

UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Identificação e caracterização de isoformas de
fosfomonohidrolases presentes na cauda de
girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)
durante o desenvolvimento larval

ADRIANO MARQUES GONÇALVES

Tese de Doutorado

2017

Adriano Marques Gonçalves

Identificação e Caracterização de Isoformas de Fosfomonohidrolases Presentes
na Cauda de Girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) Durante o
Desenvolvimento Larval

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

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

G635i Gonçalves, Adriano Marques
Identificação e caracterização de isoformas de
fosfomonohidrolases presentes na cauda de girinos de Rã-touro
(*Lithobates catesbeianus*) durante o desenvolvimento larval /
Adriano Marques Gonçalves. – Araraquara : [s.n.], 2017
84 f. : il.

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

1. Morte celular. 2. Metamorfose. 3. Fosfatases.
4. Mitocôndria. 5. Anuro. I. Título.

Elaboração: Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

ADRIANO MARQUES GONÇALVES

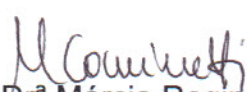
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de março de 2017.

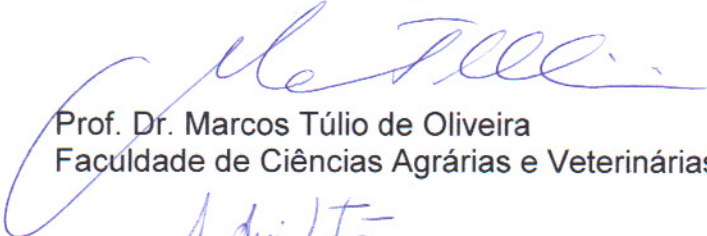
BANCA EXAMINADORA



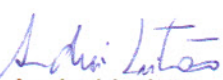
Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior (Orientador)
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP / Jaboticabal - SP



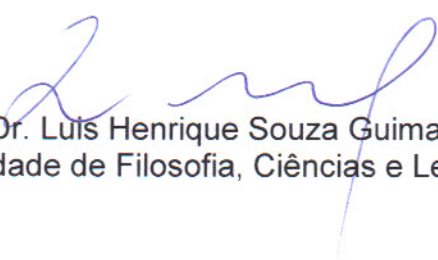
Profª Drª Márcia Regina Cominetti
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCAR / São Carlos - SP



Prof. Dr. Marcos Túlio de Oliveira
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP / Jaboticabal - SP



Prof. Dr. Andrei Leites
Instituto de Química / USP / São Carlos - SP



Prof. Dr. Luís Henrique Souza Guimarães
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adriano Marques Gonçalves

Nome em citações científicas: GONÇALVES, A. M.; GONÇALVES, ADRIANO, M.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, CEP 14884-900, Jaboticabal/SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharelado em Ciências Biológicas, eixo de Conservação da Fauna, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - FCAV/UNESP Jaboticabal (2007-2010).

Mestrado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IQ/UNESP Araraquara (2011-2013).

Doutorado em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - IQ/UNESP Araraquara (2013-2017).

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em Periódicos:

1. SANTOS, LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS; DE OLIVEIRA-BAHIA, VERONICA REGINA LOBATO; NAKAGHI, LAURA SATIKO OKADA; DE STEFANI, MARTA VERARDINO; **GONÇALVES, ADRIANO MARQUES**; JUNIOR, JOÃO MARTINS PIZAURO. Ontogeny of the Digestive Enzymes of Tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. Copeia. , v.104, p.838 - 842, 2016.
2. **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.
3. ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; MORAES, J. R. E.; PIZAURO, J. M.; MORAES, F. R. Histologia dos órgãos e tecidos linfóides de galinhas poedeiras White Leghorn. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. , v.110, p.74 - 78, 2015.
4. ROMBOLA, TIAGO; PEDRINHO, ELIAMAR APARECIDA; DE MACEDO LEMOS, ELIANA; **GONÇALVES, ADRIANO**; DOS SANTOS, LUIZ FLÁVIO; PIZAURO, JOÃO. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. BMC Research Notes. , v.7, p.221 - , 2014.

Trabalhos publicados em Anais de eventos científicos:

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 In: XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Foz

do Iguaçu. **Anais da XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** , 2016.

2. 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 Detecção de Proteínas Microbianas de Células Bacterianas de *Streptococcus agalactiae* In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016, Jaboticabal. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental.** 2016.

3. FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA, G. M.; PIZAURO, J. M. Produção e Purificação de Anticorpos Anti-Aeromonas hydrophila: Padronização para o Ensaio de Blot In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016, Jaboticabal. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental.** 2016.

4. **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 for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

5. 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 for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

6. NEIRA, L. M.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; BUZOLLO, H.; NASCIMENTO, T. M. T.; PIZAURO, J. M.; CARNEIRO, D. J. Electrophoresis as a tool to estimate the polypeptide chain in tilapia waste hydrolysate In: Aquaculture America, 2015, New Orleans. **Anais do Aquaculture America 2015.** 2015.

7. 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 for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais da 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

8. 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: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2014.

9. **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: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da**

XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014.

10. 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: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014.**

11. 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: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014.**

12. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PEREIRA, M. C.; PIZAURO, J. M. Activity of Acid and Alkaline Phosphatases Present in the Bone Tissue of *Lithobates catesbeianus* During the Limbs Development Period In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz Iguaçu. **Anais da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2013.**

13. SANTANA, C. C.; 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: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz Iguaçu. **Anais da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2013.**

14. 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: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz Iguaçu. **Anais da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2013.**

15. SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. Partial Characterization Of Intestinal Alkaline Phosphatase From Tadpoles Bull frog (*Lithobates catesbeianus*) In: XLI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu. **Anais da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2012.**

16. 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 tissues of Bull Frog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) In: XLI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu. **Anais da XLI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2012.**

17. 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: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. **Anais da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2011.**

18. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Partial Characterization of Phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. **Anais da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2011.
19. 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: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2010.
20. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Activities of Phosphomonohydrolase from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2010.
21. SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases Activities In *Lithobates catesbeianus* Tadpoles Digestive System During Larval Development In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais da XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2010.
22. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Activity Of Alkaline Phosphatase From *Lithobates catesbeianus* During Metamorphosis In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Aguas de Lindoia. **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2009.
23. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Atividade da fosfatase alcalina da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose In: Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS), 2009, São Pedro. **Anais do XIX Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS)**. 2009.
24. SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Behavior of Digestive Enzymes During the Larval Development of *Lithobates catesbeianus* In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009, Aguas de Lindoia. **Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**. 2009.
25. SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Variação da atividade proteolítica no sistema digestório de girinos de *Lithobates catesbeianus* In: Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS), 2009, São Pedro. **Anais do XIX Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS)**. 2009.

26. GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V. Atividade da tripsina pancreática em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) nos diferentes estágios metamórficos In: VJornada de Iniciação Científica, 2008, Jaboticabal. **Anais da V Jornada de Iniciação Científica**. 2008.

Apresentação de trabalho ou Palestras:

1. GONÇALVES, A. M. **Ciências Biológicas**, 2016. (Palestra)

2. GONÇALVES, A. M. **Ciências Biológicas**, 2016. (Palestra)

3. GONÇALVES, A. M. **Regeneração e Metamorfose: O papel dos anfíbios para a compreensão de processos biológicos**, 2016. (Palestra)

4. GONÇALVES, A. M. **Metamorfose: os anfíbios como modelos não tradicionais no estudo em biotecnologia**, 2015. (Palestra)

5. 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**, 2014. (Apresentação de Trabalho)

6. 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**, 2013. (Apresentação de Trabalho)

7. 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. (Apresentação de Trabalho)

8. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. **Partial Characterization of Phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis**, 2011. (Apresentação de Trabalho)

9. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. **Activities of Phosphomonohydrolase from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis**, 2010. (Apresentação de Trabalho)

10. GONÇALVES, A. M. **Atuação do Biólogo na Área de Enzimologia Aplicada**, 2010. (Palestra)

11. 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**, 2010. (Apresentação de Trabalho)

12. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. **Activity Of Alkaline Phosphatase From *Lithobates catesbeianus* During Metamorphosis**, 2009. (Apresentação de Trabalho)

13. **GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Atividade da fosfatase alcalina da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose**, 2009. (Apresentação de Trabalho)

14. **GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; CASANOVA, D. C.; SANTOS, L. F. J. Atividade das fosfatases ácida e alcalina da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose**, 2009. (Apresentação de Trabalho)

15. **GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V. Atividade da tripsina pancreática em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) nos diferentes estágios metamórficos**, 2008. (Apresentação de Trabalho)

16. **GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V. Comportamento de catepsina-E e tripsina durante a metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus***, 2008. (Apresentação de Trabalho)

Pedidos de patente:

ETO, S. F. ; ETO, A. K. ; MORAES, F. R. ; MORAES, J. R. E. ; PIZAURO, J. M. ; FERNANDES, D. C. ; CLAUDIANO, G. S. ; **GONÇALVES, A. M.** ; SANTOS, L. F. J. ; SALVADOR, R. ; ETO, A. N. ; BALBUENA, T. S. . Rações nutracêuticas e seus usos. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150141548, data de depósito: 16/06/2015, título: "Rações nutracêuticas e seus usos", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Participação em eventos científicos:

1. TICs no Ensino, 2016. (Oficina)
2. 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology, 2015. (Congresso)
3. VIII EPEA - Encontro Pesquisa em Educação Ambiental - A avaliação da década da educação para o Desenvolvimento Sustentável e perspectivas futuras, 2015. (Congresso)
4. XLIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2015. (Congresso)
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. (Congresso). Membrane Interaction Study of Acid and Alkaline Phosphatases from Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles Tail.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) XLII Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013. (Congresso). Pyrophosphatase And ATPase Activities From Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles' Tail During Development And Metamorphosis.
7. XLI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012. (Congresso)
8. Avaliador no I Fórum de Extensão Universitária, 2011. Avaliador de Trabalhos.
9. I Fórum de Extensão Universitária, 2011.

10. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011. (Congresso) Partial Characterization of Phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis.
11. IX JABu Jornada Anual Biológica da Unesp, 2010.
12. VI CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da U, 2010.
13. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010. (Congresso). Caracterização da atividade de fosfomono-hidrolases da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose.
14. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010. (Congresso). Activities of Phosphomohydrolase from *Lithobates catesbeianus* Tail During Metamorphosis.
15. Apresentação de Poster / Paineis no(a) Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS), 2009. (Congresso). Activity of Alkaline Phosphatase From *Lithobates catesbeianus*' tail During Metamorphosis.
16. V CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da U, 2009.
17. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009. (Congresso). Atividade das fosfatases ácida e alcalina da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose.
18. Apresentação de Poster / Paineis na XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2009. (Congresso). Activity Of Alkaline Phosphatase From *Lithobates catesbeianus* During Metamorphosis.
19. IV CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da Unesp Jaboticabal, 2008.
20. Apresentação de Poster / Paineis no(a) Jornada de Iniciação Científica da FCAVJ-UNESP, 2008. Atividade da tripsina pancreática em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) nos diferentes estágios metamórficos.
21. Apresentação de Poster / Paineis no(a) XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008. (Congresso). Comportamento de catepsina-E e tripsina durante a metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus*.
22. Conferencista no(a) Exposição Água é Vida. Cuide desse bem, 2007. (Oficina). Exposição Água é Vida. Cuide desse bem.
23. III CEBIO Colóquio Sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas, 2007. (Seminário)
24. Mini Curso: Animais peçonhentos, 2007. (Seminário)
25. Mini Curso: Aplicações da genética e biologia molecular, 2007. (Seminário)
26. VI JABU Jornada Anual Biológicas da Unesp, 2007. (Seminário)
27. XXII SECITAP - Sobrevivência em Matas, 2007. (Seminário)

Orientações:

1. Caroline Carla Santana. **Co-orientação do Trabalho de Conclusão de Curso "Estudo da Atividade das Fosfatases Ácida e Alcalina Presentes em Fígado de Girinos de Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) na Metamorfose**. 2012. Ciências Biológicas - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Jaboticabal

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Alberto Gonçalves e Maria Aparecida Marques Gonçalves, Por terem me possibilitado trilhar os caminhos da maneira que eu escolhi. Sem dúvida nenhuma, nada disso seria possível sem o amor, o carinho e os conselhos que me deram. Vocês são meu exemplo de vida, de caráter e de companheirismo. Espero que eu ainda possa orgulhá-los muito, obrigado pela vida. Amo muito vocês.

À minha irmã, Andréa Marques Gonçalves, por todo amor e amizade. por ter me dado de presente as minhas sobrinhas, Isabela e Manuela, que, mesmo sem saber, já me ensinaram muito mais sobre a vida do que eu as ensinei sobre qualquer coisa. Apesar de todas as preocupações, no final, só há felicidade.

Também agradeço aos meus avós, que, mesmo ausentes, infelizmente, deixaram grandes ensinamentos de amor e educação. Com eles, pude aprender a lidar com os meus sentimentos, e compreender um pouco mais sobre a vida e o fato de, muitas vezes, não temos controle nenhum sobre ela. Assim, me ensinaram a nunca deixar os sentimentos ruins sobressaírem dos bons, pois não sabemos o dia de amanhã.

Aos meus tios e primos, por todo amor e carinho, pelos momentos felizes e tristes que passamos juntos e pelas incontáveis lições que aprendi ao lado de vocês.

Agradeço ao Professor João Martins Pizauro Junior, meu orientador, por todos esses anos de convívio e aprendizado. Devo ressaltar que além de é um excelente profissional, também o tenho como amigo. Obrigado por todas as conversas e conselhos durante todos esses anos, posso dizer que tê-lo como orientador só me fez crescer como pessoa e profissional. Sem dúvida, sempre será um exemplo para mim.

Aos meus companheiros de laboratório: Maria Cecília (Mi-leva), Caroline (Frígida), Rafael (Dopamina), Lígia, Mareliza (Dá-fiel), Gabriella (Prima), Natália, Luiz Flávio José (Pudendo), Estevão (Xukrrutt), Gustavo (Tendeu), Gabriel (Covi), Dayanne e Silas; por todo o aprendizado e convívio. Costumamos brincar que não somos o LEA, mas sim, o FamiLEA. Acredito que será difícil encontrar um local tão harmonioso e amistoso como o nosso laboratório. O percurso nem sempre é fácil, mas ao lado de vocês, eu tenho certeza de que, além de mais simples, é muito mais engraçado. É difícil destacar alguém, mas gostaria de chamar a atenção para o Luiz Flávio José, pois ele foi decisivo para o curso que a minha vida tomou.

Gostaria de agradecer também à Bio07, a melhor turma de Biologia da FCAV de todos os tempos. Para os que não acreditam, basta olhar o nosso histórico nas competições do IntraBio.

Aproveito também para agradecer ao pessoal do futebol de segunda-feira por todos esses anos de convívio e atividades físicas. Talvez, sem os jogos de segunda, as coisas teriam sido mais difíceis, afinal, os momentos de descontração são muito importantes.

Agradeço aos meus companheiros Pedro (Parlito) e Guilherme (Poderosa) pelas reuniões e discussões que, embora sempre descontraídas, acabavam por reaver nossos tempos áureos de Centro Acadêmico.

Aos meus companheiros de República: Valter (Biskoitão), Igor (Tele-Ton), André Felipe (Black-Out) e Rodrigo (Mono-bola); por todos os momentos de diversão, de conversa, de aprendizado e de discussões profícuas. Foi muita sorte encontrar essas pessoas tão boas e tê-las ao meu lado por esses quase dez anos. Eles participaram do meu amadurecimento pessoal e profissional, só tenho a lhes agradecer por tudo.

À Thaís Angeli, a qual tornou todos esses anos muito mais tranquilos e menos estressantes. Devo agradecer por sua amizade, carinho e cumplicidade, além, é claro, de suas revisões de texto. Sem ela tudo teria sido mais difícil, obrigado por ser meu porto seguro, minha melhor amiga e minha inspiração para continuar. Só ela sabe o quanto teve que me aguentar nos momentos mais difíceis e o quanto foi necessária para manter minha saúde mental. Ao término dessa etapa é chegado o momento para escolhermos juntos os caminhos que trilharemos. Não poderia deixar de agradecer nossa cachorrinha, a Cloe, que só nos traz alegrias e torna nossos dias sempre mais divertidos e cheios de carinho.

Agradeço também aos meus amigos Araraquarenses, sobretudo Raphael (Gordo), Raphael (Rosa), Ramon (Ruivo cara), Gabriel (Chulão), Gabriel (Puto), André (Primo), Luis (Maleite), Bruno (D), Murilo (Dú), Leonardo (Pink), Caio, Alécio e Felipe, por tantos anos de amizade e, é claro, pelas risadas. Agradecimento especial aos que sempre foram e serão meus fregueses em nossos campeonatos.

Ao Márcio Roberto Reche (Perereca), pela paciência e ajuda com o manuseio e a criação dos animais, além, é claro, das muitas vitórias ao meu lado nas partidas de futebol.

Ao professor Tiago Santana Balbuena, por todo o auxílio com a espectrometria de massas, sem a qual esse trabalho não seria o mesmo.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado ou fizeram parte de minha vida.

Para finalizar, gostaria de agradecer à Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida e por me dar forças para levantar todos os dias com o objetivo de ser sempre um homem correto e uma pessoa cada vez melhor.

Muda, que quando a gente muda o mundo muda com a gente.

A gente muda o mundo na mudança da mente.

Gabriel, o Pensador

Quanto mais alto eu alcanço, mais próximo fico do sol.

Quanto mais eu aprendo, menos eu sei com certeza.

Daniel Gildenlöw

RESUMO

A metamorfose dos anfíbios é um processo altamente regulado que envolve a participação de hormônios e biomoléculas na morte celular e absorção da cauda, a qual libera nutrientes para as transformações morfofisiológicas necessárias para a ocupação do meio terrestre. Dentre os nutrientes liberados, o fosfato é essencial para a síntese de ATP, membranas biológicas, ácidos nucleicos e metabólitos fosforilados, bem como para a regulação de processos degradativos e da atividade de enzimas. Neste sentido, a identificação e caracterização cinética das fosfatases que participam da absorção da cauda de girinos de *Lithobates catesbeianus*, durante a passagem da fase larval aquática para a adulta terrestre, poderão contribuir para a compreensão dos eventos envolvidos na morte celular e na liberação de nutrientes. O estudo revelou aumento da atividade das fosfatases ácida e alcalina, de aproximadamente 30 e 17 vezes, respectivamente, no período da metamorfose. A centrifugação diferencial do extrato bruto da cauda e os estudos cinéticos, permitiram a identificação de três fosfatases distintas, sendo uma fosfatase ácida solúvel, uma fosfatase ácida ligada à membrana e uma fosfatase alcalina ligada à membrana por meio da âncora de fosfatidilinositol. A fosfatase ácida ligada à membrana revelou $V_m=104,5 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_m=0,29 \text{ mM}$ e $n_H=0,9$; a solúvel, $V_m= 25,9 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_m=0,33 \text{ mM}$ e $n_H=0,8$, enquanto a fosfatase alcalina ligada à membrana revelou $V_m=10,5 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_m=0,2 \text{ mM}$ e $n_H=1,0$, para a hidrólise do *p*NPP. Os resultados da espectrometria de massas revelaram a presença de três proteínas fosfatases, sendo duas serina/treonina, uma PP2A, uma PP1 e uma tirosina, PTP-LMW. Estudos utilizando substratos específicos para PP2A e PTP-LMW e inibidor para PP1 permitiram confirmar suas presenças na cauda dos girinos de *L. catesbeianus*. Além disso, a separação em diferentes frações proteicas possibilitou atribuir atividade de PP2A mitocondrial à fosfatase alcalina de membrana, de PTP-LMW à fosfatase ácida solúvel e de PP1 à fosfatase ácida de membrana. Os resultados obtidos levaram à proposta de um modelo de atuação das referidas enzimas no processo de absorção da cauda de anuros durante a metamorfose. Tal modelo propõe a possível função tanto da PP1, quanto da PP2A na sinalização dos eventos que levam à morte celular, bem como o da PTP-LMW na regulação da proliferação celular.

Palavras-chave: Morte celular. Metamorfose. Fosfatases. Mitocôndria. Anuro.

ABSTRACT

Amphibian metamorphosis is a tightly regulated transformation that involves the participation of hormones and other biomolecules in cell death and tail absorption, to release nutrients for the morphophysiological changes necessary for the occupation of the terrestrial environment. Among these nutrients, the phosphate is essential for the synthesis of ATP, biological membranes, nucleic acids and phosphorylated metabolites; regulation of degradative processes and of enzymes activity. In this sense, the identification and characterization of the phosphatases that participate in the absorption of the tail of *Lithobates catesbeianus* during the transition from the aquatic larval phase to the terrestrial adult, may contribute to the understanding of the events involved in cell death and nutrient release. The study showed that there was an increase in the activity of the acid and alkaline phosphatases of approximately 30 and 17 fold, respectively, in the metamorphosis period. The differential centrifugation of the tail crude extract, as well as the kinetic tests, allowed the identification of three distinct phosphatases, a soluble acid phosphatase, a membrane bound acid phosphatase and an alkaline phosphatase bound to the membrane by the anchor of phosphatidylinositol. The kinetic characterization of membrane bound acid phosphatase revealed $V_m=104.5 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_{0.5}=0.29 \text{ mM}$ and $n_H=0.9$; the soluble, $V_m= 25.9 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_{0.5}=0.33 \text{ mM}$ and $n_H=0.8$, while the membrane bound alkaline phosphatase revealed $V_m=10.5 \text{ U.mg}^{-1}$; $K_{0.5}=0.2 \text{ mM}$ and $n_H=1.0$, for *p*NPP hydrolysis. The mass spectrometry results showed the presence of three protein phosphatases, two serine/threonine, being one PP2A, one PP1 and one tyrosine, PTP-LMW. Studies using specific substrates for PP2A and PTP-LMW and inhibitor for PP1 confirmed their presence in the tail of the tadpoles of *L. catesbeianus*. In addition, the separation in different protein fractions, allowed to attribute PP2A mitochondrial activity to the membrane alkaline phosphatase, PTP-LMW to the soluble acid phosphatase and PP1 to the membrane acid phosphatase. A model of the role of these enzymes in the process of anurans tail absorption, during metamorphosis, is proposed. Such model provides information on the role of both PP1 and PP2A in the signaling events leading to cell death, as well as that of PTP-LMW in the regulation of cell proliferation.

