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

Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

ADRIANO MARQUES GONÇALVES

Dissertação de Mestrado
2013

Adriano Marques Gonçalves

Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

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

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Araraquara

2013

ADRIANO MARQUES GONÇALVES

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

Araraquara, 27 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Marcio Hipolito
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal – LISA, São Paulo - SP

FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Adriano Marques
G635a Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro *(Lithobates catesbeianus)* / Adriano Marques Gonçalves. – Araraquara : [s.n], 2013
49 f. : il.

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

1. Biotecnologia. 2. Fosfatase. 3. Metamorfose. 4. Girino. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

unesp "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 010537/11 do trabalho de pesquisa intitulado **"Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), durante o desenvolvimento larval"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Júnior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de Junho de 2011.

Jaboticabal, 13 de Junho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

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

Dados curriculares

Adriano Marques Gonçalves

1. Dados Pessoais

Filiação: Carlos Alberto Gonçalves e Maria Aparecida Marques Gonçalves

Nascimento:14 de Junho de 1988

Documento de Identidade: 34.080.010-0

Cadastro de Pessoa Física: 358.387.598-28

Endereço Pessoal: Rua Diógines Muniz Barreto, 720, apto 102, Vila Yamada

Endereço Profissional: Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha

Profissão: Biólogo

2. Formação Acadêmica

2011 – 2013 Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Atividade de fosfomonohidrolases envolvidas com o crescimento e absorção da cauda de girinos de rã-touro (Lithobates catesbeianus) durante o desenvolvimento larval
Orientador: João Martins Pizauro Junior
Bolsista do: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2007 – 2010 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes na cauda de girinos rã-touro (Lithobates catesbeianus) durante a metamorfose
Orientador: João Martins Pizauro Júnior
Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

3. Atividades de Pesquisa

3.1 Trabalhos Apresentados em Congresso

1. SANTOS, L. F. J., **GONÇALVES, A. M.**, COLOSIO, R. R., SANTANA, C. C., PEREIRA, M. C. **Desenvolvimento de Girinos: Estudos Para Criação, Ecologia e Conservação**, 2011. (Outra,Apresentação de Trabalho)

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

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

4. **GONÇALVES, A. M. Atuação do Biólogo na Área de Enzimologia Aplicada**, 2010. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

5. **GONÇALVES, A. M.**, PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., COLOSIO, R. R.
Caracterização da atividade de fosfomonohidrolases da cauda de Lithobates catesbeianus durante a metamorfose, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

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

7. **GONÇALVES, A. M.**, SANTOS, L. F. J., PIZAURO, J. M. **ATIVIDADE DA FASFATASE ALCALINA DA CAUDA DE LITHOBATES CATESBEIANUS DURANTE A METAMORFOSE**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

8. **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. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

9. **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 en girinos de rã-touro (Rana catesbeiana) nos diferentes estágios metamórficos**, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)

10. **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. (Outra,Apresentação de Trabalho)

3.2 Participação em Eventos

1. **XLI Reuniao Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2012. (Congresso)

2. Apresentação de Poster / Painel 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.

3. Avaliador no(a) **I Fórum de Extensão Universitária**, 2011. (Outra)
Valaiador dos Trabalhos.

4. **I Fórum de Extensão Universitária**, 2011. (Outra)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010. (Congresso) Activities of Phosphomohydrolase from Lithobates catesbeianus Tail During Metamorphosis.

6. Conferencista no(a) **VIII Ciclo de Palestras da Blologia**, 2010. (Seminário). Atuação do Biólogo na Área de Enzimologia Aplicada.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXII Congresso de Iniciação Cientifica da UNESP**, 2010. (Congresso). Caracterização da atividade de fosfomonohidrolases da cauda de Lithobates catesbeianus durante a metamorfose.

8. **VI CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da U**, 2010. (Outra)

9. **IX JABu Jornada Anual Biológica da Unesp**, 2010. (Outra)

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de**

Bioquímica e Biologia Molecular, 2009. (Congresso). Activity Of Alkaline Phosphatase From Lithobates catesbeianus During Metamorphosis.

11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS)**, 2009. (Congresso). Activity of Alkaline Phosphatase From Lithobates Catesbeianus' tail During Metamorphosis.

12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXI Congresso de Iniciação Cientifica da UNESP**, 2009. (Congresso). Atividade das fosfatases ácida e alcalina da cauda de Lithobates catesbeianus durante a metamorfose.

13. **V CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da U**, 2009. (Outra)

14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Jornada de Iniciação Cientifica da FCAVJ-UNESP**, 2008. (Outra). Atividade da tripsina pancreática en girinos de rã-touro (Rana catesbeiana) nos diferentes estágios metamórficos.

15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Congresso de Iniciação Cientifica da UNESP**, 2008. (Congresso). Comportamento de catepsina-E e tripsina durante a metamorfose em girinos de Lithobates catesbeianus..

16. **IV CEBIO Colóquio sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas da Unesp Jaboticabal**, 2008. (Outra)

17. Conferencista no(a) **Exposição Água é Vida. Cuide desse bem**, 2007. (Oficina). Exposição Água é Vida. Cuide desse bem.

18. **XXII SECITAP - Sobrevivência em Matas**, 2007. (Seminário)

19. **III CEBIO Colóquio Sobre Educação do Curso de Ciências Biológicas**, 2007. (Seminário)

20. **VI JABU Jornada Anual Biológicas da Unesp**, 2007. (Seminário)

21. **Mini Curso:Aplicações da genética e biologia molecular**, 2007. (Seminário)

22. **Mini Curso: Animais peçonhentos**, 2007. (Seminário)

Agradecimento

Agradeço meus pais, Carlos Alberto Gonçalves e Maria Aparecida Marques Gonçalves, por todo amor e carinho, além da paciência e compreensão. São meu exemplo de vida, meu porto seguro e só tenho a agradecê-los pela vida e por toda educação que me deram. Não existem palavras suficientes para descrever a minha gratidão, afinal, sem vocês não sou nada. Amo vocês!

A minha irmã Andréa Marques Gonçalves, que pediu um irmãozinho para os nossos pais, então de certa maneira é responsável pela minha vida. Aproveito para agradecer por todo amor e amizade, além das duas crianças maravilhosas que acrescentou na vida da família, elas só nos proporcionam alegrias e bons momentos. Pelas minhas sobrinhas, Isabela e Manoela, também agradeço ao David, meu cunhado.

Agradeço aos meus avós por toda educação, carinho, amor e emoções indescritíveis. Devo muito a eles, pois mesmo agora, as lembranças que deixaram me fazem amadurecer na vida e ser um homem melhor.

Aos meus tios e primos por todo o apoio seja em momentos felizes ou tristes, além da participação marcante na minha formação enquanto pessoa.

Agradeço ao Professor João Martins Pizauro Junior, meu orientador, por toda atenção e orientação durante esses anos que estou no laboratório. Fico feliz em dizer que não é apenas um excelente profissional, mas também, um exemplo pelo caráter e pela pessoa que é. Felizmente, além de todas essas características, é São Paulino, o que torna a convivência sempre harmoniosa. Obrigado pela amizade, pelas conversas e todas as orientações, seja no âmbito profissional ou pessoal.

Aos meus companheiros de laboratório, Maria Cecília (Mi-leva), Caroline (Frígida), Rafael (Dopamina), Gisele, Mareliza (Dá-fiel), Gabriella (Prima), Thomaz (Mió), Luiz Flávio José (Pudendo) e Rodrigo (Sai), por todo o aprendizado, não só profissional, como pessoal. Como já disse um dia, somos um grupo diferenciado, nossa união e amizade não é encontrada em qualquer lugar, muito obrigado por fazerem parte da minha vida. Gostaria de destacar o Luiz Flávio José, que contribuiu muito para meu crescimento acadêmico, não apenas no laboratório, obrigado pela amizade. Aproveito para agradecer a Andréia, funcionária do departamento de Tecnologia, que independente da situação, está sempre por perto para nos dar força.

Não poderia esquecer de agradecer aos meus companheiros de sala, a Bio 07, pois tive a sorte de fazer parte da turma certa, a melhor biologia da FCAV, os resultados não mentem (vide IntraBio). Momentos e pessoas inesquecíveis.

Aos companheiros de república, Igor (Tele-Ton), Valter (Biskoitão), André Felipe (Black-Out) e Rodrigo (Mono-bola), que são companheiros na vida, amigos inesquecíveis. Foram anos de emoções, aprendizado e amizade. Tive muita sorte de encontra-los em meu caminho e só tenho a agradecer por isso, não existiria companhia melhor para dividir a casa e os momentos que passamos juntos.

Aos agregados Danilo (Fejão) e Diego (Dongo), pela amizade e pelas risadas, e é claro, pelas inúmeras vitórias que obtive independente de ser a zebra ou não.

Agradeço aos companheiros de Centro Acadêmico, em especial ao Guilherme (Poderosa) e Pedro (Parlito), pela amizade, aprendizado e esforço realizado para melhorarmos o pouco que pudemos o nosso querido curso, e é claro que com isso crescemos juntos como homens e profissionais.

A Thaís Angeli (Maminha), que teve papel crucial durante o desenvolvimento desse trabalho, já que durante todo o tempo foi um ombro amigo, nos momentos bons e ruins. Agradeço por todo carinho, paciência, amizade e cumplicidade, que aliados ao seu caráter e personalidade, sem dúvida fizeram toda a diferença.

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), por todos esses anos de amizade, e o orgulho que tenho deles, pois crescemos juntos e agora estamos trilhando nossos caminhos profissionais, mas sem perder a amizade, essa turma é fera.

Aos Professores Luiz Henrique Souza Guimarães e Marcio Hipolito, membros da banca avaliadora deste trabalho, que muito o enriqueceram com seus elogios, críticas e sugestões.

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

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 a Deus, por ter colocado tantas pessoas especiais em minha vida e por me dar forças para levantar todos os dias querendo ser um homem correto e melhor.

