

RAFAEL RODRIGUES COLOSIO

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

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

Orientador: Prof. Dr. João Martins Pizauro
Junior

**Araraquara
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

C718a Colosio, Rafael Rodrigues
Atividade de enzimas relacionadas ao processo de
ossificação em girinos de *Lithobates catesbeianus*: / Rafael
Rodrigues Colosio. – Araraquara : [s.n], 2015
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: João Martins Pizauro Junior

1. Calcificação. 2. Osteoblastos. 3. Fosfatases.
4. Metamorfose. 5. Rã-touro. I. Título.

Dados Curriculares

Rafael Rodrigues Colosio

1. Dados Pessoais

Filiação: José Antônio Visoná Colosio e Edilene Aparecida Rodrigues Colosio

Nascimento: 29 de Setembro de 1990

Documento de Identidade: 47.775.598-7

Cadastro de Pessoa Física: 383.956.668-10

Endereço Pessoal: Av. Dr. José Adriano Arrobas Martins, 750, apto 302, Jd Nova Aparecida, Jaboticabal.

2. Formação Acadêmica

- 2013 – 2015** Mestrado em Biotecnologia.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
Título: Estudo da atividade de enzimas relacionadas ao processo de ossificação em girinos de *Lithobates catesbeianus* durante o período de desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores
Orientador: João Martins Pizauro Junior
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2009 – 2012** Graduação em Ciências Biológicas.
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Jaboticabal, FCAVJ - UNESP, Brasil
Título: Estudo da atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo de *Lithobates catesbeianus*, durante o período de desenvolvimento dos membros anteriores e posteriores
Orientador: João Martins Pizauro Junior
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

3. Produção bibliográfica

3.1 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **COLOSIO, R. R.**, SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., SANTANA, C. C., MENEZES, M. P., PIZAURO, J. M.

Bone nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase and alkaline phosphatase activities during *Lithobates catesbeianus* limbs development In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.

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

2. GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, SANTANA, C. C., BALDISSERA, G., PIZAURO, J. M.

Membrane interaction study of acid and alkaline phosphatases from bull frog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles tail In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.

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

3. SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., **COLOSIO, R. R.**, SANTANA, C. C., PAVARINA, G. C., PIZAURO, J. M.

PC-1, alkaline and acid phosphatases activities in normal and affected by tibial dyschondroplasia chickens In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.

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

4. MENEZES, M. P., GONÇALVES, A. M., **COLOSIO, R. R.**, CURSINO, M. S., DUARTE, J. M. B., PIZAURO, J. M.

Seminal evaluation and determination of protein concentration present in seminal plasma of two species of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira* and *M. nemorivaga*) maintained in captivity In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu.

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

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

Activity of acid and alkaline phosphatase present in the bone tissue of *Lithobates catesbeianus* during the limbs development period In: 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., GONÇALVES, A. M., **COLOSIO, R. R.**, PEREIRA, M. C., PAVARINA, G. C., PIZAURO, J. M.

Activity of phosphomonohydrolases present in the liver of bullfrog's tadpoles during metamorphosis In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu.

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

7. GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M.

Pyrophosphatase and ATPase activities from bull frog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles tail during development and metamorphosis In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz do Iguaçu.

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

8. SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., **COLOSIO, R. R.**, SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M.

Partial characterization of intestinal alkaline phosphatase from tadpoles bull frog (*Lithobates catesbeianus*) In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu.

Anais da XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia

Molecular. , 2012.

9. SANTANA, C. C., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, GONÇALVES, A. M., PIZAURO, J. M.

Partial kinetic characterization of acid and alkaline phosphatases from different tissue of bull frog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu.

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

10. **COLOSIO, R. R.**, GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., PIZAURO, J. M.

Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu.

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

11. GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, PIZAURO, J. M.

Partial characterization of phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* tail during metamorphosis In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu.

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

12. **COLOSIO, R. R.**, GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., PIZAURO, J. M.

Acid and alkaline phosphatases activities of *Lithobates catesbeianus* forelimbs during metamorphosis In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.

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

13. GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, PIZAURO, J. M.

Activities of phosphomonohydrolase from *Lithobates catesbeianus* tail during metamorphosis In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu.

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

3.2 Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., **COLOSIO, R. R.**

Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes em fígados de girinos de rã-touro In: XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal.

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

2. **COLOSIO, R. R.**, PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., SANTANA, C. C.

Caracterização cinética parcial das fosfatases ácida e alcalina presentes no tecido ósseo dos membros de girinos de rã-touro In: XXIV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2012, Jaboticabal.