Keywords: Cell death. Metamorphosis. Phosphatases. Mitochondria. Anuran.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Adaptações esqueléticas de anuros para o salto.	22
Figura 2 - Modelos de morte celular “Assassino” e “Suicida”	25
Figura 3 - Subtipos de morte celular.	29
Figura 4 - Mecanismos de morte celular intrínseco (a) e extrínseco (b).	30
Figura 5 - Exemplar de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>) adulto (A) e girinos de <i>L. catesbeianus</i> dos estádios 42 ao 46, incluindo duas subdivisões do estágio 44 (B).	35
Figura 6 - Tabela de Gosner para classificação dos girinos em estádios de desenvolvimento de 26 a 46.	36
Figura 7 - Esquema para obtenção de proteínas solúveis e de membrana.	39
Figura 8 - Esquema do isolamento de mitocôndria da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> . ..	43
Figura 9 - Atividade da fosfatase ácida na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , do estágio 26 ao 45.	45
Figura 10 - Atividade da fosfatase alcalina na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , do estágio 26 ao 45.	46
Figura 11 - Razão da proteína total da cauda pela massa corpórea de girinos de <i>L. catesbeianus</i> durante a metamorfose.	46
Figura 12 - pH ótimo aparente das atividades das fosfatases presentes na fração de membrana da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	47
Figura 13 - pH ótimo aparente das atividades das fosfatases presentes na fração de proteínas solúveis da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	48
Figura 14 - pH ótimo aparente da atividade de fosfatase alcalina (pNPP 0,1mM) presente na fração de membrana da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	48
Figura 15 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica da fosfatase alcalina de membrana solubilizada com PIPLC da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	52
Figura 16 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida de membrana da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	52
Figura 17 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida solúvel da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	53
Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença (A) e na ausência (B) de agente desnaturante da fosfatase alcalina da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44, solubilizada por PIPLC.	54
Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante do extrato bruto da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44 utilizado para análise em espectrômetro de massas.	54
Figura 20 - pH ótimo aparente da atividade de serina/treonina proteína fosfatase presente na fração de membrana da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	56
Figura 21 - Atividade da fosfatase alcalina presente na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44, nas diferentes etapas de separação por ultracentrifugação e solubilizada com PIPLC.	56
Figura 22 - Atividade de PP2A presente na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44, nas diferentes etapas de separação por ultracentrifugação e solubilizada com PIPLC.	57
Figura 23 - Média da atividade de fosfatase alcalina presente nas frações SMP e MIT, nos estádios 41, 43 e 45.	57
Figura 24 - Média da atividade de PP2A presente nas frações SMP e MIT, no estágio 43.	58

Figura 25 - pH ótimo aparente da atividade de proteína tirosina fosfatase presente na fração solúvel da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.....	59
Figura 26 - Atividade de PTP presente na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44, nas etapas de separação por ultracentrifugação.....	59
Figura 27 - Modelo de atuação da PP1 e PP2A na cauda de anuros durante a metamorfose. .	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média da atividade das fosfatases presentes na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> , estágio 44, nas diferentes frações obtidas por centrifugação diferencial.	47
Tabela 2 - Atividade residual das fosfatases ácida e alcalina nos diferentes tratamentos de solubilização de proteínas ligadas à membrana, da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.....	49
Tabela 3 - Ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.....	50
Tabela 4 - Ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase ácida solúvel da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.	51
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para atividade p-nitrofenilfosfatásica das fosfatases presentes na cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i> no estágio 44.....	53
Tabela 6 - Possíveis fosfatases identificadas pela análise de espectrometria de massas em busca por <i>Sequest</i>	55
Tabela 7 - Efeito do <i>Inhibitor</i> -2 sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica da fração de proteínas de membrana no pH 7,0.	58
Tabela 8 - Quinases de interesse identificadas por Espectrometria de massas em busca por <i>MS Amanda</i>	60
Tabela 9 - Proteínas de interesse identificadas por Espectrometria de massas em busca por <i>MS Amanda</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF1 - *Apoptosis protease-activating factor-1*

BAD - *Bcl-2 antagonist of cell death*

BAK - *Bcl-2 antagonistic killer*

BAX - *Bcl-2 associated X protein*

BCL-2 - *B cell lymphoma-2 protein*

BCL-XL - *Bcl-extra long*

BID - *Bcl-2 interacting domain death agonist*

CASPASE - *cysteine-dependent aspartate-specific*

DNTR - receptor de hormônio da Tireoide negativo dominante

FADD - *Fas-associated death domain protein*

MIT - fração mitocondrial

MOMP - permeabilização da membrana externa da mitocôndria

OMI - *Mammalian serine protease*

pHMB - *p-hydroxymercuribenzoate*

PIPLC - fosfolipase C

PSMs - Peptide-spectrum matches

pNPP - *p-nitrofenilfosfato*

PP1 - serina/treonina proteína fosfatase tipo 1

PP2A - serina/treonina proteína fosfatase tipo 2A

PTP - proteína tirosina fosfatase

PTP-LMW - tirosina proteína fosfatase de baixa massa molecular

SMAC - *Second mitochondrial activator of caspase*

SMP - proteínas solúveis de membrana plasmática

TNF - *Tumor necrosis factor*

XIAP - *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVO	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Características gerais dos girinos e Metamorfose	22
3.2 As Fosfatases	26
3.3 Morte Celular em Vertebrados.....	28
3.3.1 Apoptose	29
3.3.2 Morte celular autofágica	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 Animais experimentais	35
4.2 Obtenção do extrato enzimático	37
4.3 Determinação da atividade p-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina.....	37
4.4 Efeito do pH sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina	38
4.5 Ação de compostos sobre a atividade das fosfatases	38
4.6 Obtenção de proteínas solúveis e de membrana.....	38
4.7 Investigação do tipo de interação de proteínas com a membrana	39
4.7.1 Solubilização de proteínas periféricas	39
4.7.2 Solubilização de proteínas de membrana com Triton X-100.....	40
4.7.3 Remoção das proteínas ligadas à membrana através da âncora de fosfatidilinositol	40
4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante	40
4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	41
4.10 Efeito da concentração de substrato sobre a atividade das fosfatases	41
4.11 Identificação de isoformas das fosfatases ácidas e alcalina	41
4.12 Isolamento de mitocôndria da cauda de girinos de <i>L. catesbeianus</i>.	42
4.13 Determinação da atividade de serina/treonina proteína fosfatase (PP2A)	43
4.14 Determinação da atividade de proteína tirosina fosfatase (PTP).....	43
4.15 Identificação da atividade de serina/treonina proteína fosfatase tipo 1 (PP1)	43
4.16 Efeito do pH sobre a atividade de serina/treonina proteína fosfatase (PP2A).....	44
4.17 Efeito do pH sobre a atividade de proteína tirosina fosfatase (PTP)	44
4.18 Análise dos géis de eletroforese	44
4.19 Dosagem de proteína	44
4.20 Análise de dados	44
5 RESULTADOS	45
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO.....	75
8 PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS.....	76

1 INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que acarretam o declínio nas populações de anfíbios destacam-se a degradação dos habitats naturais, poluição por agentes químicos, introdução de espécies exóticas e infecções por patógenos, facilitadas por alterações climáticas (ALEXANDER; EISCHEID, 2001; ROLLINS-SMITH, 2017).

A deterioração do habitat está intimamente ligada com os diferentes nichos ocupados pelos anuros em seus estádios, larval e pós-metamórfico. A maioria dos anuros possui uma fase larval aquática e uma fase adulta terrestre. As larvas dos anuros, denominadas girinos, são tão diversificadas em suas especializações morfológicas e ecológicas quanto os adultos (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Grande parte das espécies é caracterizada por larvas herbívoras filtradoras, enquanto os adultos são carnívoros (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). A metamorfose dos anfíbios é caracterizada por mudanças morfofisiológicas, que configuram a transição do girino aquático para a vida terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003).

Outro aspecto que merece ser destacado é que a biologia desses animais ainda não é completamente conhecida. Segundo Santos e colaboradores (2016), durante a metamorfose, a atividade das enzimas digestivas sofre grande declínio nos girinos de rã-touro, o que pode estar relacionado com o fato de que, nesse período, o animal não se alimenta. Além disso, Albinati (1999), admite que a cauda é uma potencial fonte de energia durante a metamorfose, e sua absorção poderia suprir a diminuição no consumo de alimentos durante esse período.

Os mecanismos pelos quais a cauda é completamente absorvida ainda não foram elucidados. Dessa maneira, o presente estudo poderá contribuir substancialmente para a compreensão do papel das fosfatases durante o desenvolvimento larval, uma vez que a regulação de diversos processos fisiológicos depende do balanço entre a fosforilação e a defosforilação de biomoléculas.

2 OBJETIVO

Identificar e caracterizar cineticamente as fosfatases que participam da absorção da cauda de girinos de *Lithobates catesbeianus*, durante a passagem da fase larval aquática para a adulta terrestre. Os resultados obtidos poderão contribuir para a compreensão do papel das proteínas fosfatase no processo de absorção da cauda e liberação de nutrientes durante a metamorfose.

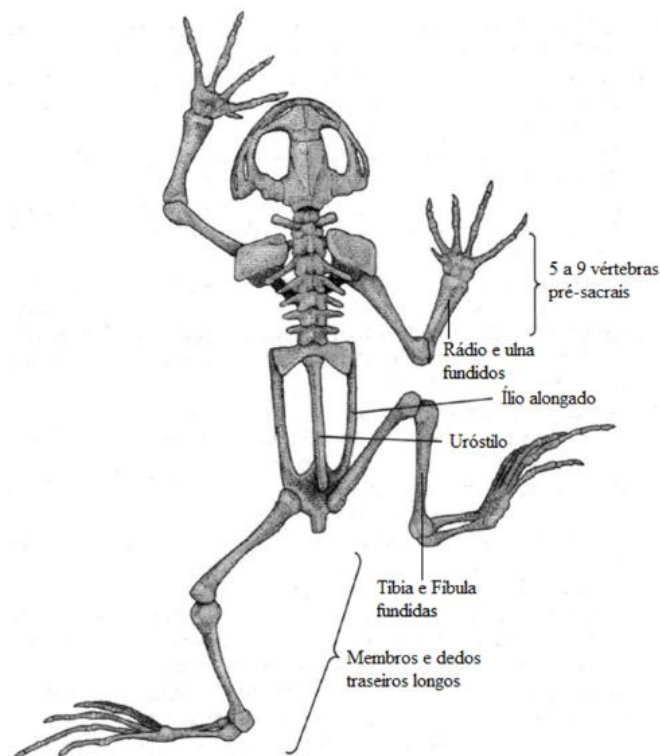
3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Características gerais dos girinos e Metamorfose

Os anfíbios são divididos em três linhagens distintas. Os Anura, grupo que engloba sapos, rãs e pererecas; os Urodela, que compreendem as salamandras e tritões; e os Gymnophiona, grupo que abrange as cecílias (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). A maioria das diferenças entre os grupos está relacionada às adaptações de locomoção.

Os anuros estão amplamente distribuídos pelo mundo, ocorrendo em todos os continentes, exceto a Antártida. Nos adultos, a adaptação mais evidente é a capacitação morfológica para o salto (Figura 1). Tal característica demanda uma série de especializações morfológicas, tais como: a fusão da tíbia com a fíbula; o alongamento dos membros posteriores; o encurtamento e enrijecimento da coluna vertebral; e a fusão das vértebras caudais, formando o uróstilo (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Além disso, a alta capacidade de contração dos músculos, quando comparada a outros vertebrados, confere a potência necessária para impulsionar o animal no salto (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Figura 1 - Adaptações esqueléticas de anuros para o salto.



Fonte: Pough, Janis e Heiser (2008)

Os Anura possuem ampla diversificação reprodutiva, entretanto, a fecundação externa está presente na maioria das espécies. A presença de uma fase larval, denominada girino, representa uma interessante adaptação evolutiva, uma vez que a maioria dos girinos é onívora com tendência à herbivoria, enquanto todos os adultos são carnívoros. Dessa maneira, os girinos exploram recursos que não estão disponíveis para os adultos (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

A transição da vida aquática do girino para a fase pós-metamórfica ocorre por meio da metamorfose. Durante esse período ocorrem grandes transformações pós-embrionárias que envolvem mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais. Nos anfíbios, a metamorfose é caracterizada por três grandes alterações: regressão de estruturas utilizadas apenas nos girinos, transformações de estruturas larvais em estruturas úteis nos adultos e desenvolvimento de estruturas e funções que são essenciais apenas aos adultos (McDIARMID; ALTIG, 1999). A metamorfose nos anuros é um fenômeno principalmente endócrino regulado pelos hormônios tireoidianos (TH). Em 1912, Gudernatsch (apud DUELLMAN; TRUEB, 1994) descobriu que a metamorfose dos girinos de *Rana temporaria* era acelerada quando alimentados com tireoide de cavalos. Estudos posteriores demonstraram a função destes hormônios no processo de metamorfose (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

As alterações morfológicas que ocorrem durante a metamorfose nos anuros são extremamente acentuadas e perceptíveis. Já as alterações bioquímicas podem ser caracterizadas por: aumento na produção de proteínas séricas; alterações no metabolismo do ferro, devido ao aumento da ceruloplasmina; mudança no tipo de hemoglobina, de excreção de amônia para ureia; e aumento da síntese de DNA e RNA (MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; JUST; ATKINSON, 1972; THEIL, 1973; DUELLMAN; TRUEB, 1994; WEBER, 1996).

O trato gastrointestinal do girino é um tubo longo e simples com um estômago rudimentar e um intestino longo. Durante o clímax da metamorfose, o intestino é reduzido em cerca de 75%, já o estômago é remodelado e desenvolve novas glândulas secretoras (ISHIZUYA-OKA; SHI, 2005). Na parede interna do intestino desenvolvem-se as vilosidades, estruturas que caracterizam o intestino delgado dos vertebrados adultos (OLIVEIRA-BAHIA et al., 2005). Nos rins, os pró-néfrons regridem e desaparecem no final da metamorfose (FOX, 1970). Além destas modificações, há também a remodelação de órgãos funcionais, como a pele (YOSHIZATO, 1996), os órgãos respiratórios (DODD; DODD, 1976), o fígado (ATKINSON; WARKMAN; CHEN, 1998), o sistema imune (ROLLINS-SMITH, 1998), o cérebro e a medula espinhal (KOLLROS, 1981), os olhos (HOSKINS, 1986; MANN; HOLT, 2001), as narinas (HIGGS; BURD, 2001), a pituitária (KIKUYAMA et al., 1993; BUCKBINDER; BROWN,

1993; HUANG et al., 2001), o sistema hematopoiético (WEBER, 1996) e grande parte do esqueleto (TRUEB; HANKEN, 1992).

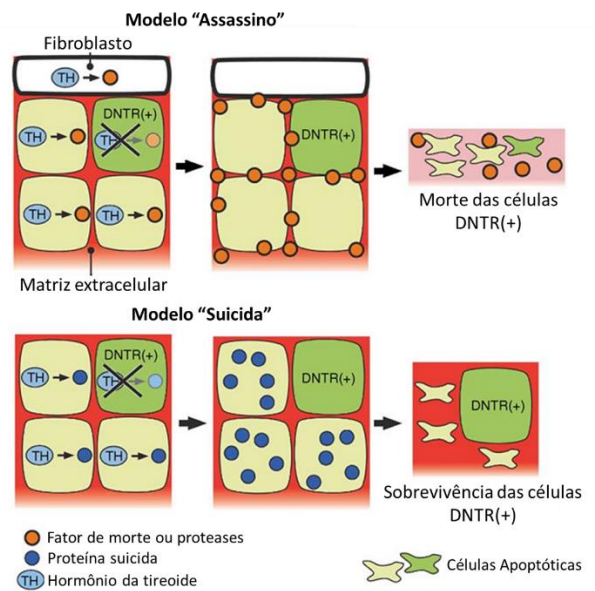
Um dos eventos que tem despertado o interesse de vários pesquisadores durante a metamorfose dos anfíbios é a absorção da cauda, a qual corresponde a uma grande parte do corpo dos girinos. A absorção da cauda de girinos induzida por hormônios da tireoide foi provavelmente o primeiro exemplo conhecido de morte celular programada controlada por hormônio (BROWN; CAI, 2007). Uma série de experimentos concluiu que os dois principais tipos de células da cauda, os fibroblastos e as musculares, respondem independentemente aos hormônios tireoidianos (BROWN; CAI, 2007). Na metamorfose dos anfíbios, a morte celular é iniciada pelos referidos hormônios (KIKUYAMA et al., 1993). Estudos realizados por vários pesquisadores mostraram que, em cultura de tecidos, os hormônios da tireoide podem induzir de maneira autônoma a absorção da cauda (TATA, 1966) e brânquias (DERBY; JEFFREY; EISEN, 1979) do girino, e apoptose do epitélio do intestino delgado durante a remodelação (ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1992). Estes experimentos sugerem que os mecanismos moleculares da morte celular durante a metamorfose dos anfíbios são controlados por uma cascata de expressão dos genes TH-dependentes (ISHIZUYA-OKA; HASABE; SHI, 2009).

A cauda de girino consiste em epiderme, músculos, tecido conjuntivo (derme), tecido nervoso (medula espinhal) e notocorda. Embora apenas alguns tipos de células sofram apoptose, até o final da metamorfose, a cauda é totalmente absorvida pelo processo de morte celular. Na cauda de girinos de *Xenopus laevis*, os músculos começam a sofrer apoptose na fase pró-metamorfose, muito antes do início do encurtamento da cauda (NAKAJIMA; YAOITA, 2003), e o número de células apoptóticas nos músculos atinge seu ápice no clímax metamórfico, quando a cauda encurta drasticamente (NISHIKAWA; HAYASHI, 1995). Por outro lado, na medula espinhal caudal, o número de células em apoptose atinge o seu maior valor no início do clímax metamórfico (ESTABEL et al., 2003), quando os membros anteriores se projetam. Da mesma forma, no sapo marrom japonês, *Rana japonica*, a epiderme sofre morte celular quando os membros anteriores são externalizados (KINOSHITA; SASAKI; WATANABE, 1985). Embora os hormônios tireoidianos induzam a absorção da cauda (TATA, 1966), estudos em cultura de tecidos indicam que as interações entre a epiderme e a derme são necessárias para a absorção da cauda da rã-touro (KINOSHITA; SASAKI; WATANABE, 1986).

Atualmente existem dois modelos mais aceitos para explicar a morte celular na cauda de girinos durante a metamorfose: o “Modelo Suicida” e o “Modelo Assassino” (Figura 2). Quando a cauda está sendo absorvida, suas células morrem tanto pelo mecanismo “suicida” quanto pelo “assassino”. Em ambos os casos, é o hormônio da tireoide que induz a morte celular

(NAKAJIMA; FUJIMOTO; YAOITA, 2005). No modelo “suicida”, cada célula responde diretamente ao hormônio tireoidiano, produzindo algumas proteínas que induzem sua própria morte. No modelo “assassino”, as células são induzidas pelo hormônio tireoidiano a secretar proteases na matriz extracelular, que perturbam interações célula a célula e célula-matriz, levando à perda de ancoragem celular e, conseqüentemente, à sua morte, independentemente se uma célula, que está morrendo, responde ao hormônio tireoidiano ou não (Figura 2) (NAKAJIMA; FUJIMOTO; YAOITA, 2005). A morte celular assassina é equiparada a *Anoikis* (FRISCH; FRANCIS, 1994), na qual o processo de morte celular é ocasionado pela falta de interação entre célula e matriz extracelular.

Figura 2 - Modelos de morte celular “Assassino” e “Suicida”.



Fonte: adaptado de Nakajima, Fujimoto e Yaoita (2005).

*DNTR: receptor de hormônio da Tireoide negativo dominante. Modelo "Assassino" - Após a sinalização por TH, as células com receptores funcionais liberam proteases na matriz extracelular, acarretando sua degradação e conseqüentemente, a morte celular, independente da célula ter ou não capacidade de resposta ao estímulo hormonal. Modelo "Suicida" - Após a sinalização por TH, as células capazes de responder ao estímulo iniciam o processo de apoptose, sendo assim, as células DNTR, as quais não respondem ao estímulo hormonal, permanecem vivas.

3.2 As Fosfatases

O fósforo é um nutriente essencial para os seres vivos, participando da composição dos fosfolipídios, do ATP, dos ácidos nucleicos, da formação de metabólitos fosforilados durante os processos de catabolismo e anabolismo, bem como da regulação da atividade de várias enzimas, do controle gênico e dos processos metabólicos do carbono e de aminoácidos. Além disso, o fósforo é o segundo mineral mais abundante no corpo animal, possuindo um papel importante na calcificação biológica e na fisiologia do tecido ósseo (PIZAURO et al., 1998).

As fosfatases são fosfomonohidrolases que utilizam como substrato fosfomonoésteres, e encontram-se amplamente distribuídas na natureza em diversas formas moleculares (AOYAMA et al., 2003). São classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, de acordo com seu pH de atuação e suas características estruturais, presença ou ausência de cofatores e especificidade por determinados substratos possibilita outras classificações mais específicas, tais como tirosinas fosfatase, fosfatase ácida tartarato resistente, proteínas fosfatase, dentre outras (ZHANG, 2002). A catálise é caracterizada pela interação entre substrato e sítio ativo. Uma série de fatores interferem na atividade enzimática, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, a temperatura, o pH, os inibidores e a presença ou ausência de íons, entre outros (NELSON; COX, 2014).

