemático  $Y = V_{\max} * X / (K_m + X)$ . Para calcular o coeficiente de Hill foi utilizado o modelo  $Y = V_{\max} * X^h / (K_{prime} + X^h)$ .

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Os valores de  $V_{\max}$ , para *p*NFFase e PPase diferiram, porém seguiram o mesmo padrão quando se compara as diferentes regiões ósseas, sendo maiores nas epífises das rãs, seguidas da diáfise dos girinos e sendo menores na epífise dos girinos, indicando mais uma vez o padrão de formação e crescimento do osso durante o desenvolvimento do animal, do centro para as extremidades, uma vez que onde há mais atividade enzimática, há maior formação do tecido ósseo (FELISBINO; CARVALHO, 1999, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; PIZAURO; SANTOS; GONÇALVES, 2017; SONG; LI; STOCUM, 2010).

O valor de  $V_{\max}$ , na fração SPIPLC, foi de 800,20  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  na epífise de girinos, de 1157,00 na diáfise de girinos, e de 1885,00 na epífise de rãs (Tabela 5), enquanto que os valores de  $V_{\max}$  da atividade de PPase, foram de 704,60  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  na epífise de girinos, de 2093,00 na diáfise de girinos, e de 2248,00 na epífise de rãs (Tabela 5). Tais resultados demonstram que, independentemente da fosfatase alcalina utilizar o substrato cromogênico (*p*NFF) ou o fisiológico (PPi), a maior atividade se deve à maior formação de tecido ósseo na epífise de rãs, provavelmente devido ao tamanho do animal. E com relação ao girino, a maior formação do

tecido ósseo ocorre na diáfise em relação à epífise. Em seus estudos com *Rana catesbeiana* (atualmente denominada de *Lithobates catesbeianus*), Felisbino e Carvalho (1999, 2001), propõem que, na fase larval, a ossificação do tipo periosteal é a principal responsável pelo crescimento tanto em diâmetro quanto em comprimento, e que na fase adulta, a ossificação periosteal também continua sendo a principal responsável pelo crescimento e formação dos ossos dos membros das rãs, apresentando apenas uma pequena quantidade de ossificação endocondral, responsável, em parte, pelo crescimento longitudinal do referido tecido.

Comparando-se os valores de  $K_m$  das atividades de *p*NFFase (Tabela 5), nota-se valores semelhantes (aproximadamente 0,6 mM) na epífise e diáfise de girinos e na epífise de rãs, sugerindo que se trata da mesma enzima atuando nas diferentes regiões do osso e nas diferentes fases de vida do animal. Outra semelhança que pôde ser verificada nas três amostras estudadas, é que não foi observado interações sítio-sítio ( $n_H$  aproximadamente igual a 1,0), o que indica comportamento “Michaeliano” das enzimas (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

Em contrapartida, os valores de  $K_m$  observados para PPase são menores, indicando maior afinidade da enzima pelo PPi, resultado que apoia a suposição de que esse é o substrato fisiológico da fosfatase alcalina (MILLÁN, 2006; REZENDE et. al., 1998). Os valores de  $n_H$  para estas atividades também se encontram dentro de uma faixa de valores em que é possível considerar que as enzimas de fato apresentam comportamento “Michaeliano” (Tabela 5) (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

Os valores de  $V_{max}/K_m$ , que indicam a eficiência das atividades enzimáticas, mostram que, a eficiência sobre o PPi é bem maior, resultado que confirma o fato deste ser o substrato fisiológico da enzima (MILLÁN, 2006; REZENDE et. al., 1998).

## 6 CONCLUSÕES

O presente estudo mostra que a fosfatase alcalina liberada da membrana pela ação da PIPLC de *B. cereus* apresenta as mesmas propriedades cinéticas em relação ao pH ótimo de atuação, afinidade pelos substratos e a ação de compostos, nas diferentes regiões ósseas, independentemente do tipo de ossificação que está ocorrendo, e nas diferentes fases de vida do animal, tanto aquática quanto terrestre.

Os resultados do trabalho são semelhantes aos de estudos realizados com outros vertebrados, o que indica a conservação dos genes das enzimas estudadas durante o processo evolutivo, demonstrando o potencial dos anfíbios como ótimos modelos animais para o estudo do processo de calcificação biológica.



