

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

Estudo da atividade das enzimas envolvidas na ossificação de frangos de corte normais e acometidos por discondroplasia tibial

Luiz Flávio José dos Santos

Tese de Doutorado

Araraquara – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

Instituto de Química

***Araraquara***

Estudo da atividade das enzimas envolvidas na ossificação de frangos de corte normais e acometidos por discondroplasia tibial

Luiz Flávio José dos Santos

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior

Tese apresentada à Instituto de Química –  
Unesp, Câmpus de Araraquara, como parte das  
exigências para a obtenção do título de Doutor  
em Biotecnologia.

Araraquara – SÃO PAULO – BRASIL

Fevereiro de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

S237e Santos, Luiz Flávio José dos  
Estudo da atividade das enzimas envolvidas na ossificação de frangos de corte normais e acometidos por discondroplasia tibial / Luiz Flávio José dos Santos. – Araraquara : [s.n], 2015  
70 f. : il.

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

1. Ossificação. 2. Fosfatase alcalina. 3. Enzimas. 4. Produção animal. 5. Proteínas - análise. I. Título.

## ATESTADO

Atestado nº 285/2015 - STPG-IQ/CAr

Atesto, para os devidos fins, que **LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS SANTOS**, portador do RG nº 41.573.301-7- SSP/SP, nascido em 30/11/1985, natural de Terra Roxa - SP, apresentou em 24/02/2015, Tese de Doutorado intitulada: "Estudo da atividade das enzimas envolvidas na ossificação de frangos de corte normais e acometidos por discondroplasia tibial", contendo 66 páginas, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, tendo sido APROVADO.

Atesto, ainda, que a Comissão Examinadora para o julgamento da Tese de Doutorado em apreço, ficou assim constituída:

Presidente: Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior (Orientador)  
Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido  
Prof. Dr. Marcos Túlio Oliveira  
Prof. Dr. Luiz Henrique Souza Guimarães  
Prof. Dr. Douglas Emygdio de Faria

Atesto, outrossim, que o título de Doutor obtido pelo interessado será homologado pela Congregação deste Instituto em reunião p.f

Araraquara, 02 de março de 2015.

SEÇÃO TÉCNICA DE PÓS-GRADUAÇÃO IQ/CAr  
  
WENNIA LIMONTI DE SOUZA DOS SANTOS  
Supervisor Técnico de Seção

STPG/eq

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

### Formação acadêmica/titulação

- 2009 - 2011** Mestrado em Zootecnia.  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, FCAVJ/UNESP, Brasil  
Título: Atividade de enzimas digestivas em girinos de Rã Touro (*Litobates catesbeianus*) durante o desenvolvimento larval, Ano de obtenção: 2011  
Orientador: João Martins Pizauro Junior  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2008 - 2009** Graduação em Ciências Biológicas.  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, FCAVJ/UNESP, Brasil  
Título: Atividade de duas enzimas digestivas de *Lithobates catesbeianus* durante o desenvolvimento larval  
Orientador: João Martins Pizauro Junior  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2004 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, FCAVJ/UNESP, Brasil  
Título: O uso de animais considerados sem importância ao homem no ensino de cadeia alimentar e outras relações entre os animais  
Orientador: Rosemary Rodrigues de Oliveira

### Produção

---

#### Produção bibliográfica

##### Artigos completos publicados em periódicos

1. ROMBOLA, T. H., PEDRINHO, E. A. N., LEMOS, E. G. M., GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M.  
Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. BMC Research Notes, v.7, p.221 - 227, 2014.

##### Artigos aceitos para publicação

1. GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, SANTANA, C. C., COLÓRIO, R. R., PIZAURO, J. M.  
Tail phosphatases activity: a study during growth and metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. Copeia (Online), 2014.

##### Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. GONCALVES, A. M., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, CASANOVA, D. C.  
ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA DA CAUDA DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* DURANTE A METAMORFOSE In: XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2009, São José dos Rio Preto.  
**Anais do XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2009.

2. **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V.

Comportamento de  $\alpha$ -amilase e maltase durante a metamorfose em girinos de *Lithobates catesbeianus*. In: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008, São José dos Campos.

**Anais do XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008.**

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

1. COLÓCIO, R. R., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, 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 da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.

**Anais da XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.**

2. GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, COLÓCIO, 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 da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu.

**Anais da XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.**

3. PAVARINA, G. C., **SANTOS, L. F. J.**, SANTANA, C. C., Alarcon, M. F. F., Baldissera, G., PIZAURO, J. M.

Partial Purification and Characterization of Intestinal Alkaline Phosphatase from Broilers In: XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Fóz do Iguaçu.

**Anais da XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.**

4. **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., COLÓCIO, 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 da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Fóz do Iguaçu.

**Anais da XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.**

5. COLOSIO, R. R., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., SANTANA, C. C., PEREIRA, M. C., PAVARINA, G. C., PIZAURO, J. M.

Activity of Acid and Alkaline Phosphatases Present in the Bone Tissue of *Lithobates catesbeianus* During the Limbs Development Period In: XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu.

**Anais da XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.**

6. SANTANA, C. C., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., COLÓCIO, 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 do Iguaçu.

**Anais da XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013.**

7. VACONSELOS, R. L., PEREIRA, M. C., **SANTOS, L. F. J.**, PRADO, R. M., PIZAURO, J. M.

Partial characterization of acid phosphatase extracted from sugar cane leaves (*Saccharum officinarum* L.) In: XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu.

**Anais da XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular,**

2013.

8. GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, COLÓCIO, 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 do Iguaçu.

**Anais da XLII Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2013.

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

**Anais XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2012.

10. SANTANA, C. C., **SANTOS, L. F. J.**, COLÓCIO, R. R., GONCALVES, A. M., PIZAURO, J. M. Partial Kinetic Characterization of acid and alkaline phosphatases from different tissues of Bull Frog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu.

**Anais do XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2012.

11. NAKAGI, V. S., AMARAL, C. M. C., STECH, M. R., LIMA, A. F., HARNICH, F. A. R., LAURENTIS, A. C., **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M.

Acid and Alkaline Phosphatase Activity in Broiler Chicks Fed Different Levels of Phytase and Nonphytate Phosphorus 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.

12. COLÓCIO, R. R., GONCALVES, 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.

13. GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, COLÓCIO, R. R., PIZAURO, J. M.

Partial Characterization of Phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus*' Tail During Metamorphosis In: XXXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu.

**Anais da XXXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2011.

14. COLÓCIO, R. R., GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M.

Acid And Alkaline Phosphatases Activities Of *Lithobates catesbeianus*' Forelimbs During Metamorphosis In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.

**Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010.

15. COLÓCIO, R. R., GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M.

Activities of Phosphomonohydrolase from *Lithobates catesbeianus*' Tail During Metamorphosis In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.

**Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010.

16. **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V., GONCALVES, A. M., PIZAURO, J. M.  
Hydrolases Activities In *Lithobates Catesbeianus* Tadpoles Digestive System During Larval Development. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.  
**Anais da XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2010.
17. GONCALVES, A. M., **SANTOS, L. F. J.**, CASANOVA, D. C., 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.
18. GONCALVES, 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-SP.  
**Anais do XIX Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS)**, 2009.
19. **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V., GONCALVES, A. M., PIZAURO, J. M.  
Behavior of Digestives 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.
20. **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V., GONCALVES, 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 - SP.  
**Anais do XIX Congresso de Biólogos do CRBio-1 (SP, MT, MS)**, 2009.
21. GONCALVES, 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: V Jornada de Iniciação Científica, 2008, Jaboticabal.  
**Anais da V Jornada de Iniciação Científica**, 2008.
22. **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V.  
Comparação entre as atividades das enzimas catepsina-E e amilase durante o processo de metamorfose em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) In: V Jornada de Iniciação Científica, 2008, Jaboticabal.  
**Anais da V Jornada de Iniciação Científica**, 2008.
23. CASANOVA, D. C., PIZAURO, J. M., CIANCAGLINI, P., **SANTOS, L. F. J.**, SANBRINI, G. B.  
COMPARISON OF MINERALIZATION PROCESS KEY ENZYMES IN NORMAL AND TIBIAL DYSCHONDROPLASTIC CHICKENS. In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e XI Congresso da associação Pan-Americana de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Agua de Lindóia.  
**Anais do XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e XI Congresso da associação Pan-Americana de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2008.

24. **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V.

Enzymatic profile of amylase, cathepsin and trypsin during the early development of *Rana catesbeiana* tadpoles In: XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e XI Congresso da associação Pan-Americana de Bioquímica e Biologia Molecular, 2008, Aguas de Lindoia.

**Anais da XXXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e XI Congresso da associação Pan-Americana de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2008.

25. BUTTLER, L., **SANTOS, L. F. J.**, GIMENEZ, A. C., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V., PIZAURO, J. M.

ULTRASTRUCTURE AND ENZYMOLOGY OF THE PANCREAS OF BULLFROG (*LITHOBATES CATESBEIANUS*) TADPOLES DURING DEVELOPMENT AND METAMORPHOSIS. In: XXIII Congresso Brasileiro de Anatomia, XI Congresso Luso Brasileiro de Anatomia, IX Congresso do Cone Sul, XXVIII Congresso Chileno de Anatomia, 2008, Belém.

**Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Anatomia, XI Congresso Luso Brasileiro de Anatomia, IX Congresso do Cone Sul, XXVIII Congresso Chileno de Anatomia**, 2008.

26. ASSUNCAO, A. W. A., PEREIRA, R., PERES, A. L. F., **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA, R. R.

Água transparente e água pura: desmistificando conceitos In: III Colóquio sobre educação do curso de Ciência Biológicas da FCAV – UNESP – Jaboticabal (III CEBIO), 2007, Jaboticabal.

**Anais do III Colóquio sobre educação do curso de Ciência Biológicas da FCAV – UNESP – Jaboticabal (III CEBIO)**, 2007.

27. **SANTOS, L. F. J.**, PERES, A. L. F., PEREIRA, R., ASSUNCAO, A. W. A., OLIVEIRA, R. R.

O uso de animais considerados sem importância para o Homem no ensino de cadeia alimentar e outras interações entre os seres vivos In: III Colóquio sobre educação do curso de Ciência Biológicas da FCAV – UNESP – Jaboticabal (III CEBIO), 2007, Jaboticabal.

**Anais do III Colóquio sobre educação do curso de Ciência Biológicas da FCAV – UNESP – Jaboticabal (III CEBIO)**, 2007.

28. **SANTOS, L. F. J.**, PIZAURO, J. M., DIAS, S. G., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V.

Atividade de tripsina e de lipase pancreáticas durante o processo de metamorfose em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*) In: III Jornada de iniciação científica da FCAV – UNESP Jaboticabal, 2006, Jaboticabal.

**Anais da III Jornada de iniciação científica da FCAV – UNESP Jaboticabal**, 2006.

29. DIAS, S. G., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.

Perfil enzimático do sistema digestório dos girinos de rã touro (*Rana catesbeiana*) durante o processo de metamorfose In: III Jornada de iniciação científica da FCAV – UNESP Jaboticabal, 2006, Jaboticabal.

**Anais da III Jornada de iniciação científica da FCAV – UNESP Jaboticabal**, 2006.

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

1. SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., COLÓCIO, R. R.

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA PARCIAL DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA PRESENTES EM FÍGADOS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO In: XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal.

**Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2012.

2. COLÓCIO, R. R., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., SANTANA, C. C.

CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA PARCIAL DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA PRESENTES NO TECIDO ÓSSEO DOS MEMBROS DE GIRINOS DE RÃ-TOURO In: XXIV Congresso de

Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal.

**Anais do XXIV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012.**

3. SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., COLÓCIO, R. R., HARNICH, F. A. R.

ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA E A MASSA DA CAUDA DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANUS*) DURANTE A METAMORFOSE. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal.

**Anais do XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011.**

4. COLÓCIO, R. R., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M., SANTANA, C. C., HARNICH, F. A. R.

ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA NA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DE GIRINOS DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* DURANTE O CLÍMAX METAMÓRFICO. In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal.

**Anais do XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011.**

5. GONCALVES, A. M., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, COLÓCIO, R. R.

ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA DA CAUDA DE *LITHOBATES CATESBEIANUS* DURANTE A METAMORFOSE In: XXII Congresso de Iniciação da UNESP, 2010, Jaboticabal.

**Anais do XXII Congresso de Iniciação da UNESP, 2010.**

6. COLÓCIO, R. R., PIZAURO, J. M., **SANTOS, L. F. J.**, GONCALVES, A. M.

ATIVIDADE DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA NA OSSIFICAÇÃO ENDOCONDAL DE GIRINOS DE *LITHOBATES CATESBEIANUS*. In: XXII Congresso de Iniciação da UNESP, 2010, Jaboticabal.

**Anais do XXII Congresso de Iniciação da UNESP, 2010.**

7. GONCALVES, 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*. In: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008, São José dos Campos.

**Anais do XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2008.**

8. **SANTOS, L. F. J.**, OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., NAKAGHI, L. S. O., STÉFANI, M. V., PIZAURO, J. M.

Atividade da tripsina pancreática durante o processo de metamorfose em girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*). In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Botucatu.

**Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007.**

9. CASANOVA, D. C., PIZAURO, J. M., NAKAGI, V. S., SANBRINI, G. B., **SANTOS, L. F. J.**, RODRIGUES, G. R.

FOSFODIESTERASE NUCLEOTÍDEO PIROFOSFATASE E DA FOSFATASE ALCALINA EM FRANGOS DE CORTE NORMAIS E PORTADORES DE DISCONDROPLASIA TIBIAL. In: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007, Botucatu.

**Anais do XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2007.**

10. BUTTLER, L., OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L., MATEUS, O., **SANTOS, L. F. J.**, STÉFANI, M. V., NAKAGHI, L. S. O.

Giemsa stain application for the identification of endocrine cells of the pancreas of bullfrogs (*Rana catesbeiana*) in paraffin-embedded samples. In: XX Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise / I Simpósio Brasileiro de Microscopia Aplicada às Ciências Forenses, 2005, Aguas de Lindoia.

**Brazilian Journal of Morphological Sciences - Supplement. Campinas: Anatomy and Pan-American Association of Anatomy. , 2005. p.200 - 201**

## Orientações e Supervisões

### Orientações e supervisões

#### Orientações e supervisões concluídas

##### Trabalhos de conclusão de curso de graduação

1. Rafael Rodrigues Colósio. **Co-orientação do trabalho - Estudo da atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo de *Lithobates catesbeianus* durante o período de desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores.** 2012. Curso (Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal.

2. Adriano Marques Gonçalves. **Co-orientação do Trabalho intitulado: Atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes na cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose.** 2010. Curso (Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal.

##### Iniciação científica

1. Rafael Rodrigues Colósio. **Co-orientador do trabalho intitulado: Atividade da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) e das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de *Lithobates catesbeianus*.** 2010. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal.

**Ofereço**

Aos professores João Martins Pizauro Junior,  
Jesus Ap. Ferro e Wagner Cotroni Valeti  
os três maiores cientistas que  
tive o prazer de conhecer.

**Dedico**

A todos meus educandos  
passados, presentes e futuros,  
com quem mais aprendo do que ensino.

## Agradecimentos

Primeiro agradeço a minha mãe Madalena por em seu exercício diário de ternura e força, me ensinar que todos temos nossos dilemas, e que eles foram feitos para serem resolvidos por nós mesmos. A meu pai Luiz me mostrar que um pai é aquele que o filho pode sempre contar, mesmo quando este não tem feito por merecer. E a minha avó Aparecida por sempre me dar lições de humildade.

Agradeço a meu orientador, o Professor Dr. João Martins Pizauro Junior, não somente pela sua orientação formal, mas principalmente, pelos conselhos e exemplos de vida, por se importar comigo e pelo afeto desprendido.

Aos meus irmãos, Fabiana, Fabiano e Jhenifer; sobrinhos, Raissa, Rhuam, Ramom e Polyana; tios e primos pela carga genética compartilhada e principalmente pelos conselhos e o carinho.

Com muito orgulho agradeço as risadas, a ajuda e as conversas científicas dos integrantes do L.E.A., Caroline, Rafael, Gabriella, Ligia, Guilherme, Gustavo, Victor, Mareliza e Gabriel e ao Adriano por nunca me faltar nos momentos de precisão.

As pessoas que muito além de dividir um teto, formei uma verdadeira família, Thiago, Paulo, Marcelo, Néviton, Guilherme, Pedro Coelho, Pedro Perez, Gabriel, Rubens, Cláudio, Renan Lieto, Renan Perinazzo, Bruno e Silene.

Aos amigos Jaboticabalenses, Carla, Monica, Paola, Ana Luiza, Argos, Rafaela, João, Cristiane, Maria Cecilia, Amanda, Rullian, Guilherme Ferreira, Nayara, Guilherme Pereira, Monique, Carina, Michele, Aylan e Lucas, por todas as ajudas e bons momentos, em especial aos membros do Clã *Lithographica*, que são das poucas pessoas que já me viram chorar um dia.

Aos meus melhores amigos terrarroxenses, André, Thiago Padovam, Thiago MJ, Rogério, Luiz Antônio e Rakelli, por todos os momentos, felizes e/ou tristes, pelos segredos e sonhos que dividimos desde quando éramos crianças.

Aos membros da banca de defesa, Professores, Douglas Emygdio de Faria, Luiz Henrique Souza Guimarães, Marcos Tulio Oliveira e Saulo Santesso Garrido, pelos seus questionamentos, sugestões e cobranças e elogios.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que participaram deste trabalho e de minha vida, muito obrigado.