O centro ativo é constituído por grupos funcionais, como aminoácidos específicos de diferentes regiões da estrutura, íons metálicos e coenzimas, 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. Para algumas enzimas a presença de metais na molécula é essencial tanto para a preservação da estrutura como para a sua atividade máxima, auxiliando na orientação e/ou estabilização dos estados de transição das metaloenzimas (NELSON; COX, 2014). As fosfatases podem ser constitutivas ou induzidas por fosfato. As fosfatases induzidas são sintetizadas apenas na presença de concentrações limitantes de fosfato; sendo as constitutivas sintetizadas independentemente da composição do meio que atuam (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

O estudo dos inibidores possibilita investigar a presença de isoenzimas, 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 e atividade enzimática. Nesse sentido, tem sido verificado que a fosfatase alcalina de diferentes origens é inibida competitivamente pelo fosfato inorgânico, um dos produtos da

reação, e por seus análogos, arsenato e vanadato. Diversos inibidores da fosfatase alcalina são conhecidos e amplamente utilizados para a caracterização enzimática (PIZAURO et al., 1988).

Em 1931, a fosfatase ácida foi detectada pela primeira vez, quando se observou a presença de uma enzima em eritrócitos, sendo capaz de hidrolisar a ligação éster-fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato com um pH ótimo entre 5,6 e 6,0; diferente da fosfatase alcalina encontrada nos glóbulos brancos, que apresentou atividade ótima em pH de 8,8 a 9,0 (ROCHE, 1931).

Atualmente admite-se que algumas fosfatases podem atuar como proteínas fosfatases, defosforilando aminoácidos específicos de determinadas proteínas. A adição ou remoção de grupamentos fosfato de proteínas é um mecanismo de controle de vários processos celulares, tais como transporte via membrana, desenvolvimento embrionário, divisão celular, transcrição, tradução, proliferação de células, além de morte e sobrevivência celular (HONKANEN; GOLDEN, 2002; VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009). Tal regulação ocorre principalmente por fosforilação ou defosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina, e se dá pela ação coordenada de proteínas quinases e fosfatases, respectivamente (HONKANEN; GOLDEN, 2002). A fosforilação de resíduos de serina corresponde a aproximadamente 86,4% do fosfoproteoma de humanos, enquanto de treonina representa cerca de 11,8% e de tirosina 1,8% (MOORHEAD; TRINKLE-MULCAHY; ULKE-LEMÉE, 2007). Além disso, em humanos, foram identificadas 518 proteínas quinases, em contraste com apenas 147 proteínas fosfatases (MOORHEAD; TRINKLE-MULCAHY; ULKE-LEMÉE, 2007).

As proteínas fosfatases estão divididas em três grupos, com base em sua estrutura, sequência, mecanismo catalítico e de regulação (HONKANEN; GOLDEN, 2002). As serina/treonina proteínas fosfatases clássicas fazem parte do primeiro grupo que engloba a extensa família das fosfoproteínas fosfatases (PPP - *phosphoprotein phosphatases*), que são classificadas como PP1, PP2A, PP2B, PP4, PP5, PP6 e PP7. Além das PPP, existe a família das PPM (*Magnesium dependent PPases*), que são proteínas fosfatases dependentes de Mg^{2+} ou Mn^{2+} , tendo como representante mais abundante a PP2C. O segundo grupo é composto pela superfamília das proteínas tirosina fosfatases (PTP), enquanto o terceiro abrange as aspartato proteínas fosfatases (*Aspartate-based protein phosphatase*) (HONKANEN; GOLDEN, 2002; SUN; WANG, 2012).

Os estudos iniciais mostraram que as proteínas fosfatases eram extremamente inespecíficas, ao contrário de suas antagonistas quinases, e por essa característica foram pouco estudadas no passado. De fato, as duas serina/treonina proteínas fosfatases mais abundantes nos tecidos, a PP1 e a PP2A, são proteínas regulatórias e possuem subunidades catalíticas

inespecíficas. Contudo, *in vivo*, essas moléculas são multiméricas e, apesar de apresentarem poucas variações na subunidade catalítica, possuem mais de 100 subunidades regulatórias variáveis, as quais lhes conferem propriedades específicas (VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009).

Na família PP2A, as fosfatases são hétero-trímeros constituídos por um dímero principal, contendo uma subunidade regulatória e uma catalítica, as quais estão associadas a uma terceira subunidade regulatória variável, que confere especificidade de substrato e localização celular à enzima (JANSSENS; LONGIN; GORIS, 2008). Dessa maneira, a subunidade regulatória variável possibilita a interconversão das holoenzimas da família PP2A, adaptando a célula rapidamente às suas necessidades fisiológicas. Tal propriedade tem dificultado seu estudo, principalmente no que tange às pesquisas estruturais (JANSSENS; LONGIN; GORIS, 2008).

Assim como a PP2A, a PP1 é uma enzima que foi extremamente conservada durante a evolução (HEROES et al., 2012). A PP1 é composta por uma subunidade catalítica que se liga a outra regulatória, porém, mais de uma subunidade regulatória pode se ligar à subunidade catalítica, formando assim um hétero-dímero, trímero, respectivamente (VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009). Além disso, a PP1 pode interagir com mais de 200 outras proteínas, dando origem a um dos maiores interactomas conhecidos (HEROES et al., 2012). Essa gama de possibilidade de interações faz com que a PP1 seja responsável por diferentes papéis celulares, tendo sua localização e afinidade por substratos dependentes da subunidade regulatória (VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009; HEROES et al., 2012).

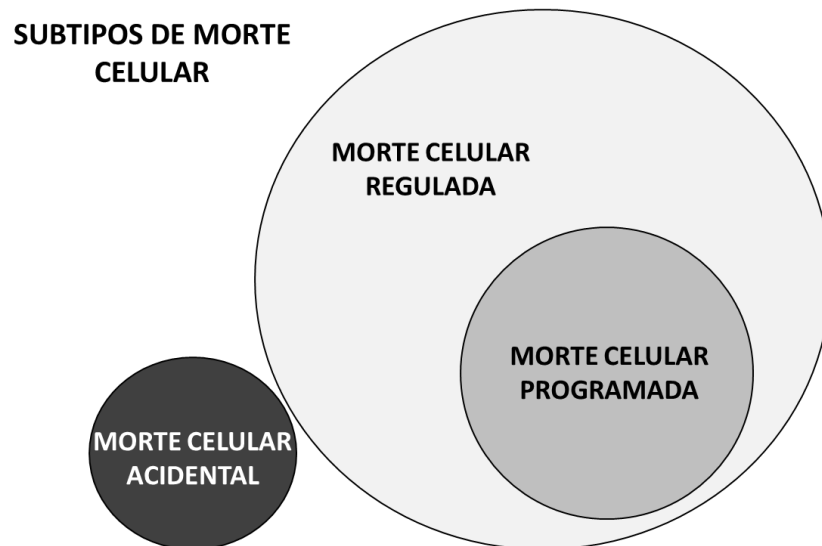
Ao contrário das serina/treonina proteína fosfatases, as tirosina fosfatases possuem uma grande diversidade, devido a possibilidade de serem expressas por aproximadamente 100 genes em humanos (TONKS, 2006). Apesar disso, apenas 0,01 a 0,05% das fosforilações ocorrem em resíduos de tirosina, sendo essa porcentagem aumentada para até 2% em condições oncológicas ou em estímulo de proliferação celular (ZHANG, 2002). O extenso número de genes de tirosina fosfatases também reflete sua diferença estrutural, a qual é bem diversificada quando comparada às estruturas base das PP1 e PP2A.

3.3 Morte Celular em Vertebrados

A descoberta da morte celular data de meados de 1840, mas só na década de 1960 o conceito de morte celular programada foi sugerido em casos que a célula morria por ativação de uma cascata de genes específicos. Nos anos 70, a microscopia eletrônica possibilitou a observação de diferentes ultraestruturas ligadas à morte celular (FUCHS; STELLER, 2015).

Dessa maneira, diversas definições e subtipos de morte celular programada foram propostos (Figura 3), baseados em alterações morfológicas características da célula. Por outro lado, estudos recentes têm fornecido evidências para distinções no nível molecular desses subtipos (GALLUZZI et al., 2012). Atualmente, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (*Nomenclature Committee on Cell Death* – NCCD) recomenda o uso do termo Morte Celular Regulada (MCR) para a morte de células que envolve a expressão de um maquinário genético, ou seja, é passível de ser evitada com o uso de inibidores. Assim sendo, a Morte Celular Programada é uma variante da MCR, que ocorre em contextos como desenvolvimento embrionário e pós-embrionário, resposta imune e homeostase (GALLUZZI et al., 2015).

Figura 3 - Subtipos de morte celular.

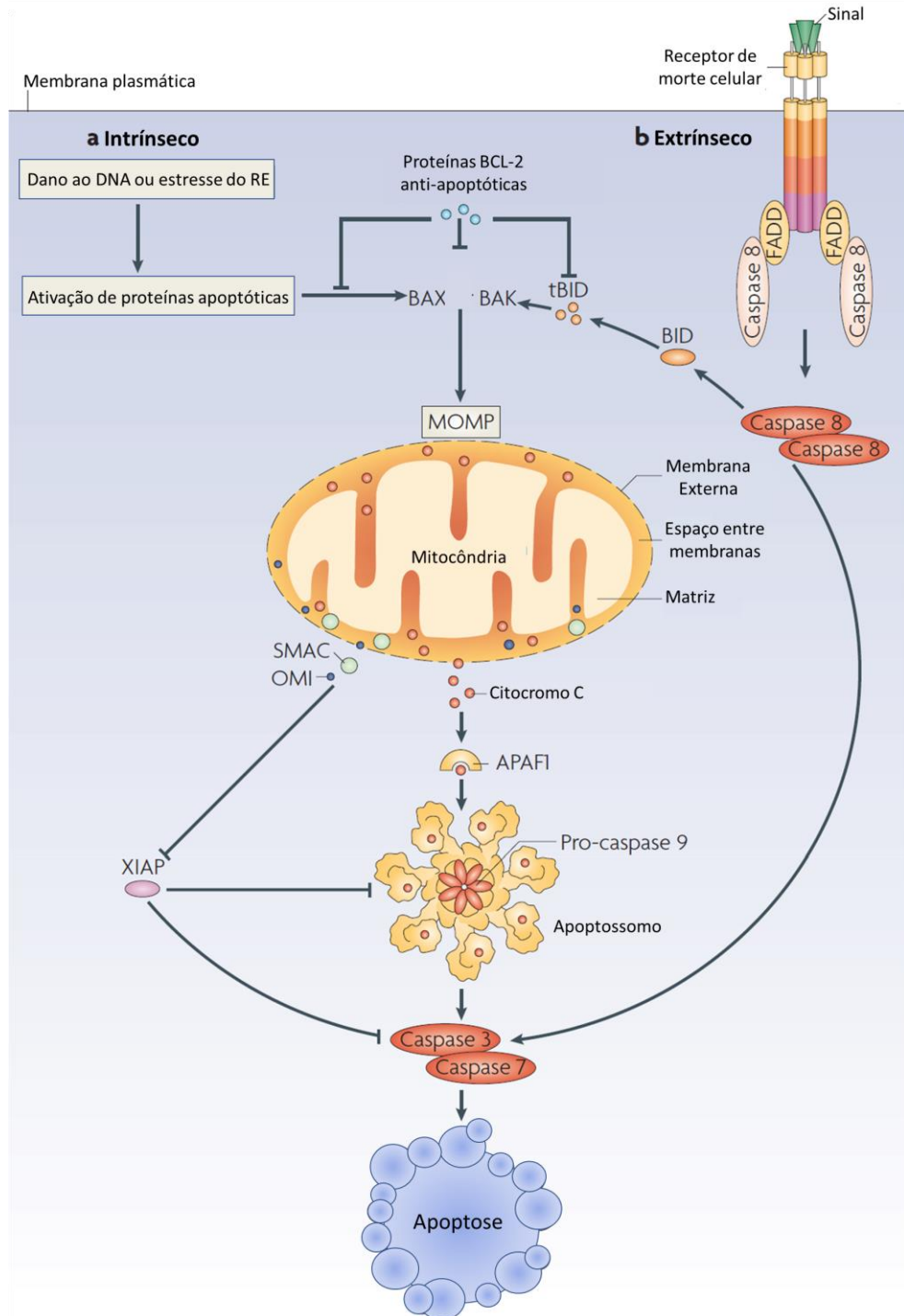


Fonte: adaptado de Galluzzi e colaboradores (2015).

3.3.1 Apoptose

A apoptose é um mecanismo essencial para a sobrevivência e manutenção de organismos multicelulares. Alguns mecanismos de desencadeamento apoptótico são conhecidos, contudo, os dois mais bem caracterizados são o extrínseco e o intrínseco (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). No primeiro, a apoptose ocorre por sinalização extracelular, que acarreta na ativação de receptores na superfície da célula, os quais iniciam uma cascata de sinalização e ativação de morte celular (Figura 4). No segundo, o processo acontece devido ao estresse intracelular, como danos ao DNA e estresse oxidativo (Figura 4) (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006; GALLUZZI et al., 2012).

Figura 4 - Mecanismos de morte celular intrínseco (a) e extrínseco (b).



Fonte: adaptado de Tait e Green (2015).

O mecanismo intrínseco de apoptose envolve, obrigatoriamente, a permeabilização da membrana externa da mitocôndria (*Mitochondrial outer membrane permeabilization* – MOMP), a qual ocorre por uma cascata de informações e é regulada por proteínas da família BCL-2, enquanto o extrínseco pode ou não ocorrer por MOMP (CHIPUK; GREEN, 2008;

GALLUZZI et al., 2015). Um fato notório é que, nas células, tanto estímulos anti-apoptóticos quanto pró-apoptóticos ocorrem simultaneamente e, dependendo de variações do microambiente celular, haverá prevalência um desses estímulos, levando à morte ou à sobrevivência celular (CHIPUK; GREEN, 2008; GALLUZZI et al., 2015). A família BCL-2 engloba tanto proteínas anti-apoptóticas quanto pró-apoptóticas. As proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-xL, a BCL-w e a MCL-1, encontram-se normalmente ligadas à membrana mitocondrial. As proteínas pró-apoptóticas, como as proteínas efetoras BAK e BAX, são responsáveis por gerar poros proteolipídicos na membrana da mitocôndria, enquanto proteínas como BAD, BID, BIK e BIM atuam em diferentes mecanismos de estresse celular como sinalizadores por interação proteína-proteína, podendo levar ao início da MOMP e, conseqüentemente, à apoptose (CHIPUK; GREEN, 2008). Nos vertebrados, a maioria dos estímulos apoptóticos, tanto intrínseco, quanto extrínseco, são dependentes da MOMP para a ativação de caspases e morte celular (TAIT; GREEN, 2010).

Após a MOMP, ocorre a liberação do citocromo *c* do espaço entre as membranas mitocondriais para o citosol, onde se liga ao APAF-1 (*Apoptotic Protease-activating factor 1*), acarretando mudanças conformacionais e oligomerização, formando assim o apoptossomo de ativação de caspases (LUNA-VARGAS; CHIPUK, 2016; TAIT; GREEN, 2010; CHIPUK; GREEN, 2008). O apoptossomo é responsável pelo recrutamento, dimerização e ativação da caspase 9, uma caspase iniciadora, a qual ativa as caspases efetoras 3 e 7. A liberação de outras duas proteínas do espaço interno da membrana da mitocôndria, SMAC e OMI, inibe a proteína anti-apoptótica XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*) e estimula a ativação de caspases (TAIT; GREEN, 2010). No mecanismo extrínseco de apoptose, após o estímulo via receptor, ocorre a ativação da caspase 8, que por sua vez pode ativar tanto as caspases 3 e 7, quanto a proteína pró-apoptótica BID. A proteína BID promove a ativação de BAK e BAX, as quais formam poros na membrana externa da mitocôndria, iniciando a MOMP (TAIT; GREEN, 2010).

As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific*) são cisteína proteases que podem ser divididas em dois tipos em relação à apoptose, e são sintetizadas como proteínas inativas. As caspases iniciadoras têm como papel a ativação das formas inativas das caspases efetoras, as quais são responsáveis por clivar diversas proteínas celulares (HOOF; GORIS, 2003; BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). A seguir, as caspases acarretam ativação de cascatas proteolíticas, destruição do DNA, inibição de mecanismos de reparação celular e iniciação de processos de remoção e aproveitamento de nutrientes das células apoptóticas (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). É importante salientar que, durante o processo de morte celular, a

célula libera sinalizadores, tais como lisofosfatidilcolina, esfingosina-1-fosfato, ATP e UTP, que facilitam sua identificação e são responsáveis por atrair macrófagos. Além disso, a exposição ao meio extracelular da fosfatidilserina, que é componente exclusivo da camada interna da membrana celular, atua como sinalizador para o aproveitamento dos componentes celulares (FUCHS; STELLER, 2015).

A apoptose é um processo altamente regulado e complexo no qual os mecanismos para sua ativação e supressão ocorrem de forma concomitante na célula. Assim, faz-se necessário uma regulação pós-traducional das moléculas envolvidas no processo apoptótico, envolvendo fosforilações e defosforilações de resíduos de aminoácidos específicos de proteínas regulatórias (SIDDIQUI et al., 2001; HOOFF; GORIS, 2003; GALLEGO; VIRSHUP, 2005; GALLUZZI et al., 2015). A proteína pró-apoptótica BAD, quando fosforilada, permanece inibida no citosol. Quando defosforilada, migra para a membrana mitocondrial, onde interage com a proteína anti-apoptótica BCL-2, levando à resposta apoptótica (HOOFF; GORIS, 2003). Estudos sugerem uma complexa regulação das proteínas da família BCL-2 por PP2A, sendo a relação entre essas proteínas crucial para a definição do destino da célula (LIN et al., 2006). Além disso, as serina/treonina proteínas fosfatase são essenciais para os mecanismos de apoptose intrínseca e extrínseca, e sua inibição acarreta na supressão da morte celular (SUN; WANG, 2012).

3.3.2 Morte celular autofágica

Durante o estresse nutricional os lisossomos de células de diferentes tecidos iniciam a autofagia de organelas e proteínas, a fim de reutilizar seus nutrientes. Esse mecanismo protege as células e as mantém ativas. Contudo, a continuidade do estímulo negativo inicia a morte celular (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006).

A autofagia complementa o mecanismo de limpeza celular proteossomal, que é responsável por degradar agregados de proteínas, proteínas velhas e organelas, pela via lisossomal (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). O lisossomo é uma organela ligada à membrana interna da célula e contém inúmeras enzimas hidrolíticas, dentre elas, as fosfatases. Estudos mostraram que o aumento da permeabilidade da membrana lisossomal desencadeia processos de morte celular (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005). Além disso, essa organela tem papel essencial na fase de remoção de restos celulares após a morte celular, tornando possível o reaproveitamento dos nutrientes da antiga célula para a síntese de novas biomoléculas (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005).

Embora tenha sido controverso por muito tempo se a autofagia leva à apoptose ou se, de fato, caracteriza um mecanismo de morte específico, a morte celular autofágica é independente da ação de caspases (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). A tentativa de reciclar nutrientes em períodos de inanição pode levar à degradação de um grande número de moléculas e organelas, comprometendo assim as funções normais celulares. Outro ponto que tem sido levantado é que a autofagia é capaz de selecionar a degradação específica de proteínas e organelas responsáveis pela manutenção do funcionamento celular e dessa maneira, acarreta a morte celular (GOZUACIK; KIMCHI, 2007).

A autofagia é um processo altamente regulado, o qual pode ser ativado por diversos estímulos como inanição, estresse oxidativo, hipóxia, agregados de proteína e organelas danificadas. Os diferentes estímulos de ativação de autofagia também estão ligados a diferentes vias de sinalização (FUCHS; STELLER, 2015; LIN; BAEHRECKE, 2015). Por exemplo, a rapamicina (mTOR) é uma serina/treonina proteína quinase que regula negativamente a iniciação da autofagia em condições normais, por outro lado, em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, essa quinase é inibida, acarretando início do processo autofágico (LIN; BAEHRECKE, 2015).

Outro mecanismo de regulação conhecido é a interação entre a proteína pró-autofágica BECLIN-1 e proteínas da família BCL-2, como a BCL-2 e a BCL-xL, em que os níveis de cada proteína determinariam a diferença entre autofagia para reaproveitamento de nutrientes ou morte celular (GOZUACIK; KIMCHI, 2007; FUCHS; STELLER, 2015; LIN; BAEHRECKE, 2015). Dessa maneira, a fosforilação e defosforilação de tais proteínas é essencial para a sinalização autofágica. Outro aspecto que merece ser destacado é que a autofagia e a apoptose podem ocorrer simultaneamente, assim, em casos de inibição de um dos tipos de morte celular regulada, o outro se encarregaria de dar continuidade ao destino da célula (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006; GOZUACIK; KIMCHI, 2007; FUCHS; STELLER, 2015).

Os mecanismos pelos quais a autofagia leva à morte celular ainda não estão completamente esclarecidos. Algumas hipóteses foram propostas para explicar a relação entre os processos autofágico e de morte celular. Uma das possibilidades seria a de que a degradação da mitocôndria causa um desbalanço energético na célula, acarretando sua morte (FUCHS; STELLER, 2015). Outra hipótese está relacionada à degradação seletiva de moléculas anti-apoptóticas (GOZUACIK; KIMCHI, 2007). Além disso, é possível que as membranas de células autofágicas sirvam como sinal que permite a iniciação da apoptose ou necroptose (LIN; BAEHRECKE, 2015).

Tendo em vista que a regulação da morte celular, assim como de outros processos essenciais para a manutenção dos seres vivos, ocorre por fosforilação e defosforilação de proteínas, o estudo das fosfatases é crucial para o entendimento dos mecanismos de regulação e sinalização de sobrevivência e morte das células, durante a metamorfose dos anuros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

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 da FCAV, protocolo N° 010537/11, 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, a densidade utilizada foi de um girino para cada dois litros de água, com temperatura média de 27°C. A alimentação fornecida foi ração comercial para peixes, constituída por 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de matéria fibrosa, oferecida três vezes ao dia até aparente saciação. Semanalmente foram realizadas coletas dos girinos.