“Eduquem as crianças e não será necessário castigar os homens.”
Pitágoras

"O que me preocupa não é o grito dos sem ética, dos sem caráter, dos corruptos, dos sem vergonha. O que me preocupa é o silêncio dos bons.”
Martin Luther King

Resumo

Durante a metamorfose dos anuros, além da natação, a cauda tem como função fornecer nutrientes necessários para as transformações morfofisiológicas da fase larval aquática em adultos terrestres, pois os animais não se alimentam durante esse período. A fosfatase alcalina é uma enzima importante na mobilização do fosfato necessário para o anabolismo de biomoléculas essenciais à vida, enquanto a fosfatase ácida é uma marcadora lisossomal. Nesse sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade das fosfatases ácida e alcalina obtidas da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*), visando fornecer informações acerca do processo de mobilização de nutrientes durante o desenvolvimento e a metamorfose. Os animais foram mantidos em aquários a 27 °C, e separados por estádios de desenvolvimento. As caudas foram coletadas de animais em cada estádio e homogeneizadas em tampões acetato, TRIS.HCl ou 2-amino-2-metil-1-propanol, contendo $MgCl_2$ 2 mM e $ZnCl_2$ 1 μM, centrifugadas a 10000 *g,* durante 10 minutos, a 4°C, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C. A atividade de *p*-nitrofenilfosfatase foi estável quando as amostras homogeneizadas foram armazenadas em diferentes valores de pH, contudo, a atividade da fosfatase alcalina reduziu aproximadamente 70% após 12 horas de armazenamento no pH 4. O pH ótimo aparente para a hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato pelas fosfatases ácida e alcalina foi 5,0 e 10,5, respectivamente, enquanto a hidrólise do pirofosfato de sódio e do ATP para as atividades de pirofosfatase e ATPase foram de 7,5 e 7,0. A temperatura ótima para a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi 45°C por 15 minutos de reação. O estudo da ação de compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina revelou que o arsenato, EDTA, metavanadato, teofilina, levamisol, íons fosfato e o *p*-hidroximercuriobenzoato agem como inibidores, sendo que o arsenato promoveu maior inibição. As fosfatases ácida e alcalina tiveram um aumento na atividade quando comparados o período anterior à metamorfose e durante este processo, sendo as maiores atividades para a fosfatase ácida e alcalina 189,9 $U.mg^{-1}$(estádio 45) e 39,5 $U.mg^{-1}$ (estádio 44/2), respectivamente. A atividade específica de pirofosfatase e ATPase sugere sua importância na manutenção do sistema biológico do animal, portanto apresentam atividade desde os primeiros estádios estudados, apresentando pouca variação até o estádio 45. O aumento das atividades das fosfatases ácida e alcalina durante a metamorfose sugere que as enzimas desempenham um papel essencial na liberação do fosfato necessário as transformações morfofisiológicas que ocorrem durante esse processo, além de desempenharem um papel crucial na morte celular e absorção da cauda.

Abstract

During anurans metamorphosis, besides swimming, the tail has the function to supply with nutrients the morphophysiological changes of the larval aquatic stage to terrestrial adults, because the animals do not eat during this period. Alkaline phosphatase is an important enzyme in phosphate mobilization required to the anabolism of essential biomolecules, whereas the acid phosphatase is a lysosomal marker. Thus, the aim of this study was to evaluate the activity of acid and alkaline phosphatase obtained from the tail of bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*), to provide information about the process of nutrients mobilization during development and metamorphosis. The animals were kept in aquaria at 27 °C, and separated by stages. The tails were collected from animals at each stage and homogenized in acetate buffers, Tris.HCl or 2-amino-2-methyl-1-propanol, containing 2 mM $MgCl_2$ and 1 mM $ZnCl_2$, centrifuged at 10000 *g* for 10 minutes at 4 °C, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C. The activity of *p*-nitrophenylphosphatase was stable when the homogenized samples were stored at different pH values, however, alkaline phosphatase activity decreased about 70% after 12 hours of storage at pH 4. The apparent optimum pH for the hydrolysis of *p*-nitrophenylphosphate by acid and alkaline phosphatase was 5.0 and 10.5, respectively, while the hydrolysis of sodium pyrophosphate and ATP by the activities of pyrophosphatase and ATPase were 7.5 and 7.0. The optimum temperature for the activity of acid and alkaline phosphatases was 45 ° C for 15 minutes of reaction. The study of the action of compounds on the activity of alkaline phosphatase revealed that arsenate, EDTA, metavanadate, theophylline, levamisole, phosphate ions and *p*-hydroxymercurybenzoate act as inhibitors, and arsenate showed greater inhibition. Acid and alkaline phosphatase had an increase in activity when the period preceding metamorphosis and the period during this process are compared, and the highest activities for acid and alkaline phosphatase were 189.9 $U.mg^{-1}$ (stage 45) and 39.5 $U.mg^{-1}$ (stage 44/2), respectively. The specific activity of pyrophosphatase and ATPase suggests their importance in maintaining the animal's biological system, therefore they present activity since the first studied stages showing little variation until the stage 45. The increase in activity of acid and alkaline phosphatases during metamorphosis suggests that these enzymes play an essential role in the release of the phosphate necessary to the morphophysiological transformations that occur during the metamorphosis process, besides they play a crucial role in cell death and tail absorption.

SUMÁRIO

RESUMO.....11
ABSTRACT.....12
1. INTRODUÇÃO.....14
2. OBJETIVOS.....15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....16
3.1. Características gerais dos girinos e Metamorfose.....16
3.2. As Fosfomonohidrolases.....18
3.3. Morte Celular.....20
4. Material e Métodos.....21
4.1. Animais experimentais.....21
4.2. Padronização da obtenção do extrato bruto.....24
4.2.1. Estudo do efeito do armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina.....24
4.2.2. Efeito do pH sobre a atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina...25
4.2.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação, sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina.....25
4.3. Obtenção dos extratos enzimáticos.....25
4.4. Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases ácida e alcalina....26
4.5. Estudo da inativação térmica da atividade das fosfatases ácida e alcalina.....26
4.6. Ação de compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina.....26
4.7. Determinação da atividade de pirofosfatase.....26
4.8. Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatase.....27
4.9. Dosagem de proteína.....27
4.10. Análise de dados.....28
5. RESULTADOS.....29
6. DISCUSSÃO.....40
7. CONCLUSÃO.....44
REFERÊNCIAS.....45

1. Introdução

Entre as causas conhecidas e suspeitas de declínios populacionais de anfíbios relacionadas com ações antrópicas estão as alterações climáticas (ALEXANDER; EISCHEID, 2001), a poluição por contaminantes do ar, herbicidas e pesticidas (STALLARD, 2001), introdução de espécies exóticas (GILLESPSIE, 2001), doenças (CAREY; COHEN; ROLLINS-SMITH, 1999; MUTHS et al., 2003), e a deterioração do hábitat (WELSH; OLLIVIER, 1998).

A deterioração do habitat está relacionada com os diferentes nichos ocupados pelos Anura em seus estádios larval e adulto. A maioria dos anuros possui uma fase larval aquática e uma fase adulta terrestre. Os girinos, de uma maneira geral, são animais completamente diferentes tanto morfológica como ecologicamente dos adultos. As larvas são tão diversificadas em suas especializações morfológicas e ecológicas quanto os adultos. A maioria dos girinos dos anuros são herbívoros filtradores, enquanto os adultos são carnívoros. Desta maneira as larvas exploram recursos que não estão disponíveis para os adultos (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). A metamorfose dos anfíbios é caracterizada por drásticas transformações morfofisiológicas, relacionadas às mudanças da vida aquática para a terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003).

Outro aspecto interessante que merece ser destacado é que a biologia desses animais ainda não é completamente conhecida. Segundo Santos e colaboradores (2010), durante a metamorfose, a atividade das enzimas digestivas diminuiu bruscamente 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 pode ser uma fonte de energia para suprir a diminuição no consumo do alimento pelos girinos no decorrer da metamorfose.

A cauda contém quatro fileiras de fibras musculares chamadas de “cordas” (ELINSON; REMO; BROWN, 1999). Essas fibras musculares contraem conforme a cauda reduz e persistem até o final da metamorfose quando ela é totalmente absorvida. As cordas não são degradadas por morte celular autônoma, mas são completamente digeridas por enzimas responsáveis pela degradação da cauda (CAI; DAS; BROWN, 2007), tais como catepsina, peptidases, fosfatases e desoxirribonucleases. Tem sido demonstrado que as metaloproteinases da matriz (MMP) são induzidas por hormônios tireoidianos durante o clímax da metamorfose de anfíbios e desempenham um papel importante na remodelação intestinal e na absorção da cauda e das brânquias (FUJIMOTO; NAKAJIMA; YAOITA, 2007). Nesse sentido, o estudo de fosfomonohidrolases tem como finalidade fornecer

informações sobre a mobilização do fósforo e do perfil enzimático da absorção da cauda do animal durante a metamorfose, devido às escassas informações existentes na literatura acerca desse processo.

2. Objetivo

Determinar as atividades das fosfatases ácida e alcalina, ATPase e Pirofosfatase, presentes na cauda de girinos de *Lithobates catesbeianus*.

3. Revisão de Literatura

3.1. Características gerais dos girinos e Metamorfose

Durante a metamorfose 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 nos adultos (McDIARMID; ALTIG, 1999).

Cada uma das ordens de anfíbios, Anura, Caudata e Gymnophiona, passam por metamorfose, embora, nem todas as espécies de cada ordem sofram tal processo (DUELLMAN; TRUEB, 1994). A metamorfose nos anuros é um fenômeno principalmente endócrino regulado pelos hormônios tireoidianos. Em 1912 Gudernatsch (apud DUELLMAN; TRUEB, 1994) descobriu que a metamorfose dos girinos de *Rana temporaria* era acelerada quando alimentados com tireóide 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 são menos visíveis e 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, no ciclo da uréia e aumento da síntese de DNA e RNA (MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; THEIL, 1973; DUELLMAN; TRUEB, 1994; WEBER, 1996; JUST; ATKINSON, 1972).

O trato gastrointestinal do girino é um tubo longo e simples com um estômago rudimentar e um intestino longo. Durante o clímax da metamorfose é reduzido em cerca de 75%, 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 pro-néfrons regridem e desaparecem no final da metamorfose (FOX, 1970). Além de haver o remodelamento de órgãos funcionais dos girinos, como a pele (YOSHIZATO, 1996), os órgãos respiratórios (DODD; DODD,1976), fígado (ATKINSON; WARKMAN; CHEN, 1998), o sistema imune (ROLLINS-SMITH, 1998), o cérebro e 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 boa 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 tireóide foi provavelmente o primeiro exemplo conhecido de morte celular programada controlada por hormônio. Uma série de experimentos concluiu que os dois principais tipos de células da cauda, os fibroblastos e os músculos, respondem independentemente aos hormônios tireoidianos (BROWN; CAI, 2007). A apoptose, na metamorfose dos anfíbios, é iniciada pelos referidos hormônios (KIKUYAMA et al., 1993). Estudos realizados por vários pesquisadores mostraram que em cultura de tecidos os hormônios da tireóide podem induzir de maneira autônoma a absorção da cauda do girino (TATA, 1966) e brânquias (DERBY; JEFFREY; EISEN, 1979), e apoptose do epitélio do intestino delgado durante a remodelação (ISHIZUYA-OKA; SHIMOZAWA, 1992). Estes experimentos sugerem que os mecanismos moleculares da apoptose 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 na epiderme, músculos, tecido conjuntivo (derme), tecido nervoso (medula espinhal), e notocorda. Até o final da metamorfose, a cauda é totalmente absorvida através da morte celular de praticamente todos os tecidos, embora apenas alguns tipos de células sofram apoptose. Na cauda de girinos de *Xenopus laevis*, os músculos começam a sofrer apoptose na fase pro-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 se estendem (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, *L. catesbeianus* (KINOSHITA; SASAKI; WATANABE, 1986).