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

3. **COLOSIO, R. R.**, PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M., SANTANA, C. C., HARNICH, F. A. R.

Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus* durante o clímax metamórfico In: XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal.

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

4. SANTANA, C. C., PIZAURO, J. M., GONÇALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**, HARNICH, F. A. R.

Relação entre a atividade da fosfatase alcalina e a massa da cauda de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose In: XXIII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2011, Jaboticabal.

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

5. **COLOSIO, R. R.**, PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., GONÇALVES, A. M.

Atividade das fosfatases ácida e alcalina na ossificação endocondral de girinos de *Lithobates catesbeianus* In: XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010, Jaboticabal.

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

6. GONÇALVES, A. M., PIZAURO, J. M., SANTOS, L. F. J., **COLOSIO, R. R.**

Caracterização da atividade de fosfomonohidrolases da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose In: XXII CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2010, Jaboticabal.

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

RAFAEL RODRIGUES COLOSIO

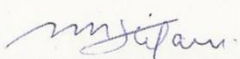
Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 25 de março de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR (Orientador)
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP / Jaboticabal



Profª. Drª. MARTA VERARDINO DE STÉFANI
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias / UNESP / Jaboticabal



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUMARÃES
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto

Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus irmãos e à minha namorada Isa, por todo o incentivo em minha caminhada, apoio em minhas conquistas e crença em minha capacidade.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por permitir que minha trajetória seja possível.

Aos meus pais, José Antônio e Edilene, por todo o suporte oferecido ao longo desta caminhada chamada vida, por terem me ensinado a amar e perdoar, a respeitar e ser honesto, e por tudo o que fizeram, fazem e ainda farão pela minha felicidade.

Aos meus irmãos, Guilherme, Alene e Henrique, por serem meus mais fiéis companheiros, fazendo com que eu me sinta seguro sempre, por me ensinarem a ser forte quando precisam de mim, a ser compreensivo e paciente nos momentos de discussão e por me proporcionarem momentos inesquecíveis de descontração e boas risadas.

À Isa, minha atual namorada e futura esposa, pelo carinho e apoio em todos os momentos desde que nos conhecemos, por me fazer acreditar que tudo é possível, por ser uma mulher forte e amável, tornando minha vida mais feliz, prazerosa e fácil de ser vivida.

Aos meus avós, tios e primos, por acreditarem em minha competência e responsabilidade.

Ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior, pela orientação neste trabalho e pelo exemplo de orientador e pesquisador a serem seguidos, além dos momentos de descontração.

Aos integrantes da “FamiLEA” (“Família” do Laboratório de Enzimologia Aplicada), que sempre me auxiliam, tanto na parte teórica quanto na parte prática da pesquisa, além das trocas de experiências de vida, sempre de forma descontraída, o que permite uma boa convivência no local de trabalho, porém sem que as coisas deixem de ser levadas a sério.

Aos professores, Marta Verardino de Stéfani e Luis Henrique Souza Guimarães, por terem aceito o convite de compor a banca, enriquecendo o presente trabalho com seus elogios, críticas e sugestões.

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

À professora Marta por permitir gentilmente, e ao técnico Márcio por auxiliar na coleta dos girinos, fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo financiamento concedido para realização do presente trabalho.

Por fim agradeço aos meus amigos mais próximos e à todas as amizades conquistadas durante a vida, além de todas as pessoas que de alguma forma participam na minha formação pessoal.