“A Ciência deve servir aos mais vulneráveis, e seus conhecimentos produzir transformações ideológicas, teológicas e no senso comum”

**José Gilberto de Souza**

“Existem verdades que a gente só pode dizer depois de ter conquistado o direito de dizê-las”

**Jean Cocteau**

## Resumo

A Discondroplasia Tibial é atribuída a uma assíncronia no processo de ossificação endocondral, levando a um acúmulo de cartilagem não calcificada e avascularizada onde deveria ser formado osso trabecular. É necessária uma atuação sincronizada das enzimas, ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1), fosfatase alcalina e fosfatase ácida durante o processo de calcificação biológica, pois elas atuam como reguladoras das concentrações de pirofosfato, que, quando elevadas, podem inibir a calcificação e levar ao desenvolvimento da discondroplasia tibial. As aves foram separadas em normais e portadoras de discondroplasia, sacrificadas, as tíbias foram retiradas, congeladas e estocadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente os discos de crescimento foram homogeneizados, receberam diferentes tratamentos para se ter as enzimas purificadas, então foram aliquotados, congelados e estocados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para futuras análises enzimáticas e dosagem de proteína. Não houve diferença entre a atividade específica da PC-1 extraída de aves normais, quando comparada aquela obtida de aves portadoras de lesão, já a atividade específica da fosfatase alcalina foi diminuída nas aves portadoras de discondroplasia tibial em relação as aves normais, sugerindo que a discondroplasia pode ser atribuída a um aumento na concentração de pirofosfato, o qual pode dificultar a mineralização se ligando diretamente aos cristais de hidroxiapatita e impedindo o seu crescimento, e também pela não produção do fosfato inorgânico. A fosfatase ácida, apresentou redução na atividade nas aves doentes, quando comparadas as aves normais, sugerindo que o disco de crescimento tem as suas funções de remodelação afetadas. Nossos resultados sugerem que a disfunção tibial discondroplasia pode ser atribuída a diminuição das atividades da fosfatase alcalina, o que gera o aumento da concentração pirofosfato inorgânico inibindo a ossificação, mas ainda não pode-se descartar que condições locais do disco de crescimento possa ter participação no desenvolvimento da patologia.

**Palavras chave:** Fosfatase alcalina, calcificação biológica, ossificação endocondral.

## **Abstract**

The tibial dyschondroplasia is attributed to an asynchrony in the endochondral ossification process, leading to an accumulation of non-calcified and non-vascularized cartilage in the place where the trabecular bone should be formed. A synchronized action of ectoenzyme nucleotide phosphodiesterase pyrophosphatase (PC-1), alkaline phosphatase and acid phosphatase is required in the biological calcification process, because they act in the regulation of pyrophosphate concentrations, which in high concentrations is an inhibitor of calcification and may lead to the development of tibial dyschondroplasia. The birds were divided into normal and dyschondroplastic, sacrificed, then the tibiae were removed, frozen in liquid nitrogen and stored at -70 °C. Afterwards, the growth plates were homogenized, submitted to different treatments to make each enzyme extract and then were aliquoted, frozen and stored at -70 °C for posterior enzyme assays and protein dosage. There was no difference between the specific activity of PC-1 extracted from normal birds compared to that obtained from dyschondroplastic birds, on the other hand the specific activity of alkaline phosphatase was lower in birds with tibial dyschondroplasia, when compared with healthy birds, suggesting that dyschondroplasia may be attributed to an increase in the concentration of pyrophosphate, which may cause prejudice to mineralization by binding directly to the hydroxyapatite crystals and preventing their growth and also because there is no production of inorganic phosphate. The acid phosphatase activity decreased in dyschondroplastic birds when compared to the normal ones, suggesting that the growth plate has its remodeling functions affected. Our results suggest that the tibial dyschondroplasia can be attributed to the decrease in alkaline phosphatase activity, which leads to an increase in inorganic pyrophosphate concentration, inhibiting ossification, although it still can not be discarded that local conditions of the growth plate may play a role in the development of this pathology.

**Keywords:** Alkaline phosphatase, biological calcification, endochondral ossification.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1. O osso e a ossificação	18
2.2. Vesículas de matriz extracelular e Enzimas envolvidas na ossificação	21
2.3. Discondroplasia tibial	23
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção dos animais	27
4.2. Sacrifício das aves e coleta dos ossos	27
4.3. Preparação do extrato enzimático	28
4.4. Remoção das proteínas ligadas à membrana pela âncora do fosfatidilinositol	28
4.5. Solubilização das proteínas da membrana com triton X-100	28
4.6. Solubilização de proteínas periféricas da membrana com NaCl	28
4.7. Determinação da atividade p-nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases	29
4.8. Efeito do pH sobre a atividade PNFFásica das fosfatases	29
4.9. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da fosfatase alcalina	30
4.10. Ação de inibidores sobre a atividade da fosfatase alcalina	30
4.11. Inativação térmica da fosfatase alcalina	30
4.12. Determinação da atividade da fosfatase ácida tartarato resistente	30
4.13. Determinação da atividade da ecto-fosfodiesterase nucleotídeo	
4.14. pirofosfatase (PC-1)	31
4.15. Efeito do pH sobre a atividade da PC-1	31
4.16. Determinação da atividade de pirofosfatase (PPiase)	32
4.17. Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase)	32
4.18. Dosagem de proteína	32
4.19. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE	33
4.20. Determinações dos parâmetros cinéticos da fosfatase alcalina	33
4.21. Análise estatística	33

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	55

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira aparece desde 2011 como maior exportadora mundial deste tipo carne e sendo o terceiro maior produtor de carne de frango, segundo dados da União Brasileira de Avicultura – UBABEF (2013). Em 2012, a produção avícola do Brasil foi da ordem de 12,6 milhões de toneladas, ficando atrás apenas de China e EUA, respectivamente, primeiro e segundo maiores produtores de frango no mundo.

Para se alcançar esses níveis de produção, avanços tecnológicos foram necessários, nas áreas de melhoramento genético, manejo, sanidade e nutrição (DIBNER, 2007; PALHARES, 2012). Em 1930, o frango de corte era abatido, com 105 dias de idade e peso médio de 1,5 kg, a taxa de conversão alimentar era de 3,5 kg de ração por quilograma de carne de frango. Em 2009, a uma taxa de conversão alimentar de 1,839, o frango de corte pesava em torno de 2,6 kg, com idade para abate de 35 dias (ABPA, 2008; PATRICIO et. al., 2012, OLIVEIRA & NÄÄS, 2012).

Para assegurar o crescimento rápido das aves, faz-se necessário garantir o desenvolvimento adequado do esqueleto dos animais, assim o Conselho Nacional de Pesquisa dos EUA (NRC) fornece estimativas das quantidades de nutrientes para várias classes de aves domésticas, mas a necessidade de melhorias nutricionais levaram os pesquisadores a procurar maneiras de otimizar a eficiência metabólica animal, a fim de aumentar a produtividade, diminuir os custos e produção de resíduos indesejáveis (GOMES et al., 2009).

Nesse sentido, sabendo que o consumo da carne de frango aumentou, no ano de 2013, o peso total de carcaças de frango de corte produzidas no Brasil foi de mais de 12 milhões de toneladas, enquanto o peso total de carcaças de bovinos foi de pouco mais de 8 milhões de toneladas (IBGE, 2013).

Porém, o aumento da demanda de carne de frango e o melhoramento genético no intuito de maior produção de carne acarretou em problemas locomotores e do sistema imune das aves, visto que o desenvolvimento ósseo não acompanhou o maior ganho de peso dos animais. Assim, atualmente há uma grande preocupação com esses problemas considerando que podem interferir no desempenho e ocasionar condenação de carcaça (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Tecido ósseo

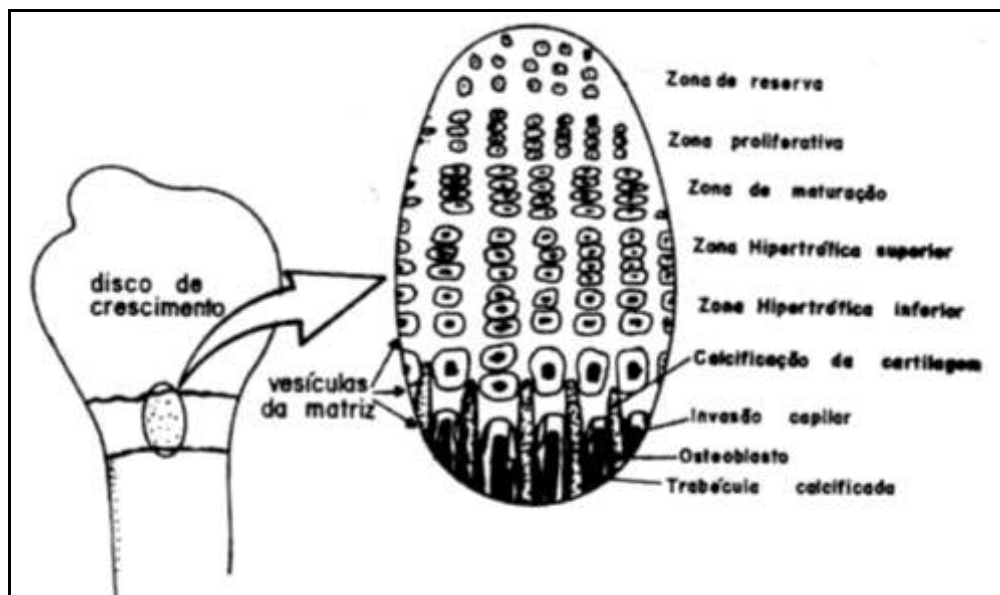
O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente muito ativo, constituído de uma população heterogênea de células, que por meio de uma sequência coordenada de eventos, regula a mobilização e a deposição mineral durante a vida do animal (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; MILLAN, 2012). O equilíbrio entre estes dois processos é de importância fundamental para a formação do sistema esquelético (CIANCAGLINI et al., 2006; BONEWALD, 2011).

Nos tetrápodes, ocorrem dois processos de ossificação, a ossificação intramembranosa e a endocondral, o processo de ossificação endocondral é o responsável pelo crescimento longitudinal da maioria dos ossos do esqueleto. Em circunstâncias normais a calcificação ocorre no disco epifisário pela ação de células conhecidas como condrócitos, que se encontram em diferentes estágios de diferenciação, dependendo, principalmente, da sua localização no interior do disco de crescimento (ANDERSON, 1995; GERBER; FERRARA, 2000).

O disco de crescimento é constituído de cartilagem, formando uma estreita faixa de ligação entre a epífise e a diáfise e pode ser dividido nas seguintes regiões (Figura 1) (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002):

- Zona de reserva, contém condrócitos aparentemente em repouso, dispersos e inativos.
- Zona de proliferação, onde ocorre a maioria das divisões celulares, nesta região localizam-se as células precursoras dos condrócitos (células progenitoras). A divisão celular do condrócito gera o acúmulo de novas células, deslocando-as para baixo e formando colunas longitudinais. A formação destas, permite a subdivisão da matriz em septos transversais, que separam as colunas de células que estão em diferentes estágios de desenvolvimento e, em septos longitudinais que separam as colunas de células adjacentes. É na zona de proliferação que ocorre a divisão celular dos condrócitos, e sua morte ocorre na zona hipertrófica, mantendo assim distância constante entre a zona proliferativa e a metáfise.

**Figura 1:** Estágios do processo de ossificação endocondral no disco de crescimento.



Fonte: Pizauro; Ciancaglini; Macari (2002).

- Zona de maturação, os condrócitos passam de uma fase de pós-divisão a um estado de maturação, neste período ocorre intensa síntese e secreção de matriz extracelular, e aparecem os primeiros indícios de produção de fosfatase alcalina.
- Zona hipertrófica, onde condrócitos aumentam de tamanho e há presença de muitas vesículas da matriz extracelular (VME).
- Zona de calcificação, nesta região os condrócitos degeneram, inicialmente ocorre a deposição de fosfato de cálcio no interior das VME formando o cristal de hidroxiapatita que posteriormente rompem as vesículas e extravasam.

Num segundo passo, após o extravasamento dos cristais de hidroxiapatita para o fluido extracelular, ocorre a deposição destes nas fibras de colágeno dos ossos em formação (MILLAN, 2012).

Conforme observado, para que haja crescimento ósseo, é necessário equilíbrio entre proliferação dos condrócitos, produção de matriz óssea, calcificação biológica, hipertrofia e invasão da lacuna do condrócito hipertrofiado. O que torna a diferenciação dos condrócitos uma etapa crucial na ossificação endocondral (ANDERSON, 1995; GERBER; FERRARA, 2000; FARQUHASON; JEFERREIS, 2000).

A hipertrofia dos condrócitos é a etapa essencial para invasão vascular e subsequente substituição da matriz calcificada por osso (HASKY-NEGEV et al., 2008), sugerindo que a vascularização da região inferior do disco de crescimento representa

uma etapa crucial na interação entre os processos de condrogênese (produção de cartilagem) e osteogênese (formação do tecido ósseo), principalmente, durante o período de crescimento rápido dos ossos longos ou reparo de fraturas (GERBER; FERRARA, 2000). Mudanças nesse equilíbrio podem levar ao desenvolvimento de doenças esqueléticas tais como osteoartrite, calcificação ectópica e discondroplasia tibial (DT).

Apoptose, ou morte programada da célula é um fenômeno necessário para o desenvolvimento da maioria dos tecidos, a coordenação desse processo é necessária para o crescimento e remodelação do tecido ósseo. Uma variedade de condições e fatores pode ativar e regular a morte da célula, dentre eles podemos citar: danos ao DNA, hipóxia, perda de integrina e ativação de receptores de morte, sendo que todos culminam em aumento na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2013). Assim, o atraso na apoptose dos condrócitos pode resultar em acúmulo de células hipertrofiadas no disco de crescimento. Logo, a compreensão dos mecanismos que regulam a maturação do condrócito poderá contribuir para a elucidação do(s) mecanismo(s) responsável(is) pelo desenvolvimento da lesão (CLARKE; CLARKE, 1996; JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2013).

A morte programada dos condrócitos no disco de crescimento de ossos longos tem sido muito estudada (CLARKE; CLARKE, 1996) e os resultados obtidos mostram que existe uma estreita relação entre a vascularização da cartilagem e a morte programada dos condrócitos hipertróficos (FLOYD et al., 1987). De fato, tem sido demonstrado que a vascularização e a reabsorção da cartilagem calcificada ocorrem após a apoptose dos condrócitos (GIBSON; KOHLER; SCHAFFER, 1995; GIBSON; LIN; ROQUE, 1997), e que a invasão vascular pode eliminar, de cada coluna de células, um condrócito hipertrófico a cada 3 horas, ou 8 células em um dia (HUNZIKER; SCHENK; CRUZ-ORIVE, 1987), sugerindo que a apoptose coincide com a hipertrofia e morte dos condrócitos e não depende de estímulos externos (GIBSON; LIN; ROQUE, 1997).

Além disso, estudos realizados por vários pesquisadores mostram que a ossificação endocondral é um processo muito bem regulado que envolve proliferação dos condrócitos, maturação e hipertrofia, assim como síntese e calcificação de matriz extracelular. Estes eventos iniciais são seguidos pela vascularização e reabsorção da cartilagem calcificada que, finalmente, é substituída por osso (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

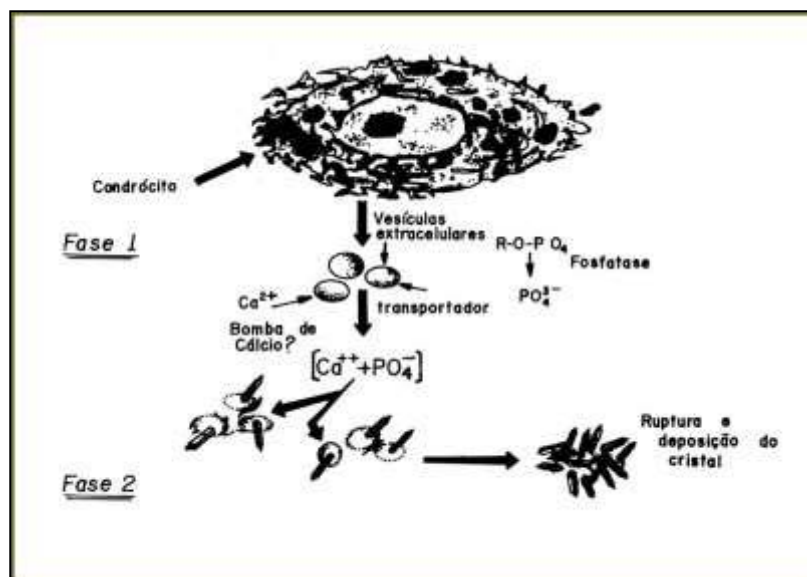
## 2.2. Teoria da ossificação endocondral

A mineralização é considerada o último passo da formação do tecido ósseo. A forma de sal cristalino depositado sobre a matriz orgânica do osso é constituída principalmente de fosfato e de cálcio na forma de hidroxiapatita. O primeiro passo na precipitação de sais de osso que envolve a formação de um arranjo mineral de cálcio e de fosfato capaz de um crescimento de hidroxiapatita é o fenômeno de nucleação "semente", que é explicado pelo conceito de que os fluídos do corpo existem em um estado metaestável (são saturados com cálcio e fosfato) até a formação do primeiro precipitado (ROBINSON, 1923).