Existem dois modelos mais aceitos para explicar a morte celular na cauda de girinos durante a metamorfose: o “Modelo Suicida” e o “Modelo Assassino”. As células da cauda morrem por ambos os mecanismos de suicídio e assassinato quando a cauda está sendo absorvida. Em todos os casos, o hormônio da tireóide induz a morte celular por apoptose (NAKAJIMA ; FUJIMOTO; YAOITA, 2005). No modelo de suicídio, cada célula responde diretamente ao hormônio tireoideano, e produz algumas proteínas que induzem a morte celular. Por outro lado, no modelo de assassinato, as células são induzidas pelo hormônio tireoideano a secretar proteases de degradação na matriz extracelular, que perturbam interações célula a célula, e célula-matriz, levando à perda de ancoragem celular e apoptose, independentemente se uma célula morrendo responde ao hormônio tireoideano ou não (NAKAJIMA ; FUJIMOTO; YAOITA, 2005). Apoptose por assassinato corresponde a anoikis (FRISCH; FRANCIS, 1994), processo muito estudado em mamíferos.

3.2. As Fosfomonohidrolases

O fósforo é um nutriente essencial para os seres vivos, participa da composição dos fosfolipídios, do ATP, dos ácidos nucléicos, na formação de metabólitos fosforilados durante os processos degradativos, 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, possui um papel importante na calcificação biológica e na fisiologia do tecido ósseo (PIZAURO et al., 1998).

Durante o processo de degradação da cauda, o papel da fosfatase ácida, uma enzima lisossomal, tem recebido especial atenção (ROBINSON, 1970; GILBERT; FRIEDEN, 1981) devido ao fato de que muito pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos no metabolismo de fósforo durante a absorção da cauda. Mahapatra, Mohanty-Hejmadi e Gagan (2001) observaram aumento rápido na atividade da fosfatase ácida durante a absorção da cauda de anuros. Segundo Gilbert e Frieden (1981), esse aumento pode ser atribuído à liberação progressiva da enzima lisossomal em resposta ao hormônio tiroxina ou ainda devido à sua liberação pelos macrófagos fagocitários que se acumulam durante a absorção da cauda. Robinson (1970) estudou a atividade de fosfatase no extrato bruto obtido da cauda da rã saltadeira indiana, (*Polypedates maculatus*), no período de pré-absorção e de absorção e verificou aumento linear na atividade enzimática durante o desenvolvimento da cauda e no período que antecede a metamorfose, permanecendo elevada durante a primeira metade do período de absorção da cauda e a partir daí diminuiu progressivamente. Esse autor estudou

ainda as propriedades cinéticas da fosfatase ácida em diferentes regiões da cauda (nadadeira dorsal, ventral e tecido muscular) e verificou que ocorrem alterações na km e no pH ótimo aparente da fosfatase ácida durante a absorção.

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. Em geral, 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, inibidores e a presença ou ausência de íons, entre outros (NELSON; COX, 2011).

O centro ativo é constituído por grupos funcionais, como cadeias laterais de aminoácidos específicos, íons metálicos e coenzima, importantes para ligação do substrato ao sítio catalítico por interações iônicas, ligações de hidrogênio e posicionamento preciso para otimização da energia de ligação no estado de transição. A presença de metais na molécula enzimática é essencial tanto para a preservação da estrutura como para sua atividade máxima auxiliando na orientação e/ou estabilização dos estados de transição das metaloenzimas (NELSON; COX, 2011). 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 capaz de hidrolisar a ligação ésterfosfato 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).

3.3. Morte Celular

A apoptose, morte celular programada, é um mecanismo essencial para a sobrevivência e manutenção de organismos multicelulares. O reconhecimento desse processo é dado por alterações morfológicas características, que ocorrem de maneira coordenada (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006). Alguns mecanismos de desencadeamento apoptótico são conhecidos, contudo, os dois mais bem caracterizados são o extrínseco e o intrínseco. No primeiro, a apoptose ocorre pela ativação dos receptores de morte celular na superfície da célula, enquanto no segundo, o processo acontece devido à dissociação do citocromo C presente na membrana interna da mitocôndria (BREDESEN; RAO; MEHLEN, 2006).

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

O lisossomo é uma organela ligada à membrana interna da célula e contêm inúmeras enzimas hidrolíticas, entre elas, as fosfatases. Estudos mostraram que o aumento da permeabilidade da membrana lisossomal desencadeia processos de morte celular, a intensidade da permeabilidade ou ruptura está ligada ao tipo de morte celular, como apoptose; semelhante a apoptose ou necrose (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005). A apoptose ou semelhante a apoptose possuem como característica a ordenação de eventos que acarretam na morte celular programada, enquanto a necrose é patológica e corresponde a um processo desordenado, levando à morte celular. Além disso, essa organela tem papel essencial na fase de “limpeza” após a morte celular, tornando possível o reaproveitamento dos nutrientes da antiga célula para a síntese de novas biomoléculas (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005).

Diversos estudos demonstraram que muitos mecanismos que levam à morte celular estão associados com a ativação de proteínas fosfatase, fosforilação ou defosforilação de moléculas, evidenciando a importância do estudo das fosfatases nos diferentes tipos de morte celular (SIDDIQUI et al, 2001; GALLEGO; VIRSHUP, 2005).

4. Material e Métodos

4.1. Animais experimentais

Os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) (Figuras 1, 2 e 3) 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 27ºC. 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. Esta classificação é dividida em 46 estádios de desenvolvimento, sendo que os estádios que vão do número 1 ao 24 correspondem ao desenvolvimento embrionário. Dos estádios 25 ao 35, ocorre a fase de crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Dos estádios 36 ao 41 há uma estabilização do crescimento corporal e maturação dos membros posteriores e, finalmente, dos estádios 42 ao 46 (Figura 4), quando ocorre a metamorfose propriamente dita, com a externalização dos membros anteriores, absorção da cauda e reestruturação da mandíbula.

Figura 1 - Exemplar de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) adulto.

Elaborado pelo autor

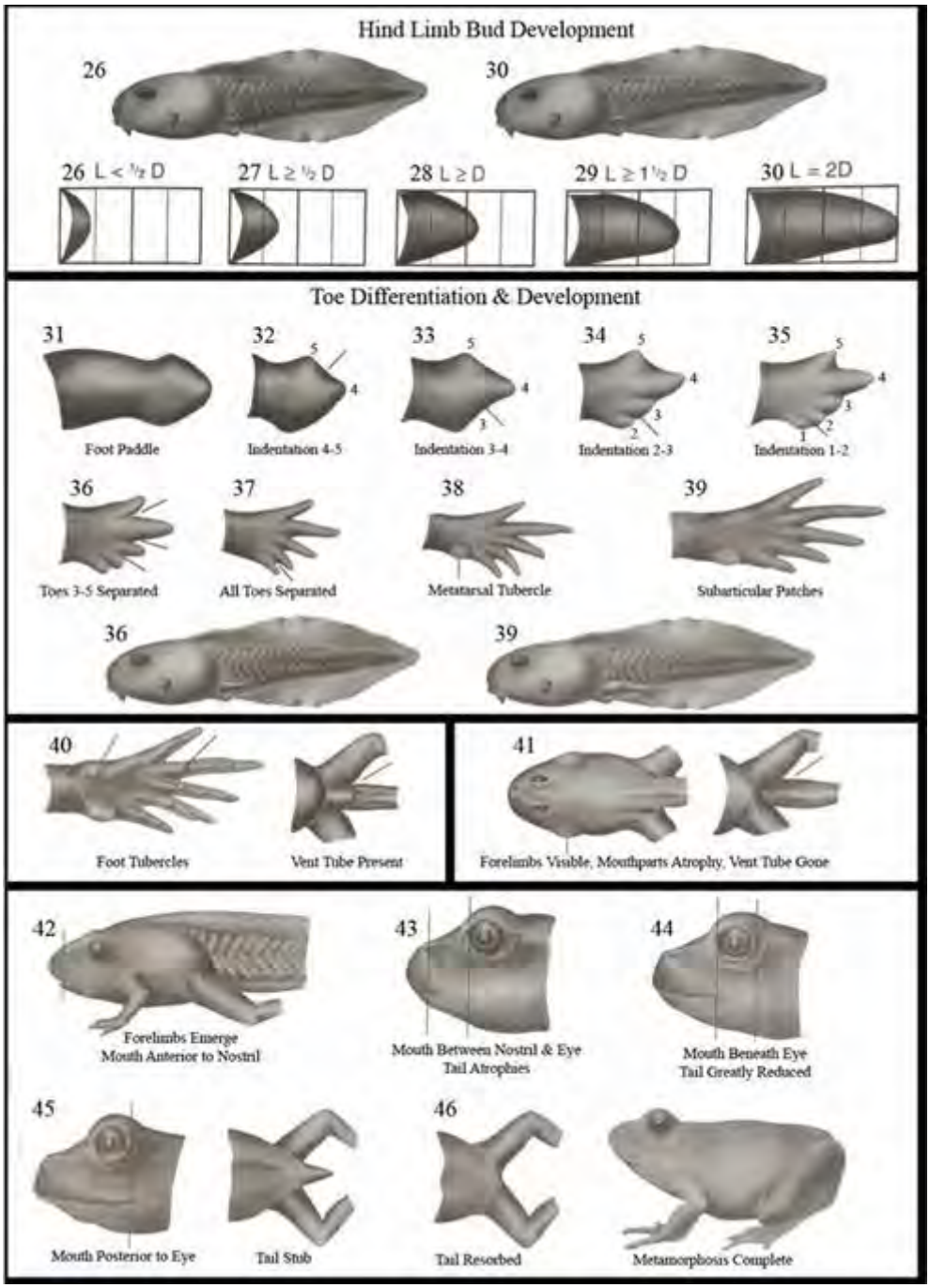
Figura 2 - Girinos de *L. catesbeianus* dos estádios 42 ao 46, incluindo duas subdivisões do estádio 44.