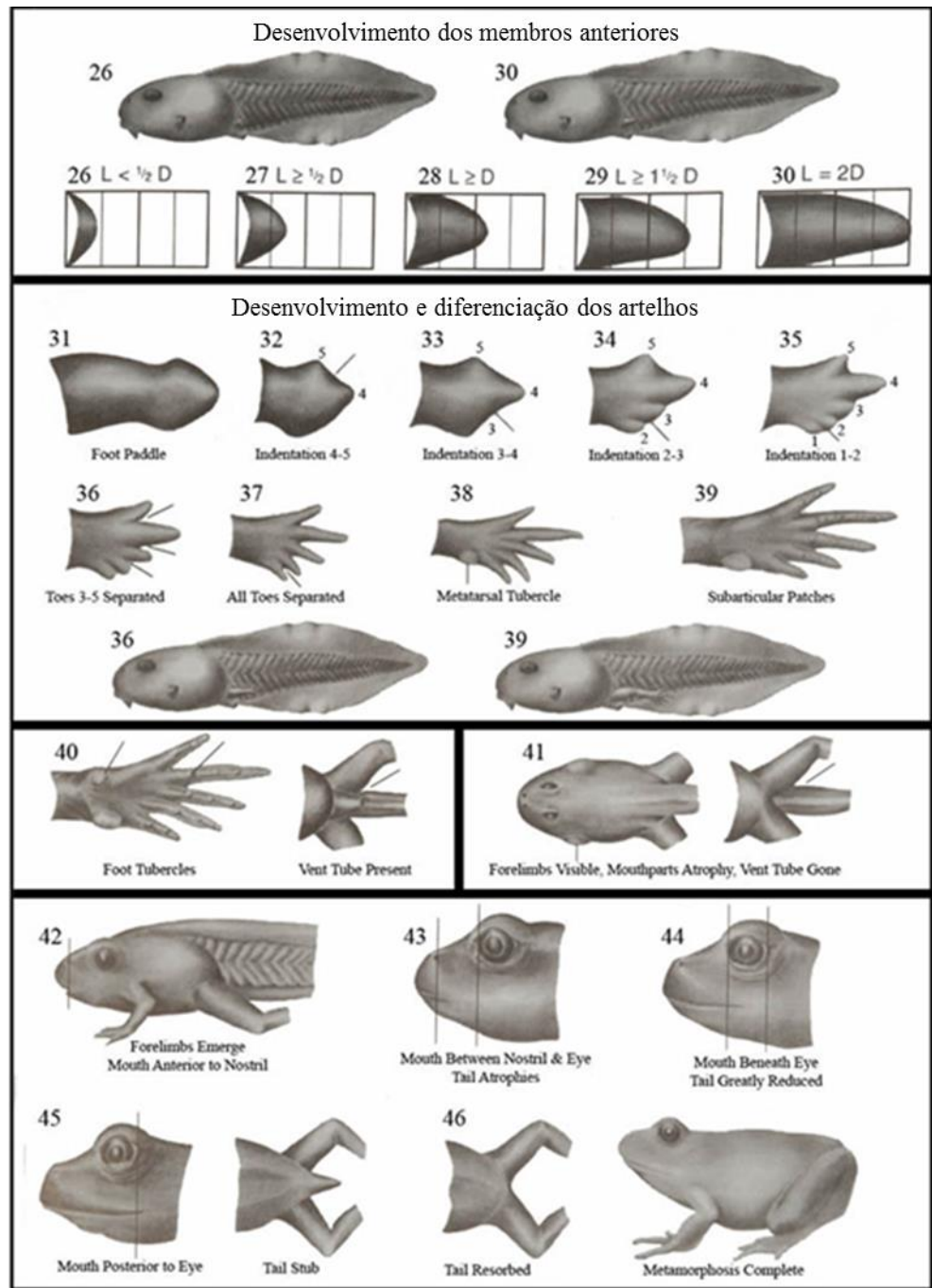
Os girinos foram classificados em estádios de desenvolvimento segundo a tabela de Gosner (1960) e em fases da metamorfose de acordo com a tabela de Etkin (1968). A tabela de Gosner (1960) classifica o desenvolvimento dos girinos baseado nas alterações morfológicas que ocorrem neste período. Essa classificação é dividida em 46 estádios de desenvolvimento, sendo que os estádios que vão do número 1 ao 24 correspondem ao desenvolvimento embrionário. Do estágio 25 ao 35, ocorre a fase de crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Do estágio 36 ao 41, há uma estabilização do crescimento corporal e uma maturação dos membros posteriores. Finalmente, do estágio 42 ao 46, é quando ocorre a metamorfose propriamente dita, com a externalização dos membros anteriores, absorção da cauda e reestruturação da mandíbula (Figura 6).

Figura 5 - Exemplar de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) adulto (A) e girinos de *L. catesbeianus* dos estádios 42 ao 46, incluindo duas subdivisões do estágio 44 (B).



Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 6 - Tabela de Gosner para classificação dos girinos em estádios de desenvolvimento de 26 a 46.



Fonte: Gosner (1960).

A tabela de Etkin (1968) define o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimento dependentes dos hormônios da tireoide, sendo elas: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax, ou metamorfose propriamente dita, a qual é subdividida em três fases: inicial, média e tardia. A pré-metamorfose corresponde aos estádios 1 ao 30 (GOSNER, 1960), a pró-metamorfose inicia-se no estágio 31, com o início do desenvolvimento dependente dos

hormônios tireoidianos, indo até o estágio 41 (GOSNER, 1960). O clímax inicia-se no estágio 42 e vai até o estágio 46 (GOSNER, 1960). Para o estudo das enzimas presentes na cauda, os girinos do estágio 44 foram divididos em duas classes, de acordo com a proporção do peso da cauda em relação ao corpo: classe 1, igual ou maior que 8%; classe 2, menor que 8% (GONÇALVES et al., 2015).

4.2 Obtenção do extrato enzimático

Para a obtenção dos extratos enzimáticos das caudas foram utilizados 5 animais de cada estágio de desenvolvimento do 26 ao 45 e de cada subdivisão do estágio 44. Os testes que não envolveram divisão em estádios de desenvolvimento foram realizados com *pools* de caudas de animais no estágio 44, sem as subdivisões referidas acima (GOSNER, 1960). Os animais foram insensibilizados em água com gelo a 4°C e decapitados (CZESNIK, et al., 2006). Em seguida, as caudas foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas separadamente a -70°C.

Após o descongelamento, as caudas foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Turrax, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5 contendo, MgCl₂ 2mM e ZnCl₂ 5μM, na proporção de 1 grama de tecido para 10 mL de tampão, formando um *pool* de cada estágio. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 *g* por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C. Posteriormente, os mesmos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas e da concentração de proteína do extrato (GONÇALVES et al., 2015).

4.3 Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina

A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina foi determinada a 37°C, através da formação do íon *p*-nitrofenolato ($\epsilon=17600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 13), a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) 1mM, em um volume final de 1mL. A reação enzimática foi iniciada por meio da adição do extrato enzimático ao meio de reação e interrompida com a adição de 1mL de NaOH 1M. Após mistura por agitação, a absorbância foi determinada a 410 nm. As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada experimento foram incluídos controles para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. As condições de ensaio foram determinadas a partir da caracterização

realizada anteriormente. Os ensaios foram realizados de acordo com as condições estabelecidas por Gonçalves e colaboradores (2015).

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 presente no extrato (U.mg⁻¹), nas condições de ensaio.

4.4 Efeito do pH sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina foi estudado utilizando-se as soluções tampão: acetato (pH 3,5-6,5), TRIS.HCl (pH 6,5-8,0) e AMPOL (pH 8,0-11,0), em concentração de 100mM.

A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina foi determinada a 37°C, através da formação do íon *p*-nitrofenolato ($\epsilon=17600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 13), a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) 1mM, em um volume final de 1mL. 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 presente no extrato (U/mg), nas condições de ensaio.

4.5 Ação de compostos sobre a atividade das fosfatases

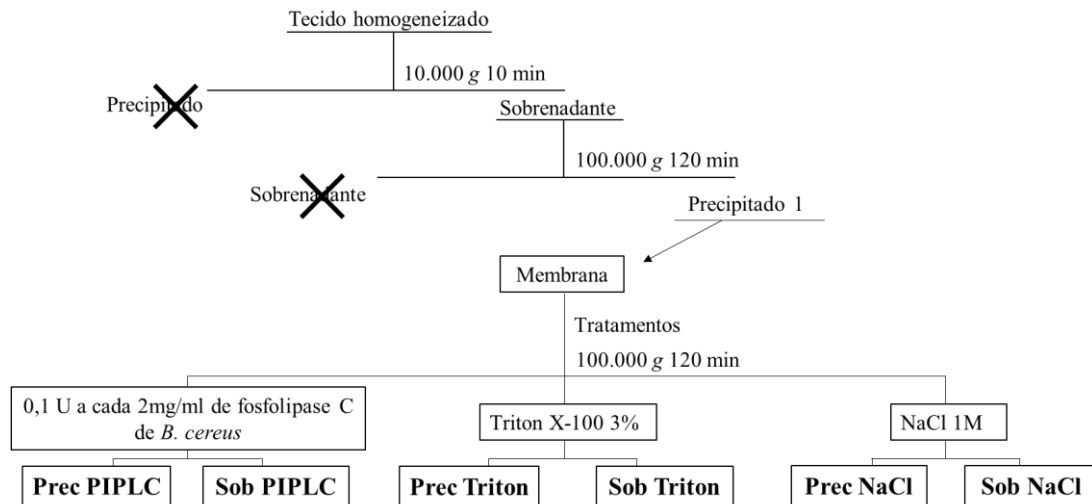
Os compostos arsenato, EDTA, levamisol, cloreto de magnésio, metavanadato, *p*HMB, pirofosfato de sódio, teofilina e cloreto de zinco para a fosfatase alcalina e vanadato, nitrato de prata, cloreto de zinco, *p*HMB, tartarato e fluoreto de sódio para a fosfatase ácida solúvel, foram escolhidos uma vez que já haviam sido empregados por outros pesquisadores para fosfatases de diferentes origens, com bons resultados (GRANJEIRO et al., 1997; BUZALAF et al., 1998; PIZAURO et al., 1998; ZHANG, 2002; RATHAUR et al., 2009). O efeito desses compostos sobre a atividade das fosfatases foi estudado utilizando-se concentrações compreendidas entre 50µM e 25mM, dependendo do composto.

4.6 Obtenção de proteínas solúveis e de membrana

As proteínas solúveis e de membrana presentes no extrato enzimático de animais do estádio 44 foram separadas por Ultracentrifugação a 100.000 *g*, a 4°C, durante duas horas. O precipitado foi ressuspensão com o auxílio de um homogeneizador tipo *Potter* no volume inicial

do tampão de homogeneização (Figura 7). O sobrenadante é constituído de uma mistura de proteínas solúveis e o precipitado de vesículas contendo proteínas associadas à membrana.

Figura 7 - Esquema para obtenção de proteínas solúveis e de membrana.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.7 Investigação do tipo de interação de proteínas com a membrana

4.7.1 Solubilização de proteínas periféricas

O tipo de interação das fosfatases ácida e alcalina com a membrana biológica foi avaliada por meio da incubação de 1mL do extrato bruto, ao qual foi adicionado 1mL de NaCl 2M preparado em TRIS.HCl 5mM, pH 7,5, na presença e na ausência de MgCl₂ 2mM e ZnCl₂ 1μM, sob agitação constante, durante uma hora à temperatura ambiente (PIZAURO et al., 1988). Após o período de incubação a mistura foi centrifugada a 100.000 g durante duas horas a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2mM, ZnCl₂ 1μM, utilizando-se o mesmo volume final (PIZAURO et al., 1988). Paralelamente, um tubo controle foi incluído nas mesmas condições sem a adição de NaCl, para se estimar o efeito do tratamento na liberação de proteínas da membrana. O precipitado e o sobrenadante foram utilizados para avaliar o tipo de interação da enzima com a membrana.

4.7.2 Solubilização de proteínas de membrana com Triton X-100

Para cada 1mL de extrato bruto foram adicionados 100 μ L de Triton X-100 a 30%, a mistura foi mantida sob agitação constante em banho de gelo, durante uma hora. A seguir, a mistura de incubação foi centrifugada a 100.000 *g* durante duas horas a 4°C. O precipitado foi homogeneizado em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2mM, ZnCl₂ 1 μ M, utilizando-se o mesmo volume final (PIZAURO et al., 1988). Paralelamente, um tubo controle foi incluído nas mesmas condições sem a adição do Triton X-100, para se estimar o efeito do tratamento na liberação de proteínas da membrana. O precipitado e o sobrenadante foram utilizados para avaliar o tipo de interação da enzima com a membrana.

4.7.3 Remoção das proteínas ligadas à membrana através da âncora de fosfatidilinositol

A membrana foi incubada com fosfolipase C (PIPLC) em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2mM e ZnCl₂ 1 μ M, a 37°C durante uma hora, mantida sob agitação constante (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995). Após o período de incubação, a mistura foi centrifugada a 100.000 *g* durante duas horas, a 4°C. O sobrenadante obtido foi congelado e armazenado. O precipitado foi homogeneizado utilizando-se o mesmo volume final em tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5, contendo MgCl₂ 2 mM e ZnCl₂ 1 μ M (PIZAURO et al., 1988). Paralelamente, um tubo controle foi incluído nas mesmas condições sem a adição de PIPLC, a fim de se estimar o efeito do tratamento na liberação de proteínas da membrana. O precipitado e o sobrenadante foram utilizados para avaliar o tipo de interação da enzima com a membrana.

4.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, da fosfatase alcalina solubilizada, foi desenvolvida a 4°C de acordo com Davis (1964). A atividade de fosfomonohidrolase foi detectada por incubação do gel em tampão AMPOL 50mM, pH 9,4, contendo MgCl₂ 2mM, α -naftilfosfato 0,12% (p/v) e Fast Blue RR 0,12% (p/v), a 37°C.

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

Foi utilizada a metodologia descrita por Laemmli (1970), a eletroforese foi realizada em géis de poliacrilamida a 10 e 12%, em temperatura ambiente. Após a corrida, os géis foram fixados e corados com *Blue Silver* (CANDIANO et al., 2004).

4.10 Efeito da concentração de substrato sobre a atividade das fosfatases

A influência da concentração de substrato sobre a atividade das fosfatases ácidas e alcalina foi determinada utilizando-se concentração de *pNPP* variando de 0,001 mM a 8 mM. A atividade da fosfatase alcalina foi determinada em tampão AMPOL 100mM, pH 10,5 e das fosfatases ácidas em tampão acetato 100mM, pH 4,5. Todas as atividades foram realizadas a 37°C.

4.11 Identificação de isoformas das fosfatases ácidas e alcalina

Além das propriedades cinéticas, as fosfatases ácida e alcalina também foram identificadas por espectrometria de massas de alta resolução. Para tanto, as proteínas do extrato proteico foram separadas por SDS-PAGE a 12%, digeridas de acordo com o procedimento estabelecido por Shevchenko e colaboradores (2007), enquanto as proteínas em solução foram digeridas utilizando-se o *Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade Promega* da Promega, seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante. Após a digestão por adição de tripsina (5ng/μL), os peptídeos foram ressuspensos em solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico e separados em um sistema cromatográfico do tipo EASY-nLC1000 (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Alemanha) utilizando-se uma nano-coluna de fase reversa (15cm, 2μm, 100Å). A cromatografia foi realizada utilizando-se gradiente de polaridade decrescente constituído de 0,1% de ácido fórmico em H₂O, seguido de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, durante 60 minutos sob fluxo de 300nL/min. A ionização e injeção dos peptídeos no espectrômetro de massas (Q-Exactive, Thermo) foi realizada por *electrospray* (ESI), utilizando-se 2,5kV de potencial aplicado diretamente na agulha de injeção.

O espectrômetro de massas foi operado no modo “data-dependent”, onde os dez íons peptídicos mais abundantes de cada “survey scan” (MS1) foram selecionados para fragmentação e aquisição de espectros de fragmentação peptídica (MS2). Os espectros do tipo MS1 e MS2 foram adquiridos, respectivamente, em resolução igual a 70.000 e 17.500 FWHM

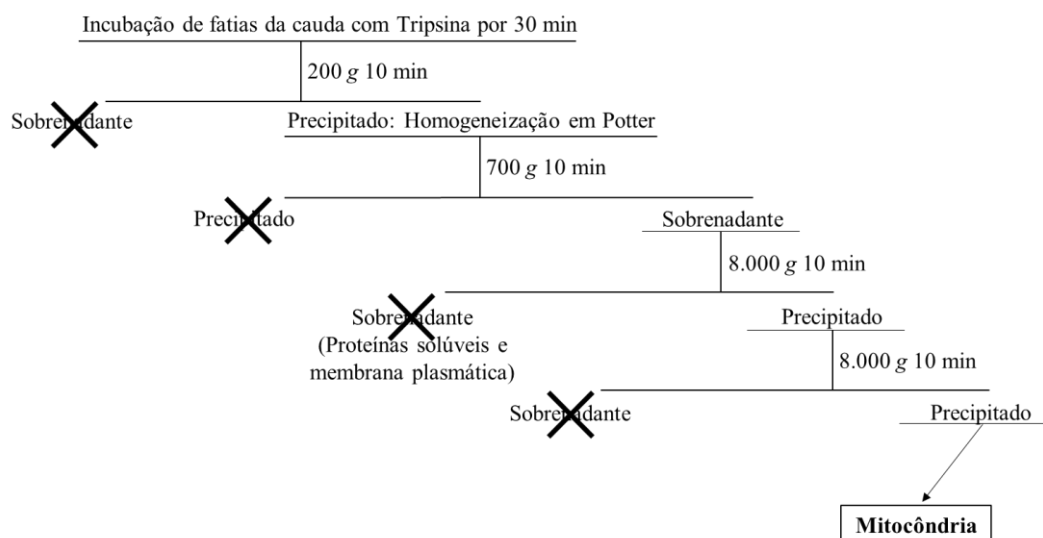
(“full width at half maximum”). O tipo de fragmentação utilizado foi o “high collision energy” (HCD), com energia de colisão normalizada a 35%. Os íons peptídicos selecionados para fragmentação foram excluídos de um novo evento de fragmentação por 30s.

A identificação das proteínas de interesse foi realizada por correlação entre os espectros do tipo MS2 e espectros teóricos obtidos por processamento do banco de dados UniProt. As correlações entre os espectros do tipo MS2, que foram obtidos do espectrômetro de massas, e os espectros virtuais, oriundos da digestão virtual e processamento do banco de proteínas do UniProt, foram realizados pela ferramenta *Sequest* ou *MS Amanda*, contido no ambiente virtual *Proteome Discoverer*, utilizando os seguintes parâmetros de busca: 10 ppm de tolerância para os íons precursores e 0,02 Da para os íons fragmentos, oxidação da metionina como modificação variável e carbamidometilação da cisteína como variação estática. Os resultados obtidos (“peptide spectrum matches”, PSMs) foram filtrados, considerando apenas as identificações que continham no mínimo dois peptídeos e que esses possuísem coeficiente de correlação cruzada (XCorr) igual a 1,5; 2,0; 2,5 para os íons de carga +1, +2 e +3, respectivamente. O *score* observado nas análises é uma relação entre o espectro de massas experimental em relação ao espectro de massas hipotético, indicando a qualidade da sobreposição dos dados experimentais e hipotéticos.

4.12 Isolamento de mitocôndria da cauda de girinos de *L. catesbeianus*.

Foi utilizada a metodologia descrita por Frezza Frezza, Cipolat e Scorrano (2007) e a centrifugação diferencial foi realizada utilizando sacarose como osmólito (Figura 8). Foram utilizados *pools* de animais dos estádios 41 (antes da metamorfose), 43 (durante a metamorfose) e 45 (final da metamorfose) estabelecidos pela tabela de Gosner (1960). As caudas foram cortadas em fatias delgadas e incubadas com tripsina para a posterior centrifugação diferencial. Foram aliquoteadas amostras da fração contendo proteínas solúveis e de membrana citoplasmática (SMP), e da fração mitocondrial (MIT).

Figura 8 - Esquema do isolamento de mitocôndria da cauda de girinos de *L. catesbeianus*.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.13 Determinação da atividade de serina/treonina proteína fosfatase (PP2A)

A atividade de serina/treonina proteína fosfatase foi determinada utilizando-se o kit “Serine/Threonine Phosphatase Assay System”, marca Promega, seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante a 37°C em tampão imidazol 50mM, pH 7,2, contendo EGTA 0,2mM, 0,02% de β-mercaptoetanol e 0,1mg/mL de BSA.

4.14 Determinação da atividade de proteína tirosina fosfatase (PTP)

A atividade de serina/treonina proteína fosfatase foi determinada utilizando-se o kit “Tyrosine Phosphatase Assay System”, marca Promega, seguindo as especificações fornecidas pelo fabricante a 37°C em tampão acetato 50mM, pH 6,0.

4.15 Identificação da atividade de serina/treonina proteína fosfatase tipo 1 (PP1)

A identificação de serina/treonina proteína fosfatase tipo 1 (PP1) foi realizada em tampão TRIS.HCl 100mM, pH 7,0, contendo *p*-nitrofenilfosfato (*p*NPP) 5mM, na presença e ausência de *Inhibitor-2*, inibidor específico de PP1 em volume final de 1mL. Inicialmente, o extrato enzimático foi incubado por 30 minutos com o inibidor. Findo tal período, a reação foi iniciada pela adição do substrato ao meio de reação e interrompida com 1mL de NaOH 1M. O *p*-nitrofenol liberado foi estimado a 410 nm.

4.16 Efeito do pH sobre a atividade de serina/treonina proteína fosfatase (PP2A)

O estudo do efeito do pH sobre a atividade de serina/treonina proteína fosfatase foi realizado utilizando-se as seguintes soluções tampão: Acetato (entre pH 4,5-6,0), TRIS.HCl (pH 6,5-8,0), Imidazol 7,2 e AMPOL (pH 8,5-9,5), em concentração final de 100mM.