## REFERÊNCIAS

- ADDISON, W. N.; AZARI, F.; SORENSEN, E. S.; KAARTINEN, M. T.; McKEE, M. D. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15872-15883, 2007.
- ALI, S. Y. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. **Federation Proceedings**, v. 35, n. 2, p. 135-142, 1976.
- ALI, S. Y.; EVANS, L. The uptake of [<sup>45</sup>Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 2, p. 647-650, 1973.
- ANDERSON, H. C. Calcium-accumulating vesicles in the intercellular matrix of bone. In: **HARD tissue growth: repair and remineralization**. Amsterdam: Elsevier, 1973. p. 213-226. (Ciba foundation symposium, 11).
- ANDERSON, H. C. Matrix vesicle calcification. **Federation Proceedings**, v. 35, p. 105-108, 1976.
- ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 314, p. 266-280, 1995.
- AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.
- ATKINSON, B. G.; WARKMAN, A. S.; CHEN, Y. Thyroid hormone induces a reprogramming of gene expression in the liver of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles. **Wound Repair Regeneration**, v. 6, n. 4, p. 323-337, 1998.
- BONUCCI, E. The locus of initial calcification in cartilage and bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 78, p. 108-139, 1971.
- BOTH, C.; LINGNAU, R.; SANTOS-JR., A.; MADALOZZO, B.; LIMA, L. P.; GRANT, T. Widespread occurrence of the American Bullfrog, *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) (Anura: Ranidae), in Brazil. **South American Journal of Herpetology**, v. 6, n. 2, p. 127-134, 2011.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BUCKBINDER, L.; BROWN, D. D. Cloning and developmental expression of *Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes. **Proceedings of the National Academy of Science United States of America**, v. 90, n. 9, p. 3820-3824, 1993.
- CASWELL, A. M.; WHYTE, M. P.; RUSSELL, R. G. Normal activity of nucleoside triphosphate pyrophosphatase in alkaline phosphatase-deficient fibroblasts from patients with infantile hypophosphatasia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 63, n. 5, p. 1237-1241, 1986.

CUI, L.; HOUSTON, D. A.; FARQUHARSON, C.; MACRAE, V. E. Characterisation of matrix vesicles in skeletal and soft tissue mineralisation. **Bone**, v. 87, p. 147-158, 2016.

CURTI, C., PIZAURO, J. M., CIANCAGLINI, P., LEONE, F. A. Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix-induced alkaline phosphatase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 33, p. 625-635, 1987.

CZESNIK, D.; KUDUZ, J.; SCHILD D.; MANZINI, I. ATP activates both receptor and sustentacular supporting cells in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis* tadpoles. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 119-128, 2006.

DODD, M. H. I.; DODD, J. M. The biology of metamorphosis. In: LOFTS, B. (Ed.). **Physiology of the amphibia**. New York: Academic Press, 1976. v. 3. p. 467-599.

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGraw-Hill. 1994. 672 p.

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

FARLEY, J. R.; IVEY, J. L.; BAYLINK, D. J. Human skeletal alkaline phosphatase: kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 255, n. 10, p. 4680-4686, 1980.

FELISBINO, S. L.; CARVALHO, H. F. The epiphyseal cartilage and growth of long bones in *Rana catesbeiana*. **Tissue and Cell**, v. 31, n. 3, p. 301-307, 1999.

FELISBINO, S. L.; CARVALHO, H. F. Growth cartilage calcification and formation of bone trabeculae are late and dissociated events in the endochondral ossification of *Rana catesbeiana*. **Cell and Tissue Research**, v. 306, p. 319-323, 2001.

FLORENCIO-SILVA, R.; SASSO, G. R. S.; SASSO-CERRI, E.; SIMÕES, M. J.; CERRI, P. S. Biology of bone tissue: structure, function and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-17, 2015.

GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; BOLLEN, M. Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 2, p. 1361-1368, 2001.

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Activity of Tail Phosphatases: A Study during Growth and Metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 103, n. 3, p. 634-638, 2015.

GONÇALVES, A. M. **Purificação e Caracterização de Isoformas de Fosfomonohidrolases Presentes na Cauda de Girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) Durante o Desenvolvimento Larval**. 2017. 78 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

GOSNER, K. L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. 3, p. 183-190, 1960.

GUDDAT, L. W.; McALPINE, A. S.; HUME, D.; HAMILTON, S.; DE JERSEY, J.; MARTIN, J. L. Crystal structure of mammalian purple acid phosphatase. **Structure**, v. 7, n. 7, p. 757-767, 1999.

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

HIGGS, D. M.; BURD, G. D. Neuronal turnover in the *Xenopus laevis* olfactory epithelium during metamorphosis. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 433, p. 124-130, 2001.

HOSKINS, S. G. Control of the development of the ipsilateral retinohalamic projection in *Xenopus laevis* by thyroxine: results and speculation. **Journal of Neurobiology**, v. 17, p. 203-229, 1986.