Elaborado pelo autor

Figura 3 - Girinos de *L. catesbeianus*.

Elaborado pelo autor

Figura 4 - Tabela de Gosner para classificação dos girinos em estádios de desenvolvimento de 26 a 45.



A tabela de Etkin (1968) define o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimentos 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 estádio 31 com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios tireoidianos indo até o estádio 41(GOSNER, 1960). O clímax inicia-se no estádio 42 e vai até o estádio 46 (GOSNER, 1960). Além disso, para o estudo das enzimas presentes na cauda, os girinos do estádio 44 foram divididos em duas classes, de acordo a proporção do peso da cauda em relação ao corpo: classe 1, igual ou maior que 8%; classe 2, menor que 8%.

4.2. Padronização da obtenção do extrato bruto

Com o objetivo de estabelecer as condições ideais para as atividades das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina, foram realizados diferentes ensaios enzimáticos variando-se: o pH e o tempo de armazenamento; a temperatura e o tempo de reação enzimática e o tempo e a temperatura necessários para inativação térmica das enzimas.

Para a obtenção do extrato bruto a ser utilizado nestes experimentos foi homogeneizado um *pool* de caudas de 5 animais do estádio 43 (determinação do tempo e temperatura ótimos de reação, e da inativação térmica) e de 5 animais do estádio 42 (determinação do pH e tempo ótimos de armazenamento).

4.2.1. Estudo do efeito do armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina

O efeito do armazenamento sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi estudado utilizando-se as soluções tampão: Acetato (pH 4, 5 e 6), Tris.HCl (pH 7 e 8) e AMPOL (pH 9 e 10), em concentração 5mM, contendo $MgCl_2$ 2mM e $ZnCl_2$ 1μM, para homogeneizar as caudas, na proporção de 1 grama de tecido para 10mL de tampão.

Imediatamente após homogeneização, foi realizada determinação de atividade enzimática em cada pH, sendo que o restante de cada amostra foi congelado em nitrogênio liquido e armazenado a -70ºC para ensaios posteriores nos tempos: 0,5; 1; 2; 7; 15 e 30 dias.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um ηmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato (U/mg), nas condições de ensaio.

4.2.2. 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 (entre pH 3,5-6.0), TRIS.HCl (entre pH 6,5-8,0) e AMPOL (entre pH 8,5-11,0), em concentração 100 mM.

A atividade PNFFásica (*p*-nitrofenilfosfatásica) das enzimas fosfatase ácida e fosfatase alcalina foi determinada a 37°C, através da formação do íon *p*-nitrofenolato (ε=17600$M^{-1}cm^{-1}$, pH 13), a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato 1mM, em um volume final de 1mL (PIZAURO et al, 1988).

4.2.3. Efeito da temperatura e do tempo de reação, sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina

Esse estudo foi realizado utilizando-se amostras homogeneizadas, em solução tampão TRIS.HCl 5mM, pH 7,5 contendo $MgCl_2$ 2mM e $ZnCl_2$ 1μM, congelada em nitrogênio líquido e armazenadas a -70ºC. A determinação das atividades foram realizadas em temperaturas de 20, 25, 27, 30, 35, 37, 40 e 45ºC, durante tempos de 1, 5,10, 15, 20 e 25 minutos.

4.3. Obtenção dos extratos enzimáticos

Após a padronização, para a obtenção dos extratos enzimático das caudas foram utilizados 5 animais dos estádios de desenvolvimento do 26 ao 45, além de 5 animais de cada sub-divisão do estádio 44. Os animais foram insensibilizados em água com gelo a 4° C, decapitados (CZESNIK et al, 2006) e, em seguida, as caudas retiradas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a –70ºC separadamente.

Após o descongelamento, as caudas foram homogeneizadas em homogeneizador tipo Turrax marca OMNI modelo GLH–2511, em tampão TRIS-HCl contendo $MgCl_2$ 2 mM e $ZnCl_2$ 5 μM, na proporção de 1 grama de tecido para 10 mL de tampão, formando um *pool* de cada estádio. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 *g* por 10 minutos a 4 ºC. Em seguida, o sobrenadante foi aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a –70ºC. Posteriormente, os mesmos foram utilizados para a determinação das atividades enzimáticas e da concentração de proteína do extrato.

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

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 (PIZAURO et al, 1988). 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.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um ηmol de *p*-nitrofenolato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato (U/mg), nas condições de ensaio.

4.5. Estudo da inativação térmica da atividade das fosfatases ácida e alcalina

O estudo da inativação térmica das atividades das fosfatases ácida e alcalina foi realizado incubando-se alíquotas do extrato bruto em temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60ºC durante 1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, posteriormente as amostras foram transferidas para banho de gelo onde permaneceram até a determinação da atividade enzimática a 37ºC, nas condições padrões do ensaio.

4.6. Ação de compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina

A ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina foi testada utilizando-se concentrações compreendidas entre 50 μM a 25 mM, dependendo do composto a ser testado.

4.7. Determinação da atividade de pirofosfatase

A atividade de pirofosfatase foi determinada descontinuamente a 37 ^{o}C, através da dosagem do fosfato inorgânico, pelo método de Heinonen e Lahti, (1981) modificado. A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional. Em tempos pré-estabelecidos a reação foi interrompida pela adição de 0,1 mL de solução gelada de TCA 50% (p/v). Em cada experimento foram incluídos controles, sem adição da enzima, para se estimar a hidrólise

espontânea do substrato. As determinações foram feitas em triplicatas, sendo que menos de 5% do substrato foi hidrolisado, e a absorbância foi determinada a 355 ηm.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um ηmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína (U/mg), nas condições de ensaio.

4.8. Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatase

A atividade de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase) foi determinada descontinuamente, a 37ºC, através da dosagem do fosfato inorgânico liberado a partir da hidrólise do ATP, pelo método de Heinonen e Lahti, (1981) modificado.

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio reacional e interrompida com 0,1 mL de solução gelada de TCA 50%, em tempos previamente estabelecidos. Após a homogeneização, os tubos foram transferidos e mantidos em banho de gelo para diminuir a hidrólise espontânea do ATP.

Neste método, o fosfato inorgânico liberado no meio de reação é complexado pelo molibdato de amônio acidificado com ácido sulfúrico. O fosfomolibdato formado é imediatamente extraído com acetona, sob agitação contínua durante 15 segundos. A seguir o excesso de molibdato presente no meio de reação é complexado pelo citrato e, em seguida o fosfomolibdato formado é dosado espectrofotometricamente em 355 ηm.

As determinações foram feitas em triplicatas, sendo que menos de 5% do substrato foi hidrolisado.

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um ηmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína (U/mg), nas condições de ensaio.

4.9. Dosagem de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo uso do kit de dosagem de proteína por fluorescência no aparelho Qubit™ fluorometer marca Invitrogen™, seguindo as especificações do protocolo fornecido pelo fabricante e utilizando soroalbumina bovina como padrão.

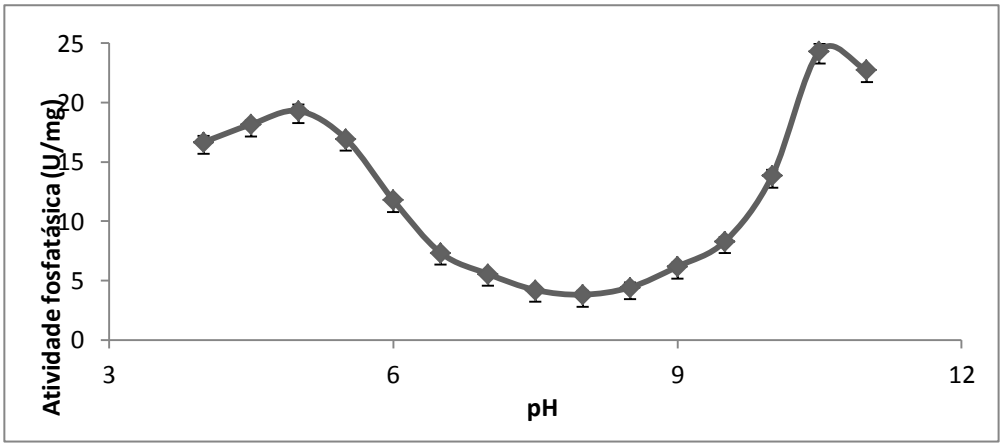
4.10. Análise de dados

A comparação das médias foi realizada pelo teste de Tukey (5%) e analisada utilizando o programa estatístico SAS de 2002.

5. Resultados

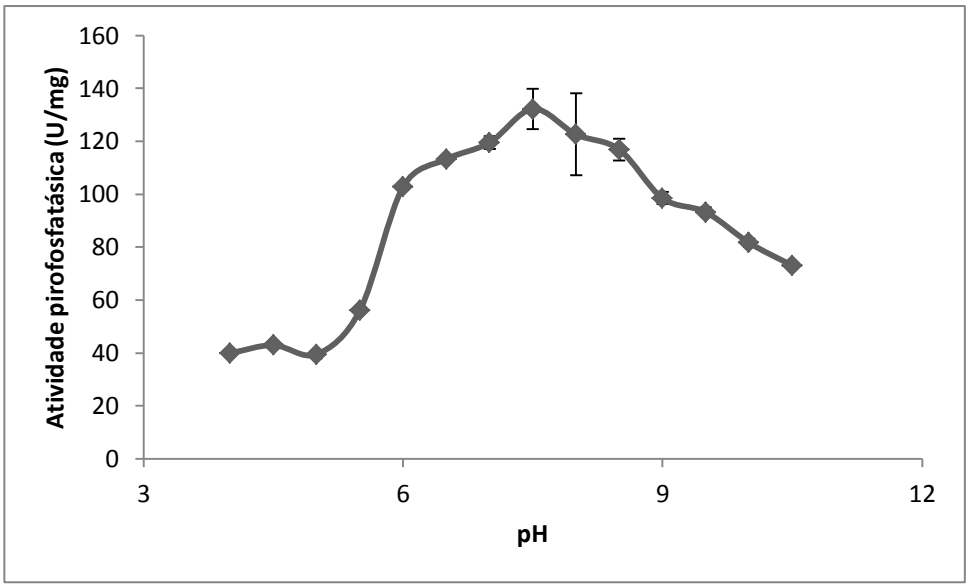
O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática demonstrou a existência de dois pH ótimos aparentes para hidrólise do substrato *p*-nitrofenilfosfato, um correspondendo a fosfatase ácida e outras a alcalina. Dessa forma esses valores de pH foram escolhidos para os demais estudos realizados no presente trabalho (Figura 5).