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

Aleff Lavoisier

RESUMO

A calcificação biológica é um processo muito bem regulado, no qual os diferentes tipos de tecidos, células, organelas e biomoléculas, participam na coordenação e regulação de eventos metabólicos envolvidos na deposição de fosfato de cálcio, sob a forma de cristais de hidroxiapatita. As alterações morfológicas ocorridas nos anuros, durante a metamorfose, são extremamente acentuadas e perceptíveis, sendo uma delas a remodelação do esqueleto. Os eventos relacionados à ossificação em girinos raramente são descritos na literatura. A fosfatase ácida tartarato resistente tem sido amplamente utilizada como um marcador específico de osteoclastos, células que participam do processo de reabsorção e de remodelação do tecido ósseo, enquanto a fosfatase alcalina tem sido usada como marcador de osteoblastos, células responsáveis pela formação do tecido ósseo. Estudos efetuados por vários pesquisadores, com o objetivo de determinar, principalmente, as enzimas presentes nas vesículas extracelulares dos condrócitos, têm revelado a presença de outras enzimas, além da fosfatase alcalina que são importantes para o processo de calcificação biológica. Assim, no presente trabalho foi avaliada a variação na atividade das fosfatases no processo de ossificação no período de desenvolvimento dos membros de *Lithobates catesbeianus*, a fim de contribuir na compreensão deste processo não somente em anuros, mas também nos demais vertebrados. Os animais foram dessensibilizados em água com gelo, decapitados, os membros foram removidos, em seguida os ossos foram descarnados e homogeneizados, centrifugados, sendo o sobrenadante alíquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C para posteriores atividades enzimáticas e dosagem de proteína no extrato. As enzimas, fosfatase ácida e fosfatase alcalina, apresentaram estabilidade em todos os pH de armazenamento estudados, pH ótimo aparente de hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (PNFF) de 5,0 e de 10,5, respectivamente, estáveis até 45°C e $t_{1/2}$ em 60 minutos a 55°C para a alcalina e em 20 minutos a 55°C para a ácida. Os padrões das atividades das enzimas estudadas no presente trabalho demonstram que o processo de ossificação, independentemente do tipo (periosteal ou endocondral), ocorre inicialmente, no sentido de formar o tecido ósseo dos membros anteriores e posteriores, enquanto o animal ocupa o ambiente aquático, apresentando, posteriormente, remodelação e fortalecimento deste tecido possibilitando a transição para o ambiente terrestre, evidenciando as diferentes necessidades durante as distintas fases de vida.

Palavras-chave: Calcificação Biológica, Fosfatases, Rã-touro, Metamorfose.

ABSTRACT

Biological calcification is a tight regulated process in which different types of tissues, cells, organelles, and biomolecules participate in the coordination and regulation of metabolic events involved in accumulating calcium phosphate, in the form of hidroxiapatite crystals. The morphological changes that occur during anuran metamorphosis are extremely accentuated and perceptible, such as the remodeling of the skeleton. The ossification events are rarely described for tadpoles in the literature. The tartarate resistant acid phosphatase has been widely used as a specific marker of osteoclasts, cells that participate in the process of resorption and remodeling of bone tissue, while the alkaline phosphatase has been used as a marker for osteoblasts, cells responsible for bone tissue formation. Studies conducted by many researchers with the aim of determining, mainly, the enzymes in chondrocyte extracellular vesicles have revealed the presence of other enzymes, in addition to alkaline phosphatase, which are important to the process of biological calcification. Thus, in the present study, the changes in the activity of phosphatases in the ossification process during the development of the limbs of *Lithobates catesbeianus* was evaluated, with the aim to contribute to the understanding of this process not only in anurans, but also in other vertebrates. The animals were desensitized in water with ice, decapitated and limb bones were removed and homogenized, centrifuged, and the supernatant aliquoted, frozen in liquid nitrogen and stored at -70°C for subsequent enzymatic activities and protein quantification. The enzymes, acid phosphatase and alkaline phosphatase, remained stable in all of the studied storage pH, the apparent pH optimum of hydrolysis of *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP) was of 5.0 and 10.5, respectively, and the enzymes were stable at 45°C and the $t_{1/2}$ was 60 minutes at 55°C for alkaline phosphatase and 20 minutes at 55°C for acid phosphatase. The activity patterns of the studied enzymes showed that the ossification process, regardless of the type (periosteal or endochondral), occurs initially, to form the bone tissue of the fore and hind limbs, while the animal occupies the aquatic environment, presenting later remodeling and strengthening of this tissue, enabling the transition to the terrestrial environment, emphasizing the different necessities during the distinct phases of life.