Em mamíferos, onde a mineralização é sinônimo de calcificação, a principal causa de controvérsia é o mecanismo pelo qual a barreira termodinâmica é vencida para a conversão dos íons cálcio e fosfato orgânico presentes no sangue e fluídos intersticiais de tecidos em calcificação em uma fase mineral sólida. Na tentativa de explicar este mecanismo, várias teorias tem sido propostas, dentre todas, sem dúvida alguma, a mais antiga e persistente é aquela proposta por Robinson (1923), que admite que a fosfatase alcalina atua sobre a hexose monofosfato, derivada da quebra do glicogênio, liberando o fosfato inorgânico. Este aumento localizado do fosfato inorgânico, acrescido à concentração normal já existente no líquido tissular, provocaria a mineralização dos tecidos.

O brotamento das vesículas de matriz é o mecanismo de geração de organelas extracelulares que participam das etapas finais do processo de calcificação antes da morte programada do condrócito (Figura 2) (ANDERSON, 1995; PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; SIMSA et al., 2007). Os eventos bioquímicos e biofísicos, responsáveis pela biogênese das vesículas extracelulares, ainda não estão perfeitamente elucidados, mas admite-se que elas estejam relacionadas ao ciclo de vida da célula do condrócito e possivelmente com sua apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972; ANDERSON, 1995; RASAPUTRA et al., 2012).

**Figura 2:** Biogênese das Vesículas de Matriz Extra Celular.



Fonte: Pizauro; Ciancaglini; Macari (2002).

Um dos grandes desafios da Biologia é a compreensão de como as células se replicam e se dividem e, um dos aspectos importantes desse evento é saber como as células formam as VME (CIANCAGLINI et al., 2006). A nova vesícula deve ser formada com grande precisão e possuir todas as informações necessárias para criar um microambiente adequado para a formação e preservação do mineral (ANDERSON, 1995; ANDERSON et al., 1997; PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

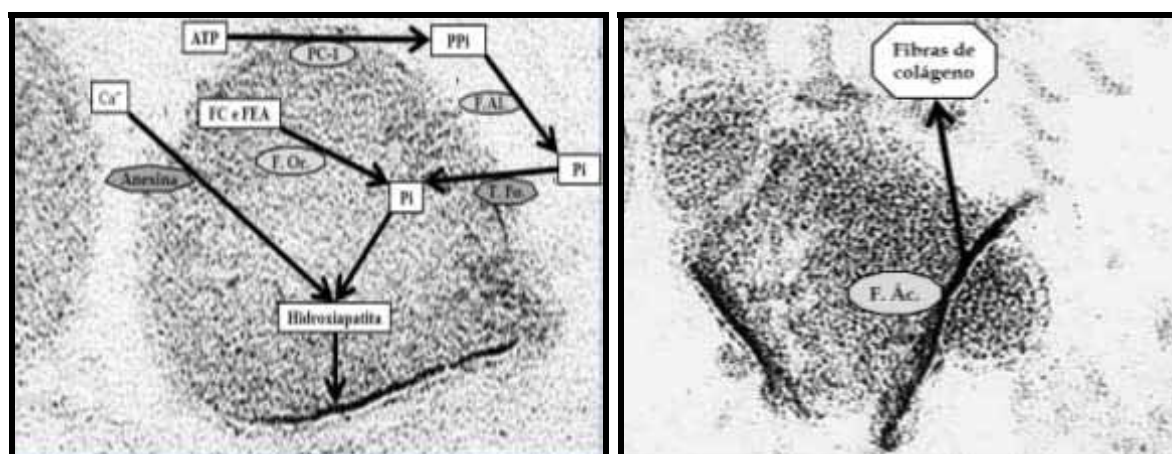
As vesículas são secretadas na zona de mineralização do disco de crescimento por brotamento das superfícies laterais dos condrócitos no início da fase de hipertrofia (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002), seu papel como mediadoras da deposição mineral é reforçado devido aos seguintes fatos: o local de aparecimento de depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (ANDERSON, 1973; ALI, 1976). Primeiro são formados cristais de hidroxiapatita dentro da VME e posteriormente ocorre a impregnação do colágeno ósseo com este material (ANDERSON, 1973; 1976; WUTHIER, 1977; MILLAN, 2012). É proposto que o interior das VME serve como microambiente selado que protege o primeiro núcleo do mineral, mais solúvel, antes de se converter em cristais de hidroxiapatita. Foi verificado que, vesículas isoladas também possuem a capacidade de depositar sais de cálcio "in vitro" (WUTHIER; REGISTER, 1985; HSU, 1994; CIANCAGLINI et al., 2006; NARISAWA; YADAV; MILLAN, 2013).

Vários estudos com o objetivo de determinar os tipos de lipídeos, eletrólitos e principalmente enzimas presentes nessas vesículas têm revelado que a fosfatase

alcalina não é a única enzima, presente na membrana, que tem importância no processo de calcificação biológica (ANDERSON, 1995; PIZAURO et al., 1998; MACRAE et al., 2010; KIFFER-MOREIRA et al., 2014).

Além da fosfatase alcalina, tem sido demonstrada a presença de elevados níveis de pirofosfatase (PPIase), de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase) e da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1), dentre outras (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; MACRAE et al., 2010; MILLAN, 2012). Segundo Johnson e colaboradores (1999, 2000) e Gijsbers e colaboradores (2000), a PC-1 utiliza o ATP presente no fluido extracelular da cartilagem para gerar o pirofosfato inorgânico (PPi), substrato fisiológico da ectofosfatase alcalina (Figura 2).

**Figura 3:** Coordenação da atividade das enzimas das vesículas de matriz extracelular.



ATP – Trifosfato de adenosina, PPi - Pirofosfato, Pi – Fosfato, FC – Fosfatidil colina, FEA – Fosfatidil etaloamina, PC-1 – ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase, F.AL – Fosfatase alcalina, F.Ác – Fosfatase ácida, F.Or PHOSPHO 1, T. Fo – transportador de fosfato.

Anderson; Garimella; Sarah (2005) com adaptações do autor.

Além disso, já foi demonstrado que a fosfatase alcalina também pode hidrolisar o ATP, liberando fosfato inorgânico; e que a enzima é regulada alostericamente pelo ATP e inibida competitivamente pelo produto da reação, o fosfato inorgânico (PIZAURO et al., 1987), sugerindo que os níveis relativos de PPi e de Pi presentes no fluido da matriz extracelular, também desempenham um papel importante na regulação do processo de calcificação biológica (ZAKA et al., 2006; FOSTER et al., 2012). Esta hipótese é suportada pela recente demonstração de que o nível do fosfato inorgânico, derivado da hidrólise do PPi pela fosfatase alcalina, atua como um sinal da indução da expressão

da glicoproteína fosforilada osteopontina em osteoblastos (BECK; ZERLER; MORAN, 2000; NARISAWA; YADAV; MILLAN, 2013).

Além disso, foi verificado que o PPI inibe a capacidade dos condrócitos de depositar minerais na matriz extracelular do tecido ósseo (POOLE et al., 1989; JONHSON et al., 1999; 2000), e que a remoção desse mineral, cessa o efeito inibitório da calcificação biológica mediada pelas VME (LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; REZENDE et al., 1999; ADDISON et al., 2007). Tem sido verificado ainda que a propagação dos cristais de hidroxiapatita fora das vesículas extracelulares também é inibida pelo PPI (ANDERSON, 1995; PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; ADDISON et al., 2007).

Segundo Terkeltaub (2001) e Addison e colaboradores (2007) o PPI representa a molécula responsável no controle da calcificação biológica tanto em condições normais como em condições patológicas, sugerindo que o aumento da concentração extracelular do inibidor natural da formação da hidroxiapatita e da mineralização bloqueia a calcificação da cartilagem articular e de outros tecidos, além de atuar como inibidor da fosfatase alcalina (PIZAURO et al., 1988; ADDISON et al., 2007).

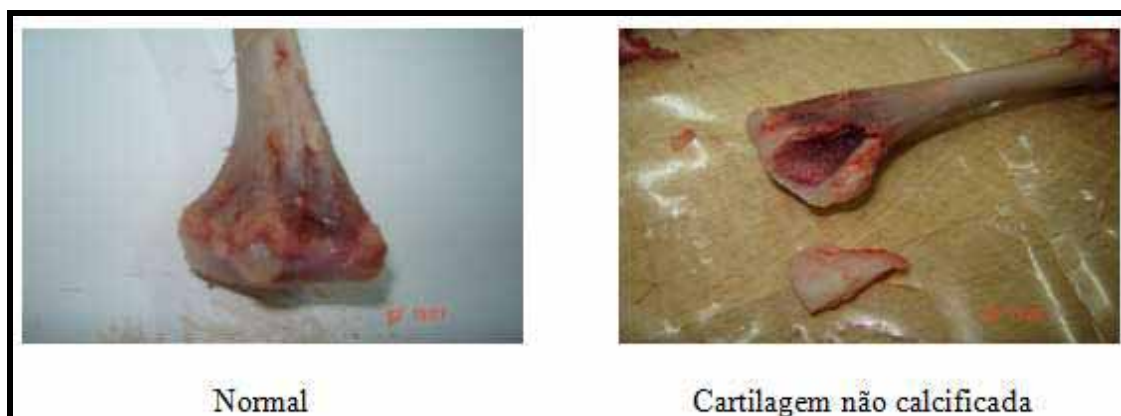
### **3.3. Discondroplasia Tibial**

A discondroplasia tibial é uma patologia das placas de crescimento epifisárias dos ossos longos de aves crescimento de rápido, caracterizada por anomalias na diferenciação dos condrócitos, o que gera acúmulo de cartilagem branca, opaca, não calcificada e avascular (Figura 3) (ORTH; COOK, 1994). Tendo a genética como fator importante, vários fatores afetam a gravidade e a incidência das lesões discondroplásicas (ORTH; COOK, 1994). Os trabalhos atuais têm caracterizado a cartilagem discondroplásica relativamente à expressão de vários genes e seus produtos (FARQUHARSON; JEFFERIES, 2000; PRAUL et al., 2000; LEACH; MONSONEGO-ORNAN, 2007). Sua etiologia ainda não está devidamente esclarecida, e acredita-se que sua origem seja multifatorial (ORTH; COOK, 1994).

Na tentativa de explicar este mecanismo, alguns autores admitem que o estímulo mecânico, juntamente com o genótipo e alterações nos constituintes da dieta, podem interromper os eventos envolvidos no processo de diferenciação dos condrócitos e desencadear o processo de formação da lesão (EDWARDS, 2000; PRAUL et al., 2000;

FARQUHARSON; JEFFEREIS, 2000; RATH et al., 2005; 2007; VELLEMAN, 2000; REDDI et al., 2000; PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

**Figura 4:** Corte da região de crescimento de ave normal e de ave portadora de discondroplasia tibial acometida de lesão grau 4.



Elaborado pelo autor.

Nesse sentido, resultados recentes mostraram que no caso da DT, a interrupção na cascata de diferenciação dos condrócitos, localizados no interior do disco de crescimento de aves, resulta em altos níveis de condrócitos pré-hipertróficos e ausência de células hipertróficas, sugerindo que a etapa final do processo de calcificação não acontece devido à presença de células que não expressam, ou possuem baixo nível de expressão, dos genes responsáveis pela hipertrofia dos condrócitos (SIMSA et al., 2007; RASAPUTRA et al., 2012). Além disso, tem sido sugerido que a formação de estruturas vasculares e a calcificação da cartilagem estão intimamente associadas com o desenvolvimento de patologias (ANDERSON, 1995; GERBER; FERRARA, 2000; FARQUHARSON; JEFFEREIS, 2000).

Dessa maneira, genes que são normalmente expressos nos condrócitos hipertróficos podem ter expressão reduzida na DT. Nie e colaboradores (1995) demonstraram que as vesículas extracelulares isoladas do interior da lesão de aves com DT são inativas e não conseguem iniciar o processo de calcificação biológica. Segundo os autores, neste processo ocorrem defeitos na vascularização do tecido, dificultando o fornecimento de nutrientes necessários para a formação da cartilagem e das vesículas extracelulares. Já Wu e colaboradores (2005) demonstraram que condrócitos extraídos da lesão podem apresentar a capacidade de crescer, diferenciar e de expressar seus fenótipos normalmente, quando cultivados em condições ideais.

Estudos de mutação dos genes que controlam a ossificação endocondral no disco de crescimento têm mostrado que ratos transgênicos deficientes de fosfatases também apresentam cartilagem não vascularizada no local onde o osso trabecular deveria se formar (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002; NARISAWA; YADAV; MILLAN, 2013). Além disso, Wu e colaboradores (2005) demonstraram que ratos cujo gene da metaloproteinase-9 da matriz foi nocauteado, também apresentam uma zona de condrócitos hipertróficos com cartilagem semelhante àquela encontrada na DT, sugerindo que os osteoclastos também desempenham um papel importante no processo de vascularização da porção terminal distal dos condrócitos hipertróficos e reabsorção da cartilagem calcificada (PRAUL et al., 2000).

Nesse sentido, a caracterização cinética das enzimas que se encontram associadas à membrana das vesículas extracelulares poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos de formação de novos ossos e do desenvolvimento da lesão da DT.

### 3. OBJETIVOS

- Estudar a atividade das enzimas consideradas marcadores do tecido ósseo, PC-1, fosfatase ácida e fosfatase alcalina em aves normais e acometidas com discondroplasia tibial.
- Caracterizar cineticamente a fosfatase alcalina visando investigar se existem modificações nas propriedades cinéticas desta enzima, entre em aves normais e acometidas com discondroplasia tibial.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Obtenção dos animais**

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 Nº 021238/13, estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Para as análises foram utilizados frangos de corte machos, de 21 dia de idade, da linhagem Cobb-500, obtidos de um incubatório comercial. As aves foram criadas em condição termoneutra, sob um programa de luz contínuo de 24 horas, em um galpão experimental constituído de boxes de 2,5 m de comprimento por 1,5 m de largura, totalizando 3,75 m<sup>2</sup>, forradas com cama de maravalha com aproximadamente 10 cm de altura. Os animais foram criados com fornecimento de ração tradicional formulada segundo as recomendações de Rostagno e colaboradores (2011) e água à vontade.

Sabendo que até 60% dos casos de DT são subclínicos (BARTELS; McDANIELS; HOERR, 1989; THORP et al., 1997), sendo dificilmente identificados mediante a forma de diagnóstico visual, foi realizado diagnóstico da discondroplasia, feito através de um aparelho portátil de raio-X de baixa intensidade, denominado Lixiscope, e classificado conforme scores, de tal forma que o score 1 correspondeu à ave sem lesão, score 2 a uma lesão de grau leve, score 3 a uma lesão de grau intermediário, e score 4 a uma lesão de grau severo.

Assim foram utilizados sete frangos normais e sete frangos acometidos com DT score 4.

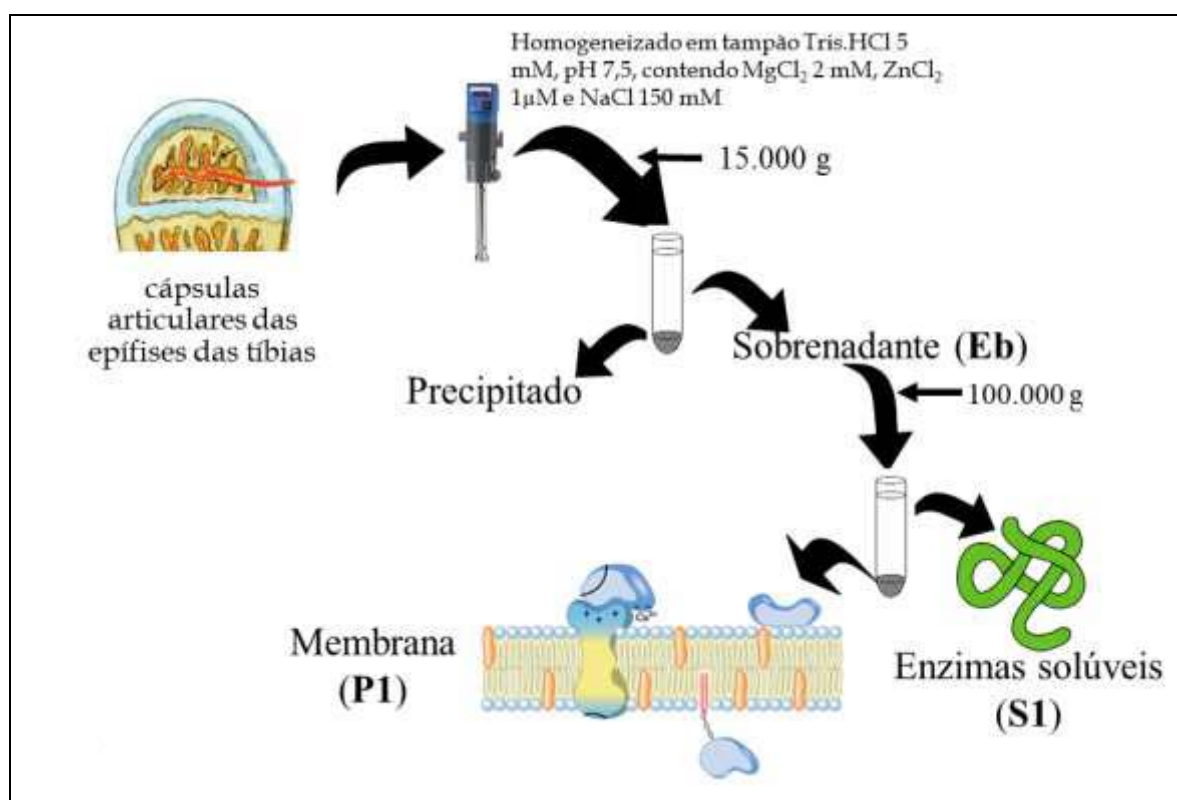
### **4.2. Sacrifício das aves e coleta dos ossos**

As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical, e os ossos da tíbia de ambas as pernas foram colhidos mediante secção e avulsão dos tecidos até completa exposição do tecido ósseo. Este material foi embrulhado em papel alumínio, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -70°C para posterior processamento e análises.