Figura 5 - pH ótimo aparente das atividades das fosfatases presentes na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 42.



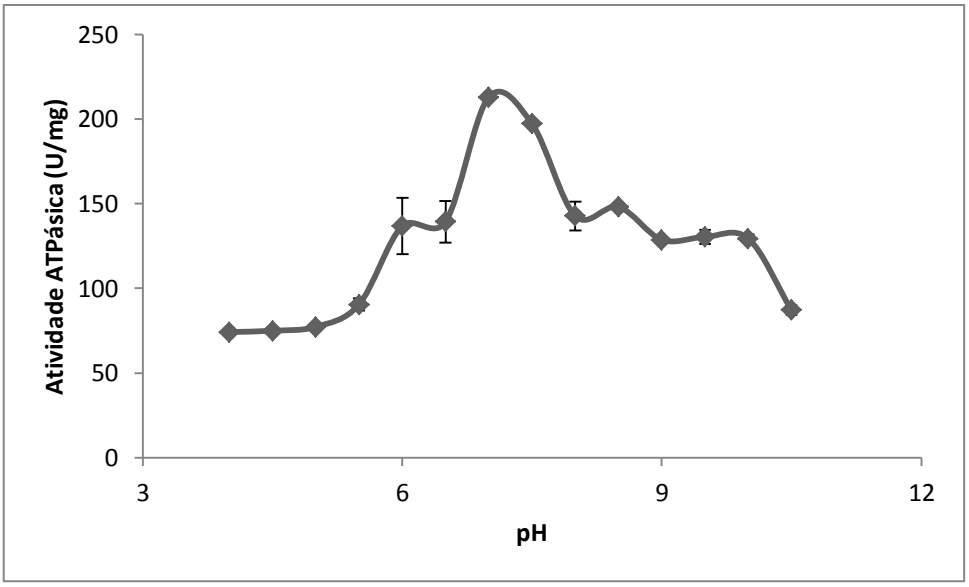
O efeito do pH sobre a atividade enzimática demonstrou que o pH ótimo aparente para hidrólise do substrato pirofosfato de sódio foi 7,5. Dessa forma esse pH foi escolhido para o estudo da atividade da possível Pirofosfatase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* durante o desenvolvimento e metamorfose (Figura 6).

Figura 6 - pH ótimo aparente da atividade de pirofosfatase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 42.



O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática demonstrou que o pH ótimo aparente para hidrólise do substrato ATP foi 7,0. Dessa maneira esse foi o pH escolhido para o estudo da atividade de ATPase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* durante o desenvolvimento e metamorfose (Figura 7).

Figura 7 - pH ótimo aparente da atividade de ATPase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 42.



Os resultados do estudo do efeito do armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina (Figuras 8 e 9) mostraram que ambas as enzimas são estáveis nos diferentes pH analisados, contudo, a fosfatase alcalina perde cerca de 70% de sua atividade no tempo de 0,5 dia após a homogeneização do tecido no pH 4.

Figura 8 - Atividade da fosfatase alcalina presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 42, realizada em diferentes tempos de armazenamento e em diferentes pH.

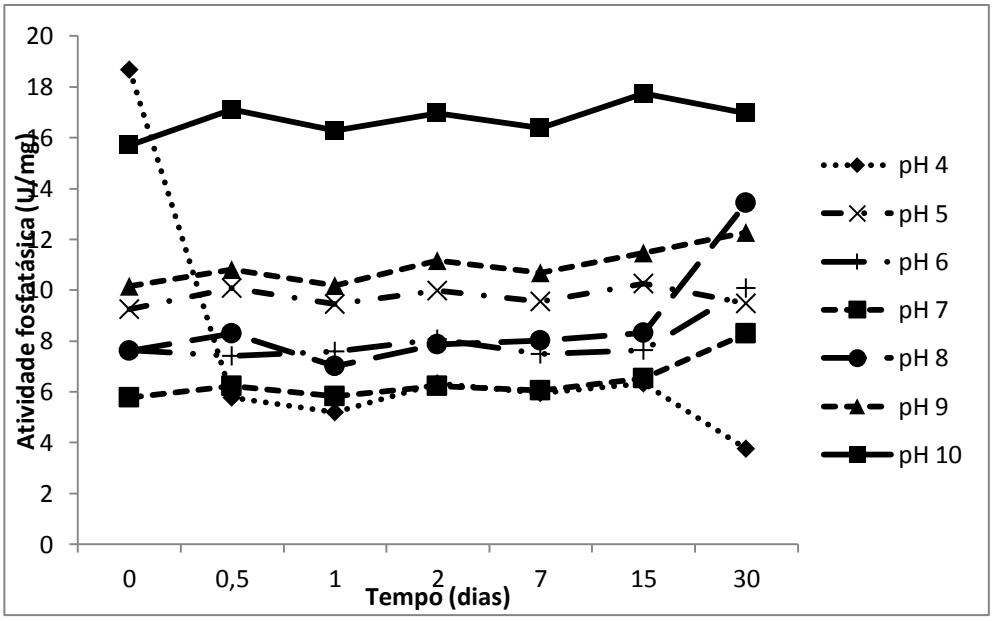
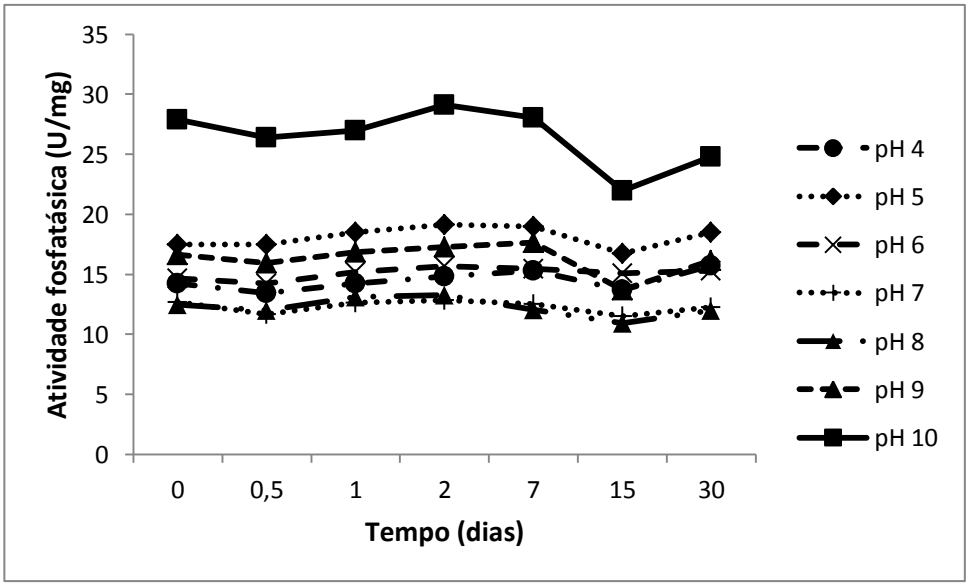


Figura 9 - Atividade da fosfatase ácida presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 42, realizada em diferentes tempos de armazenamento e em diferentes pH..



O efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade das fosfatases alcalina e ácida (Figuras 10 e 11) revelou que a primeira mantém linearidade e estabilidade a partir dos 5 minutos de reação, exceto para os 45°C. A atividade da fosfatase ácida mantém-se linear e estável, após os 5 minutos de incubação, em todos os tempos e temperaturas testados.

Figura 10 - Atividade da fosfatase alcalina, presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 43, realizadas em diferentes tempos e temperaturas.

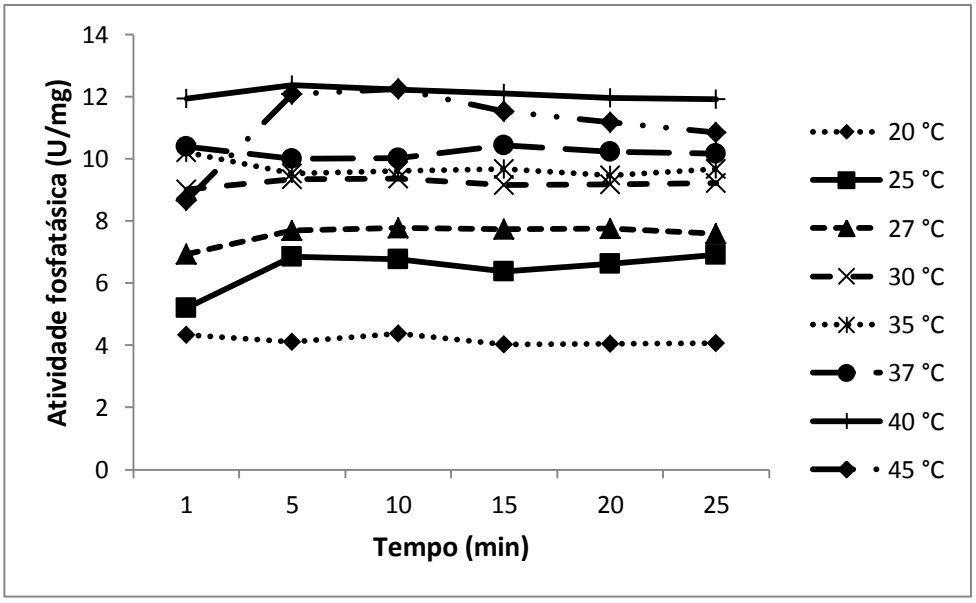
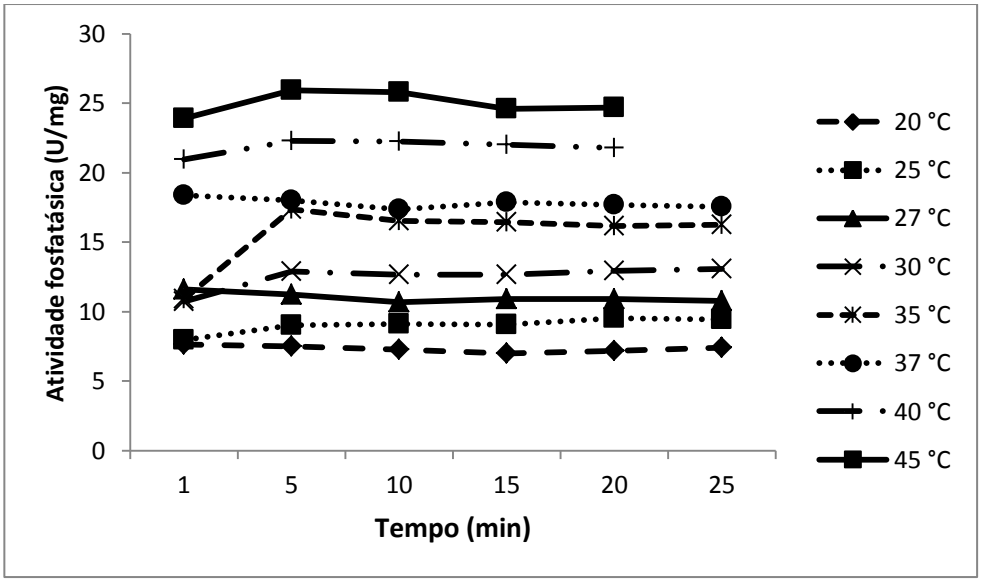


Figura 11 - Atividade da fosfatase ácida obtida da cauda de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 43, realizadas em diferentes tempos e temperaturas.