4.17 Efeito do pH sobre a atividade de proteína tirosina fosfatase (PTP)

O efeito do pH sobre a atividade de proteína tirosina fosfatase foi estudado utilizando-se as soluções tampão: Acetato (entre pH 4,5-6,0), TRIS.HCl (pH 6,5-7,5), em concentração de 50mM.

4.18 Análise dos géis de eletroforese

Após coloração, os géis foram fotodocumentados em scanner Bio-Rad, Modelo ChemiDoc MP System, e analisados através do software Image Lab[®] da Bio-Rad.

4.19 Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Hartree (1972), utilizando-se soroalbumina bovina fração V como padrão.

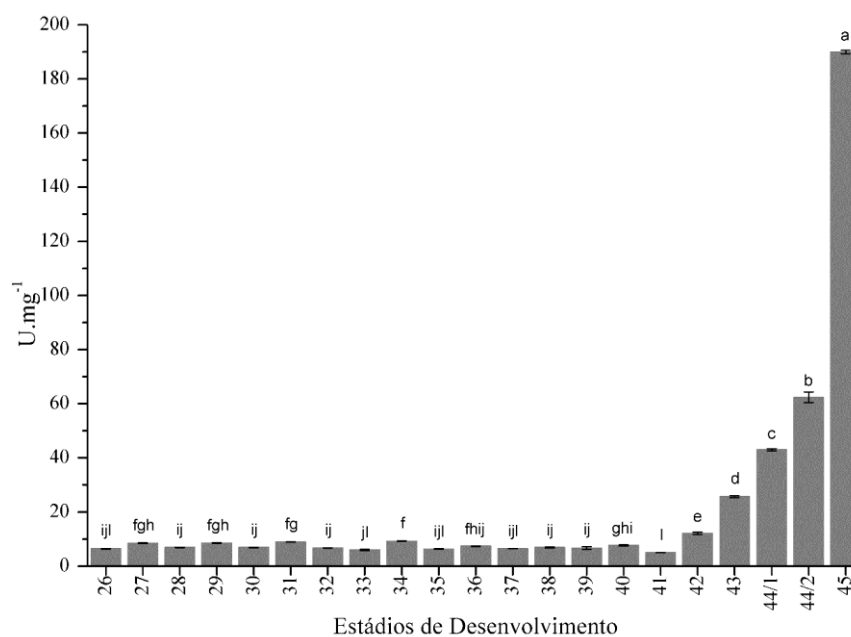
4.20 Análise de dados

A análise da variância (ANOVA), bem como a comparação das médias pelo teste de Tukey (5%) foram realizadas e analisadas utilizando o programa estatístico SAS (2002).

5 RESULTADOS

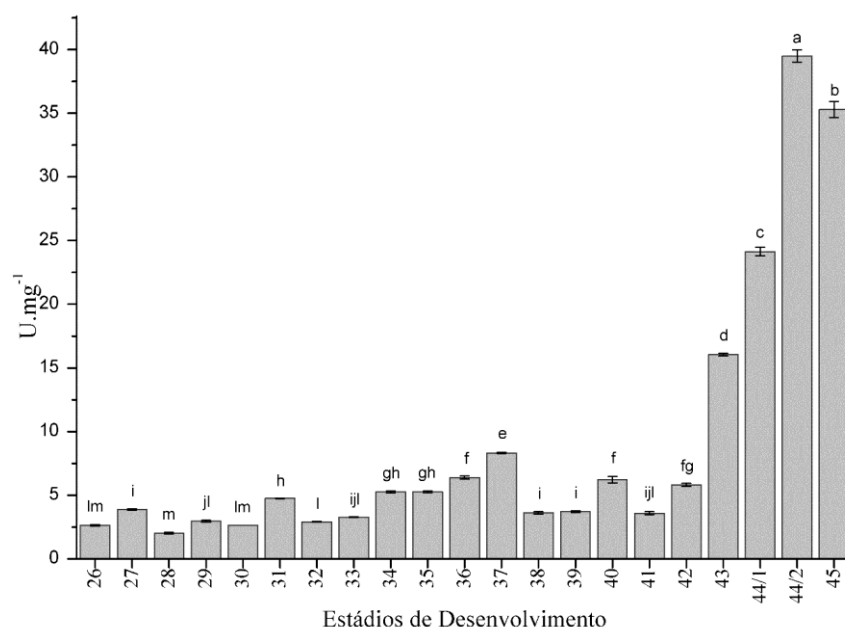
A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina (Figuras 9 e 10) presentes na cauda dos girinos de *L. catesbeianus* nos diferentes estádios de desenvolvimento revelou que a atividade específica de ambas as enzimas permanece baixa e constante durante os períodos de pré e pró-metamorfose, seguido de aumento significativo no clímax metamórfico. A fosfatase ácida teve maior atividade específica no estágio 45 (Figura 9), já a atividade da fosfatase alcalina diminuiu de 39,5 no estágio 44/2 para 35,3 U.mg⁻¹ no estágio 45 (Figura 10).

Figura 9 - Atividade da fosfatase ácida na cauda de girinos de *L. catesbeianus*, do estágio 26 ao 45.



Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

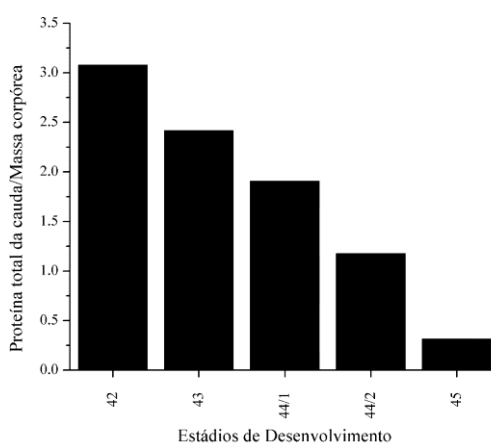
Figura 10 - Atividade da fosfatase alcalina na cauda de girinos de *L. catesbeianus*, do estágio 26 ao 45.



Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Não foi observada variação na concentração proteica das caudas nos estádios de desenvolvimento durante a metamorfose, quando expressa em miligrama de proteína por mililitro de extrato. A razão da concentração de proteína total da cauda pela massa corpórea (Figura 11) foi realizada visando comparar diferentes estádios da metamorfose, possibilitando assim a análise da influência da proteína remanescente durante este processo. Conforme pode ser observado, houve diminuição da relação entre proteína e massa corpórea no decorrer da metamorfose.

Figura 11 - Razão da proteína total da cauda pela massa corpórea de girinos de *L. catesbeianus* durante a metamorfose.



A ultracentrifugação do extrato bruto a 100.000 *g* revelou que há pelo menos duas isoformas de fosfatase ácida, uma associada à membrana e outra solúvel (Tabela 1). Tal admissão deve-se ao fato de que este tratamento separa a fração solúvel da membrana. No que se refere à fosfatase alcalina, o tratamento revelou a presença de uma forma, associada à membrana (Tabela 1). A purificação foi de 3,5 vezes para a atividade da referida enzima.

Tabela 1 - Média da atividade das fosfatases presentes na cauda de girinos de *L. catesbeianus*, estágio 44, nas diferentes frações obtidas por centrifugação diferencial.

Fração	Atividade específica (U.mg ⁻¹)	
	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
Extrato bruto	58,94 ± 0,54	21,65 ± 0,35
Precipitado	81,56 ± 0,18	76,39 ± 0,39
Sobrenadante	44,05 ± 0,42	8,89 ± 0,07

O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática revelou que os pH ótimos aparentes para hidrólise do substrato *p*-nitrofenilfosfato (5mM) pelas fosfatases ácida e alcalina de membrana foram 4,5 e 10,5 (Figura 12), respectivamente, e 4,5 para a fosfatase ácida solúvel (Figura 13).

Figura 12 - pH ótimo aparente das atividades das fosfatases presentes na fração de membrana da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

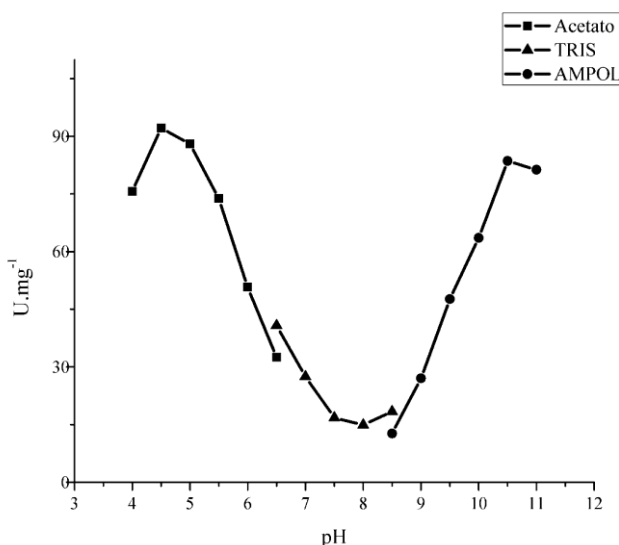
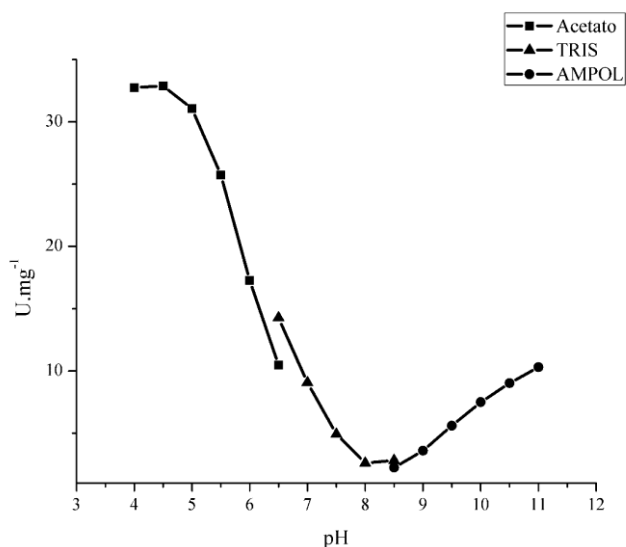
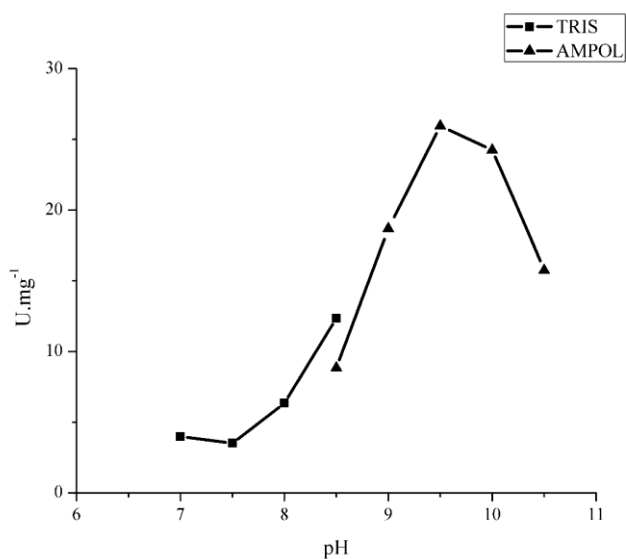


Figura 13 - pH ótimo aparente das atividades das fosfatases presentes na fração de proteínas solúveis da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



A diminuição da concentração final do *p*-nitrofenilfosfato, de 5mM para 0,1mM, revelou que a atividade da fosfatase alcalina ligada à membrana varia em função da concentração do substrato, apresentando pH ótimo aparente de 10,5 (Figura 12) para maior concentração e 9,5 para menor concentração (Figura 14).

Figura 14 - pH ótimo aparente da atividade de fosfatase alcalina (*p*NPP 0,1mM) presente na fração de membrana da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



O estudo da interação de proteínas com a membrana (Tabela 2) revelou que 131% da fosfatase ácida foi solubilizada por Triton X-100 e apenas 34% permaneceu associada à

membrana. O tratamento com PIPLC revelou diminuição significativa da atividade da referida enzima. Já a fosfatase alcalina foi solubilizada pela ação do Triton X-100 e da PIPLC. Observa-se ainda que o detergente teve ação aditiva para ambas as fosfatases (PIZAURO et al., 1998).

Tabela 2 - Atividade residual das fosfatases ácida e alcalina nos diferentes tratamentos de solubilização de proteínas ligadas à membrana, da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

Tratamento	% da Atividade			
	Fosfatase ácida		Fosfatase alcalina	
	Precipitado	Sobrenadante	Precipitado	Sobrenadante
Controle	100	100	100	100
Triton X-100	33,92 ± 1,41	131,09 ± 1,25	133,45 ± 1,20	149,82 ± 1,85
NaCl	83,22 ± 2,05	15,86 ± 0,98	96,01 ± 0,33	12,04 ± 0,57
PIPLC	28,26 ± 1,70	27,46 ± 0,87	24,88 ± 0,17	135,81 ± 0,82

As atividades específicas utilizadas como 100% para as fosfatases ácida e alcalina correspondem a 82 e 80,17 U.mg⁻¹, respectivamente.

O estudo da ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina revelou que o arsenato, um análogo estrutural do fosfato, apresentou maior inibição (Tabela 3). Além disso os compostos levamisol, metavanadato, pHMB, pirofosfato de sódio, teofilina e cloreto de zinco também apresentaram ação inibitória que variaram de 50,81 a 71,59%.

Tabela 3 - Ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

Tratamento	Concentração	Atividade residual (%)
Controle	-----	100,00
Arsenato	25mM	9,57 ± 0,35
EDTA	10mM	82,36 ± 1,25
Levamisol	1mM	68,84 ± 1,8
Cloreto de Magnésio	10mM	94,51 ± 0,7
Metavanadato	50µM	71,59 ± 2,99
pHMB	1mM	60,47 ± 0,11
Pirofosfato de sódio	10mM	75,46 ± 0,6
Teofilina	5mM	55,50 ± 0,6
Cloreto de Zinco	50µM	50,81 ± 1,13

A atividade específica utilizada como 100% para a fosfatase alcalina corresponde a 57,55 U.mg⁻¹.

Enquanto a prata e o zinco exerceram pouca influência sobre a atividade da fosfatase ácida solúvel, o vanadato, o tartarato e o pHMB inibiram cerca de 50%. O fluoreto de sódio foi o que acarretou maior inibição da atividade enzimática dentre os compostos testados (Tabela 4). A inibição por pHMB e NaF sugere que esta enzima é uma tirosina fosfatase.

Tabela 4 - Ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase ácida solúvel da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

Tratamento	Concentração	Atividade residual (%)
Controle	-----	100,0
Vanadato	50 μ M	55,6 $\pm$ 1,05
Nitrato de prata	2,5 mM	98,5 $\pm$ 0,45
Cloreto de Zinco	2,5 mM	72,8 $\pm$ 0,07
<i>p</i> HMB	1 mM	65,2 $\pm$ 0,24
Tartarato	90 mM	58,3 $\pm$ 0,17
NaF	2,5 mM	7,2 $\pm$ 0,03

A atividade específica utilizada como 100% para a fosfatase alcalina corresponde a 27,08 U.mg⁻¹.

O estudo do efeito da concentração do substrato *p*NPP (Figuras 15, 16 e 17, e Tabela 5) sobre a atividade das enzimas ligadas à membrana revelou que a fosfatase ácida apresentou V_m de 104,5 U.mg⁻¹, aproximadamente 10 vezes maior que a fosfatase alcalina ($V_m=10,5$ U.mg⁻¹), enquanto a ácida solúvel (Figura 16) apresentou V_m de 25,9 U.mg⁻¹, que é cerca de 4 vezes menor que a de membrana e 2,5 vezes maior que o da fosfatase alcalina. Semelhantemente ao observado para o V_m , a fosfatase ácida de membrana foi a que apresentou maior relação V/K_m (357,9). Observa-se ainda que a fosfatase alcalina de membrana foi a que apresentou menor relação V/K_m (53,3). As fosfatases alcalina e ácidas apresentaram comportamento Michaeliano, uma vez que não houve diferença estatística entre os valores de n_H próximos de 1.

Figura 15 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase alcalina de membrana solubilizada com PIPLC da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

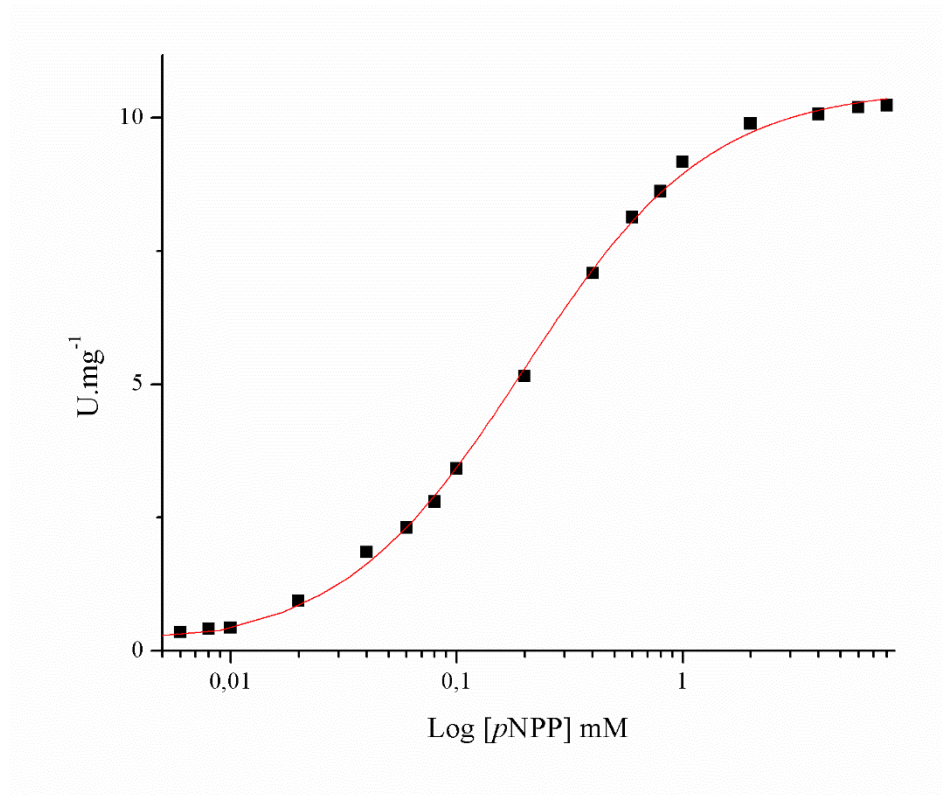


Figura 16 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida de membrana da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

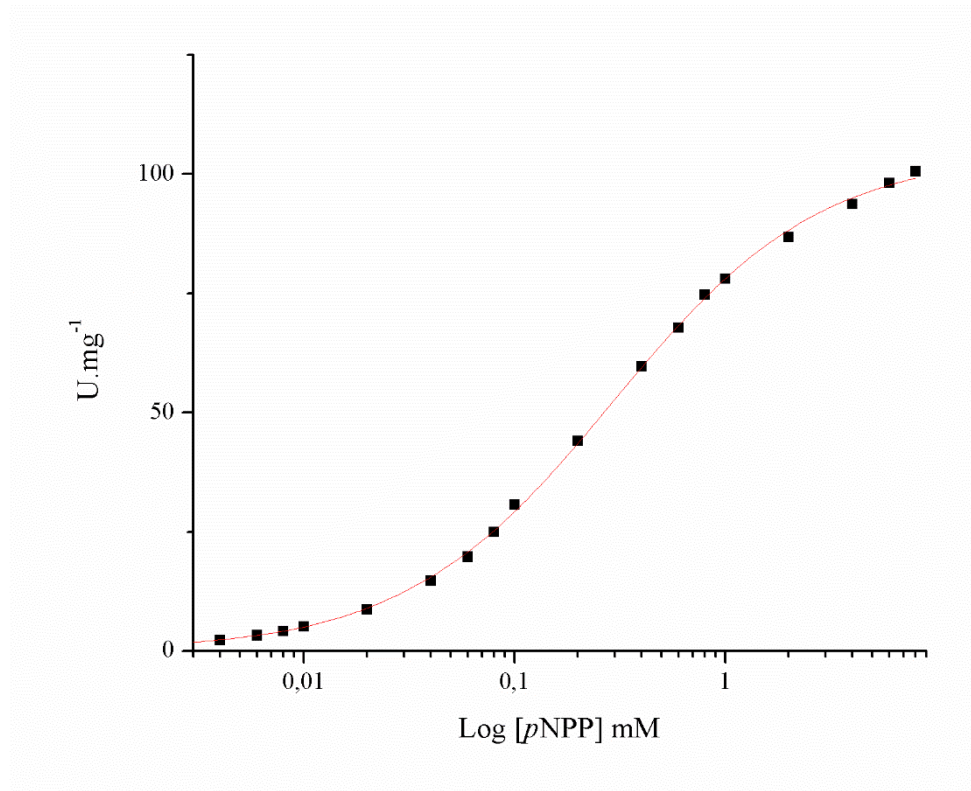


Figura 17 - Efeito da concentração de substrato sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida solúvel da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

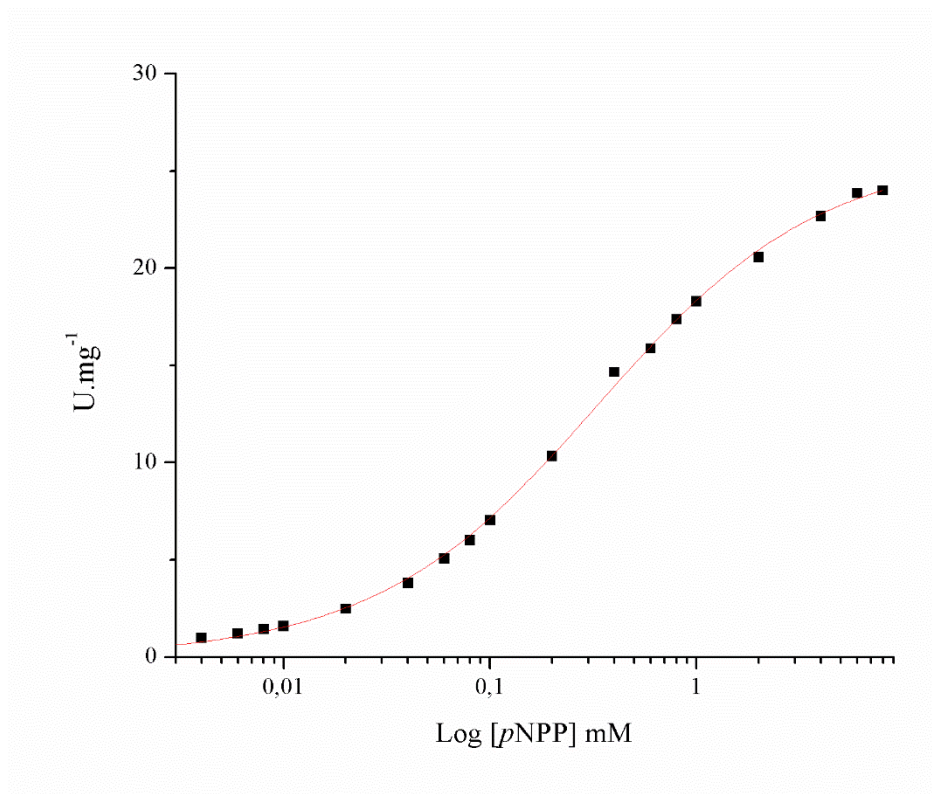
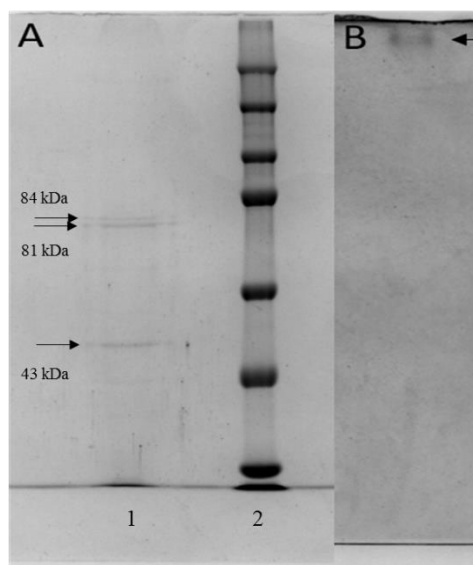


Tabela 5 - Parâmetros cinéticos para atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases presentes na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.