### 4.3. Preparação do extrato enzimático

A epífise das tíbias foi homogeneizada em um homogeneizador tipo Turrax com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,5, contendo  $MgCl_2$  2 mM e NaCl 150 mM, na proporção de 1 g de tecido para 5 ml de tampão. Este foi centrifugado a 15.000 g, durante 10 minutos, a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (Extrato Bruto, EB) foi novamente centrifugado a 100.000 g durante 2 horas, a 4°C. O sobrenadante (S1) foi utilizado para estudos referentes a atividade da fosfatase ácida, o precipitado (P1) foi solubilizado em homogeneizador tipo POTTER com 5 ml com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,25, contendo  $ZnCl_2$  1  $\mu$ M,  $MgCl_2$  2 mM, e utilizado nos próximos passos da purificação (Figura 5).

**Figura 5:** Purificação das enzimas de membrana.



### 4.4. Tratamento de membrana com PiPlc

A membrana foi incubada com de fosfolipase C de *B. thurigiensis* (PiPlc), a 37°C durante uma hora. Após o período de incubação a mistura foi centrifugada a 100.000 g durante 2 horas, a 4°C. O sobrenadante (Sob PiPlc) foi armazenado para estudo referentes a atividade da PC-1. O precipitado (Prec PiPlc) foi solubilizado utilizando-se

o mesmo volume inicial em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,25, contendo  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgCl}_2$  2 mM, e utilizado nos estudos referentes a atividade da fosfatase alcalina (Figura 6).

#### **4.5. Tratamento de membrana com triton X-100**

Para cada 1,0 ml de membrana contendo utilizou-se 100  $\mu\text{L}$  de Triton X-100 30% para encubação durante 1 hora, em banho de gelo ( $\cong 7^\circ\text{C}$ ). Depois a mistura foi centrifugada a 100.000 g durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ .

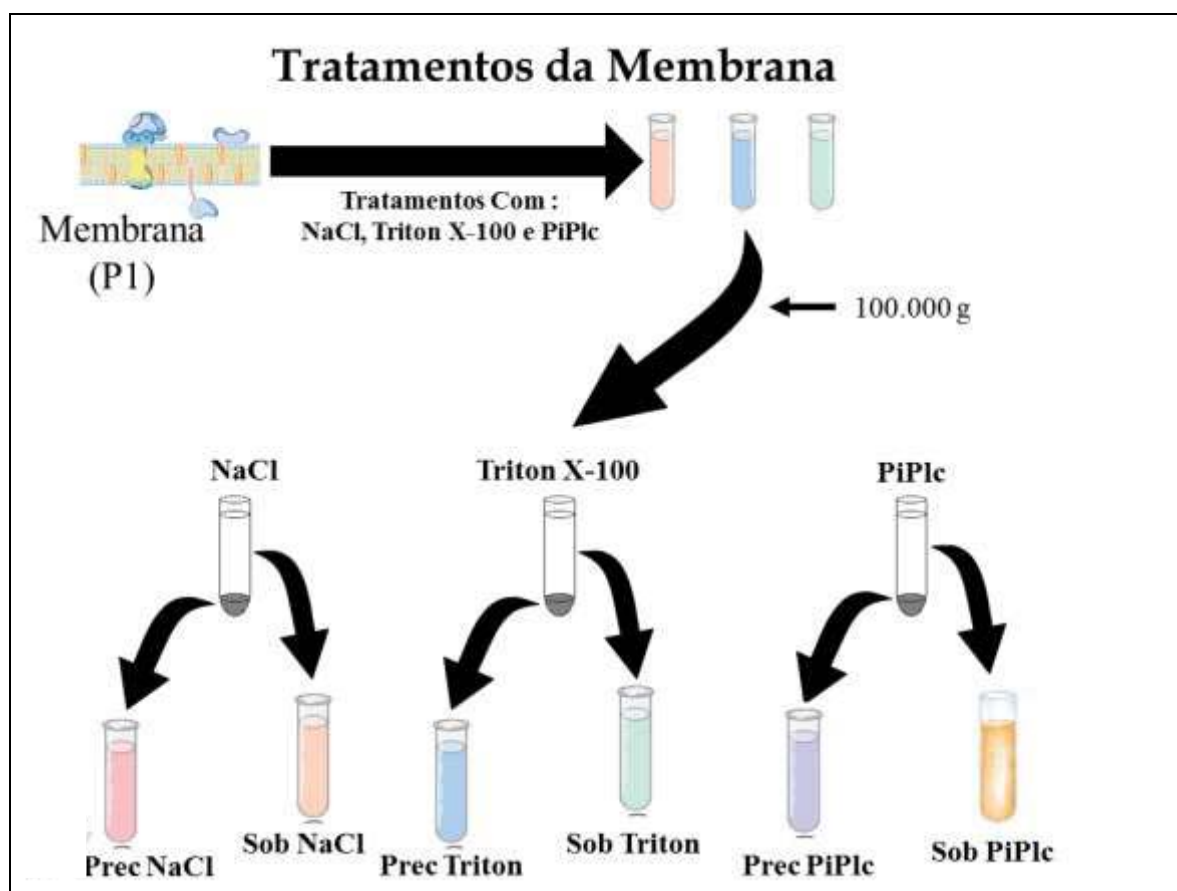
O sobrenadante (Sob Triton) foi armazenado e o precipitado (Prec Triton) foi solubilizado utilizando o mesmo volume inicial do tampão, e foi armazenado (Figura 6).

#### **4.6. Tratamento de membrana com NaCl**

Para cada 1 ml de membrana contendo utilizou-se 1 ml de NaCl 2 M preparado em Tris.HCl 5 mM, pH 7,25, contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  e foi incubado, durante 1 hora a temperatura ambiente. Depois a mistura foi centrifugada a 100.000 g durante 2 horas a  $4^\circ\text{C}$ .

O sobrenadante (Sob NaCl) foi armazenado e o precipitado (Prec NaCl) foi solubilizado utilizando o mesmo volume inicial do tampão, e foi armazenado (Figura 6).

**Figura 6:** Tratamentos da membrana biológica.



P1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob NaCl - Sobrenadante do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Prec NaCl - Precipitado do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Sob Triton - Sobrenadante do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Prec Triton - Precipitado do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Sob PiPc - Sobrenadante do tratamento com PiPc após a ultracentrifugação, Prec PiPc - Precipitado do tratamento com PiPc após a ultracentrifugação.

#### 4.7. Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases

A atividade PNFFásica da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente, a 37°C, por meio da formação do íon *p*-nitrofenolato ( $\epsilon = 17600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , pH 13), em 410 nm a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (SIGMA®) 1 mM em meio de reação contendo AMPOL 100 mM, pH 9,4,  $\text{MgCl}_2$  2 mM,  $\text{ZnCl}_2$  1  $\mu\text{M}$  e PNFF 1 mM, em volume final de 1 ml.

A reação enzimática foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação e interrompida por meio da adição de 1 ml de NaOH 1 M. 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 hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada determinação foi incluído controle para estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

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

A atividade da fosfatase ácida foi determinada nas mesmas condições substituindo-se o tampão AMPOL por Acetato 100 mM pH 6,0.

#### 4.8. Efeito do pH sobre a atividade PNFFásica das fosfatases

O efeito do pH sobre a atividade das fosfatases foi realizado utilizando-se as seguintes soluções tampão: Acetato de sódio (entre pH 3,5-6,5), Tris.HCl (entre pH 6,5-8,5) e AMPOL (entre pH 8,5-11,0), em concentração 100 mM. A atividade foi determinada conforme descrito no item anterior.

#### 4.9. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade da fosfatase alcalina

O estudo da influência da concentração de substrato sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi determinado variando-se a concentração de substrato de 0,001 mM até 8 mM.

#### 4.10. Ação de inibidores sobre a sobre a atividade da fosfatase alcalina

A ação de diferentes inibidores sobre a atividade da fosfatase alcalina solubilizada foi estudada utilizando-se concentrações de inibidor compreendidas entre 1  $\mu$ M a 10 mM, dependendo do inibidor testado (Tabela 1). As soluções dos inibidores foram previamente preparadas em pH 9,4 e a atividade PNFFase residual da enzima foi determinada conforme descrito anteriormente.

**Tabela 1:** Compostos e concentrações utilizados nos testes de inibição.

Inibidor	Concentração	
Fosfato	0, 1, 2 e 4	mM
Levamisol	0, 0,001 e 0,01	mM
Teofilina	0, 0,06, 0,1 e 0,16	mM
Vanadato	0, 0,01 e 0,02	mM
Zinco	0, 0,004, 0,006 e 0,008	mM

#### **4.11. Inativação térmica da fosfatase alcalina**

O estudo de inativação térmica da fosfatase alcalina solubilizada foi realizado em tampão AMPOL 50 mM, pH 9,4, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e PNFF 1 mM. A enzima (5 µg/ml), em tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2mM, foi incubada em temperaturas compreendidas entre 40 e 60°C e, em tempos previamente estabelecidos, foram retiradas alíquotas de 150 µl que foram mantidas em banho de gelo durante um minuto. Finalmente, a atividade PNFFase foi determinada conforme descrito anteriormente.

#### **4.12. Determinação da atividade da fosfatase ácida tartarato resistente**

A atividade PNFFásica (p-nitrofenilfosfatásica) da fosfatase alcalina presente no extrato bruto foi determinada a 37°C, através da formação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon = 17600 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 13), a 410 nm, em tampão acetato 100 mM, pH 6,0, contendo tartarato dissódico 100 mM e p-nitrofenilfosfato 1 mM, em um volume final de 1 ml.

A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato ao meio de reação e interrompida pela adição de 1 ml de NaOH 1M. Após mistura por agitação, a absorbância dos tubos foi determinada a 410 nm. As determinações foram efetuadas em duplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5%.

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, nas condições de ensaio.

#### **4.13. Determinação da atividade da ecto-fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1)**

A atividade da PC-1 foi determinada descontinuamente, em tampão AMPOL 100 mM, pH 10,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 1,6 mM e timidina 5´monofosfato *p*-nitrofenil éster (PMTN) 1 mM, em um volume final de 0,5 ml. A reação enzimática foi iniciada pela adição do substrato ao meio de reação e interrompida pela adição de 0,45 ml de NaOH 1 M. Após mistura por agitação, a absorbância foi determinada a 410nm.

As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada experimento foram incluídos controles por meio da adição da enzima após a interrupção da reação, para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato.

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

#### **4.14 Efeito do pH sobre a atividade da PC-1**

O efeito do pH sobre a atividade das fosfatases foi realizado utilizando-se as seguintes soluções tampão: HEPES (entre pH 7,0 – 9,5), Tris.HCl (entre pH 7,0-8,5) e AMPOL (entre pH 8,5-11,0), em concentração 100 mM. A atividade foi determinada conforme descrito no item anterior.

#### **4.15 Determinação da atividade de pirofosfatase (PPIase)**

A atividade de PPIase foi determinada descontinuamente, a 37°C, através da dosagem do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do substrato, em tampão AMPOL 100 mM, pH 9,4, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 µM, e PPI 1 mM.

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida pela adição de 0,1 ml de solução gelada de TCA 50% (p/v). A dosagem do fósforo inorgânico liberado foi efetuada de acordo com o método descrito por Heinonen e Lahti (1981). 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. O excesso de molibdato presente no meio de reação é complexado pelo citrato e, em seguida o fosfomolibdato formado é dosado espectrofotometricamente a 355 nm.

As determinações foram efetuadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada experimento foram incluídos controles sem a reação enzimática para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato

Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um nmol de fosfato por minuto por miligrama de proteína presente no extrato, nas condições de ensaio.

#### **4.16. Determinação da atividade de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase)**

A atividade de ATPase foi determinada conforme o procedimento descrito para determinação da PPIase, substituindo-se o substrato PPI pelo ATP em concentração final 1 mM.

#### **4.17. Dosagem de proteína**

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

#### **4.18. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS-PAGE**

As proteínas presentes nos extratos foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de acordo com o método de Laemmli (1970).

Às alíquotas foi adicionado 40  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol e 90  $\mu$ L de tampão de amostra 3X concentrado (125mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de SDS; 0,002% azul de bromofenol, concentração final), então foram aquecidas em banho-maria em ebulição durante 2 minutos, transferidas para um banho de gelo e armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida.

As amostras preparadas como descrito anteriormente foram aplicadas no gel de poliacrilamida a uma concentração de 30  $\mu$ g de proteína total. Em todos os géis foi aplicado também padrão de referencia Bio-Rad. O gel de separação, com concentração igual a 9%, foi preparado utilizando-se 2 ml de tampão de separação (0,75 M Tris; 0,21% SDS, pH 8,8), 1,2 ml de acrilamida-bis (30:0,8%), 0,8 ml de água deionizada, 60  $\mu$ L de APS 10% e 6  $\mu$ l de TEMED. O gel de empilhamento (5%) foi preparado com 1,5 ml de tampão de empilhamento (0,13 M Tris, 0,12% SDS, 0,01%  $\text{NaN}_3$ , pH 6,8), 0,250 ml de acrilamida-bis (30:0,8%), 40  $\mu$ L de APS 10% e 4  $\mu$ L de TEMED.

Foi utilizado o sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad) conectado a uma fonte à qual foi aplicada uma voltagem de 200 V, por aproximadamente 40 minutos.

#### **4.19. Determinações dos parâmetros cinéticos**

Os resultados obtidos nos experimentos de cinética de hidrólise dos substratos foram ajustados de acordo com a equação de Hill utilizando-se o programa Origin Pro 8 (North Hampton, Massachusetts, EUA).

#### **4.20. Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa "SAS system" versão 9.0, considerando-se três repetições. Foram realizados testes de homocedasticidade, de normalidade dos erros, análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias a 5% de probabilidade.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os dados referentes à separação da membrana do sobrenadante por ultracentrifugação e os diferentes tratamentos utilizados. Verifica-se que a concentração de proteínas presentes no sobrenadante do tratamento com PiPlc (0,27 mg/ml) é cerca de sete vezes menor que a do extrato bruto (1,89 mg/ml). A análise das atividades enzimáticas mostrou que o processo de ultracentrifugação e tratamentos foi eficiente para estudar a forma de interação das proteínas com a membrana, apresentando maiores fatores de purificação, para a fosfatase alcalina no sobrenadante do tratamento com PiPlc (7,54), fosfatase ácida no sobrenadante da primeira ultracentrifugação (5,54) e PC-1 no sobrenadante do tratamento com Triton X-100 (3,64).

**Tabela 2:** Atividades das enzimas PC-1 e Fosfatases Alcalina e Ácida presentes no disco de crescimento de frangos de corte, após diferentes tratamentos.

Fração	Concentração de Proteínas	Fosfatase Alcalina	Fator de Purificação F. Al.	Fosfatase e Ácida	Fator de Purificação F. Ác.	PC-1	Fator de Purificação PC-1
EB	1,89	81,07	1,00	2,93	1,00	0,91	1,00
Sob 1	2,36	45,59	0,56	5,54	1,89	0,81	0,89
Prec 1	1,41	130,71	1,61	2,60	0,89	2,01	2,21
Sob NaCl	0,32	8,74	0,11	2,52	0,86	0,13	0,14
Prec NaCl	0,50	98,12	1,21	1,71	0,58	1,46	1,61
Sob Triton	0,59	320,32	3,95	2,99	1,02	3,30	3,64
Prec Triton	0,66	10,92	0,13	1,78	0,61	2,53	2,79
Sob PiPlc	0,27	610,92	7,54	0,00	0,00	0,35	0,39
Prec PiPlc	1,23	28,55	0,35	2,04	0,70	0,71	0,78

EB – Extrato Bruto, Sob 1 – Sobrenadante da primeira ultracentrifugação, Prec 1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob NaCl - Sobrenadante do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Prec NaCl - Precipitado do tratamento com NaCl após a ultracentrifugação, Sob Triton - Sobrenadante do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Prec Triton - Precipitado do tratamento com Triton após a ultracentrifugação, Sob PiPlc - Sobrenadante do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação, Prec PiPlc - Precipitado do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação.