HSU, H. H.; ANDERSON, H. C. A simple and defined method to study calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicle phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 500, n. 1, p. 162-172, 1977.

HSU, H. H.; ANDERSON, H. C. Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 8, p. 3805-3808, 1978.

HSU, H. H.; ANDERSON, H. C. The deposition of calcium pyrophosphate by NTP pyrophosphohydrolase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. **International Journal of Biochemistry**, v. 18, n. 12, p. 1141-1146, 1986.

HUANG, H.; CAI, L.; REMO, B.; BROWN, D. D. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. **Proceedings of the National Academy of Science United States of America**, v. 98, p. 7348-7353, 2001.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHI, Y. B. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. **Development and Growth Differentiation**, v. 47, p. 601-607, 2005.

JOHNSON, K. A.; HESSLE, L.; VAINGANKAR, S.; WENNBERG, C.; MAURO, S.; NARISAWA, S.; GODING, J. W.; SANO, K.; MILLÁN, J. L.; TERKELTAUB, R. Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. **American Journal of Physiology**, v. 279, n. 4, p. 1365-1377, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: \_\_\_\_\_. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 8, p. 132-148.

JUST, J. J.; ATKINSON, B. G. Hemoglobin transition in the bullfrog, *Rana catesbeiana*, during spontaneous and induced metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 182, n. 2, p. 271-280, 1972.

KIKUYAMA, S.; KAWAMURA, K.; TANAKA, S.; YAMAMOTO, K. Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 105-148, 1993.

KIRSCH, T.; WUTHIER, R. E. Stimulation of calcification of growth plate cartilage matrix vesicles by binding to type II and X collagens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11462-11469, 1994.

KOLLROS, J. J. Transitions in the nervous system during amphibian metamorphosis. In: GILBERT, L. I.; FRIEDEN, E. (Ed.). **Metamorphosis: a problem in developmental biology**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1981. Chap. 36, p. 445-459.

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

LEONE, F. A.; REZENDE, L. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Allosteric modulation of pyrophosphatase activity of rat osseous plate alkaline phosphatase by magnesium ions. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, p. 89-97, 1998.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 1, p. 1-20, 2013.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: I. Site of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 2, p. 372-379, 1971a.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins of *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, n. 2, p. 380-389, 1971b.

MANN, F.; HOLT, C. E. Control of retinal growth and axon divergence at the chiasm: lessons from *Xenopus*. **Bio Essays**, v. 23, p. 319-326, 2001.

MARTINO, L. J.; YEAGER, V. L.; TAYLOR, J. J. An ultrastructural study of the role of calcification nodules in the mineralization of woven bone. **Calcified Tissue International**, v. 27, n. 1, p. 57-64, 1979.

McCOMB, R. B.; BOWERS, G. N. Jr.; POSEN, S. **Alkaline phosphatase**. New York: Plenum Press, 1979.

McDIARMID R. W.; ALTIG R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. Chicago: University of Chicago Press, 1999. 458 p.

McWHINNIE, D. J.; OELTGEN, P. R.; STILES, D. Amphibian alkaline phosphatase – I. Biochemical characterization of alkaline phosphatase in tissues of *Rana pipiens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 38, n. 2, p. 247-262, 1971.

MENZ, B.; WINTER, G.; ILG, T.; LOTTSPEICH, F.; OVERATH, P. Purification and characterization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 47, n. 1, p. 101-108, 1991.

MILLÁN, J. L. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 335-341, 2006.

MILLÁN, J. L. The role of phosphatase in the initiation of skeletal mineralization. **Calcified Tissue International**, v. 93, p. 299-306, 2012.

MINKIN, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcified Tissue International**, v. 34, p. 285-290, 1982.

NAKAJIMA, K.; YAOITA, Y. Dual mechanisms governing muscle cell death in tadpole tail during amphibian metamorphosis. **Developmental Dynamics**, v. 227, n. 2, p. 246-255, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: \_\_\_\_\_. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. Cap. 6, p. 189-241.

OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; BUTLLER, L. V. L.; STÉFANI, M. V.; SANTOS, L. F. J.; NAKAGHI, L. S. O. Development of the gastroenteric region in *Rana catesbeiana* tadpoles during the metamorphosis process. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v. 22, p. 158-159, 2005.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic properties of triton X-100 solubilized bone matrix induced alkaline phosphatase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 34, n. 5, p. 553-562, 1988.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Allosteric modulation by ATP, calcium and magnesium ions of rat osseous plate alkaline phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1202, n. 1, p. 22-28, 1993.

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. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

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. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, n. 1, p. 108-114, 1998.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismos de lesão e controle. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 169-186, 2002.

PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M. Estrutura e função do tecido ósseo. In: MACARI, M.; MAIORKA, A. **Fisiologia das aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP, 2017. Cap. 19, p. 491-513.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, anuros e cecílias. In: \_\_\_\_\_. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 10, p. 220-263.

REGISTER, T. C.; WARNER, G. P.; WUTHIER, R. E. Effect on L- and D-tetramisole on  $^{32}\text{P}$  and  $^{45}\text{Ca}$  uptake and mineralization by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 922-928, 1984.

REZENDE, L. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; LEONE, F. A. Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 44, n. 2, p. 293-302, 1998.

RODRIGUES, C. A. G.; QUARTAROLI, C. F.; CRIBB, A. Y.; BELLUZZO, A. P. **Áreas potenciais para a criação de rã-touro gigante *Lithobates catesbeianus* (Shaw, 1802) na região sudeste do Brasil**. Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite, 2010.

ROLLINS-SMITH, L. A. Metamorphosis and the amphibian immune system. **Immunology Reviews**, v. 166, p. 221-230, 1998.

SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; DE STEFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Ontogeny of the digestive enzymes of tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 104, n. 4, p. 838-842, 2016.

SCHENK, G.; MITIC, N.; HANSON, G. R.; COMBA, P. Purple acid phosphatase: A journey into the function and mechanism of a colorful enzyme. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, p. 473-482, 2013.

SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 269-278, 2014.

SELA, J.; GROSS, U. M.; KOHAVI, D.; SHANI, J.; DEAN, D. D.; BOYAN, B. D.; SCHWARTZ, Z. Primary mineralization at the surfaces of implants. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 11, n. 4, p. 423-436, 2000.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software Version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 39, p. 3733-3740, 2016.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, p. 679-687, 2007.

SIMÃO, A. M. S.; YADAV, M. C.; NARISAWA, S.; BOLEAN, M.; PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CIANCAGLINI, P.; MILLÁN, J. L. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicles' biomimetics. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 7598-7609, 2010.

SONG, F.; LI, B.; STOCUM, D. L. Amphibians as research models for regenerative medicine. **Organogenesis**, v. 6, n. 3, p. 141-150, 2010.

TERKELTAUB, R. A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. **American Journal of Physiology and Cell Physiology**, v. 281, n. 1, p. C1-C11, 2001.

THEIL, E. C. Red cell ferritin content during the hemoglobin transition of amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, v. 34, n. 2, p. 282-288, 1973.

TRUEB, L.; HANKEN, J. Skeletal development in *Xenopus laevis* (Anura: Pipidae). **Journal of Morphology**, v. 214, n. 1, p. 1-41, 1992.

WEBER, R. Switching of globin genes during anuran metamorphosis. In: GILBERT, L. I.; TATA, J. R.; ATKINSON, B. G. (Ed.). **Metamorphosis**. New York: Academic Press, 1996. p. 567-597.

WIESE, M.; BERGER, O.; STIERHOF, Y. D.; WOLFRAM, M.; FUCHS, M.; OVERATH, P. Gene cloning and cellular localization of a membrane-bound acid phosphatase of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 82, n. 2, p. 153-165, 1996.

WU, M.; CHEN, G.; LI, Y. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone Research**, v. 4, p. 1-21, 2016.

WUTHIER, R. E. Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles, and extracellular fluid. **Calcified Tissue Research**, v. 23, n. 2, p. 125-133, 1977.

WUTHIER, R. E.; REGISTER, T. C. Role of alkaline phosphatase: a polyfunctional enzyme in mineralizing tissues. **The Chemistry and Biology of Mineralized Tissues**, p. 113-124, 1985.

WUTHIER, R. E.; LIPSCOMB, G. F. Matrix vesicles: structure, composition, formation and function in calcification. **Frontiers Bioscience**, v. 16, p. 2812-2902, 2011.

YOSHIZATO, K. Cell death and histolysis in amphibian tail during metamorphosis. In: GILBERT, L. I.; TATA, J. R.; ATKINSON, B. G. (Ed.). **Metamorphosis: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells**. New York: Academic Press, 1996. Chap. 19, p. 647-671.

**ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.****CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS****CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 10315/15 do trabalho de pesquisa intitulado "**Caracterização cinética da fosfatase alcalina relacionada ao processo de ossificação periosteal e endocondral em girinos e adultos de *Lithobates catesbeianus***", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de julho de 2015.

Jaboticabal, 06 de julho de 2015.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Paola Moraes".

Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil  
Tel. 16 3209 2600 - fax 16 3202 4275 www.fcav.unesp.br

**Fonte:** Elaborado pelo autor.