O estudo da inativação térmica mostrou que o $t_{1/2}$ da fosfatase alcalina é de 60 minutos a 55°C e 10 minutos a 60°C, respectivamente. Já o $t_{1/2}$ da fosfatase ácida é de 10 minutos a 55°C e 5 minutos a 60°C (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Efeito da inativação térmica na atividade da fosfatase alcalina presente na de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 43.

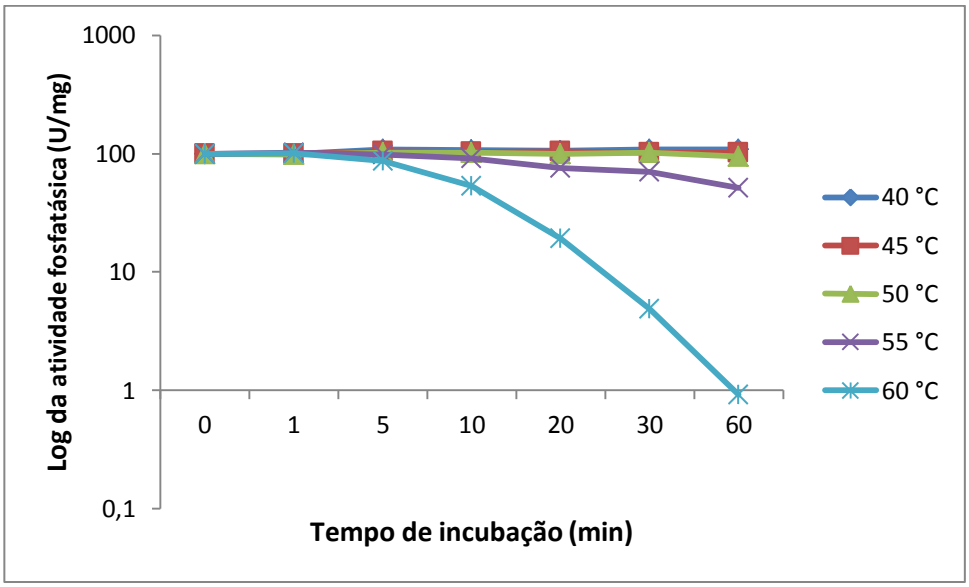
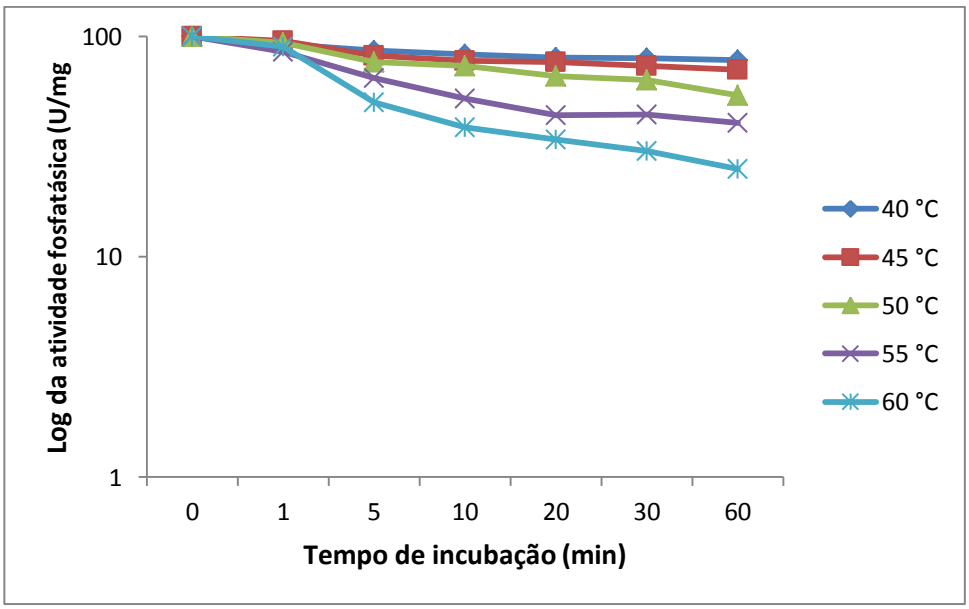


Figura 13 - Efeito da inativação térmica na atividade da fosfatase ácida presente na de girinos de *L. catesbeianus* no estádio 43.



O estudo da ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina foi realizado utilizando-se concentrações compreendidas entre 50 µM a 25 mM, sendo o arsenato o que apresentou maior inibição (Tabela 1).

Tabela 1 - Ação de diferentes compostos sobre a atividade da fosfatase alcalina.

Tratamento	**Concentração**	**% de Atividade**
Controle	----------	100,00
Arsenato	25mM	9,57
EDTA	10mM	82,36
Levamisol	1mM	68,84
Cloreto de Magnésio	10mM	94,51
Metavanadato	50µM	71,59
PHMB	1mM	45,82
Pirofosfato de sódio	10mM	75,46
Teofilina	5mM	55,50
Cloreto de Zinco	50µM	50,81

Foram considerados inibidores os tratamentos com diferença acima de 10% em relação ao controle.

A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica das fosfatases alcalina e ácida (Figuras 14 e 15) presentes na cauda dos girinos de *L. catesbeianus* nos diferentes estádios de desenvolvimento revelou que ambas as enzimas permanecem com atividade baixa e constante durante os períodos de pré e pró-metamorfose, aumentando significativamente no clímax metamórfico. A atividade da fosfatase alcalina sofreu pequeno decréscimo no estádio 45 (Figura 14), enquanto neste mesmo período a atividade da fosfatase ácida teve o maior valor (Figura 15).

Figura 14 - Atividade da fosfatase alcalina presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus,* dos estádios 26 ao 45.

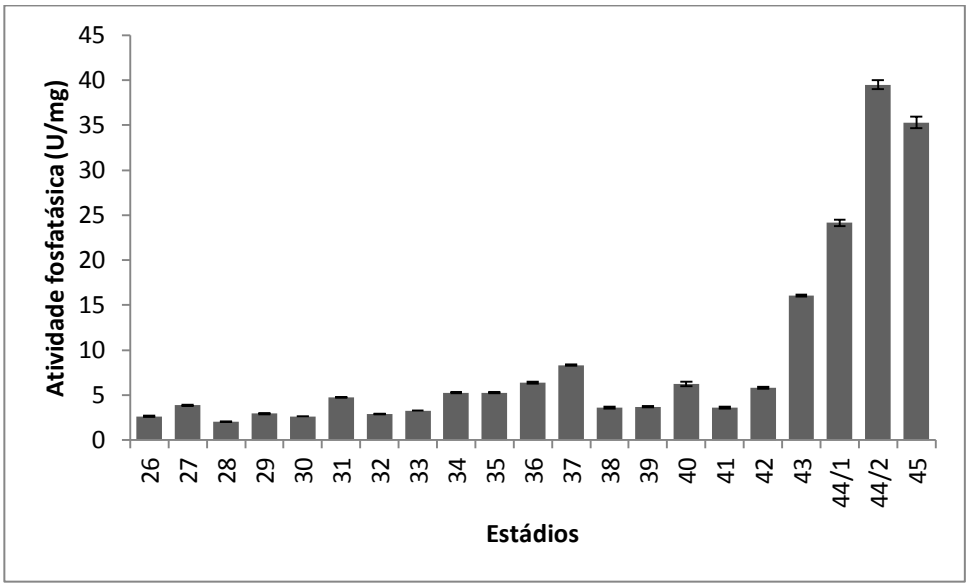
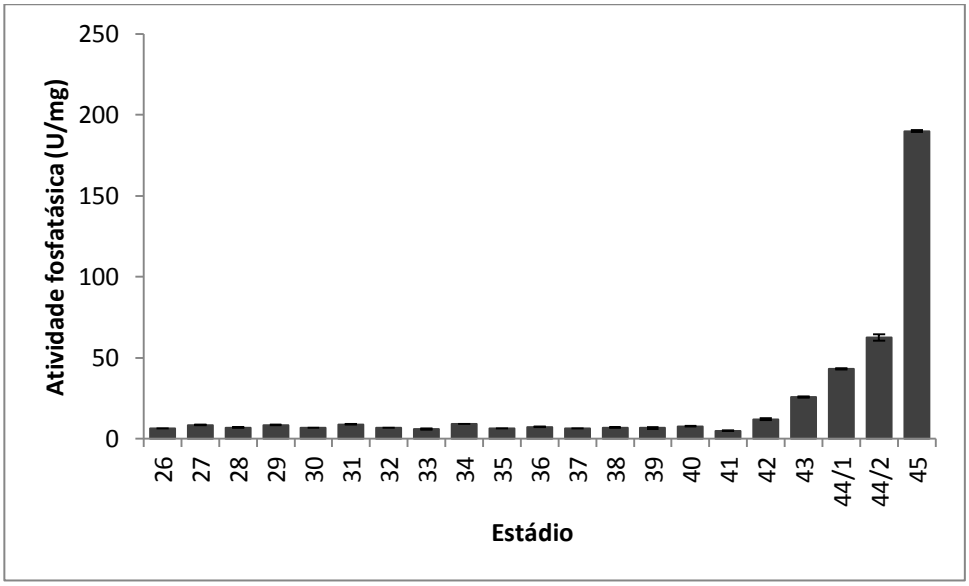
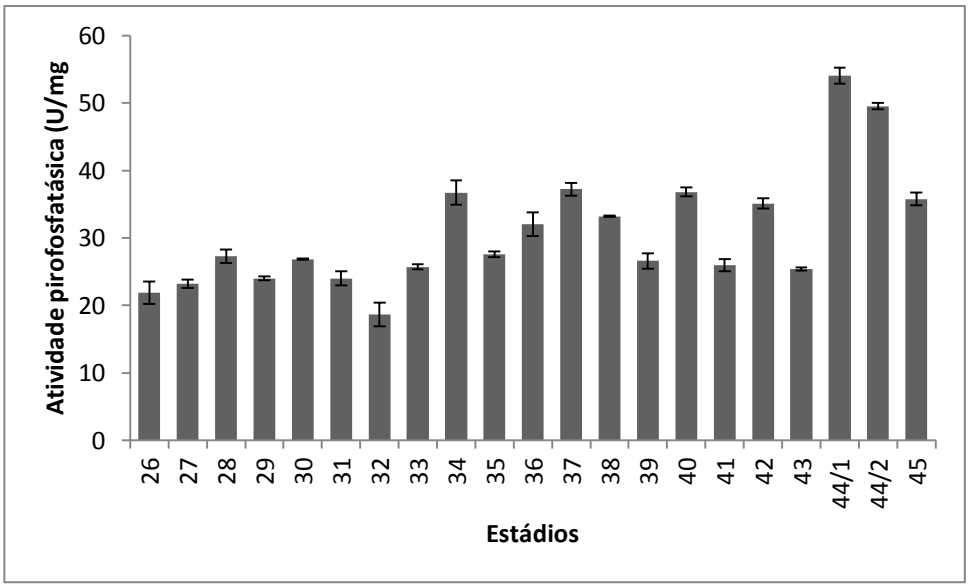