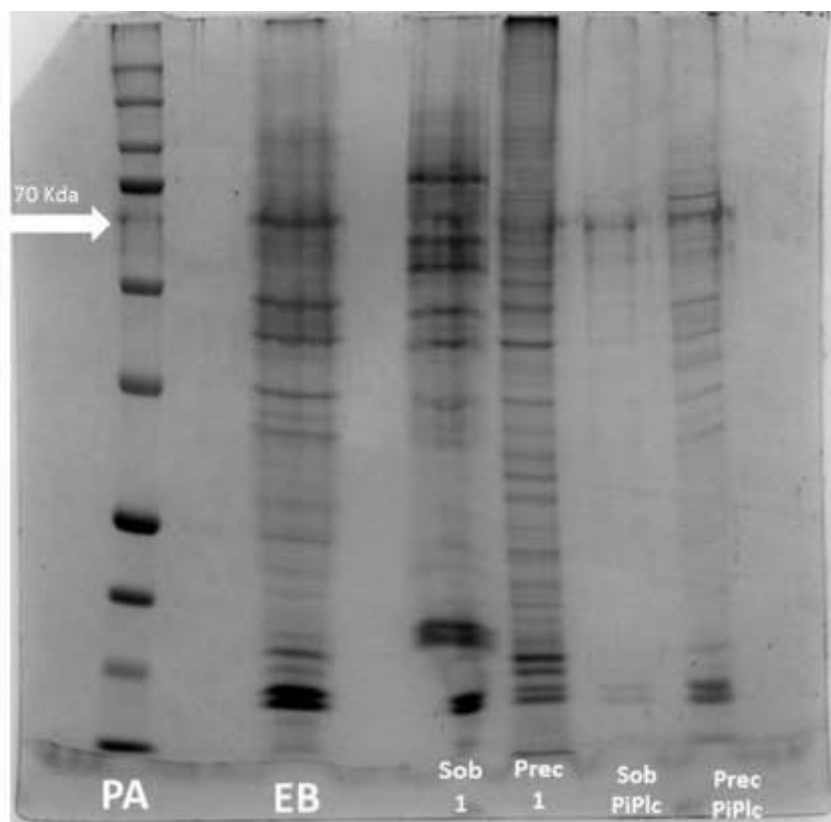
O estudo da interação da fosfatase alcalina de placas ósseas com a membrana foi realizado utilizando-se fosfolipase C de *B. thurigiensis*, mostram que a fosfatase alcalina de placas ósseas é eficientemente removida da membrana pela ação da fosfolipase C isso sugere que a enzima de placas ósseas encontra-se associada à membrana através da âncora do fosfatidilinositol. Esta suposição é baseada no fato de que o tratamento com fosfolipase C tem sido utilizado como uma evidência da participação da âncora do fosfatidilinositol na associação de proteínas com a membrana (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

Outra evidência experimental que suporta esta suposição é o fato de que a fosfatase alcalina que participa do processo de calcificação não é liberada da membrana através de soluções salinas bem como pela ação de agentes caotrópicos (CYBORON; WUTHIER, 1981; CURTI et al., 1986; CIANCAGLINI et al., 1990). Entretanto, o fato da enzima de placas ósseas poder ser solubilizada com detergentes indica claramente que ela está solidamente associada à membrana (PIZAURO et al., 1987, CIANCAGLINI et al., 1990), o que coincide com os resultados apresentados em nosso trabalho. Conforme pode ser observado na Tabela 2 praticamente toda atividade PNFFase é liberada da membrana pela fosfolipase C de *B. thuringiensis*. Nossos resultados mostram ainda, que a fosfatase alcalina solubilizada também hidrolisa o PPI (12,52U/mg) e o ATP (29,78 U/mg), apresentando portanto um caráter multifuncional.

Outro aspecto a ser considerado é que a atividade pirofosfatásica (1,59/mg) e de adenosina-5'-trifosfatase (8,51 U/mg) ainda são encontrados associados à membrana, após o tratamento com a fosfolipase C isso sugere que o tratamento com fosfolipase C ou não remove completamente a fosfatase alcalina da membrana ou então essas duas atividades pertenceriam a outra enzima. A primeira possibilidade pode ser descartada uma vez que toda atividade PNFFase foi liberada no sobrenadante e que a pequena fração que permanece na membrana não justifica os valores das atividades ATPásica e pirofosfatásica. Desse modo, essas duas atividades remanescentes na membrana podem estar associadas à uma outra enzima, Millan (2012) propõe que tanto a fosfatase alcalina como a PC-1, presentes na membrana das vesículas extracelular da matriz, podem atuar como ATPase e pirofosfatase, onde a fosfatase alcalina possui papel primário e a PC-1 apresenta papel secundário em ambos os processos (ANDERSON, 1995; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997), esta hipótese suporta os resultados aqui apresentados.

Para melhor análise da composição proteica do tratamento com PiPlc, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Figura 7). A análise mostra diferença significativa entre o perfil proteico das vesículas extraídas de animais normais, destaca-se a diminuição da quantidade de proteínas com os tratamentos e a eficiência do uso da PiPlc hidrolisar a ancora de fosfatidil inositol que liga a fosfatase a membrana, sendo que no sobrenadante deste tratamento chama a atenção a presença de uma banda de 73 kDa, que é equivalente a massa molecular da fosfatase alcalina

**Figura 7.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (p/v) das frações do extrato de tíbia de frangos.



PA – Padrão de peso molecular, EB – Extrato Bruto, Sob 1 – Sobrenadante da primeira ultracentrifugação, Prec 1 - Precipitado da primeira ultracentrifugação, Sob PiPlc - Sobrenadante do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação, Prec PiPlc - Precipitado do tratamento com PiPlc após a ultracentrifugação.

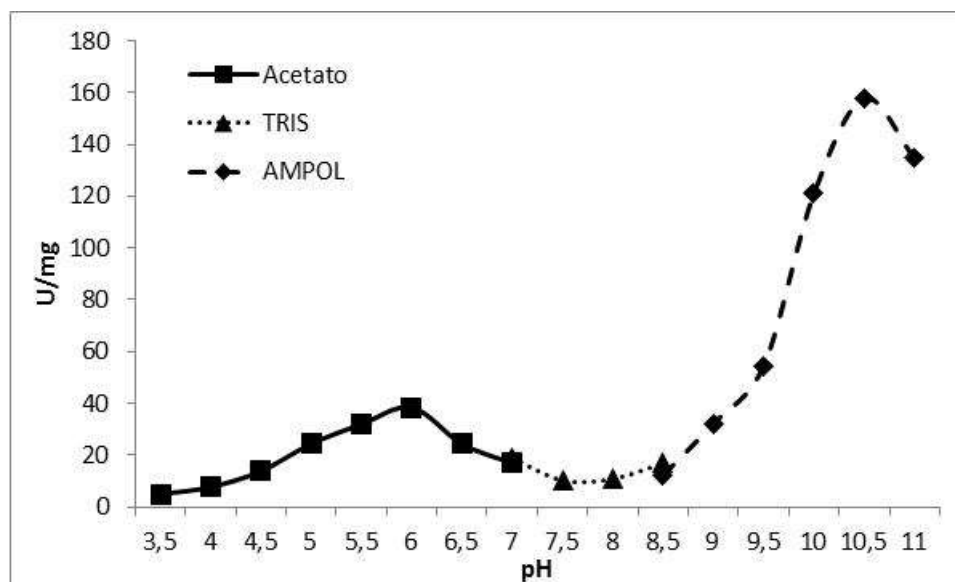
As fosfatases alcalinas de vários tecidos de mamíferos geralmente são glicoproteínas de peso molecular entre 100 e 200 kDa, constituídas por duas subunidades aparentemente idênticas (CATHALA et al., 1975; FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; WUTHIER; REGISTER, 1985; PIZAURO et al., 1987; CIANCAGLINI et al., 1990; SAY et al., 1991). Entretanto, para a fosfatase alcalina de cartilagem epifisária foi relatada a obtenção de moléculas oligoméricas de peso molecular da ordem de 207-220 kDa contendo 4 subunidades idênticas de 53 kDa (CYBORON; WUTHIER, 1981).

A massa molecular da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C, foi estimada em 73 kDa em sua forma monomérica são similares aos resultados obtidos para as enzimas isoladas de outros tecidos de mamíferos (FOSSET; CHAPPELET-TORDO; LAZDUNSKI, 1974; OHKUBO; LANGERMAN; KAPLAN, 1974; HIWADA; WACHSMUTH, 1974; CYBORON; WUTHIER, 1981; HSU et al., 1985; PIZAURO et al., 1987; CIANCAGLINI et al., 1990; SAY et al., 1991). Entretanto, para a enzima extraída

de cartilagem ou osso resultados contraditórios têm sido publicados. Nesse caso, os valores encontrados variam de 18 a 360 kDa (ARSENIS; RUDOLPH; HACKETT, 1975; CYBORON; WUTHIER, 1981; HSU et al., 1985; PIZAURO et al., 1987; HAWRYLAK; STINSON, 1987; CIANCAGLINI et al., 1990; SAY et al., 1991). Várias possibilidades têm sido relatadas para explicar essa variação encontrada no peso molecular da enzima. Alguns autores admitem que essas diferenças sejam devidas às diferentes espécies, tecidos e/ou aos diferentes métodos empregados na preparação e purificação da enzima inclusive a fatores ainda desconhecidos (HSU et al., 1985). Cyboron e Wuthier (1981) admitem que as diferenças encontradas nos pesos moleculares das fosfatases alcalinas são devidas à presença de proteases inespecíficas, nas preparações de colagenase bruta, empregada na obtenção da enzima, e que poderiam acarretar degradações na molécula da fosfatase alcalina. Finalmente Hiwada e Wachsmuth (1974) e McKenna, Hamilton e Sussman (1979) sustentam que essas diferenças são devidas à existência de isoenzimas.

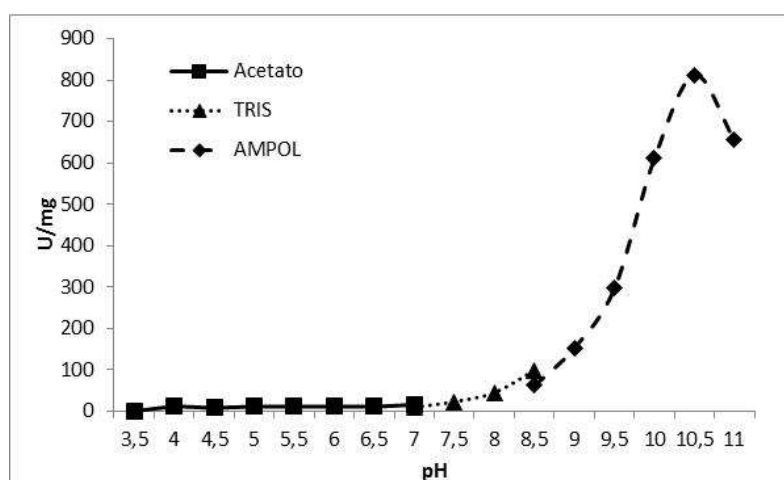
Na determinação do pH ótimo aparente das enzimas estudadas, para as fosfatases presentes no sobrenadante da ultracentrifugação (Figura 8) foram obtidos valores mais elevados nos pH 6,0 e 10,5. A presença de uma forma solúvel no processo de ossificação já foi relatada por Curti e colaboradores (1987) e caracterizada estrutural e cineticamente por Say e colaboradores (1991). A fosfatase alcalina que participa do processo de ossificação endocondral é uma ectoenzima que se encontra associada à membrana pela âncora do fosfatidil inositol a qual poderia ser liberada durante o processo de obtenção pela ação da fosfolipase C (PIPLC) específica (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995). Entretanto ainda não está perfeitamente estabelecido se ela se origina da membrana ou se existe uma fosfatase alcalina solúvel que participa do processo de ossificação.

**Figura 8:** Efeito do pH sobre a atividade das fosfatases presente no sobrenadante da ultracentrifugação, expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato.



Conforme pode ser observado na figura 9, o sobrenadante obtido após o tratamento com PiPlc é rico em atividade de fosfatase alcalina com pH ótimo aparente 10,5.

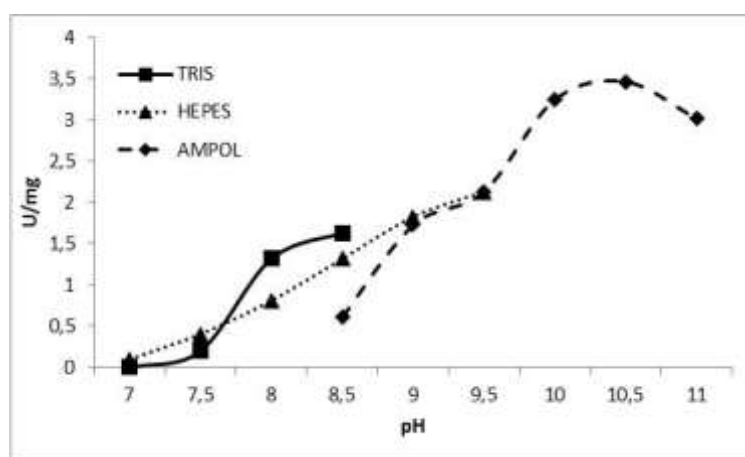
**Figura 9:** Efeito do pH sobre a atividade das fosfatases presente no sobrenadante obtido após o tratamento com PiPlc, expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato.



Semelhantemente ao observado nas figuras 8 e 9 a PC-1 (Figura 10) também apresentam pH ótimo aparente em pH 10,5. É importante salientar que dentre todas as enzimas estudadas, a PC-1, é a mais influenciada pela espécie iônica do tampão.

Comportamento semelhante foi observado por Pizauro e colaboradores (1998) para a fosfatase alcalina do tecido ósseo de rato. Esse comportamento sugere que a composição do fluido intersticial exerce papel importante na atividade das enzimas envolvidas no processo de ossificação.

**Figura 10:** Efeito do pH sobre a atividade da PC-1 presente no precipitado obtido após o tratamento com PiPlc, expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato.



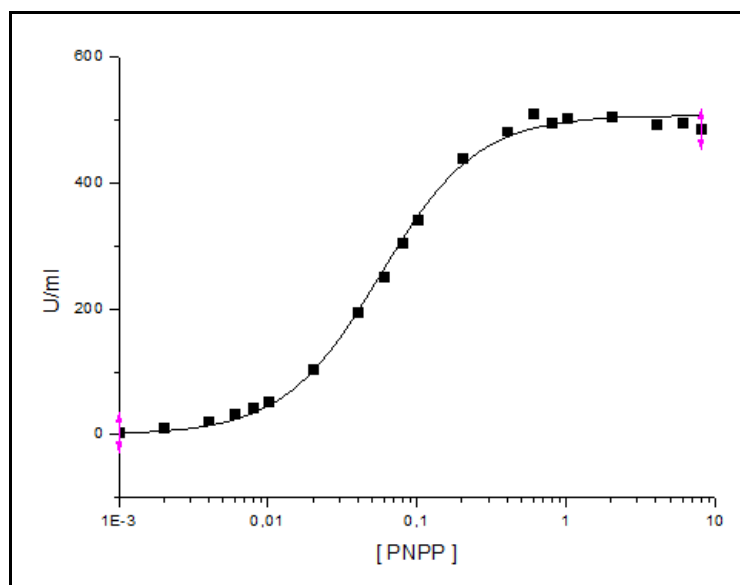
Observou-se que atividade PNFFásica da fosfatase alcalina de aves normais, apresentou velocidade máxima de 507,46 U/ml e o valor de Km 56,49  $\mu$ M (Tabela 3). A relação V/Km, foi da ordem de 9,06, em relação ao coeficiente de Hill, os resultados indicam que a enzima ligada à membrana apresenta características "Michaelianas" para as interações em relação ao PNFF.

A fosfatase alcalina ligada à membrana das vesículas apresenta uma alta especificidade pelo PNFF. A velocidade máxima é semelhante às obtidas para a fosfatase alcalina ligada a membrana das vesículas extracelulares que surgem associadas ao processo de calcificação ectópica (CIANCAGLINI et al., 2006), da fosfatase alcalina obtida de cultura de osso alveolar (SIMÃO et al., 2007), e da cartilagem epifisária (CYBORON; WUTHIER, 1981; HSU et al., 1985) e de fosfatases alcalinas purificadas de vários tecidos de mamíferos (FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979).

O comportamento "Michaeliano" observado para as interações da enzima com o PNFF (Figura 11) é similar ao observado para a fosfatase alcalina ligada a membrana das vesículas extracelulares que surgem associadas ao processo de calcificação ectópica (CIANCAGLINI et al., 2006), da fosfatase alcalina obtida de cultura de osso

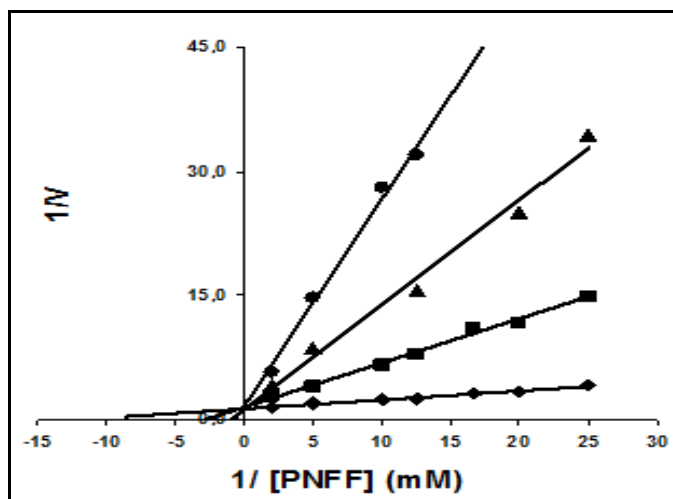
alveolar (SIMÃO et al., 2007), para a fosfatase alcalina purificada de placa óssea (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995) e para a fosfatase alcalina de condrócitos (FORTUNA et al., 1979).