Fosfatase	Vmax (U.mg ⁻¹)	Km (mM)	n _H	V/Km
Alcalina	10,5 ± 0,08	0,20 ± 0,01	1,0 ± 0,02	53,2
Ácida de membrana	104,5 ± 0,83	0,29 ± 0,01	0,9 ± 0,01	357,9
Ácida solúvel	25,9 ± 0,32	0,33 ± 0,01	0,8 ± 0,02	78,6

Enquanto a atividade de fosfatase alcalina no gel não desnaturante apresentou apenas uma banda (Figura 17B) com uma pequena migração, a eletroforese em presença de agente desnaturante da fração solubilizada por PIPLC revelou a presença de três bandas proteicas de 84, 81 e 43 kDa (Figura 18A). Sugerindo a presença de várias moléculas proteicas ou de uma enzima com subunidades.

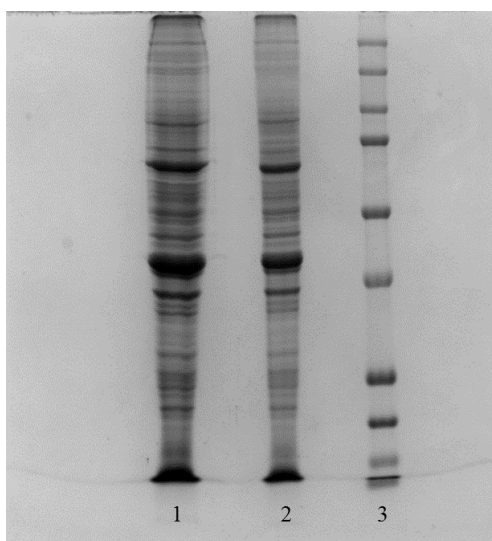
Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença (A) e na ausência (B) de agente desnaturante da fosfatase alcalina da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44, solubilizada por PIPLC.



A- Foram aplicadas 3,69 μg de proteína (1) e Padrão de massa molecular “Precision Plus Protein Standards kaleidoscope®” (Bio-rad) (2), respectivamente em gel de 10%. B- Atividade de fosfomonohidrolase, foram aplicadas 4,05 μg de proteína em gel de 7,5%.

A eletroforese do extrato bruto da cauda de animais no estágio 44 em presença de agente desnaturante (Figura 19) revelou a presença de várias moléculas proteicas.

Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente desnaturante do extrato bruto da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44 utilizado para análise em espectrômetro de massas.



Foram aplicadas, respectivamente, 56 (1) e 28 (2) μg de proteína da cauda de girinos de rã-touro no estágio 44, e Padrão de massa molecular “Precision Plus Protein Standards kaleidoscope®” (Bio-rad) (3) em gel de poliacrilamida de 12%.

A espectrometria de massas do referido gel demonstrou pela primeira vez a presença de 3 possíveis fosfatases (Tabela 6), sendo identificadas uma subunidade catalítica e uma regulatória para a serina/treonina proteína fosfatase 2A (PP2A), uma serina/treonina-proteína fosfatase PP1 e fosfotirosina proteína fosfatase de baixa massa molecular. É importante salientar que ainda não foram depositadas informações suficientes sobre a espécie *L. catesbeianus* nos bancos de dados de proteínas, logo, a identificação foi realizada utilizando o banco de dados de vertebrados do UniProt.

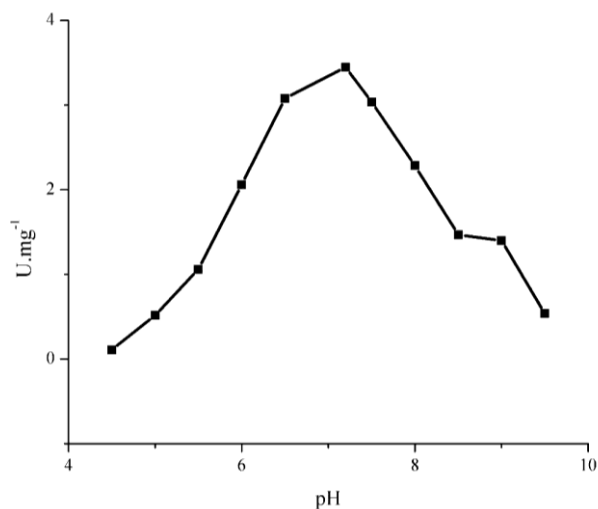
Tabela 6 - Possíveis fosfatases identificadas pela análise de espectrometria de massas em busca por *Sequest*.

Número de acesso	Descrição de proteína/Peptídeos identificados	Score	PSMs*
Q3SWW9	Serina/treonina-proteína fosfatase PP1	8,56	
	FLNRHDLDLICR		1
	YQYGGLNSGRPVTTPR		1
	EIFISQPILLELEAPIK		3
Q5ZKG5	Fosfotirosina proteína fosfatase de baixa massa molecular	3,2	
	IDSAATSTYEIGNPPDYR		1
P11493	Serina/treonina-proteína fosfatase 2A, sub catalítica (isoforma β)	10,4	
	QITQVYGFYDECLRK		1
	NVVTIFSAPNYCYR		1
	QITQVYGFYDECLR		1
P30153	Serina/treonina-proteína fosfatase 2A, sub A (isoforma α)	4,74	
	LNIISNLDCVNEVIGIR		1

*Peptide-spectrum matches

O estudo do pH sobre a atividade de serina/treonina proteína fosfatase da enzima ligada à membrana revelou pH ótimo aparente de 7,2, para a hidrólise do fosfopeptídeo (0,1mM) fornecido pelo kit “Serine/Threonine Phosphatase Assay System” (Figura 20).

Figura 20 - pH ótimo aparente da atividade de serina/treonina proteína fosfatase presente na fração de membrana da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



A determinação da atividade de PP2A em pH 7,2 nas diferentes frações obtidas por ultracentrifugação, demonstrou uma possível relação desta enzima com a fosfatase alcalina que se encontra ligada à membrana pela âncora de fosfatidilinositol (Figuras 21 e 22).

Figura 21 - Atividade da fosfatase alcalina presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44, nas diferentes etapas de separação por ultracentrifugação e solubilizada com PIPLC.

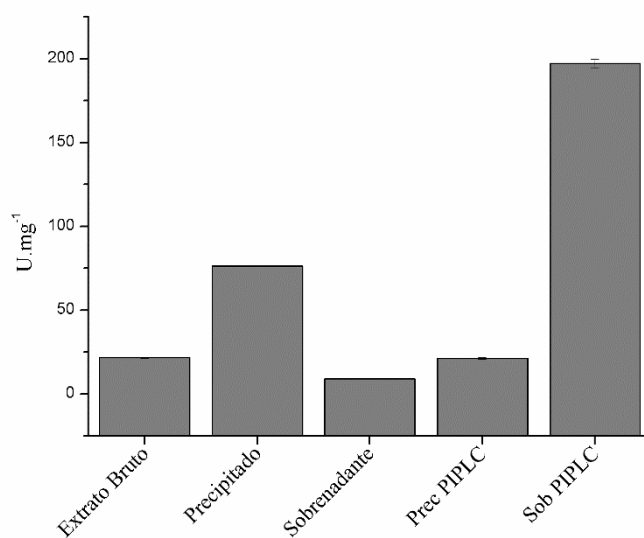
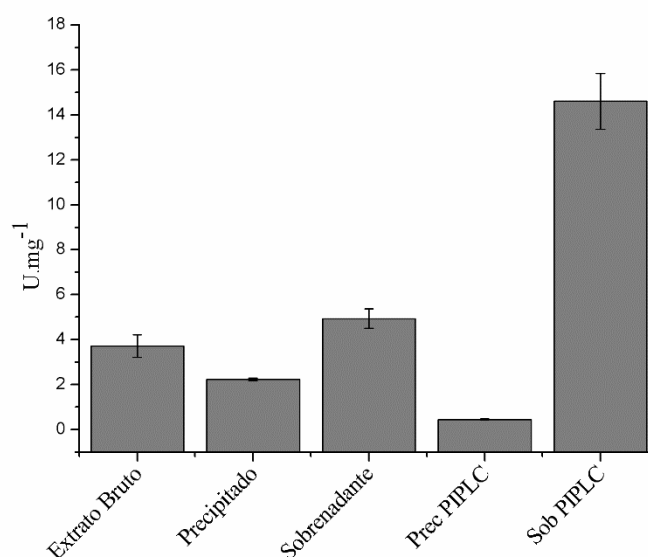
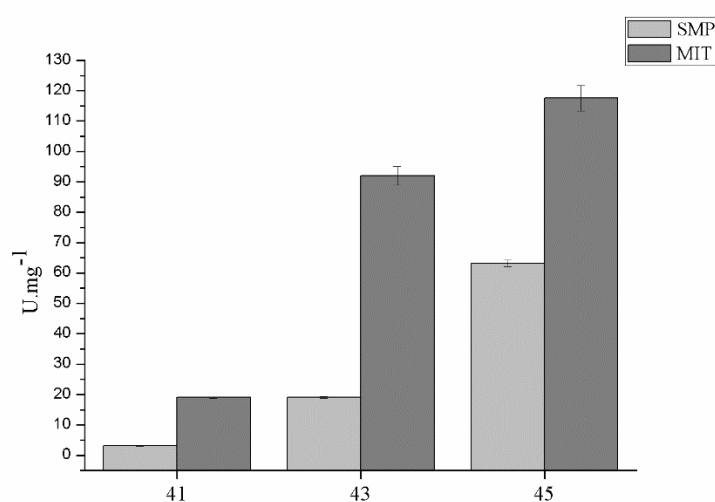


Figura 22 - Atividade de PP2A presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44, nas diferentes etapas de separação por ultracentrifugação e solubilizada com PIPLC.



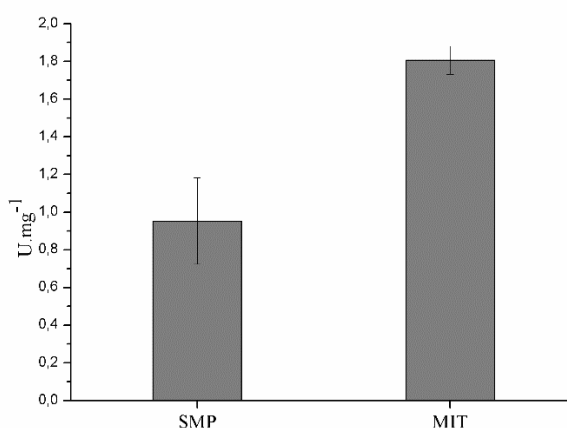
A atividade de fosfatase alcalina na fração constituída por proteínas solúveis de membrana plasmática (SMP) e mitocondrial (MIT), nos estádios 41 (pró-metamorfose), 43 (metamorfose) e 45 (último estágio da metamorfose), revelou que a maior parte de sua atividade específica se encontra na fração mitocondrial (Figura 23). Além disso, é possível observar uma alteração na proporção da localização da enzima no decorrer da absorção da cauda.

Figura 23 - Média da atividade de fosfatase alcalina presente nas frações SMP e MIT, nos estádios 41, 43 e 45.



A atividade de PP2A nas frações SMP e MIT, no estágio 43 (Figura 24), revelou que, semelhantemente ao observado para a fosfatase alcalina, a maior parte da atividade específica está associada à fração mitocondrial.

Figura 24 - Média da atividade de PP2A presente nas frações SMP e MIT, no estágio 43.



O estudo da ação do *Inhibitor-2*, um inibidor específico de PP1, sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica de proteínas de membrana em pH 7,0 revelou uma inibição de aproximadamente 20%, indicando a presença da PP1 na membrana. Entretanto, o mesmo estudo não detectou nenhum efeito de inibição da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica na fração solúvel e nos pH 4,5 e 10,5 de ambas as frações.

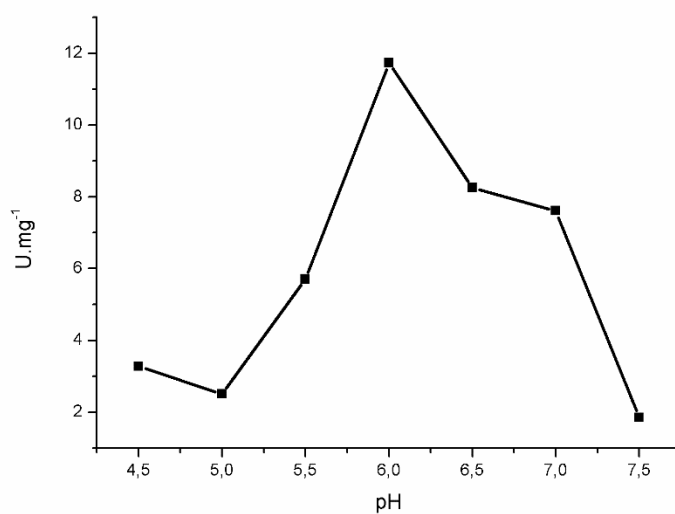
Tabela 7 - Efeito do *Inhibitor-2* sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fração de proteínas de membrana no pH 7,0.

Tratamento	Concentração	Atividade residual (%)
Controle	-----	100,0
<i>Inhibitor-2</i>	1 nM	79,2 ± 0,54
<i>Inhibitor-2</i>	10 nM	80,7 ± 0,22

A atividade específica utilizada como 100% para a fosfatase alcalina corresponde a 11,61 U.mg⁻¹.

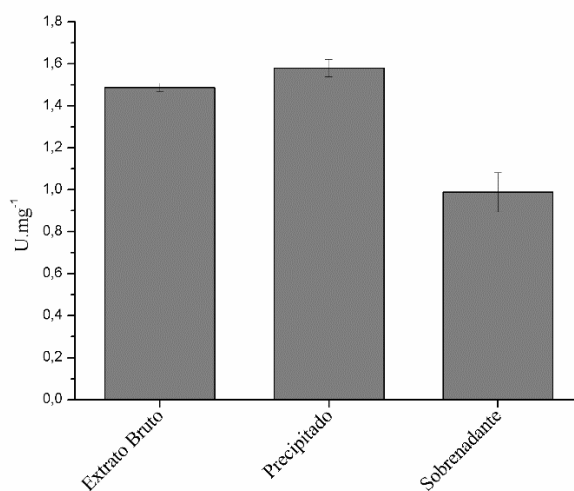
O estudo do efeito do pH sobre a atividade de proteína tirosina fosfatase da fração solúvel, revelou um pH ótimo aparente de 6,0 para hidrólise do fosfopeptídeo (0,1mM) fornecido pelo kit “Tyrosine Phosphatase Assay System” (Figura 25).

Figura 25 - pH ótimo aparente da atividade de proteína tirosina fosfatase presente na fração solúvel da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



O estudo da atividade de proteína tirosina fosfatase (PTP) nas diferentes frações de separação por ultracentrifugação revelou atividade específica tanto na fração de membrana (precipitado), quanto na de proteínas solúveis (Figura 26).

Figura 26 - Atividade de PTP presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44, nas etapas de separação por ultracentrifugação.



A espectrometria de massas, utilizando o extrato bruto da cauda de animais do estágio 44, revelou a presença de quinases (Tabela 8) e outras proteínas (Tabela 9) relacionadas ao controle de morte e sobrevivência celular, sugerindo os possíveis mecanismos envolvidos na absorção da cauda. Além das proteínas apresentadas nas tabelas, foram identificadas diversas proteínas da família HSP, relacionadas à manutenção celular em períodos de estresse.

Tabela 8 - Quinases de interesse identificadas por Espectrometria de massas em busca por *MS Amanda*.

Número de acesso	Descrição da proteína/Peptídeos identificados	Score	Papel*	PSMs**
Q9DE14	Serine/threonine-protein kinase atr OS= <i>Xenopus laevis</i>	407,51	Envolvida na fosforilação da p53, está ligada à inibição da mitose e replicação de DNA	
	AYTDAKMSR			1
	DMFYETLKVVR			3
	VASFDP TLM TISER			1
	IENLVFMQQQR			2
	IcRKVLDSAHR			1
	KMALNSLVSLMK			1
	STTWSIR			1
	SSEM QKQEATHHR			1
	AYTDAK _m SRDNEMK			1
Q9UIG0-2	VYEWKAGRADR	386,04	Regulação de reparo de DNA ou apoptose durante o estresse genotóxico	1
	Isoform 2 of Tyrosine-protein kinase BAZ1B OS= <i>Homo sapiens</i>			
	QSLELQK			1
	FSWPFREP VTR			1
	TARLLSSEDRAR			1
	GGLGYVEETSEFEAR			2
	TPIGTDNRNHR			1
	FLQGFMAPKQK			1
	LAVLKEENDK			1
	ENGKVENGLGK			1

Q5S006	Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2	153,91	Sinalização no tráfego para a reciclagem de proteínas	
	OS= <i>Mus musculus</i>			
	TIINESLNFKIR			2
	GSLDRLLQQDK			1
	QTNTGSVLAR			1
	TTLLQQLMKMK			1
	FPKNYmmQYFK			1
	ITVPScR			1
Q62388	SATLWLGcGNTEK	353,34	Tem p53 como um dos substratos, atua na sinalização de estresse celular	1
	Serine-protein kinase ATM OS= <i>Mus musculus</i>			
	EWcAELQELR			1
	SQGAcSKDILTK			1
	EEVGLLREHK			2
	YSSGSRNIAVK			3
	NKTNEESR			3
	MLAAGSVNR			1
	IRTYEHEATWEK			1
	IPDSYQK			1
	mDFLTTVK			1
	KEVDKFK			1
	ELRNGQmK			1
	YIQKEMESLR			1
Q8BTI9	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform OS= <i>Mus musculus</i>	188,52	Envolvida no início da formação do autofagossomo	
	QKFDEALRESWTTK			1
	GNKLNTEETVK			2
	SEEEALKQFK			1
	STKTINPSKYQTIR			1
	QccEDAYLILR			2
	AGLFHGTELLcK			1
	GSVGHmKVLSK			1

*Papel das quinases com base em informações do UniProt. **Peptide-spectrum matches

Tabela 9 - Proteínas de interesse identificadas por Espectrometria de massas em busca por *MS Amanda*.