Figura 15 - Atividade da fosfatase ácida presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus,* dos estádios 26 ao 45.



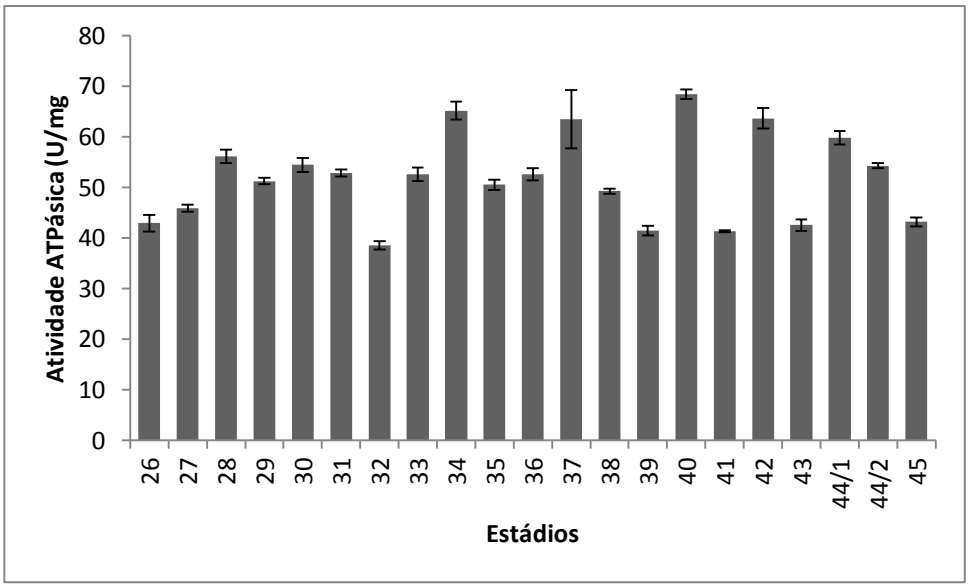
A atividade de Pirofosfatase (Figura 16) presente na cauda dos girinos de *L. catesbeianus* nos diferentes estádios de desenvolvimento revelou que a atividade enzimática não apresenta grandes variações durante os períodos de pré e pró-metamorfose, aumentando nas duas subdivisões do estádio 44 e diminuindo novamente no estádio 45, ao final da metamorfose.

Figura 16 - Atividade de pirofosfatase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus,* dos estádios 26 ao 45.



Embora a atividade de ATPase, presente na cauda dos girinos de *L. catesbeianus* nos diferentes estádios de desenvolvimento, ora diminui ora aumenta (Figura 17), de uma maneira geral ela permaneceu praticamente constante, sem grandes variações, durante os períodos de pré e pró-metamorfose, aumentando nas duas subdivisões do estádio 44 e diminuindo no período que caracteriza o último estádio de absorção da cauda, estádio 45.

Figura 17 - Atividade de ATPase presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus,* dos estádios 26 ao 45.



As médias da atividade das fosfatases ácida e alcalina, de pirofosfatase e de ATPase nos diferentes estádios de desenvolvimento da cauda de *L. catesbeianus* são mostrados na tabela 2.

Tabela 2 - Médias e coeficientes de variação da atividade (U.mg/mg) das fosfatases ácida e alcalina, de pirofosfatase e de ATPase presentes na cauda de *L. catesbeianus* durante o desenvolvimento e metamorfose.

Estádio de Desenvolvimento	**Média da Atividade Enzimática**			
	Fosfatase Ácida	Fosfatase Alcalina	Pirofosfatase	ATPase
26	6,41 ^{ijl}	2,64 ^{lm}	21,85 ^{li}	42,91 ^{gh}
27	8,44 ^{fgh}	3,86 ^{i}	23,20 ^{hi}	45,87 ^{fg}
28	6,91 ^{ij}	2,02 ^{m}	27,32 ^{f}	56,08 ^{cd}
29	8,51 ^{fgh}	2,96 ^{jl}	24,01 ^{ghi}	51,23 ^{de}
30	6,86 ^{ij}	2,63 ^{lm}	26,86 ^{fg}	54,46 ^{de}
31	8,90 ^{fg}	4,74 ^{h}	23,99 ^{ghi}	52,79 ^{de}
32	6,67 ^{ij}	2,91 ^{l}	18,66 ^{j}	38,52 ^{h}
33	5,99 ^{jl}	3,27 ^{ijl}	25,70 ^{fgh}	52,54 ^{de}
34	9,20 ^{f}	5,25 ^{gh}	36,70 ^{c}	65,13 ^{a}
35	6,30 ^{ijl}	5,26 ^{gh}	27,59 ^{f}	50,51 ^{ef}
36	7,34 ^{hij}	6,38 ^{f}	32,03 ^{e}	52,52 ^{de}
37	6,46 ^{ijl}	8,32 ^{e}	37,25 ^{c}	63,46 ^{ab}
38	6,90 ^{ij}	3,61 ^{i}	33,19 ^{de}	49,25 ^{ef}
39	6,65 ^{ij}	3,69 ^{i}	26,59 ^{fg}	41,41 ^{gh}
40	7,68 ^{ghi}	6,21 ^{f}	36,82 ^{c}	68,40 ^{a}
41	4,99 ^{l}	3,58 ^{ij}	25,96 ^{fgh}	41,32 ^{gh}
42	12,10 ^{e}	5,81 ^{fg}	35,11 ^{cde}	63,61 ^{ab}
43	25,69 ^{d}	16,04 ^{d}	25,41 ^{fgh}	42,54 ^{gh}
44/1	43,00 ^{c}	24,13 ^{c}	54,06 ^{a}	59,77 ^{bc}
44/2	62,36 ^{b}	39,49 ^{a}	49,52 ^{b}	54,26 ^{de}
45	189,94 ^{a}	35,30 ^{b}	35,77 ^{cd}	43,16 ^{gh}
CV%	2,30	2,33	3,30	3,24

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna, diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

6. Discussão

Durante a metamorfose dos anuros ocorrem alterações morfofisiológicas em todo o corpo dos girinos (ISHIZUYA-OKA; SHI, 2005), durante a pré e a pró-metamorfose estas mudanças são subsidiadas pela alimentação exógena, mas durante o clímax metamórfico o animal não se alimenta. Santos e colaboradores (2010) demonstraram que durante este período as atividades das enzimas digestivas diminuíram bruscamente nos girinos de *L. catesbeianus*. Os resultados obtidos mostraram que nesse mesmo período a atividade específica das fosfatases ácida (Figura 15) e alcalina (Figura 14) aumentou mais de dez vezes, sugerindo o papel da cauda como fonte energética para o estádio final da metamorfose.

Os resultados obtidos sugerem que o aumento da atividade das fosfatases ácida (Figura 15) e alcalina (Figura 14) no decorrer da metamorfose dos girinos de rã-touro suporta a hipótese de que a absorção da cauda acontece por meio da atividade de enzimas hidrolíticas, as quais são sintetizadas no período que antecede ou durante a metamorfose, como consequência da atividade do hormônio da tireoide (ROBINSON, 1970; BROWN; CAI, 2007). Ainda segundo Robinson (1970), a fosfatase do extrato bruto obtido da cauda da rã saltadeira indiana, (*Polypedates maculatus*), no período de pré-absorção e de absorção sofreu um aumento linear na atividade enzimática durante o desenvolvimento da cauda e no período que antecede a metamorfose, permanecendo elevada durante o período de absorção da cauda, semelhante aos resultados mostrados nas figuras 15 e 14 para *L. catesbeianus*.

Em *Xenopus laevis* foi observada mudança do pH ótimo da fosfatase ácida durante a metamorfose, de 5,0 no início para 4,6 no final desse processo (ROBINSON, 1972). Filburn (1969) observou a presença de três isoenzimas para fosfatase ácida na cauda de girinos de *X. laevis* durante o desenvolvimento e a metamorfose, contudo Robinson (1972) demonstrou a presença de duas isoenzimas no mesmo tecido da mesma espécie e atribuiu a disparidade do número de formas encontradas às variações nos métodos utilizados. O perfil do gráfico da inativação térmica da fosfatase ácida presente na cauda de girinos de *L. catesbeianus* (Figura 13) sugere a presença de isoenzimas, assim como em *X. laevis* (ROBINSON, 1972). Segundo Markert (1975) algumas enzimas importantes ocorrem em formas múltiplas, dessa forma a inibição, por algum fator, de uma das formas não afeta significativamente o processo fisiológico.

Por serem animais ectotérmicos, a temperatura dos anuros é dependente de condições climáticas e de seu comportamento junto ao habitat, o que pode ocasionar grande variação de temperatura corpórea no decorrer de um mesmo dia (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). O

efeito da inativação térmica sobre as atividades das fosfatases ácida e alcalina (Figuras 13 e 12) mostra boa tolerância das enzimas a elevadas temperaturas, o que está relacionado à plasticidade de interações entre o animal e o meio ambiente.