**Figura 11.** Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de epífise de aves normais.



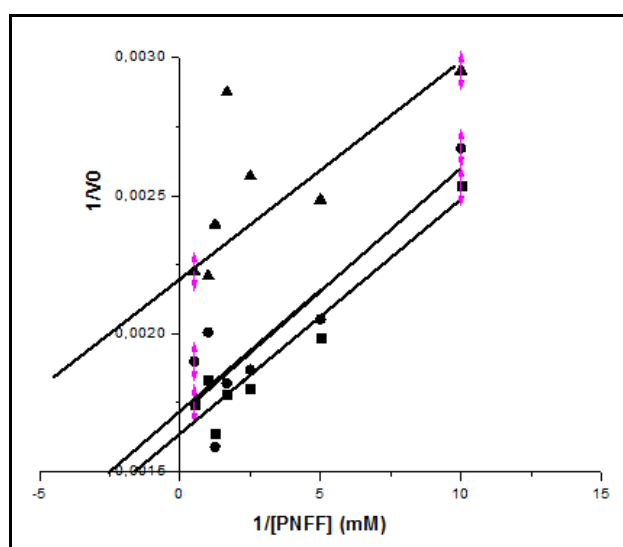
O estudo do efeito da variação da concentração de fosfato, mostrou que o mesmo atua como inibidor competitivo (Figura 12) do PNFF, similar ao resultado obtido para a enzima solubilizada com Triton X-100 (PIZAURO et al., 1987) e para a enzima extraída de cartilagem epifisária de pintainho (CYBORON; WUTHIER, 1981). A mudança do tipo de inibição relatada por Curti e colaboradores (1987) para a enzima associada à membrana sugere que, pelo menos para o fosfato, o microambiente da membrana parece exercer algum tipo de influência nas propriedades cinéticas da enzima.

**Figura 12.** Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo fosfato (Concentrações: (♦) Zero; (■) 1mM; (▲) 2mM; (●) 4mM).



O estudo da ação do levamisol sobre a atividade de PNFFase da fosfatase alcalina solubilizada (Figura 13) revelou que o tipo de inibição incompetitiva é coincidente com o obtido para a enzima associada à membrana (CURTI et al., 1987) e para a enzima obtida de condrócitos (FORTUNA et al., 1979). O fato do levamisol atuar como um inibidor incompetitivo da enzima sugere a formação de um complexo ternário enzima-Pi-levamisol, que não depende do pH (CYBORON; VEJINS; WUTHIER, 1982; CURTI et al., 1987).

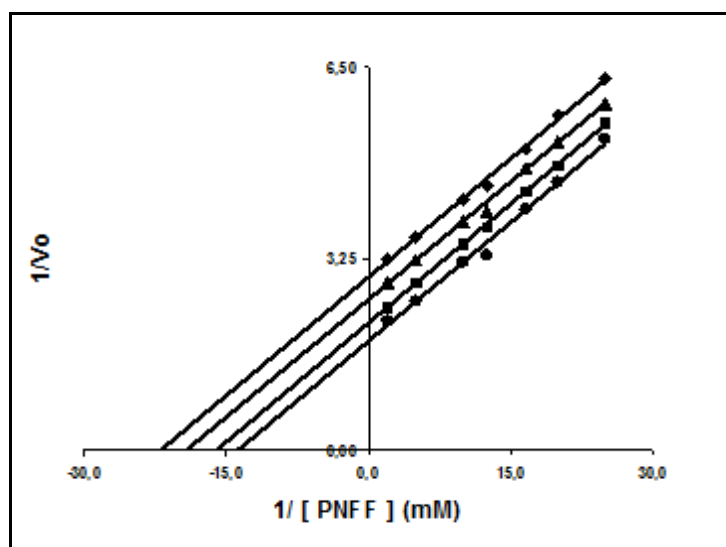
**Figura 13.** Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo levamisol (Concentrações: (■) Zero; (●) 0,001mM; (▲) 0,01mM).



No caso da teofilina, um análogo estrutural de nucleotídeos, a inibição incompetitiva observada (Figura 14), coincide com os resultados obtidos para a fosfatase alcalina de placas ósseas ligada à membrana (CURTI et al., 1987) e de esqueleto humano (FARLEY; IVEY; BAYLINK, 1980).

Farley, Ivey e Baylink (1980), admitem que durante a reação com o PNFF, a enzima expõe um sítio de ligação que pode ser ocupado pela teofilina (ou por nucleotídeos cíclicos) e que esse sítio somente é revelado após a ligação do PNFF e a subsequente liberação do *p*-nitrofenol. De acordo com esses autores, o aparecimento deste sítio na molécula da enzima após a formação do intermediário fosforilado poderia explicar a sua possível ação como uma fosfotransferase e/ou como uma proteína transportadora de fosfato in vivo.

**Figura 14.** Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pela teofilina (Concentrações: (●) Zero; (■) 0,06mM; (▲) 0,1mM; (◆) 0,16mM).

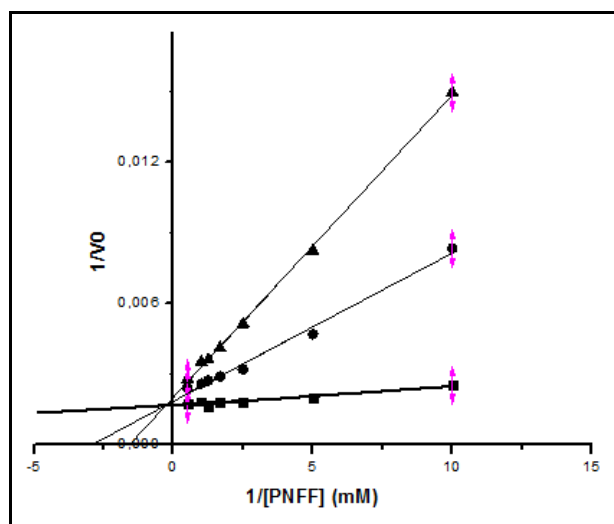


Semelhantemente ao observado para a enzima de placas ósseas ligada à membrana (CURTI et al., 1987) e para a enzima extraída de cartilagem epifisária (CYBORON; VEJINS; WUTHIER, 1982) o metavanadato de sódio é o mais efetivo inibidor da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C, atuando como inibidor competitivo (Figura 15).

Segundo Seargeant e Stinson (1979) e Curti e colaboradores (1987) a inibição pelo metavanadato é sensivelmente mais efetiva para enzimas cujo mecanismo de

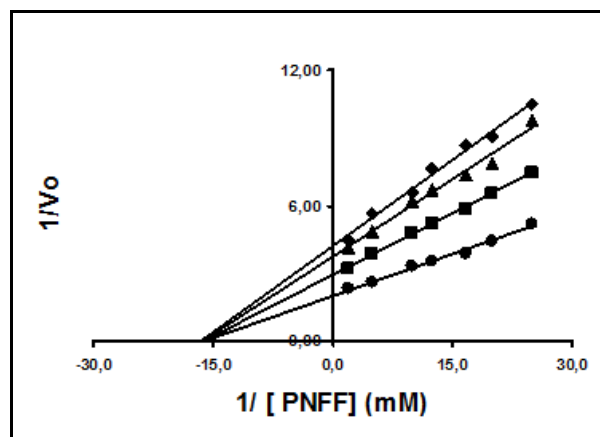
reação é compatível com a formação de um intermediário covalente fosforilado e estável, quando comparada com reações onde o produto é liberado sem que ocorra a formação desse intermediário.

**Figura 15.** Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo vanadato (Concentrações: (■) Zero; (●) 0,01mM; (▲) 0,02mM).



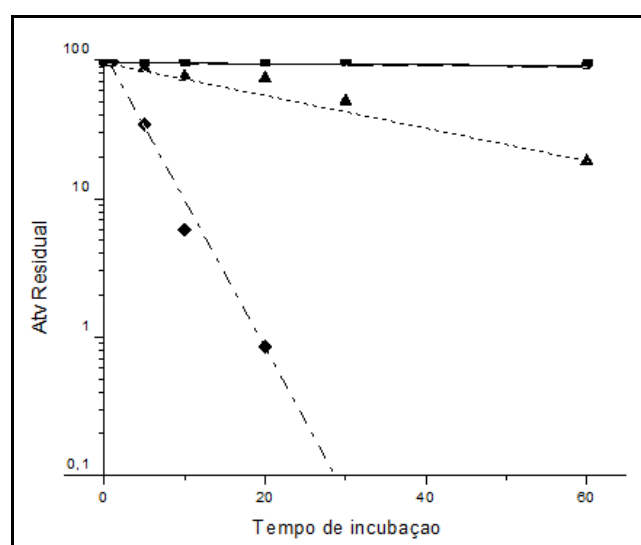
Os íons zinco são considerados como um componente integral da maioria das fosfatases alcalinas e essencial para a catálise. Entretanto, em excesso apresentam efeitos inibitórios (BRUNEL; CATHALA, 1973; CATHALA et al., 1975a; PETITCLERC; FECTEAU, 1977; FORTUNA et al., 1979; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; CIANCAGLINI et al., 1990a, CIANCAGLINI; PIZAURO; LEONE, 1992; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1992). De fato, conforme pode ser observado na Figura 16 em excesso os íons zinco também atuam como inibidor não competitivo da enzima. Os resultados apresentados são coerentes com os obtidos para a fosfatase alcalina de placas ósseas ligada à membrana ou solubilizada com polidocanol (CIANCAGLINI; PIZAURO; LEONE, 1992; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1992). Fosfatases alcalinas obtidas de diferentes tecidos de mamíferos também apresentam um comportamento similar (BRUNEL; CATHALA, 1973; CATHALA et al., 1975a; PETITCLERC; FECTEAU, 1977; EY; FERBER, 1977; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; FORTUNA et al., 1979; JAHAN; BUTTERWORTH, 1986). A inibição da enzima nativa pelos íons zinco tem sido atribuída ao deslocamento do magnésio do seu sítio, pelos íons zinco (CATHALA et al., 1975a; CIANCAGLINI et al., 1990a, CIANCAGLINI; PIZAURO; LEONE, 1992; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1992).

**Figura 16.** Inibição da atividade PNFFásica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de aves normais pelo cloreto de zinco (Concentrações: (●) Zero; (■) 0,004mM; (▲) 0,006mM; (◆) 0,008mM)



O estudo da inativação térmica revelou que a fosfatase alcalina (Figura 17) é resistente à altas temperaturas, haja visto que mantém sua atividade praticamente inalterada mesmo incubada a 50°C, e atingindo  $T_{0,5}$  somente após 30 minutos de incubação a 55°C, sugerindo que a temperatura afeta ligações que estabilizam a configuração nativa das enzimas estudadas.

**Figura 17:** Efeito da inativação térmica na atividade de hidrólise do PNFF pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de animais normais.



A DT é atribuída a assincronia do processo de ossificação endocondral, levando ao acúmulo de cartilagem não calcificada e avascularizada no local onde o osso trabecular deveria ter sido formado.

As aves foram classificadas em dois grupos em relação ao grau de discondroplasia tibial, normais e portadoras de lesão grave, pela utilização do aparelho portátil de raios-X denominado de Lixiscope. Após o abate, em nosso laboratório procedemos com o diagnóstico visual, tendo encontrado que as lesões estavam presentes apenas na tíbia. Assim podemos considerar que independentemente das aves apresentarem ou não DT o fêmur apresentava-se com desenvolvimento normal.

A eficácia do método de utilização do lixiscopes para diagnóstico de pequenas lesões é discutível e pode ocasionar dúvidas com relação à sua presença. Thorp e colaboradores (1997) e Ribeiro e colaboradores (2004), consideraram o lixiscopes como sendo eficaz para a detecção de lesões grandes, mas falho para o diagnóstico de lesões menores. Segundo estes autores, 47% das aves estudadas que apresentavam lesão, não foram diagnosticadas pelo aparelho. No entanto, Bartels, McDaniels e Hoerr (1989) obtiveram 100% de sucesso no diagnóstico de DT em aves com 6 a 8 semanas de idade.

Assim, após o sacrifício das aves, foi realizado diagnóstico visual e classificação de acordo com os seguintes padrões:

- Score 1: ausência de lesão;
- Score 2: lesão ocupando até 25% da área epifisária, sem profundidade;
- Score 3: lesão ocupando de 25 a 50% da área epifisária e com certa profundidade;
- Score 4: lesão ocupando área superior a 50%, e estendendo-se de tal forma que a lesão prolonga-se até cerca de 35 mm em direção à metáfise.

Nie e colaboradores (1995) demonstraram que as vesículas extracelulares isoladas de aves com discondroplasia tibial são praticamente inativas e não conseguem iniciar o processo de calcificação biológica. Segundo esses autores, neste processo existe um defeito na vascularização do tecido, onde o fornecimento de minerais e nutrientes necessários para a cartilagem é inadequado para suportar a formação de vesículas extracelulares normais, necessárias para iniciar o processo calcificação biológica. Além disso, Wu et al., 2005 admitem que os condrócitos isolados do interior da lesão não são viáveis para realizar o processo de ossificação endocondral in vivo. Esses autores demonstraram ainda que, semelhantemente ao observado para condrócitos obtidos de tecidos normais, em condições ideais, tais células possuem todos os efetores necessários para ser cultivadas, recuperar a habilidade diferenciar, de

expressar biomoléculas, tais como colágeno, osteopontina e altos níveis de fosfatase alcalina e realizarem calcificação *in vitro*, nesse sentido, as vesículas extracelulares foram extraídas de animais normais e portadores de discondroplasia tibial (lesão grave) e analisada quanto a atividade das principais enzimas envolvidas no processo de ossificação.

A comparação das atividades das enzimas envolvidas na ossificação em frangos de corte normais e daqueles acometidos de discondroplasia tibial mostra que a atividade da PC-1 praticamente não sofreu alteração. Já as atividades de fosfomonohidrolase, das fosfatases alcalina, ácida e ácida tartarato resistente, bem como a concentração de proteínas (Tabela 4) estão diminuídas nas aves portadoras da lesão.

**Tabela 4:** Atividade das enzimas PC-1, Fosfatase Alcalina, Fosfatase Ácida e Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato) e Concentração de Proteínas (expressa em mg de proteína por ml de extrato bruto), de frangos de corte normais e portadores de discondroplasia tibial, e Variação entre as atividades dos animais normais e doentes (Atv DT/ Atv Normal, expressas em porcentagem de variação).

	PC-1	Fosfatase Alcalina	Fosfatase Ácida	Fosf. Ác. T. R.	Conc. Proteína
Normal	2,98	513,09	6,75	6,79	1,78
Discondroplasia	2,92	465,83	5,64	5,68	1,68
Variação	-1,93%	-9,21%	-16,39%	-16,27%	-5%

A diminuição na quantidade de proteína total na placa de crescimento portador de DT (Tabela 4) pode ser atribuída a síntese proteica deficiente devido à destruição de condrócitos. Esta interpretação é suportada pelo fato de que segundo Hargest, Gay e Leach (1985) nas lesões de DT existem áreas de necrose que poderiam acarretar falta de oxigênio devido à inadequada suplementação vascular. Além disso, estudos patológicos e bioquímicos mostram que na DT os condrócitos do disco de crescimento não atingem o tamanho esperado, a zona hipertrófica necrosa prematuramente e a quantidade de proteína extracelular, tais como colágeno do tipo X e fator beta de crescimento de fibroblastos, necessários para a maturação da cartilagem, diminuem (ORTH; COOK, 1994).

Os estudos referentes à participação da fosfatase alcalina e da PC-1 no processo de calcificação mediada pelas VME mostram que elas possuem papel antagônico (FOSTER et al., 2012). A PC-1 é a enzima responsável por produzir e enriquecer as vesículas com PPi, substrato da fosfatase alcalina, mas também um potente inibidor da calcificação. Durante o processo de calcificação o nível de PPi no fluido intersticial é regulado pela atividade da PC-1 e ação da fosfatase alcalina que possui a habilidade de hidrolisá-lo liberando fosfato inorgânico para participar do processo de calcificação mediado pelas vesículas extracelulares (NARISAWA; YADAV; MILLAN, 2013).

Os valores de atividade da PC-1 quase não sofreram alterações (Tabela 4), quando comparadas entre as de tíbias extraídas de animais sadios e doentes. Estes resultados indicam que não ocorreria elevação dos níveis de PPi, o que poderia atuar como inibidor da enzima fosfatase alcalina (FOSTER et al., 2012; MILLAN, 2012). Além disso, a falta de dados na literatura relacionando o possível papel da atividade da PC-1 na discondroplasia tibial não permite uma discussão mais aprofundada dos resultados obtidos para a referida enzima.

A fosfatase alcalina é outro marcador bioquímico presente nas vesículas extracelulares. A sua participação no processo de calcificação foi proposta por Robinson (1923) e confirmada com a descoberta de que a doença genética rara denominada hipofosfatasia é caracterizada por uma diminuição no processo de calcificação biológica (WHYTE, 1994; 1996; KIFFER-MOREIRA et al., 2014). A severidade da hipofosfatasia é variável e depende do local e do aminoácido mutado (FUKUSHI et al., 1998; DI MAURO et al., 2002).

Tem sido demonstrado ainda que tais mutações acarretam modificações nas propriedades cinéticas, afinidade pelo substrato ou velocidade máxima, estabilidade térmica da fosfatase alcalina (DI MAURO et al., 2002). Foi observada a diminuição de 9% da atividade desta enzima nos animais portadores da lesão (Tabela 4), o que, se confirmado estatisticamente, pode estar ocorrendo devido por alguma modificação da enzima, diminuindo sua velocidade máxima. Segundo Wu e colaboradores (2005) os condrócitos localizados no interior da lesão não são viáveis para realizar o processo de ossificação endocondral, embora em condições ideais e *in vitro* possuem a habilidade de expressar seus fenótipos normalmente.

Além disso, a atividade da fosfatase alcalina (Tabela 4) é similar à descrita para a fosfatases ligadas VME que surgem associadas ao processo de calcificação ectópica (CIANCAGLINI et al., 2006), da obtida de cultura de osso alveolar (SIMÃO et al., 2007)

e de fosfatases alcalinas purificadas de vários tecidos de mamíferos (FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979), de cartilagem epifisária de pintinho (CYBORON; WUTHIER, 1981) e da cartilagem de feto bovino (HSU; ANDERSON, 1995). Por outro lado Wu e colaboradores (2005) relataram que cultura de células de condrócitos extraídas da lesão de aves com DT apresentam valores de atividade de fosfatase alcalina muito menor, cerca de 1/8 do valor encontrado para a fosfatase alcalina obtida de aves normais. Esses autores verificaram ainda que os condrócitos extraídos da lesão crescem e expressam seus fenótipos semelhantemente ao que ocorre com os condrócitos obtidos de animais normais, sugerindo que as condições locais do disco de crescimento podem ser a principal causa do desenvolvimento da discondroplasia tibial.