Keywords: Biologic Calcification, Phosphatases, Bullfrog, Metamorphosis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Metamorfose em girinos	15
3.2 Processos de Ossificação e Calcificação	16
3.3 Fosfatases	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Classificação dos girinos	22
4.2 Animais experimentais	24
4.3 Obtenção dos extratos enzimáticos	24
4.4 Métodos de padronização das atividades das fosfatases	25
4.4.1 Efeito do pH sobre a atividade de PNFFase das fosfatases ácida e alcalina	25
4.4.2 Estudo do efeito do pH no armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases	25
4.4.3 Estudo do efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade das fosfatases	25
4.4.4 Estudo da inativação térmica da atividade das fosfatases	26
4.5 Determinação da atividade de PNFFase das fosfatases ácida e alcalina nos diferentes estádios de desenvolvimento larval	26
4.6 Efeito do pH sobre a atividade da PC-1	26
4.7 Determinação da atividade da PC-1 nos diferentes estádios de desenvolvimento larval	27
4.8 Efeito do pH sobre a atividade de ATPase e de PPIase da fosfatase alcalina	27
4.9 Determinação da atividade de ATPase e de PPIase da fosfatase alcalina nos diferentes estádios de desenvolvimento larval	27
4.10 Dosagem de proteína	28
4.11 Forma de análise dos resultados	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os Anura (Grego *an* = sem, *uro* = cauda) são representados por 54 famílias com 6.453 espécies no mundo, ocorrendo em todos os continentes, exceto na Antártida e desertos extremos (FROST, 2015). A característica esquelética mais evidente dos Anuros é a especialização do corpo para o salto, em que os membros posteriores, juntamente com os músculos, formam um sistema de alavanca que proporciona ao animal a capacidade de se arremessar ao ar. Várias especializações morfológicas estão associadas a este tipo de locomoção, como tíbia e fíbula fundidas e patas traseiras alongadas, presença de uma pélvis resistente ligada fortemente a uma coluna vertebral enrijecida, ílio alongado e vértebras caudais fundidas, formando o uróstilo, membros anteriores fortes e cintura peitoral flexível para absorver o impacto da aterrissagem, entre outras (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, composto por: matriz óssea, material extracelular calcificado; osteócitos, localizados no interior da matriz óssea, sendo essenciais para a manutenção desta; osteoblastos, sintetizam a parte orgânica da matriz, localizando-se na sua periferia; e osteoclastos, células multinucleadas e móveis que reabsorvem o tecido ósseo, participando do processo de remodelação dos ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Este tecido é formado pelo processo de ossificação intramembranosa, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, ou pelo processo de ossificação endocondral, que se inicia sobre um molde de cartilagem hialina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Em caso de fratura óssea, para que ocorra sua reparação, forma-se no local um tecido abundante em células osteoprogenitoras, surgindo tecido ósseo tanto pela ossificação intramembranosa, como pela ossificação endocondral (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

O desenvolvimento e crescimento ósseo em rã-touro ocorre essencialmente por ossificação periosteal até a metamorfose, pois a calcificação da cartilagem hipertrófica e a formação de trabéculas ósseas não estão presentes durante esta fase. Somente nos animais mais velhos é que ocorre o processo de ossificação endocondral, com a calcificação da cartilagem hipertrófica e formação das trabéculas ósseas, que provavelmente está relacionado ao reforço das extremidades dos ossos devido ao ganho de peso do animal (FELISBINO, 2001).

2 OBJETIVOS

Avaliar as atividades de *p*-nitrofenilfosfatase (PNFFase), de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase) e de pirofosfatase (PPiase) da fosfatase alcalina, de fosfodiesterase da ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1) e de fosfomonohidrolase da fosfatase ácida durante o processo de ossificação do tecido ósseo dos membros de girinos de *Lithobates catesbeianus*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metamorfose em girinos

Em geral, os anuros possuem uma fase larval aquática e uma fase pós-metamórfica terrestre, sendo os girinos diferentes dos adultos, em morfologia e ecologia. A maioria dos girinos de anuros é classificada como herbívora filtradora, porém, após a metamorfose tornam-se carnívoros, explorando, assim, diferentes recursos durante as fases de sua vida (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). A metamorfose dos anfíbios é caracterizada por acentuadas mudanças morfofisiológicas, possibilitando ao girino aquático a ocupação do ambiente terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003).

Durante o processo de metamorfose, observam-se grandes transformações pós-embrionárias que resultam em grandes mudanças comportamentais, morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. No caso dos girinos, tal processo tem como características três notáveis alterações: (1) regressão de estruturas e funções necessárias somente aos girinos; (2) transformações de estruturas larvais em estruturas necessárias aos adultos e (3) desenvolvimento de estruturas e funções essenciais somente à fase adulta (McDIARMID; ALTIG, 1999).

A metamorfose nos anuros é um fenômeno principalmente endócrino regulado pelos hormônios tireoidianos. Gudernatsch (1912 apud DUELLMAN; TRUEB, 1994) descobriu que a metamorfose dos girinos de *Rana temporaria* era acelerada quando estes eram alimentados com extrato de glândula tireoide de boi. Posteriormente, outros estudos demonstraram a função dos hormônios tireoidianos neste processo (DUELLMAN; TRUEB, 1994).

As alterações morfológicas ocorridas durante a metamorfose nos anuros são extremamente acentuadas e perceptíveis, sendo uma delas a remodelação de boa parte do esqueleto (TRUEB; HANKEN, 1992). Em contrapartida, as alterações bioquímicas são menos visíveis, ocorrendo aumento na produção de proteínas séricas, alterações no metabolismo do ferro, devido ao aumento da ceruloplasmina, mudanças no tipo de hemoglobina e na excreção da amônia, e alterações na expressão de DNA e RNA (MANIATIS; INGRAM, 1971a, 1971b; JUST; ATKINSON, 1972; THEIL, 1973; DUELLMAN; TRUEB, 1994; WEBER, 1996).