Resultados observados por Robinson (1972) para a fosfatase ácida de *Xenopus laevis*, sugerem que o aumento da atividade específica não ocorre apenas devido ao efeito da concentração referente a perda total de proteínas da cauda (ROBINSON, 1970) e sim devido ao real aumento da atividade específica.

Filburn e Vanable Jr. (1973) sugeriram que o papel de uma das formas da fosfatase ácida de hidrólise de nucleosídeo di e trifosfato (NDP e NTP) está relacionada à autólise, interferindo com o metabolismo energético celular, reduzindo o suprimento de metabólitos de alta energia e consequentemente, interferindo nos processos de síntese normais.

Estudos realizados por Robinson (1970) mostraram a existência de mudanças qualitativas e quantitativas na atividade de fosfatase ácida da cauda de girinos de *X. laevis* durante a metamorfose. Esse mesmo autor demonstrou ainda que ambos os tipos de mudanças ocorrem aproximadamente no mesmo estádio de absorção da cauda, durante o período mais ativo de redução e autólise dos tecidos.

A baixa atividade das fosfatases ácida e alcalina durante os períodos de pró e pré-metamorfose e seu aumento durante o clímax (Figuras 15 e 14) está relacionado com a morte celular que ocorre na cauda e a mobilização de fósforo, durante a metamorfose. De fato, a presença de fosfatases no lisossomo e a sua relação com a morte celular apoia a hipótese da importância dessas enzimas no processo de absorção da cauda (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005). O lisossomo age tanto por autofagia, quanto por secreção de enzimas no meio extracelular (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005), fato que evidencia sua importância nos mecanismos de morte celular por suicídio e assassinato (NAKAJIMA; FUJIMOTO; YAOITA, 2005), e a sua relação com o aumento da atividade da fosfatase ácida (Figura 15).

Durante o estresse nutriconal ocorre reciclagem de nutrientes por meio da ativação do lisossomo, tornando possível a sobrevivência da célula. Entretanto, longos períodos desse estímulo negativo acarretam ativação de mecanismos de apoptose (KROEMER; JÄÄTTELÄ, 2005). Durante a metamorfose não há ingestão de alimento (SANTOS et al, 2010), o que pode levar, além dos estímulos hormonais, ao processo de morte celular, evidenciado pelo aumento da atividade da fosfatase ácida (Figura 15).

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 que provavelmente contém zinco, e que a inibição pode ser atribuída à remoção desse íon da enzima (PIZAURO et. al., 1998). No que tange a inibição pelo zinco, tem sido proposto que este íon atua deslocando o magnésio do sítio catalítico, inibindo a atividade de metaloenzimas (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

A inibição da atividade da fosfatase alcalina 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 do arsenato, um análogo estrutural do fosfato, apoia essa suposição (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

Segundo Goseki, Oida e Sasaki (1990) a fosfatase alcalina teve origem a partir de um único gene ancestral e que durante a evolução ocorreu diferenciação em diferentes grupos isoenzímicos como intestinal, fígado-osso-rim e da placenta. Os resultados obtidos no estudo da inativação térmica (Figura 8) mostraram que provavelmente exista apenas um tipo de fosfatase alcalina em *L. catesbeianus* fato também observado por Goseki, Oida e Sasaki (1990), mesmo após a metamorfose, diferentemente do observado em carpas e serpentes, nas quais foram encontrados dois tipos dessa enzima.

O pirofosfato é um inibidor de precipitação e dissolução de alguns sais, dessa maneira, a atividade da pirofosfatase (Figura 16) está relacionada com a prevenção da deposição de sais de cálcio em vários tecidos (FLEISCH; RUSSEL, 1972). Além disso, a atividade da pirofosfatase presente nos diferentes estádios (Figura 16) indica sua importância na regulação da concentração do pirofosfato intra e extracelular, na reciclagem de nucleotídeos, estímulo da motilidade celular, além de uma possível função na regulação do receptor de insulina (GODING; GROBBEN; SLEGERS, 2003).

A hidrólise do pirofosfato de sódio (Figura 16) pode ser atribuída à atividade de fosfomonohidrolase da fosfatase alcalina (FLEISCH; RUSSEL, 1972) e/ou de pirofosfatase presente na cauda. Estudos para elucidar a possível existência dessa(s) enzima(s) e o seu possível papel durante o desenvolvimento e metamorfose, estão sendo conduzidos em nosso laboratório.

Devido ao uso de extrato bruto das caudas, a atividade de ATPase pode estar relacionada com o transporte de íons na epiderme (ROSENBERG; WARBURG,1991), o metabolismo energético (NELSON; COX, 2011) e a contração muscular (WATKINS, 2000).

A presença de atividade de ATPase (Figura 17), desde os primeiros estádios estudados, coincide com o observado por Rosenberg e Warburg (1991), que verificaram indícios de atividade da referida enzima desde o início do desenvolvimento larval. Segundo

esses autores a presença de algumas formas de ATPase na epiderme deve-se à sua função de transportar íons.

A atividade de ATPase durante a metamorfose (Figura 17) pode também estar associada ao aumento da atividade lisossomal e de fagócitos, processos esses que requerem energia, proveniente da hidrólise do ATP, para suprir a demanda energética. (KALTENBACH; FRY; LEIUS, 1979).

7. Conclusão

O aumento das atividades específicas das fosfatases ácida e alcalina durante a metamorfose sugere que as enzimas desempenham um papel essencial na liberação do fosfato necessário as transformações morfofisiológicas que ocorrem durante esse processo, além de atuar no processo de morte celular e da absorção da cauda.

A atividade de pirofosfatase e de ATPase são essenciais aos processo vitais do animal, desde os primeiros estádios estudados até o estádio 45, ao final da metamorfose.

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.

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.

CAI, L.; DAS, B.; BROWN, D. D. Changing a limb muscle growth program into a resorption program. **Developmental Biology**, v. 304, p. 260-271, 2007.

CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 459-472, 1999.

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.

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.

ELINSON, R. P.; REMO, B.; BROWN, D. D. Novel structural elements during tail resorption in *Xenopus* metamorphosis: lessons from tailed frogs. **Developmental Biology**, v. 215, p. 243-252, 1999.

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. Changes in acid phosphatases isozymes during *Xenopus* tails resorption. **American Zoology**, v. 9, p. 1128-1129, 1969.

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

FLEISCH, H.; RUSSELL, R. G. A review of the physiological and pharmacological effects of pyrophosphate and diphosphonates on bones and teeth. **Journal of Dental Research**, v. 51, p. 324-328, 1972.

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.

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

FUJIMOTO, K.; NAKAJIMA, K.; YAOITA, Y. Expression of matrix metalloproteinase genes in regressing or remodeling organs during amphibian metamorphosis. **Development and Growth Differentiation**, v. 49, n. 2, p. 131-143, 2007.

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

GILBERT, L. I.; FRIEDEN, E. **Metamorphosis**: a problem in developmental biology. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1981. 578 p.

GILLESPSIE, G. R. The role of introduced trout in the decline of the spotted tree frog (*Litoria spenceri*) in south-eastern Australia. **Biological Conservation**, v. 100, p. 187-198, 2001.

GODING, J. W.; GROBBEN, B.; SLEGERS, H. Physiological and pathophysiological functions of the ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1638, p. 1-19, 2003.

GOSEKI, M.; OIDA, S.; SASAKI, S. Enzymatic and immunological properties of alkaline phosphatase of bullfrog. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 254, p. 1-5, 1990.

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

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

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

HOSKINS, S. G. Control of the development of the ipsilateral retinothalamic 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.; SHI, Y-B. Molecular mechanisms for thyroid hormoneinduced 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.

ISHIZUYA-OKA, A.; HASEBE T.; SHI, Y. Apoptosis in amphibian organs during metamorphosis. **Apoptosis**, v. 15, n. 3, p. 350-364, 2009.

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.

KALTENBACH, J. C.; FRY, A. E.; LEIUS, V. K. Histochemical patterns in the tadpole tail during normal and thyroxine-induced metamorphosis succinic dehydrogenase, Mg- and Ca-adenosine triphosphatases, thiamine pyrophosphatase, and s-nucleotidase. **General and Comparative Endocrinology**, v. 38, p. 111-126, 1979.

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.

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. Cap. 36, p. 445-459.

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

MAHAPATRA, P. K.; MOHANTY-HEJMADI, M.; GAGAN, B. N. Changes in oxidative stress parameters and acid phosphatase activity in the pre-regressing and regressing tail of Indian jumping frog *Polypedates maculatus* (Anura, Rhacophoridae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**: Toxicology & Pharmacology, v. 130, n. 3, p. 281-288, 2001.

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.

MARKERT, C. L. Biology of Isozymes. **Bioscience**, v. 25, n. 6, p. 365-368, 1975.

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

MUTHS, E.; CORN, P. S.; PESSIER, A. P.; GREEN, D. E. Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. **Biological Conservation**, v. 110, p. 357-365, 2003.

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. **Lehninger princípios de bioquímica**. 5. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2011. 1304 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.

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 porperties of triton X-100 solubilized bone matriz-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.

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.

ROSENBERG, M.; WARBURG, M. R. The evidence for Na^{+}, K^{+}-ATPase activity in the epidermis of *Pelobates syriacus* tadpoles and toads. **Bio Cell**, v. 71, p. 281-287, 1991.

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: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 39., 2010, Foz do Iguaçu. **Anais**... São Paulo: SBBBM, 2010.

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.

STALLARD, R. F. Possible environmental factors underlying amphibian decline in eastern Puerto Rico: analysis of U.S. government data archives. **Conservation Biology**, v. 15, p. 943-953, 2001.

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.

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

WATKINS, T. B. The effects of acute and developmental temperature on burst swimming speed and myofibrillar ATPase activity in tadpoles of the pacific tree frog, *Hyla regilla.* **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 73, n. 3, p. 356-364, 2000.

WEBER, R. Switching of globin genes during anuran metamorphosis. In: GILBERT, L.I., TATA, J. R., ATKINSON, B. G. **Metamorphosis**: postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells. New York: Academic Press, 1996. Cap. 16, p. 567-597.

WELSH, H. H.; OLLIVIER, L. M. Stream amphibians as indicators of ecosystem stress: a case study from California's Redwoods. **Ecological Applications**, v. 8, p. 1118-1132, 1998.

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