Já está estabelecido que informações importantes acerca da atividade metabólica do tecido ósseo podem ser obtidas por meio da determinação de marcadores específicos dessas células no sangue. Nesse sentido a fosfatase ácida tartarato resistente tem sido extensivamente usada como um marcador específico de osteoclastos, células que participam do processo de reabsorção e de remodelação do tecido ósseo (PAGANI; FRANCUCCI; MORO, 2005; KIRSTEIN; CHAMBERS; FULLER, 2006; JILKA; NOBLE; WEINSTEIN, 2013).

Durante o crescimento ósseo, a principal função dos osteoclastos é a de reabsorver o osso mineralizado, a dentina e a cartilagem calcificada. A reabsorção de tecidos mineralizados é uma etapa obrigatória para a maturação normal do esqueleto, crescimento e modelação óssea, bem como na erupção dos dentes (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; BOTELHO et al., 2006; FOSTER et al., 2012). A atividade da fosfatase ácida e da ácida tartarato resistente foram 16% menor no disco de crescimento de aves portadoras de DT (Tabela 4).

Resultados semelhantes foram obtidos por Rath e colaboradores (2005; 2007) com a fosfatase ácida tartarato resistente obtida do disco de crescimento de aves portadoras de DT induzida por thiram. Segundo estes autores a diminuição na atividade da fosfatase ácida tartarato resistente pode acarretar uma diminuição na reabsorção óssea e aumento do disco de crescimento levando ao acúmulo de cartilagem avascular e não calcificada, devido ao fornecimento inadequado de nutrientes. Esses resultados também suportam a suposição de que fatores e ou condições locais do disco de crescimento podem ser uma das causas do desenvolvimento da DT atuando na diferenciação, sobrevivência, fusão, ativação e expressão de marcadores bioquímicos dos osteoclastos e/ou condrócitos.

Também foram realizadas a comparação entre a atividades de PPIase e ATPase presentes no precipitado da primeira ultracentrifugação (Tabela 5).

**Tabela 5:** Atividade de PPIase, e ATPase (expressas em nmol de produto liberado por minuto de reação por miligrama de proteína presente no extrato e Concentração de Proteínas) de frangos de corte normais e portadores de discondroplasia tibial, e Variação entre as atividades dos animais normais e doentes (Atv DT/ Atv Normal).

	Pirofosfatase	ATPase
Normal	12,55	183,33
Discondroplasia	18,29	146,04
Variação	+46%	-21%

Ainda não está perfeitamente estabelecido se o aumento na atividade de PPIase pode ser devido a ação concomitante da fosfatase alcalina e de uma PPIase específica presente na membrana dos condrócitos e/ou na VME. Esta admissão poderia ser esclarecida utilizando a metodologia proposta por Pizauro e colaboradores (1998) para caracterizar a atividade de ATPase de membrana na ausência de fosfatase. Nesse método a fosfatase alcalina ligada a membrana foi removida utilizando-se PiPlc e de um inibidor da atividade residual da fosfatase que ainda permanece associada a membrana após o tratamento. Nessas condições teríamos apenas o comportamento da atividade da pirofosfatase. Esta suposição é baseada no fato de que a fosfatase alcalina não é a única enzima presente na membrana das VMC (PIZAURO; CIANCAGLINI, LEONE, 1995; MILLAN, 2012) que participam do processo de calcificação biológica.

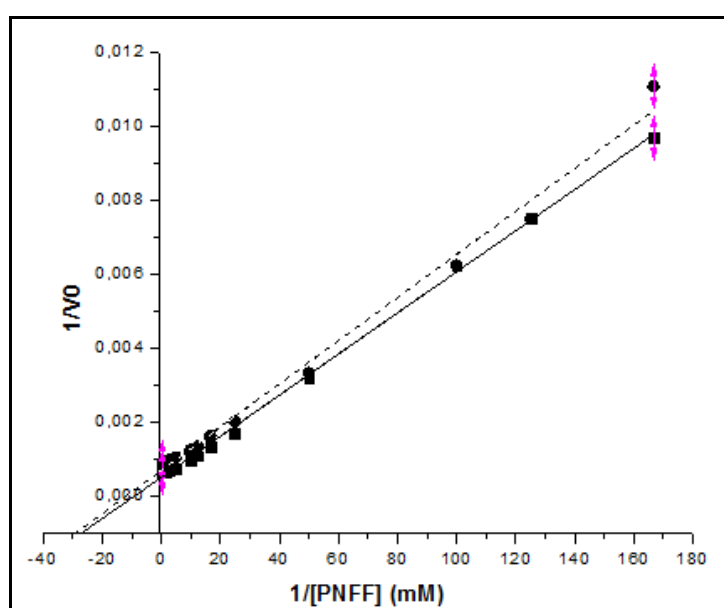
Foi investigado ainda se a fosfatase alcalina apresentava algumas de suas propriedades cinéticas alteradas, o que poderia ser responsável pela indução da discondroplasia tibial. Os parâmetros cinéticos obtidos no estudo do efeito da concentração do substrato PNFF sobre a atividade da fosfatase alcalina ligada à membrana das vesículas extraídas de aves normais e portadoras de lesão de DT são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Comparação dos parâmetros cinéticos da hidrólise do PNFF pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de animais normais e acometidos por discondroplasia tibial

	V (U/ml)	n	Km ( $\mu$ M)	V/Km
Normal	507,46	1,3	56,59	9,06
DT	359,78	1,2	49,49	7,20

Foi encontrada diferença entre os valores de  $V_m$ , o mesmo não foi observado para  $K_m$  e o coeficiente de Hill ( $n_H$ ) obtidos para a hidrólise do PNFF fosfatase alcalina ligada a membrana de VME (Figura 18), sugerindo que a discondroplasia tibial pode ser atribuída à expressão da fosfatase alcalina com alguma modificação estrutural, que gera uma velocidade máxima menor no animal doente.

**Figura 18:** Representação do duplo inverso dos parâmetros cinéticos da hidrólise do PNFF pela fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de animais normais e acometidas por discondroplasia tibial.



Esses resultados similares aqueles obtidos por Di Mauro e colaboradores (2002) que demonstraram que na hipofosfatase humana a fosfatase alcalina apresenta propriedades cinéticas significativamente diferentes ( $V$  e/ou  $K_{0,5}$ ) da enzima obtida de indivíduos normais.

Outro estudo comparativo realizado foi o efeito de inibidores sobre a atividade p-nitrofenilfosfatásica da fosfatase alcalina obtida de aves normais e DT (Tabela 7). Os resultados foram obtidos por meio da representação gráfica da constante de dissociação aparente ( $K_i$ ) do complexo enzima-inibidor.

**Tabela 7:** Comparação entre os tipos e constantes de inibição obtidos para diferentes inibidores da fosfatase alcalina de aves normais e portadoras de lesão.

Inibidor	Tipo de inibição	Ki Normal	Ki Discondroplasia
Fosfato	Competitiva	1,44 mM	1,23mM
Levamisol	Incompetitiva	25,9 $\mu$ M	21,5 $\mu$ M
Teofilina	Incompetitiva	81,9 $\mu$ M	93,7 $\mu$ M
Vanadato	Competitiva	2,3 $\mu$ M	3,1 $\mu$ M
Zinco	Não competitiva	5,6 $\mu$ M	6,4 $\mu$ M

No caso do fosfato, a inibição competitiva observada bem como os valores de Ki (1,44 e 1,23 mM) obtidos para a enzima extraída de aves normais e DT (Tabela 7) coincidem com resultados obtidos para a enzima de extraída de placas ósseas (PIZAURO et al., 1987) e para a enzima extraída de cartilagem epifisária de pintainho (CYBORON; WUTHIER, 1981).

O estudo da ação do levamisol sobre a atividade de PNFFase da fosfatase alcalina obtida de ambos os tratamentos (Tabela 7) revelou que os valores de Ki (21,5 e 25,9  $\mu$ M) e o tipo de inibição são coincidentes com os obtidos para a enzima associada à membrana (CURTI et al., 1987) e para a enzima obtida de condrócitos (FORTUNA et al., 1979). Entretanto, o valor da constante de dissociação enzima-inibidor é cerca de 60 vezes menor que o obtido para a fosfatase alcalina extraída da cartilagem epifisária (CYBORON; VEJINS; WUTHIER, 1982).

No caso da teofilina, os valores de Ki, coincidem com os resultados obtidos para a fosfatase alcalina de placas óssea ligada à membrana (CURTI et al., 1987) e de esqueleto humano (FARLEY; IVEY; BAYLINK, 1980). Entretanto, este valor é cerca de seis vezes menor que o observado para a fosfatase alcalina de condrócitos (CYBORON; VEJINS; WUTHIER, 1982).

Os baixos valores de Ki (2,3 e 3,1  $\mu$ M) observados em relação ao vanadato sugerem que a hidrólise do PNFF pela fosfatase alcalina de ambas as origens inclui a formação de um intermediário covalente entre a enzima e o fosfato, semelhante ao observado para a fosfatase alcalina obtida de diferentes origens (FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979).

Semelhantemente ao observado para a enzima de placas ósseas (CURTI et al., 1987) e para a enzima extraída de cartilagem epifisária de pintinho (CYBORON; VEJINS; WUTHIER, 1982) o metavanadato de sódio é o mais efetivo inibidor da fosfatase alcalina de aves normais e portadoras de lesão (Tabela 7).

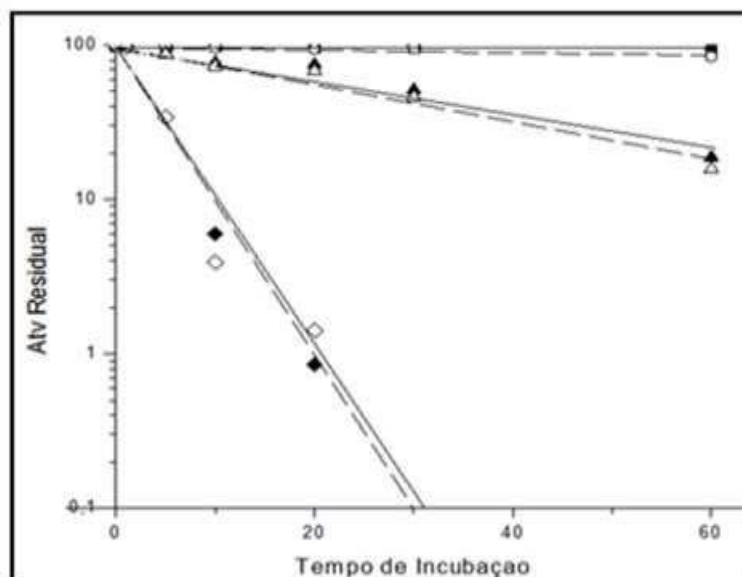
Observa-se que o cloreto de zinco atua como um inibidor não competitivo da enzima obtida de aves normais (Tabela 7) e, o valor da constante de dissociação aparente do complexo enzima-inibidor é da ordem de 6,4  $\mu\text{M}$ . Esses resultados são semelhantes aos obtidos em relação à inibição atividade PNFFase da enzima obtida de aves portadoras de lesão, cujo  $K_i$  é da ordem de 5,6  $\mu\text{M}$ .

Em relação aos íons metálicos, tem sido demonstrado que o zinco é essencial para o crescimento normal, reprodução e período de vida dos animais, tendo um efeito benéfico nos processos de reparo tissular e cicatrização. O zinco é um componente essencial de inúmeras enzimas presentes nos tecidos animais, incluindo a álcool-desidrogenase, fosfatase alcalina, anidrase carbônica, procarboxipeptidase e superóxido-dismutase do citossol (FERNLEY, 1971; McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; HARPER; RODWELL; MAYES, 1982; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1992; PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1995).

Esses resultados são coerentes com os obtidos por Di Mauro e colaboradores (2002) que demonstraram que a fosfatase alcalina obtida de indivíduos normais e portadores de hipofosfatase humana apresenta o mesmo tipo de inibição e valores de  $K_i$  similares, embora suas propriedades cinéticas de hidrólise de substratos sejam significativamente diferentes.

Foi realizado estudo do tempo de incubação em diferentes temperaturas sobre a atividade, a fim de comparar a inativação térmica da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C de animais Normais e DT, os resultados são apresentados na Tabela 8.

**Figura 19.** Atividades residuais da fosfatase alcalina de aves normais (N) e portadoras de discondroplasia tibial (DT) encubadas em diferentes temperaturas por diferentes tempos



Os resultados obtidos deste estudo da fosfatase alcalina solubilizada por fosfolipase C revelaram, que acima de 55°C a enzima é inativada rapidamente, as retas de inativação térmica seguem uma cinética de primeira ordem, apresentando perfis parecidos para os animais normais e DT.

Os resultados obtidos mostram que a enzima obtida de aves normais e de aves portadoras de lesão apresentam quase todas as mesmas propriedades cinéticas, diferindo na velocidade máxima, sugerindo que a discondroplasia tibial pode ser atribuída a alguma mutação da fosfatase alcalina, mas não pode-se descartar mecanismos e/ou defeitos mais complexos. De fato, Wu et al., 2005 têm proposto que as condições locais do disco de crescimento podem ser uma das causas do desenvolvimento da discondroplasia tibial.

Assim mais estudos, se fazem necessários para a completa determinação das causas do surgimento da lesão, dentre eles, os relacionados ao sequenciamento dos genes e/ou dos aminoácidos da fosfatase alcalina em aves normais e doentes.

## 6. CONCLUSÕES

Os valores de atividade da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) mostram que não houve diferença significativa entre os tratamentos sugerindo que o desenvolvimento da discondroplasia tibial não pode ser atribuído a um aumento na síntese do pirofosfato pela enzima PC-1.

O estudo de caracterização cinética da fosfatase alcalina obtida de aves normais e acometida de lesão mostrou que houve uma variação no  $V_m$  da enzima para a hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato da enzima obtida de ambas as origens, o que pode ser gerado por alguma mutação na estrutura da enzima e ser um dos responsáveis pelo desenvolvimento da patologia.

A diminuição na atividade da fosfatase ácida tartarato resistente pode acarretar uma diminuição na reabsorção e aumento do disco de crescimento levando a um acúmulo de uma cartilagem avascular.

Ainda não se pode descartar a teoria que o microambiente, ou seja, as condições locais ou ainda algum fator localizado no interior do disco de crescimento, pode ser outra das causas do desenvolvimento da discondroplasia tibial.

## Referências

ADDISON, W. N.; AZARI, F.; SORENSEN, E. S.; KAARTINEN, M.T.; McKEE, M. D. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, upregulating osteopontin and inhibiting alkaline phosphatase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 82, n. 21, p. 15872-15883, 2007.

ALI, S. Y. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. **Fed. Proc.**, v. 35, p. 135-142, 1976.

ANDERSON, H. C. Calcium-accumulating vesicles in the intercellular matrix of bone. In: **Hard tissue growth repair and remineralization**. Amsterdam: Elsevier, 1973. p. 213-226. (Ciba foundation symposium, 11).

ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. **Clin. Orthopaed. Rel. Res.**, v. 314, p. 266-280, 1995.

ANDERSON, H. C.; GARIMELLA, R.; SARAH E. The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. **Front. Biosc.**, v. 10, p. 822-837, 2005

ANDERSON, H. C.; HSU, H. H.; MORRIS, D. C.; FEDDE, K. N.; WHYTE, M. P. Matrix vesicles in osteomalacic hypophosphatasia bone contain apatite-like mineral crystals. **Am. J. Pathol.**, v. 151, p. 1555-1561, 1997.

AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Quim. Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900. 2003.

ARSENIS, C.; RUDOLPH, J.; HACKETT, M. H. Resolution, purification and characterization of the orthophosphate releasing activities from fracture callus calcifying cartilage. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 391, p. 301-315, 1975.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **História da avicultura no Brasil**. Disponível em: <[http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/historia\\_da\\_avicultura\\_no\\_brasil](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil)>. Acesso em: 02 fevereiro 2014.

BARTELS, J. E.; McDANIELS, G. R.; HOERR, F. J. Radiographic diagnosis of tibial dyschondroplasia in broilers: a field selection technique. **Avian Dis.**, v. 33, p. 254-257, 1989.

BECK, G. R.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 97, n. 15, p. 8352-8357, 2000.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2011.

BOTELHO, C. M.; BROOKS, R. A.; SPENCE, G.; McFARLANE, I.; LOPES, M. A.; BEST, S. M.; SANTOS, J. D.; RUSHTON, N.; BONFIELD, W. Differentiation of mononuclear precursors into osteoclasts on the surface of Si-substituted hydroxyapatite. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 78, n. 4, p. 709-720, 2006.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aves**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>> Acesso em: 05 abr. 2014a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Mercado interno**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno>> Acesso em: 19 fev. 2014b.

BRUNEL, C.; CATHALA, G. Activation and inhibition processes of alkaline phosphatase from bovine brain by metal ions ( $Mg^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ ). **Biochim. Biophys. Acta**, v. 309, p. 104-115, 1973.

CATHALA, G.; BRUNEL, C.; CHAPPELET-TORDO, D.; LAZDUNSKI, M. Bovine Kidney alkaline phosphatase: purification, subunit structure and metalloenzyme properties. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6040-6045, 1975a.