Número de acesso	Descrição da proteína/Peptídeos identificados	Score	Papel*	PSMs**
Q6GQB9	ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein 3 OS= <i>Xenopus laevis</i>	289,86	Degradação do Retículo Endoplasmático	
	VPcGFAAVKDVR			4
	DVRTGSHEDR			1
	NDPmYAQNIREPLK			1
	IAlMQRGQcmFAEK			1
	NVVDKNcPR			2
	KDSGVGAGIDSYEYLLK			1
	EFEDAVRK			2
Q6PCG4	TLIDNLNK	177,64	Proteinase turnover proteico, via lisossomo	1
	Proteasome subunit beta type OS= <i>Xenopus laevis</i>			
	VGEFDVSELLK			2
	FDLTPEEAYDLGR			1
	FKHGVIVA VDSR			1
Q6P2Y7	AISYATHR	141,99	Proteinase turnover proteico, via lisossomo	1
	Proteasome (Prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6 OS= <i>Xenopus tropicalis</i>			
	HLDWTVDMDLLNKMK			2
	YYVREMR			1
	EGALTAFR			1
D1MX09	KANEEELKR	105,98	Sinalizador de apoptose extrínseca	1
	TNF-related apoptosis-inducing ligand 2 OS= <i>Xenopus laevis</i>			
	TmTcPVPQQYYR			2
	MTMTcPVPQQYYR			1
Q9WUF3	TMTcPVPQQYYR	272,22	Necessário para ativação da Caspase 8	1
	CASP8-associated protein 2 OS= <i>Mus musculus</i>			
	MDNKEIR			1
	ERTQHSNcQK			2
	NLEKQNER			1
	ELPSQDKTER			2

	ENKEESRHK			1
	KNSPGVSHSSQK			1
	HSQcSRGTDR			1
	HDGINAcAISEGVK			1
	ERTQHSNcQKK			1
	NSPGVSHSSQKK			1
	GAVSNSELSK			1
	LSEFPFR			1
	ScPLEScLPK			1
	SGTRHSQcSR			1
Q9JM13	Rab5 GDP/GTP exchange factor OS= <i>Mus musculus</i>	196,81	Envolvida na endocitose	
	QRQIQEDWELAER			6
	YMSGQTSPR			1
	KEIQEAK			2
	KQESWPPPEAcLGVK			2
Q62415	Apoptosis-stimulating of p53 protein 1 OS= <i>Mus musculus</i>	188,82	Ativador de apoptose via p53	
	EPGEGGcHLAEVWR			5
	IRAmRGQVDYSK			1
	RNmEVAMMDK			1
	LGDREGYVPK			2
	NMEVAmMDKR			1
	VEAQENKLK			2
	LYQELQIR			1
	NMEVAMMDKR			1
O43933	Peroxisome biogenesis factor 1 OS= <i>Homo sapiens</i>	156,76	Necessário para a importação de proteínas para o peroxissomo	
	EENSEIDFILPFLK			1
	LSRQSISTREK			1
	DLGWDKIGGLHEVR			1
	KIRSDHNEEDEK			2
	DFTVLVDR			1
	DISEEDIK			1
	LETKDGLK			1
Q0VBM2	Protein FAM83B OS= <i>Mus musculus</i>	181,90	Ativador da cascata de MAPK e AKT	

	GRGIYPLNDQDK			4
	mPTLENTTK			1
	SEPKVDSSPR			1
	GIYPLNDQDK			1
Q9UKV3-5	Isoform 4 of Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus OS= <i>Homo sapiens</i>	132,36	Induz condensação da cromatina após ativação da caspase 3	
	GALMLENLQK			1
	EmKTTSPLEEEER			1
	EIKSSQGLKEK			1
	GVPAGNSDTEGGQPGR			1
	SRSRSASSNSR			1
	TTSPLEEEER			1
	RLSQPESAEK			1

*Papel das proteínas com base em informações do UniProt. **Peptide-spectrum matches

6 DISCUSSÃO

A metamorfose de anfíbios é um excelente modelo para estudar o metabolismo e as necessidades nutricionais durante a passagem da larva aquática para adulto terrestre (BROWN; CAI, 2007). Além de auxiliar na natação, durante a metamorfose, a cauda fornece nutrientes necessários para as transformações morfofisiológicas que promovem a transição do ambiente aquático para o terrestre, uma vez que os animais não se alimentam e as enzimas desempenham papel crucial durante o período de inanição. A mobilização de nutrientes depende de uma grande variedade de hidrolases, as quais possuem afinidade por substrato(s) específico(s) (TORRIANI-GORINI, 1994). Esse processo é altamente regulado e ocorre por várias reações bioquímicas ligadas à aquisição, armazenamento, síntese e liberação de enzimas (TORRIANI-GORINI, 1994).

Depois do cálcio, o fósforo é o mineral mais abundante nos tecidos animais, e possui papel importante na fisiologia celular, incluindo a mineralização do tecido esquelético (PIZAURO et al., 1998). Este nutriente participa da composição de biomoléculas como ATP, ácidos nucleicos, proteínas, coenzimas e fosfolipídios (PIZAURO et al., 1998). Além disso, o fósforo possui função crucial na regulação de vários processos metabólicos como transferência energética, ativação de proteínas, regulação de atividade enzimática, ativação gênica, sobrevivência celular, dentre outras (LI et al., 2009).

Estudos anteriores demonstraram que as transformações morfofisiológicas que ocorrem durante o desenvolvimento do animal, antes da metamorfose, dependem da alimentação exógena, contudo, durante a metamorfose não há ingestão de alimento e os nutrientes que subsidiam este período são fornecidos por meio da absorção da cauda (GONÇALVES et al., 2015). Durante o clímax metamórfico ocorre a redução da atividade de enzimas digestivas em girinos de *L. catesbeianus* (SANTOS et al., 2016). Como pode ser observado nas Figuras 9 e 10, a atividade das fosfatases ácida (Figura 9) e alcalina (Figura 10) aumentou mais de dez vezes neste período, indicando que a cauda é fonte de fósforo necessário para os processos anabólicos e catabólicos durante a metamorfose. O aumento da atividade das enzimas estudadas (Figuras 9 e 10) durante a metamorfose suporta a hipótese de que a absorção da cauda ocorre pela atividade de enzimas hidrolíticas, as quais são sintetizadas antes ou durante o clímax metamórfico, como resultado da ação do TH (ROBINSON, 1970; BROWN; CAI, 2007).

A razão da proteína total pela massa corpórea (Figura 11) diminui durante a absorção da cauda, sugerindo que ocorre preservação e/ou síntese de enzimas essenciais ao processo,

apesar da diminuição da cauda. Segundo Brown e Cai (2007), a síntese de enzimas hidrolíticas ocorre no período que antecede a metamorfose ou durante seu clímax.

Aumento similar aos da fosfatase ácida e alcalina (Figuras 9 e 10) foi observado por Robinson (1970) para fosfatase ácida de *Xenopus laevis*, sugerindo que o aumento da atividade específica está relacionado à preservação de enzimas essenciais para a mobilização de nutrientes. Além disso, alterações qualitativas e quantitativas foram observadas na fosfatase ácida na cauda de *X. laevis* durante a metamorfose (ROBINSON, 1972). Segundo Robinson (1970), tanto as mudanças quantitativas quanto as qualitativas ocorrem aproximadamente no período de maior redução e autólise da cauda. De acordo com Filburn e Vanable (1973), uma das formas da fosfatase ácida possui especificidade por nucleosídeos di e trifosfato, o que indica um importante papel na autólise, reduzindo a reserva de metabólitos de alta energia, interferindo com o metabolismo energético celular e, conseqüentemente, afetando os processos normais de síntese.

A atividade das fosfatases ácida e alcalina permaneceu baixa entre os estádios 26 e 41 e aumentou durante a metamorfose (Figuras 9 e 10), sugerindo que essas enzimas estão relacionadas à morte celular e à mobilização de fósforo que ocorrem na cauda. Além disso, a presença de uma forma da fosfatase ácida no lisossomo (KROEMER; JÄÄTELÄ, 2005) suporta a hipótese de que a enzima participa da morte celular e do processo de absorção da cauda. O lisossomo participa do processo de autofagia e, em alguns tipos de células, secreta enzimas no meio extracelular (BLOTT; GRIFFITHS, 2002), o que demonstra sua importância nos modelos de morte celular “suicida” e “assassino” (NAKAJIMA; FUJIMOTO; YAOITA, 2005) e a relação com a elevada atividade de fosfatase ácida observada na Figura 9.

O aumento da atividade de fosfatase ácida (Figura 9) pode estar relacionado ao fato de que durante a metamorfose há diminuição na ingestão de alimento (SANTOS, 2016), o que pode levar, além do estímulo hormonal, ao processo de autofagia, seguida de morte celular, a fim de reutilizar os nutrientes da cauda. Segundo Kroemer e Jäätelä (2005), o estresse nutricional acarreta ativação dos lisossomos, iniciando a autofagia e, conseqüentemente, possibilitando a sobrevivência celular. Contudo, longos períodos desse estímulo negativo levam à ativação de mecanismos de morte celular (KROEMER; JÄÄTELÄ, 2005).

O perfil da atividade das fosfatases ácida e alcalina (Figuras 9 e 10) mostra que essas enzimas são expressas quando o fósforo exógeno é escasso devido à diminuição de ingestão de alimento, sugerindo que há uma intrínseca relação entre a utilização de fosfato exógeno, a mobilização das reservas endógenas, e a expressão das fosfatases induzidas, que são

sintetizadas em resposta a baixos níveis de fosfato (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; GONÇALVES et al., 20015).

A comparação entre diversos genes de fosfatase alcalina que foram isolados e caracterizados suporta a hipótese de que a referida enzima tem um único gene ancestral e as múltiplas isoformas existentes são devido a duplicações de um gene ancestral (GOSEKI-SONE et al., 1999). Goseki-sone e colaboradores (1999) demonstraram que os aminoácidos do sítio ativo da fosfatase alcalina são conservados tanto em humanos quanto em *Escherichia coli*. Também foi demonstrado que o fosfato extracelular regula a expressão da fosfatase alcalina em *E. coli*. Além disso, essa enzima é codificada pelo *gene* PhoA e é sintetizada quando há baixa disponibilidade de fosfato para as bactérias (GOSEKI-SONE et al., 1999; ROMBOLA et al., 2014). Em *E. coli*, as proteínas PhoB e PhoR, além de outros genes, formam o sistema “regulon de fosfato” que é responsável pela regulação do transporte e assimilação do fósforo na sua presença ou ausência (TORRIANI, 1990). O sistema “regulon de fosfato” é composto por um conjunto de genes que codificam um complexo multi-proteico capaz de detectar níveis de fosfato extracelular. Esse complexo é negativamente regulado sob excesso e positivamente regulado em condições limitantes de fosfato, regulando a expressão de genes relacionados à aquisição de fosfato, como o das fosfatases (MCGRATH; CHIN; QUINN, 2013). De acordo com Kumar (2009), o sistema “regulon de fosfato” é conservado em mamíferos, e a fosfatase alcalina está possivelmente envolvida com o suprimento de fosfato inorgânico para o organismo (GOSEKI-SONE et al., 1999). Apesar do papel das fosfatases em anuros não estar bem estabelecido, os dados (Figuras 9, 10 e 11) demonstram que essas enzimas estão envolvidas na absorção da cauda e que o sistema “regulon de fosfato” pode ser conservado também em anuros (GONÇALVES et al., 2015).

A fosfatase ácida está, provavelmente, relacionada à mobilização de nutrientes durante o período de inanição no qual o animal diminui sua alimentação e ocorre a absorção da cauda. Por outro lado, é possível que a fosfatase alcalina tenha um papel essencial para a iniciação da morte celular, uma vez que já está bem estabelecido que a fosforilação por quinases e a defosforilação por proteínas fosfatase regulam efetores anti e pró-apoptóticos (GARCIA et al., 2003). Além disso, tem sido demonstrado que diversas fosfatases alcalinas têm atividade de proteína fosfatase (LI; CHAN, 1981; SWARUP; COHEN; GARBERS, 1981), o que coincide com os dados encontrados pela análise em espectrômetro de massas, os quais mostram a presença de proteínas fosfatase na cauda de girinos de *L. catesbeianus* do estágio 44 (Tabela 6).

O perfil da atividade das fosfatases ácida e alcalina (Tabelas 1 e 2) demonstram a presença de pelo menos duas isoformas para a fosfatase ácida, e de uma de fosfatase alcalina. A atividade de fosfatase alcalina presente no precipitado após a ultracentrifugação demonstra que esta enzima se encontra ligada à membrana, enquanto a fosfatase ácida possui isoformas solúvel e ligada à membrana. Estes resultados inéditos coincidem com o observado para fosfatases ligadas à membrana e obtidas de outros tecidos de vertebrados (PIZAURO et al., 1998).

O tratamento das fosfatases ácida e alcalina associadas à membrana com NaCl demonstrou que tanto a fosfatase ácida quanto a alcalina não são proteínas aderidas à membrana (Tabela 2). Por outro lado, o tratamento com Triton X-100 solubilizou ambas as enzimas e acarretou aumento na atividade (Tabela 2), provavelmente, devido às interações entre as enzimas e o detergente. Resultados similares foram obtidos por Pizauro e colaboradores (1998), para as enzimas que participam do processo de calcificação ectópica. O tratamento com PIPLC demonstrou que a fosfatase alcalina encontra-se associada à membrana por meio da âncora de fosfatidilinositol (Tabela 2), assim como em outros tecidos de vertebrados de diferentes espécies (PIZAURO et al., 1998). O tratamento da fosfatase ácida ligada à membrana com PIPLC acarretou diminuição da atividade enzimática e sua solubilização parcial da membrana. Ainda não temos uma explicação definitiva para esse comportamento, pois o tratamento na temperatura ótima de atuação da PIPLC (37°C), durante uma hora, em pH 7,5, pode ter acarretado inativação da fosfatase ácida. Mais estudos de estabilidade da enzima nestas condições são necessários para a elucidação desse comportamento.

Quanto à ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina (Tabela 3), semelhantemente ao observado para a enzima obtida de diferentes origens, a inibição da atividade enzimática pelo EDTA sugere que a fosfatase alcalina da cauda de girinos de rã-touro é uma metaloenzima (PIZAURO et al., 1998), ou que o composto interage com a molécula, acarretando mudanças conformacionais. No que tange à inibição pelo zinco (Tabela 3), tem sido proposto que este íon atua deslocando o magnésio do seu sítio catalítico, inibindo a atividade de metaloenzimas (PIZAURO et al., 1998). Apesar dessas evidências, mais estudos são necessários para demonstrar que a fosfatase alcalina identificada se trata de uma metaloenzima. A inibição da atividade da referida enzima pelo produto da reação, o fosfato inorgânico, sugere que sua concentração possui um papel importante no processo de regulação da absorção da cauda. Além disso, a ação inibitória pelo arsenato (Tabela 3), um análogo estrutural do fosfato, apoia essa suposição (PIZAURO et al., 1998). Em relação à fosfatase ácida solúvel, foram testados compostos conhecidos por inibirem proteína tirosina fosfatase

(Tabela 4). As proteínas tirosina fosfatases são caracterizadas por não necessitarem de íons metálicos para catálise, serem sensíveis ao vanadato e serem capazes de hidrolisar o pNPP (ZHANG, 2002). Segundo Granjeiro e colaboradores (1997) e Buzalaf e colaboradores (1998), a inibição por pHMB e, principalmente, a inibição por NaF (RATHAUR et al., 2009), sugere que a referida enzima atua como uma tirosina fosfatase.

A separação por ultracentrifugação das proteínas solúveis e de membrana confirmou a existência de duas isoformas da fosfatase ácida (Tabela 1, Figuras 12 e 13). Os estudos de caracterização cinética das fosfatases demonstraram que as atividades observadas são provenientes de moléculas diferentes (Figuras 15, 16 e 17). No que tange ao coeficiente de Hill, não foi observada diferença estatística entre as enzimas. É importante destacar que as enzimas também apresentaram diferenças nos parâmetros cinéticos, K_m , V_m e V_m/K_m (Tabela 5), apoiando a suposição de serem enzimas distintas que atuam nos processos de absorção da cauda durante a metamorfose.

A atividade de fosfomonohidrolase em gel de poliacrilamida (pH 9,4) da fração solubilizada com PIPLC revelou apenas uma banda (Figura 18B), enquanto a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS revelou a presença de três proteínas de massa molecular de 84, 81 e 43 kDa (Figura 18A). A combinação desses dois resultados sugere que a enzima solubilizada é constituída por subunidades.

A análise por espectrometria de massas do extrato bruto das proteínas da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44 (Tabela 6) demonstrou a presença de uma proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (PTP-LMW), uma serina/treonina proteína fosfatase (PP1), uma subunidade catalítica de serina/treonina proteína fosfatase 2A, e uma subunidade regulatória alfa de PP2A.

O pH ótimo aparente igual a 7,2, determinado para a atividade de serina/treonina proteína fosfatase (Figura 20) coincide com o recomendado pelo fabricante para a determinação da atividade de PP2A de diferentes tecidos e origens. O kit de dosagem não possibilita a determinação da atividade de PP1 e o tampão utilizado foi o recomendado para atividade de PP2A. Dessa maneira, foi feita investigação de qual das isoenzimas seria responsável pela atividade de PP2A. Na Figura 22 é possível observar que a PP2A está associada à membrana pela âncora de fosfatidilinositol, assim a atividade de serina/treonina proteína fosfatase 2A pode estar relacionada à fosfatase alcalina (Figura 21), uma vez que seu pH ótimo aparente varia dependendo do substrato e concentração do mesmo (Figura 14). Comportamento esse, característico da fosfatase alcalina obtida de vários tecidos de mamíferos (PIZAURO et al., 1998).

A atividade de fosfatase alcalina nas frações de proteínas solúveis de membrana plasmática (SMP) e mitocondrial (MIT) indicou variação durante as fases pró-metamórfica e metamórfica (Figura 23). Apesar da proporção de atividade de fosfatase alcalina na fração MIT ser maior em relação à SMP em todos os estádios estudados, é possível notar que, à medida em que a cauda é absorvida, há mudança nessa relação, indicando a liberação dessa enzima da mitocôndria. A atividade de PP2A no estágio 43 (Figura 24) também revelou maior atividade na fração MIT, assim como a fosfatase alcalina (Figura 23).

Apesar de não ser possível associar de maneira irrefutável a atividade de fosfatase alcalina com a atividade de PP2A, é possível observar similaridades de comportamento. Ambas estão associadas à membrana por meio da âncora de fosfatidilinositol (Figuras 21 e 22), além de estarem presentes na membrana de mitocôndrias (Figuras 23 e 24). O estudo cinético da fosfatase alcalina associada à membrana revelou que esta se comporta como enzima “Michaeliana” para a hidrólise do *p*NPP (Tabela 5), contudo, este é um substrato artificial utilizado apenas para a identificação da presença de fosfomonohidrolases. Por outro lado, apesar da subunidade catalítica da PP2A ser altamente inespecífica (JANSSENS; LONGIN; GORIS, 2008; VIRSHUP; SHENOLIKAR, 2009), sua regulação se dá de maneira extremamente complexa e a mudança na interação entre as subunidades catalítica e regulatória pode alterar drasticamente sua especificidade pelos diferentes substratos (JANSSENS; LONGIN; GORIS, 2008). Foi possível observar a mudança no perfil de atividade de fosfatase alcalina na SMP e MIT em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo o estágio 45, ao final da metamorfose, aquele com menor razão entre a atividade das duas frações (Figura 23). Segundo Klumpp e Krieglstein (2002), durante o processo de morte celular ocorre liberação da PP2A da membrana mitocondrial pela clivagem de sua subunidade catalítica, acarretando mudança em sua especificidade, além disso, tal clivagem aumenta sua atividade sobre peptídeos fosforilados *in vitro* (HOOF; GORIS, 2003). Como os estudos com a PP2A foram realizados principalmente no estágio 44, próximo ao final da metamorfose, é esperado que haja diferença na proporção dessa molécula associada à membrana e solúvel, o que pode alterar a sua especificidade por substratos e explicar a diferença no perfil de hidrólise do *p*NPP e de peptídeo fosforilado na treonina (Figuras 21 e 22).

O estudo da ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase ácida solúvel obtida da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44 indicou sensibilidade a inibidores específicos para tirosina fosfatase de diferentes tecidos e origens (Tabela 4), sugerindo que a fosfatase ácida solúvel pode ser a enzima responsável pela atividade de PTP identificada por espectrometria de massas (Tabela 6). Os ensaios enzimáticos realizados com peptídeo

fosforilado em um resíduo de tirosina, mostraram pH ótimo aparente 6,0 (Figura 25). Além disso, a atividade foi identificada tanto na fração de membrana quanto na solúvel (Figura 26). Segundo Janssens, Login e Goris (2008), a PP2A pode defosforilar resíduos de tirosina *in vitro*. Tal fato poderia explicar a alta atividade na fração de membrana (Figura 26), uma vez que o estudo de compostos sobre a atividade de fosfatase ácida solúvel e a identificação por espectrometria de massas de PTP (Tabela 6), indicam a presença de uma enzima solúvel.

A inibição de aproximadamente 20% na atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (Tabela 7) confirma a presença da PP1 identificada por espectrometria de massas (Tabela 6). Por ser uma proteína, o *Inhibitor*-2 está sujeito a variações conformacionais dependentes de sua composição em aminoácidos, assim, parece razoável admitir que o estudo em pH 4,5 e 10,5 afetou a ligação do inibidor à proteína alvo por ter acarretado mudanças conformacionais. A atividade enzimática realizada no pH 7,0 não possibilita diferenciar entre as atividades de fosfatase ácida ou alcalina de membrana (Figura 12), contudo, é possível afirmar que a atividade de PP1 representa 20% da hidrólise do *p*NPP nesse pH. Também deve ser destacado que não houve diferença na atividade do controle em relação ao tratamento na fração de proteínas solúveis, demonstrando que a PP1 é uma proteína de membrana.

O mecanismo de regulação de morte celular é baseado na fosforilação ou defosforilação reversível de fatores de ativação de morte celular, dentre os quais estão algumas proteínas da família BCL-2, que são sensores de sobrevivência ao estresse e, encontram-se fosforiladas em condições normais e defosforiladas nas células apoptóticas. As serina/treonina proteínas fosfatases PP1, PP2 e PP2B são responsáveis pela defosforilação de uma proteína da família BCL-2, denominada BAD, que é considerada um fator pró-apoptótico (KLUMPP; KRIEGLSTEIN, 2002). Em seu estado defosforilado, a BAD tem como alvo a proteína anti-apoptótica BCL-XL presente na superfície da mitocôndria. A ligação da BAD à BCL-XL desencadeia o processo de morte celular por MOMP (HOOF; GORIS, 2003). Além disso, a PP2A é a única proteína fosfatase conhecida até o momento (KLUMPP; KRIEGLSTEIN, 2002), por estar associada à membrana da mitocôndria, o que também foi observado na Figura 24. Essa enzima é capaz de defosforilar a proteína BCL-2, inibindo sua atividade anti-apoptótica. É importante ressaltar que a proteína pró-apoptótica BAX é regulada por fosforilação e defosforilação, sendo sua atividade a responsável por iniciar o processo de MOMP e, consequentemente, a apoptose (HOOF; GORIS, 2003). Além disso, as caspases, proteínas chave na apoptose, podem ser ativadas por defosforilação de fatores anti-apoptóticos, e afetar diretamente a atividade das fosfatases. Quando a caspase-3 cliva a subunidade alfa A da PP2A, ambas identificadas na cauda de girinos de *L. catesbeianus* (Tabela 6 e Figuras 22 e

24), acarreta aumento da atividade da PP2A, alterando drasticamente o estado de fosforilação da célula (KLUMPP; KRIEGLSTEIN, 2002).