CATHALA, G.; BRUNEL, C.; CHAPPELET-TORDO, D.; LAZDUNSKI, M. Bovine kidney alkaline phosphatase: catalytic properties, subunit interactions in the catalytic process, and mechanism of  $Mg^{2+}$  stimulation. **J. Biol. Chem.**, v. 250, p. 6046-6053. 1975b.

CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; LEONE, F. A. Polyoxyethylene-9-lauril ether-solubilized alkaline phosphatase: synergistic stimulation by zinc and magnesium ions. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 923-928, 1992.

CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; REZENDE, A. A.; REZENDE, L. A.; LEONE, F. A. Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9-lauril ether (polidocanol): purification and metalloenzyme properties. **Int. J. Biochem.**, v. 22, p. 385-392, 1990a.

CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; TEDESCO, A. C.; LEONE, F. A. Effect of moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix-induced alkaline phosphatase by zinc ions. **Int. J. Biochem.**, v. 22, p. 747-751, 1990b.

CIANCAGLINI, P.; SIMÃO, A. M. S.; CAMOLEZI, F. L.; MILLAN, J. L.; PIZAURO, J. M. Contribution of matrix vesicles and alkaline phosphatase to ectopic bone formation. **Braz. J. Med. Bio. Res.**, v. 39, p. 603-610, 2006.

CLARKE, P. G. Nineteenth century research on the naturally occurring cell death and related phenomena. **Anat. Embryol.**, v. 193, p. 81-89, 1996.

CURTI, C.; PIZAURO, J. M.; ROSSINHOLI, G.; VUGMAN, I.; OLIVEIRA, J. A. M. de; LEONE, F. A. Isolation and Kinetic properties of an alkaline phosphatase from rat bone matrix-induced cartilage. **Cell. Molec. Biol.**, v. 32, p. 55-62, 1986.

CURTI, C.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix-induced alkaline phosphatase. **Cell. Molec. Biol.**, v. 33, p. 625-635, 1987.

CYBORON, G. W.; WUTHIER, R. E. Purification and initial characterization of intrinsic membrane bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 7262-7268, 1981.

CYBORON, G. W.; VEJINS, M. S.; WUTHIER, R. E. Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effects of its inhibitors at physiological pH. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 4141-4146, 1982.

DI MAURO, S.; MANES, T.; HESSLE, L.; KOZLENKOV, A. PIZAURO, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Kinetic characterization of hypophosphatasia mutations with physiological substrates **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, n. 8, p. 1383-1391, 2002.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D.; KITCHELL, M. L.; QUIROZ, M. A. Metabolic challenges and early bone development. **J. Appl. Poult. Res.**, v. 16, n. 1, p. 126-137, 2007.

EDWARDS, H. M. Jr. Nutrition and skeletal problems in poultry. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 7, p. 1018-1023, 2000.

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

EY, P. L.; FERBER, E. Calf thymus alkaline phosphatase. II. Interaction with detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 480, p. 163-137, 1977.

FARLEY, J. R.; IVEY, J. L.; BAYLINK, D. J. Human skeletal alkaline phosphatase: kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 4680-4686, 1980.

FARQUHARSON, C.; JEFFEREIS, D. Chondrocytes and longitudinal bone growth: the development of tibial dyschondroplasia. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 7, p. 994-1004, 2000.

FERNLEY, H. N. Mammalian alkaline phosphatase. In: BOYER, P. D. (Ed.). **The enzymes**. New York: Academic, 1971. v. 4, p. 417- 477.

FLOYD, W. E. D.; ZALESKE, D. J.; SCHILLER, A. L.; TRAHAN, C.; MANKIN, H. J. Vascular events associated with the appearance of second center of ossification in the murine distal femoral epiphysis. **J. Bone Joint. Surg.**, v. 69, p. 185-190, 1987.

FORTUNA, R.; ANDERSON, H. C.; CAARTY, R.; SAJDERA, S. W. Enzymatic characterization of the chondrocytic alkaline phosphatase isolated from bovine fetal epiphyseal cartilage. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 570, p. 291-302, 1979.

FOSSET, M.; CHAPPELET-TORDO, D.; LAZDUNSKI, M. Intestinal alkaline phosphatase: physical properties and quaternary structure. **Biochemistry**, v. 13, p. 1783-1787, 1974.

FOSTER, B. L.; NAGATOMO, K. J.; NOCITI, F. H. Jr.; FONG, H.; DUNN, D.; TRAN, A. B.; WANG, W.; NARISAWA, S.; MILLAN, J. L.; SOMERMAN, M. J. Central role of pyrophosphate in acellular cementum formation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0038393.g013

FUKUSHI, M.; AMIZUKA, N.; HOSHI, K.; OZAWA, H.; KUMAGAI, H.; OMURA, S.; MISUMI, Y.; IKEHARA, Y.; ODA, K. Intracellular retention and degradation of tissue55 nonspecific alkaline phosphatase with a Gly317 Asp substitution associated with lethal hypophosphatasia. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 246, p. 613-618, 1998.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Angiogenesis and bone growth **Trends Cardivasc. Med.**, v. 10, p. 223-238, 2000.

GIBSON, G. J.; KOHLER, W. J.; SCHAFFER, M. B. Chondrocyte apoptosis in endochondral ossification of chick sterna. **Vet. Dyn.**, v. 203, p. 468-476, 1995.

GIBSON, G. J.; LIN, D. L.; ROQUE, M. Apoptosis on terminally differentiated chondrocytes in culture. **Exp. Cell. Res.**, v. 233, p. 372-382, 1997.

GIJSBERS, R.; CEULEMANS, H.; STALMANS, W.; MATHIEU, B. Structural and catalytic similarities nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 1361-1368, 2000.

HARGEST, T. E.; GAY, C. V.; LEACH, R. M. Avian tibial dyschondroplasia III. Electron probe analysis. **Am. J. Pathol.**, v. 119, p. 199-209, 1985.

HARPER, H. A.; RODWELL, V. W.; MAYES, P. A. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982. 735 p.

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

HASKY-NEGEV, M.; SIMSA, S.; TONG, A.; GENINA O.; ORNAN, E. M. Expression of matrix metalloproteinases during vascularization and ossification of normal and impaired avian growth plate. **J. Anim. Sci.**, v. 86, p. 1306-1315, 2008.

HAWRYLAK, K.; STINSON, R. A. Tetrameric alkaline phosphatase from human liver is converted to dimers by phosphatidylinositol phospholipase C. **FEBS Letters**, v. 212, p. 289-291, 1987.

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

HIWADA, K.; WACHSMUTH, E. D. Catalytic properties of alkaline phosphatase from pig kidney. **Biochem. J.**, v. 141, n. 1, p. 283-291, 1974.

HSU, H. H. T. Mechanisms of initiating calcification. ATP-stimulated Ca- and Pi-depositing activity of isolated matrix vesicles. **Int. J. Biochem.**, v. 26, p. 1351-1356, 1994.

HSU, H. H. T.; ANDERSON, C. H. A role for ATPase in the mechanisms of ATPdependent Ca and phosphate deposition by isolated rachitic matrix vesicles. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 12, p. 1349-1356, 1995.

HSU, H. H. T.; MUNOZ, P. A.; BARR, J.; OPPLIGER, I.; MORRIS, D. C.; VAANANEM, H. K.; TARKENTON, N.; ANDERSON, H. C. Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. Purification by monoclonal antibody affinity cromatography. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 1826-1831, 1985.

HUNZIKER, E. B.; SCHENK R. K.; CRUZ-ORIVE L. M. Quantition of chondrocyte performance in growth-plate cartilage during longitudinal bone growth. **J. Bone Joint Surg.**, v. 69, p. 162-173, 1987.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Abate de animais, produção de leite, couro e ovos**. 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201304\\_1.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_1.shtm)> Acesso em: 28 mar. 2014.

JAHAN, M.; BUTTHERWORTH, P. J. Alkaline phosphatase of chick Kidney. **Enzyme**, v. 35, p. 61-69, 1986.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, p. 264-271, 2013.

JOHNSON, K. A.; MOFFA, A.; CHEN, Y.; PRITZKER, K.; GODING, J.; TERKELTAUB, R. Matrix vesicle plasma cell membrane glycoprotein-1 regulates mineralization by murine osteoblastic MC3T3 cells. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, p. 883-892, 1999.

JOHNSON, K. A.; WENNBERG, C.; HESSLE, L.; MAURO, S.; GODING, J. J.; MILLAN, J. L.; TERKELTAUB, R. Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 279, p. 1365-1377, 2000.

KERR, N. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a base biological phenomenon with wide-ranging implicatons in tissue kinetics. **Br. J. Cancer.**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIFFER-MOREIRA, T.; SHEEN, C. R.; GASQUE, K. C. S.; BOLEAN, M.; CIANCAGLINI, P.; ELSAS, A. V.; HOYLAERTS, M. F.; MILLAN, J. L. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089374.

KIRSTEIN, B.; CHAMBERS, T. J.; FULLER, K. Secretion of tartrate-resistant acid phosphatase by osteoclasts correlates with resorptive behavior. **J. Cell. Biochem.**, v. 98, n. 5, p. 1085-1094, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 127, p. 680-685, 1970.

LEACH, R. M. Jr.; MONSONEGO-ORNAN, E. Tibial dyschondroplasia – tools, new insights and future prospects. **World Poul. Sci.**, v. 86, p. 2053-2058, 2007.

LEONE, F. A.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Effect of pH on the modulation of rat osseous plate alkaline phosphatase by metal ions. **Int. J. Biochem.**, v. 24, p. 923-928, 1992.

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

MacRAE, V. E.; DAVEY, M. G.; McTEIR, L.; NARISAWA, S.; YADAV, M. C.; MILLAN, J. L.; FARQUHARSON, C. Inhibition of PHOSPHO1 activity results in impaired skeletal mineralization during limb development of the chick. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1146-1155, 2010.

MATALOUN, M. M. G. B; LEONE, C. R. Peculiaridades do metabolismo de cálcio e fósforo no período perinatal: análise crítica de literatura. **Rev. Pediatr.**, v. 20, p. 332-384, 1998.

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

McKENNA, M. J.; HAMILTON, T. A.; SUSSMAN, H. M. Comparison of human alkaline phosphatase isoenzymes. Structural evidence for three protein classes. **Biochem. J.**, v. 181, p. 67-73, 1979.

MILLAN, J. L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. **Calcif. Tissue Int.**, v. 93, p. 299-306, 2012.

NARISAWA, S.; YADAV, M. C.; MILLAN, J. L. In vivo overexpression of tissue-nonspecific alkaline phosphatase increases skeletal mineralization and affects the phosphorylation status of osteopontin. **J. Bone Miner. Res.**, v. 28, n. 7, p. 1587-1598, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2011. 1304 p.

NIE, D. G.; LICIA, N.; WU, Y.; WUTHIER, R. E. Defect in formation of functional matrix vesicles by growth plate chondrocytes in avian tibial dyschondroplasia: evidence of defective tissue vascularization. **J. Bone Miner. Res.**, v. 10, n. 11, p. 1625-1634, 1995.

OHKUBO, A.; LANGERMAN, N.; KAPLAN, M. M. Rat liver alkaline phosphatase: purification and properties. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7174-7180, 1974.

ORTH, M. W.; COOK, M. E. Avian tibial dyschondroplasia: a morphological and biochemical review of the growth plate lesion and its causes. **Vet. Pathol.**, v. 31, n. 4, p. 403-404, 1994.

PAGANI, F.; FRANCUCCI, C. M.; MORO, L. Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives. **J. Endocrinol. Invest.**, v. 28, n. 10, p. 8-13, 2005.

PALHARES, J. C. Pegada hídrica das aves abatidas no Brasil na década de 2000-2010. In: MACARI, M.; SOARES, N. M. (Ed.). **Água na avicultura industrial**. 2. ed. Campinas: FACTA, 2012. p. 39-52.

PETITCLERC, C.; FACTEAU, C. Mechanism of action of  $Zn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  on rat placenta alkaline phosphatase. II. Studies on membrane-bound phosphatase in tissue sections and in whole placenta. **Can. J. Biochem.**, v. 55, p. 474-478, 1977.

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. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; MACARI, M. Discondroplasia tibial: mecanismo de lesão e controle. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, v. 3, n. 5, p. 169-185, 2002.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 87, p. 921-926, 1987.

PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic properties of Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Cell. Mol. Biol.**, v. 34, n. 5, p. 553-562, 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. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1368, p. 108-114, 1998.

POOLE, A. R.; MATSUI, Y.; HINEK, A.; LEE, E. R. Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. **Anat. Rec.**, v. 224, p. 167-179, 1989.

PRAUL, C. A.; FORD, B. C.; GAY, C. V.; PINES, M.; LEACH, R. M. Gene expression and tibial dyschondroplasia. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 7, p. 1009-1013, 2000.

RASAPUTRA, K. S.; LIYANAGE, R.; LAY, J. O. Jr.; ERF, G. F.; OKIMOTO, R.; RATH, N. C. Changes in serum protein profiles of chickens with tibial dyschondroplasia. **Open Proteom. J.**, v. 5, 2012. Disponível em: <[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bD8BAAtBQkelJ:www.researchgate.net/profile/Rohana\\_Liyana/publication/224054043\\_Changes\\_in\\_Serum\\_Protein\\_Profiles\\_of\\_Chickens\\_with\\_Tibial\\_Dyschondroplasia/links/0deec531299596875c000000.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:bD8BAAtBQkelJ:www.researchgate.net/profile/Rohana_Liyana/publication/224054043_Changes_in_Serum_Protein_Profiles_of_Chickens_with_Tibial_Dyschondroplasia/links/0deec531299596875c000000.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>. Acesso em: 05 fev. 2015.

RATH, N. C.; RICHARDS, M. P.; HUFF, W. E.; HUFF, G. R.; BALOG, J. M. Changes in the tibial growth plates of chickens with thiram-induced dyschondroplasia. **J. Comp. Path.**, v. 133, p. 41-52, 2005.

RATH, N. C.; KANNAN, L.; PILLAI, P. B.; HUFF, G. R.; HORST, R. L.; EMMERT, J. L. Evaluation of the efficacy of vitamin D3 or its metabolites on thiram-induced tibial dyschondroplasia in chickens. **Res. Vet. Sci.**, v. 83, n. 2, p. 244-250, 2007.

REDDI, A. H. Initiation and promotion of endochondral bone formation by bone morphogenetic proteins: potential implications for avian tibial dyschondroplasia. **Poult. Sci.**, v. 9, n. 7, p. 978-981, 2000.

REZENDE, L. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M.; LEONE, F. A. Inorganic pyrophosphatase-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. **Cell. Mol. Biol.**, v. 44, n. 2, p. 293-302, 1999.

RIBEIRO, G.; BELLAM, J. C.; MACARI, M.; FERRO, J. A.; PIZAURO, J. M. Does Hsp70 play a protective role in tibial dyschondroplasia? **Int. J. Poult. Sci.**, v. 3, n. 3, p. 238-241, 2004.

ROBISON, R. The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. **Biochem. J.**, v. 17, p. 286-293, 1923.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D. C.; FERREIRA, A. S.; BARRETO, S. L. T. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 252 p.

SAY, J. C.; FURRIEL, R. P. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1074, p. 256-262, 1991.

SEARGEANT, L. E.; STINSON, R. A. Inhibition of human alkaline phosphatase by vanadate. **Biochem. J.**, v. 181, p. 247-250, 1979.

SIMÃO, A. M.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.**, v. 146, n. 4, p. 679-687, 2007.

SIMSA, S.; HASDAI, A.; DAN, H.; ORNAN, E. M. Differential regulation of MMPs and matrix assembly in chicken and turkey growth-plate chondrocytes. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 292, p. 2216-2224, 2007.

TERKELTAUB, R. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. **Americ. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 281, n. 1, p. C1-C11, 2001.

THORP, B. H.; DICK, L.; JEFFERIES, D.; HOUSTON, B.; WILSON, J. An assesment of the efficacy of the Lixiscope for the detection of tibial dyschondroplasia. **Avian Pathol.**, v. 26, p. 97-104, 1997.

VELLEMAN, S. G. The role of the extracellular matrix in skeletal development. **Poult. Sci.**, v. 79, n. 7, p. 985-989, 2000.

WHYTE, M. P. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. **Endocrine Ver.**, v. 15, p. 439-461, 1994.

WHYTE, M. P. Hypophosphatasia: nature's window on alkaline phosphatase function in man. In: BILEZIKIAN, J. P. **Principles of bone biology**. San Diego: Academic, 1996. p. 951- 968.

WU, L. N. Y.; ISHIKAWA, Y.; GENGE, B. R.; WUTHIER, R. E. Chondrocytes isolated from tibial dyschondroplasia lesions and articular cartilage revert to a growth plate-like phenotype when cultured in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 202, p. 167-177, 2005.

WUTHIER, R. E. Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles and extracellular fluid. **Calc. Tiss. Res.**, v. 23, p. 125-133, 1977.

WUTHIER, R. E.; REGISTER, T. C. Role of alkaline phosphatase: a polyfunctional enzyme in mineralizing tissues. **Chem. Biol. Miner. Tissues**, p. 113-124, 1985.

ZAKA, R.; STOKES, D.; DION, A. S.; KUSNIER, A.; HAN, F.; WILLIAMS, C. P5L mutation in ank results in an increase in extracellular inorganic pyrophosphate during proliferation and non mineralizing hypertrophy in stably transduced ATDC5 cells. **Arthritis Res. Ther.**, v. 8, p. 164-176, 2006.