Tanto a PP2A quanto a PP1 são conhecidas por atuar na defosforilação de caspases. A PP1 é capaz de defosforilar a caspase 9, iniciando o processo de morte celular induzida pela ausência de Interleucina-2 (IL-2). A defosforilação da caspase 3 pela PP2A acarreta aumento da atividade dessa protease (SUN; WANG, 2012). O perfil da atividade das fosfatases durante a metamorfose (Figuras 9 e 10) está ligado ao processo de sinalização de morte celular, esse fato também pode estar relacionado à modulação de atividade de caspases (SUN; WANG, 2012), uma vez que essas proteases também são substratos conhecidos das enzimas estudadas.

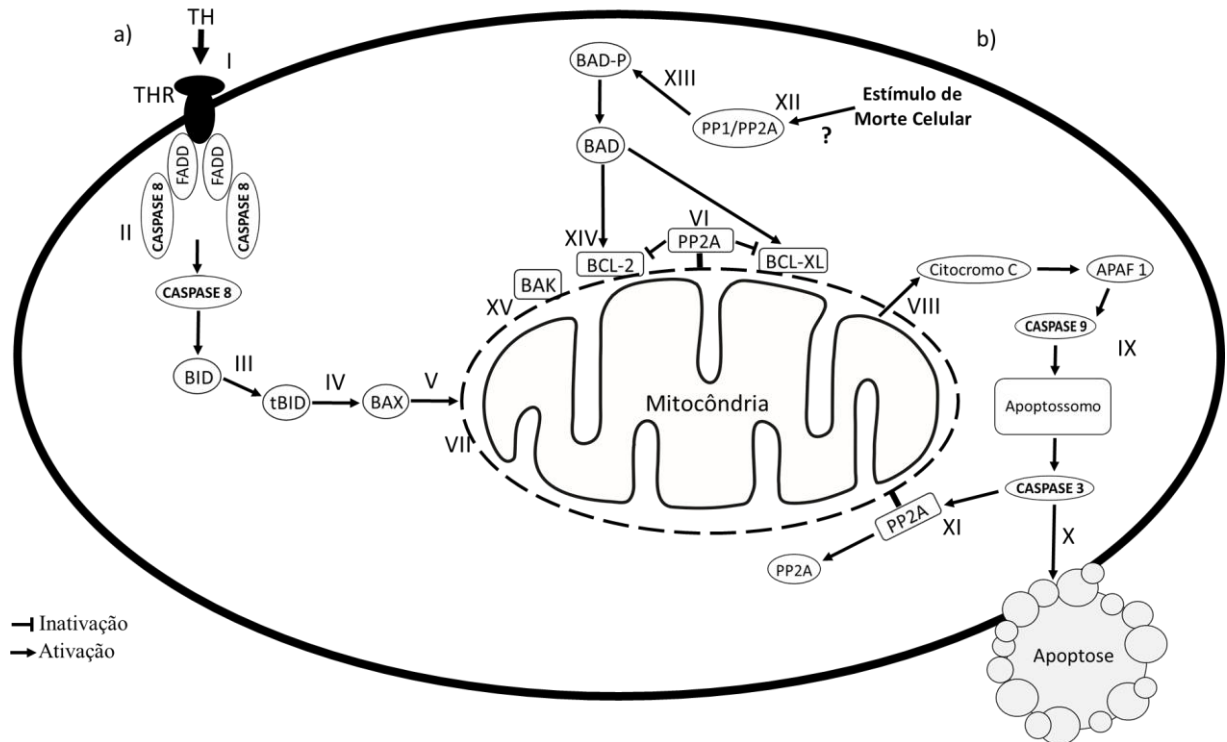
Outro ponto que merece destaque é a identificação de quinases, além de diversas proteínas, relacionadas ao processo de sobrevivência ou morte celular (Tabelas 8 e 9). Dentre as identificações, destacam-se os proteossomos, que são proteases multiméricas responsáveis pela degradação e *turnover* proteico, além de estarem envolvidos na autofagia (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006; PFISTER; EICKELBERG; MEINERS, 2013). A presença dessas proteases evidencia a degradação de proteínas por meio desse mecanismo. A identificação de um ativador de apoptose via p53 indica que a apoptose intrínseca (SUN; WANG, 2012) é um dos tipos de morte celular que ocorrem na cauda, assim como a presença do TNF e um ativador de caspase 8 evidenciam a apoptose extrínseca (TAIT; GREEN, 2010). O TNF também pode estar ligado ao modelo de “apoptose induzida por apoptose”, no qual uma célula apoptótica sinaliza via TNF para as células subjacentes sofrerem apoptose (FUCHS; STELLER, 2015), essa suposição deve-se ao fato de que o TH é capaz de sinalizar para o início da apoptose extrínseca (ISHIZUYA-OKA; HASABE; SHI, 2009), assim o TNF teria um papel de difundir a sinalização de morte.

Um fato notório é a presença, tanto de moléculas anti, como pró-apoptóticas, durante o período de metamorfose (Tabelas 8 e 9), de fato, já é estabelecido que esses estímulos coexistem nas células (CHIPUK; GREEN, 2008; GALLUZZI et al., 2015). Apesar da absorção da cauda ser um evento extremamente regulado, nem todas as células recebem a informação para sofrer apoptose, dessa maneira, existem mecanismos para impedir a sobrevivência e tentativa de proliferação celular. Enquanto as PP1 e PP2 tem papel crucial na morte celular, a proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (PTP-LMW) está relacionada à sinalização de fatores anti-proliferativos que acarretam inibição do crescimento celular (CHIARUGI et al., 1998). Apesar dos mecanismos de atuação não estarem bem estabelecidos, existem evidências da participação da referida enzima na inibição da multiplicação celular estimulada por contato, além da diferenciação celular (RAUGEI; RAMPONI; CHIARUGI, 2002). Em condições de

inibição de crescimento celular, há aumento na expressão de PTP-LMW e na atividade dessas enzimas, que pode ser devido à via de regulação positiva por oxidação-redução (RAUGEI; RAMPONI; CHIARUGI, 2002). Além disso, a proteína tirosina fosfatase regula negativamente, por defosforilação, o fator de crescimento PDGF, o qual está relacionado à proliferação de células satélites para regeneração do tecido muscular (YBLONKA-REUVENI; BALESTRERI; BOWEN-POPE, 1990).

Com base na literatura e nos resultados obtidos no presente trabalho, foi proposto um modelo de atuação da PP1 e da PP2A durante a metamorfose dos anuros (Figura 27). Nesse modelo foi estabelecido um paralelo entre as formas de apoptose e a teoria de morte celular “Suicida” e “Assassina”. O modelo “suicida” corresponde à apoptose Extrínseca, na qual a célula recebe um estímulo externo para iniciar a apoptose. Por outro lado, no modelo “assassino” ocorre apoptose Intrínseca, derivada de um evento similar à *Anoikis* em mamíferos, a degradação da matriz extracelular por proteases acarreta perda de contato entre as células e a matriz, levando à apoptose.

Figura 27 - Modelo de atuação da PP1 e PP2A na cauda de anuros durante a metamorfose.



a) Morte celular "Suicida" - O estímulo pelo TH via receptor de TH (THR) (I), em algumas células da cauda, acarreta ativação da caspase 8 pela interação entre FADD e pro-caspase 8 (II). A caspase 8 cliva a proteína BID, convertendo-a em sua forma ativa (tBID) (III), que é responsável pela ativação da BAX (IV), a qual é endereçada para a membrana da mitocôndria (V). Após a defosforilação das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-XL, pela PP2A (VI), ocorre oligomerização da BAX na membrana mitocondrial, formando poros (VII) e acarretando a modificação da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (MOMP) e consequentemente liberação do Citocromo C (VIII), o qual se complexa com a APAF1 e pro-caspase 9, formando o Apoptossomo (IX), acarretando ativação da caspase 3, levando à morte celular (X). Além disso, a caspase 3 cliva o trímero da PP2A ligada à membrana mitocondrial, liberando sua subunidade catalítica, que por ser inespecífica leva a drásticas alterações no estado de fosforilação da célula (XI).

b) Morte celular "assassina" - Com a degradação da matriz extracelular por proteases liberadas pelo estímulo do TH, ocorre a morte celular similar a *Anoikis*, caracterizada pela falta de comunicação da célula com a matriz extracelular, o que desencadeia mecanismos de apoptose Intrínseca. O estímulo interno de morte celular é responsável pela ativação de PP1 e/ou PP2A (XII), que defosforilam a proteína pró-apoptótica BAD (XIII), que por sua vez interagirá com a BCL-2 e BCL-XL, as quais também são defosforiladas a fim de permitir tal interação (VI). Com a inibição da atividade anti-apoptótica da BCL-2 e BCL-XL por meio de defosforilação e interação com a BAD (XIV), ocorre a oligomerização da proteína BAX, formando poros na membrana mitocondrial externa e consequente MOMP (XV).

7 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram identificadas duas serina/treonina proteínas fosfatases (PP1 e PP2A) e uma proteína tirosina fosfatase de baixa massa molecular (PTP-LMW) e proposto pela primeira vez um modelo de atuação dessas enzimas no processo de absorção da cauda de anuros durante a metamorfose. O presente modelo fornece informações para o conhecimento do papel, tanto da PP1, quanto da PP2A, na sinalização dos eventos que levam à morte celular, bem como o da PTP-LMW na regulação da proliferação celular.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo abrem novas perspectivas para esclarecer o papel das fosfatases tanto extramitocondrial quanto mitocondrial no processo de liberação de nutrientes de absorção da cauda durante a metamorfose. Além disso, o cultivo de células primárias da cauda de girinos de *L. catesbeianus* pode ser utilizado como importante modelo de estudo da ação de possíveis efetores que participam da apoptose. Tais estudos poderão contribuir para a compreensão dos eventos, bem como da regulação, da apoptose in vivo.

REFERÊNCIAS

- ALBINATI, R. C. B. Avanço na nutrição de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1., 1999, São Miguel do Iguaçu. **Anais...** São Miguel do Iguaçu: ABETRA, 1999. p. 13-31.
- ALEXANDER, M. A.; EISCHEID, J. K. Climate variability in regions of amphibian declines. **Conservation Biology**, v. 15, p. 930-942, 2001.
- 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.
- BLOTT, E. J.; GRIFFITHS, G. M. Secretory lysosomes. **Nature Reviews**, v. 3, p. 122-131, 2002.
- BREDESEN, D. E.; RAO, R. V.; MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, v. 443, p. 796-802, 2006.
- BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, v. 306, p. 22-33, 2007.
- 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.
- BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M.; FERREIRA, C. V.; LOURENÇÃO, V. A.; ORTEGA, M. M.; POLETTTO, D. W. Kinetic characterization of bovine lung low molecular-weight protein tyrosine phosphatase. **Experimental Lung Research**, v. 24, n. 3, p. 269-272, 1998.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.
- CHIARUGI, P.; CIRRI, P.; MARRA, F.; RAUGEI, G.; FIASCHI, T.; CAMICI, G. The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 6776-6785, 1998.
- CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 157-164, 2008.
- 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.

DAVIS, B. J. Disc eletrophoresis. Method and aplications to human serum proteins. **Annals of the New York Academy Science**, v. 121, p. 404-427, 1964.

DERBY, A.; JEFFREY, J. J.; EISEN, A. Z. The induction of collagenase and acid phosphatase by thyroxine in resorbing tadpole gills in vitro. **Journal of Experimental Zoology**, v. 207, p. 391-398, 1979.

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: McGaw-Hill, 1994. 696 p.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2. ed. Caxias do Sul: Ed. UCS, 2010. 510 p.

ESTABEL, J.; MERCER, A.; KONIG, N.; EXBRAYAT, J. M. Programmed cell death in *Xenopus laevis* spinal cord, tail and other tissues, prior to, and during, metamorphosis. **Life Science**, v. 73, p. 3297-3306, 2003.

ETKIN, W. **Metamorphosis: a problem in development biology**. New York: Appleton Century Crofts, 1968. 459 p.

FILBURN, C. R. Acid phosphatase isozymes of *Xenopus laevis* tadpole tails I: separation and partial characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 159, p. 683-693, 1973.

FILBURN, C. R.; VANABLE, J. W. Acid phosphatase isozymes os *Xenopus laevis* tadpole tails: II changes in activity during tail regression. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 159, p. 694-703, 1973.

FOX, H. Tissue degeneration: an electron microscope study of the pronephros of *Rana temporaria*. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 24, p. 139-157, 1970.

FREZZA, C.; CIPOLAT, S.; SCORRANO, L. Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 287-295, 2007.

FRISCH, S. M.; FRANCIS, H. Disruption of epithelial cell–matrix interactions induces apoptosis. **Journal of Cellular Biology**, v. 124, p. 619-626, 1994.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews**, v. 16, n. 6, p. 329-344, 2015.

GALLEGO, M.; VIRSHUP, D. M. Protein serine/threonine phosphatases: life, death, and sleeping. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, p. 197-202, 2005.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAM, J. M.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107-120, 2012.

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; VITALE, I.; AARONSON, S. A.; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; BAEHRECKE, E. H.; BAZAN, N. G.; BERTRAND, M. J.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V.; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. A.; CIECHANOVER, A.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K. M.; DI DANIELE, N.; DIXIT, V. M.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; FIMIA, G. M.; FLAVELL, R. A.; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M. L.; GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER, M. O.; ICHIO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, A.; LIPTON, S. A.; LOCKSHIN, R. A.; LÓPEZ-OTÍN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MARINE, J. C.; MARTIN, S. J.; MARTINOU, J. C.; MEDEMA, J. P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUNÓZ-PINEDO, C.; NUÑEZ, G.; OBERST, A.; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J. M.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. A.; RAVICHANDRAN, K. S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H. U.; STOCKWELL, B. R.; SZABADKAI, G.; TAIT, S. W.; TANG, H. L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, A.; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W. G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, p. 58-73, 2015.

GARCIA, A.; CAYLA, X.; GUERGNON, J.; DESSAUGE, F.; HOSPITAL, V.; REBOLLO, M. P.; FLEISCHER, A.; REBOLLO, A. Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. **Biochimie**, v. 85, p. 721-726, 2003.

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.

GOSEKI-SONE, M.; YAMADA, A.; ASAH, K.; HIROTA, A.; EZAWA, I.; IIMURA, T. Phosphate depletion enhances tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene expression in a cultured mouse marrow stromal cell line ST2. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 265, p. 24-28, 1999.

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

GOZUACIK, D.; KIMCHI, A. Autophagy and cell death. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 78, p. 217-245, 2007.

GRANJEIRO, J. M.; FERREIRA, C. V.; JUCÁ, M. B.; TAGA, E. M.; AOYAMA, H. Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 41, p. 1201-1206, 1997.

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

HEROES, E.; LESAGE, B.; GÖRNEMANN, J.; BEULLENS, M.; MEERVELT, L. V.; BOLLEN, M. The PP1 binding code: a molecular-lego strategy that governs specificity. **FEBS Journal**, v. 280, n. 2013, p. 584-595, 2012.

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.

HONKANEN, R. E.; GOLDEN, T. Regulators of serine/threonine protein phosphatases at the dawn of a clinical era? **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 2055-2075, 2002.

HOOFF, C. V.; GORIS, J. Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research**, v. 1640, p. 97-104, 2003.

HOSKINS, S. G. Control of the development of the ipsilateral retinohthalamic projection in *Xenopus laevis* by thyroxine: results and speculation. **Journal of Neurobiology**, v. 17, p. 203-229, 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.; HASEBE T.; SHI, Y. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. **Apoptosis**, v. 15, n. 3, p. 350-364, 2009.

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.

ISHIZUYA-OKA, A.; SHIMOZAWA, A. Programmed cell death and heterolysis of larval epithelial cells by macrophage-like cells in the anuran small intestine in vivo and in vitro. **Journal of Morphology**, v. 213, p. 185-195, 1992.

JANSSENS, V.; LOGIN, S.; GORIS, J. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 3, p. 113-121, 2008.

JUST, J. J.; ATKINSON, B. G. Hemoglobin transition in the bullfrog, *Rana catesbeiana*, during spontaneous and induced metamorphosis. **Experimental Zoology**, v. 182, 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.

KINOSHITA, T.; SASAKI, F.; WATANABE, K. Autolysis and heterolysis of the epidermal cells in anuran tadpole tail regression. **Journal of Morphology**, v. 185, p. 269-275, 1985.

KINOSHITA, T.; SASAKI, F.; WATANABE, K. Regional specificity of anuran larval skin during metamorphosis: dermal specificity in development and histolysis of recombined skin grafts. **Cell and Tissue Research**, v. 245, p. 297-304, 1986.

KLUMPP, S.; KRIEGLSTEIN, J. Serine/threonine protein phosphatases in apoptosis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 458-462, 2002.

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.

KROEMER, G.; JÄÄTTELÄ, M. Lysosomes and autophagy in cell death control. **Nature Reviews/Cancer**, v. 5, p. 886-897, 2005.

KUMAR, R. Phosphate sensing. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 18, n. 4, p. 281-284, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LI, H.; CHAN, W. W. S. Co-purification of type I alkaline phosphatase and type I protein phosphatase from various animal tissues. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 207, p. 270-281, 1981.

LI, L.; QIU, X.; LI, X.; WANG, S.; LIAN, X. The expression profile of genes in rice roots under low phosphorus stress. **Science in China Life Science**, v. 52, p. 1055-1064, 2009.

LIN, L.; BAEHRECKE, E. H. Autophagy, cell death, and cancer. **Molecular & Cellular Oncology**, v. 2, n. 3, 2015. doi:10.4161/23723556.2014.985913.

LIN, S. S.; BASSIK, M. C.; SUH, H.; NISHINO, M.; ARROYO, J. D.; HAHN, W. C.; KORSMEYER, S. J.; ROBERTS, T. M. PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome mediated degradation at the endoplasmic reticulum. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 23003-23012, 2006.

LUNA-VARGAS, M. P. A.; CHIPUK, J. E. The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane. **FEBS Journal**, v. 283, p. 2676-2689, 2016.

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, p. 372-379, 1971a.

MANIATIS, G. M.; INGRAM, V. M. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins in *Rana catesbeiana*. **The Journal of Cell Biology**, v. 49, 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.

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

McGRATH, J. W.; CHIN, J. P.; QUINN, J. P. Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 412-419, 2013.

MOORHEAD, G. B. G.; TRINKLE-MULCAHY, L.; ULKE-LEMÉE, A. Emerging roles of nuclear protein phosphatases. **Natura Reviews**, v. 8, p. 234-244, 2007.

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

NAKAJIMA, K.; FUJIMOTO, K.; YAOITA, Y. Programmed cell death during amphibian metamorphosis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 16, p. 271-280, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. 1328 p.

NISHIKAWA, A.; HAYASHI, H. Spatial, temporal and hormonal regulation of programmed muscle cell death during metamorphosis of the frog *Xenopus laevis*. **Differentiation**, v. 59, p. 207-214, 1995.

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.

PFISTER, N.; EICKELBERG, O.; MEINERS, S. Proteasome function in lung fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 42, 2013. Suppl. 57. Disponível em: <http://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl_57/P4886>. Acesso em: 09 fev. 2017.

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 Cellular Biochemistry**, v. 22, p. 121-129, 1995.

- 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, p. 921-926, 1988.
- PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, p. 108-114, 1998.
- 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.
- RATHAUR, S.; RAI, R.; SRIKANTH, E.; SRIVASTAVA, S. Setaria cervi dual specific phosphatase: characterization and its effect on eosinophil degranulation. **Parasitology**, v. 136, p. 895-904, 2009.
- RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 941-949, 2002.
- ROBINSON, H. Acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 173, n. 2, p. 215-224, 1970.
- ROBINSON, H. An eletrophoretic and biochemical analysis of acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 180, p. 127-140, 1972.
- ROCHE, J. Blood-phosphatases. **Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1724-1733, 1931.
- ROLLINS-SMITH, L. A. Metamorphosis and the amphibian immune system. **Immunology Reviews**, v. 166, p. 221-230, 1998.
- ROLLINS-SMITH, L. A. Amphibian immunity stress, disease, and climate change. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 66, p. 111-119, 2017.
- ROMBOLA, T. H.; PEDRINHO, E. A.; LEMOS, E. G. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. **BMC Research Notes**, v. 7, 2014. doi:10.1186/1756-0500-7-221.
- SANTOS, L. F. J. dos; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L. de; 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.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**. Version 9. Cary, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2007.

SIDDIQUI, R. A.; JENSKI, L. J.; NEFF, K.; HARVEY, K.; KOVACS, R. J.; STILLWELL, W. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in Jurkat cells by a protein phosphatase-mediated process. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1499, p. 265-275, 2001.

SUN, H.; WANG, Y. Novel ser/thr protein phosphatases in cell death regulation. **Physiology**, v. 27, p. 43-52, 2012.

SWARUP, G.; COHEN, S.; GARBERS, D. L. Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 8197-8201, 1981.

TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews**, v. 11, p. 621-632, 2010.

TATA, J. R. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. **Developmental Biology**, v. 13, p. 77-94, 1966.

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

TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. **Nature Reviews**, v. 7, p. 833-846, 2006.

TORRIANI, A. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **Bioessays**, v. 12, p. 371-376, 1990.

TORRIANI-GORINI, A. Regulation of phosphate metabolism and transport. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Ed.). **Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 1-4.

TRUEB, L.; HANKEN, J. Skeletal development in *Xenopus laevis*. **Journal of Morphology**, v. 214, p. 1-41, 1992.

VIRSHUP, D. M.; SHENOLIKAR, S. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. **Molecular Cell**, v. 33, p. 537-545, 2009.

WEBER, R. Switching of globin genes during anuran 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. 16, p. 567-597.

YABLONKA-REUVENI, Z.; BALESTRERI, T. M.; BOWEN-POPE, D. F. Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF. **Journal of Cell Biology**, v. 111, p. 1623-1629, 1990.

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.

ZHANG, Z. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 209-234, 2002.