3.2 Processos de Ossificação e Calcificação

Nas aves e mamíferos, o desenvolvimento dos ossos longos formados a partir de um molde cartilaginoso envolvem dois processos distintos de osteogênese. No primeiro processo, as células do pericôndrio se diferenciam em osteoblastos formando uma camada de células semelhante a um “colar” ao redor da região mediana do molde cartilaginoso (diáfise) do tecido ósseo, denominado de osteogênese periosteal (pericondral). No segundo processo, a cartilagem é progressivamente substituída por tecido ósseo, e é denominada osteogênese ou ossificação endocondral (FELISBINO, 2001).

Nos anuros, assim como nos mamíferos e aves, o início do desenvolvimento dos ossos longos também ocorre por osteogênese periosteal, porém, diferentemente daquele observado em aves e mamíferos, seu crescimento em direção às extremidades atinge a cartilagem articular, envolvendo externamente todas as zonas da cartilagem de crescimento, incluindo a de proliferação (FELISBINO, 2001).

Nos tetrápodes, o processo responsável pelo crescimento longitudinal da maioria dos ossos do esqueleto é denominado ossificação endocondral. Normalmente, a calcificação ocorre no disco epifisário devido à ação de condrócitos, os quais são encontrados em diferentes estágios de diferenciação, de acordo, principalmente, com a sua localização no interior do disco de crescimento (ANDERSON, 1995; GERBER; FERRARA, 2000).

O disco de crescimento é composto por cartilagem, que forma uma estreita faixa de ligação entre a epífise e a diáfise, podendo ser dividido em algumas regiões anatômicas, sendo elas: a) zona de reserva: apresenta condrócitos, aparentemente dispersos e inativos; b) zona de proliferação: onde ocorre a maioria das divisões celulares; c) zona de maturação: condrócitos finalizam sua fase de pós-divisão e iniciam o período de maturação, momento em que há intensa síntese e secreção de matriz; d) zona hipertrófica: contém condrócitos aumentados e muitas vesículas de matriz; e) zona de calcificação: região em que os condrócitos sofrem degeneração. Na zona de maturação encontra-se a fosfatase alcalina e na zona de calcificação há o depósito de fosfato de cálcio no interior de vesículas (PIZAURO; CIANCAGLINI; MACARI, 2002).

O crescimento longitudinal do osso ocorre devido a uma perfeita sincronia entre a proliferação dos condrócitos, produção de matriz óssea, calcificação biológica, hipertrofia e invasão vascular da lacuna do condrócito hipertrofiado, sendo a diferenciação dos condrócitos a etapa crucial para o processo de ossificação endocondral (LOVERIDGE;

FARQUHARSON, 1993; ANDERSON, 1995; FARQUHARSON; JEFFERIES, 2000; GERBER; FERRARA, 2000; JEFFERIES et al., 2000).

Outra etapa relevante deste processo é a vascularização da região inferior do disco de crescimento após hipertrofia do condrócito, momento muito importante na interação entre a condrogênese (produção de cartilagem) e a osteogênese (formação do tecido ósseo), principalmente durante o crescimento rápido dos ossos longos ou reparo de fraturas (GERBER; FERRARA, 2000).

Atualmente, admite-se que o brotamento das vesículas de matriz extracelular (VME) dos condrócitos representa um complexo mecanismo de geração de organelas extracelulares, cuja função é a de realizar as etapas finais do processo de calcificação biológica antes da morte celular programada (apoptose) (KIRSCH; WUTHIER, 1994; ANDERSON, 1995).

O papel dessas vesículas como mediadoras da deposição mineral é fortemente sugerido pelos seguintes fatos: o local onde ocorrem os depósitos minerais tem exata correspondência com o local das vesículas (ANDERSON, 1973; ALI, 1976; MARTINO; YEAGER; TAYLOR, 1979); os primeiros cristais na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que precedem o crescimento do cristal extracelular, têm sido detectados dentro dessas vesículas (e.g. BONUCCI, 1971; ALI; EVANS, 1973; ANDERSON, 1973, 1976; 1995; WUTHIER, 1977; SELA et al., 2000). Além disso, tem sido proposto que o interior das vesículas funciona como um microambiente selado, protegendo o primeiro núcleo do mineral, enquanto ainda está em um estado pré-cristalino mais solúvel, antes de se converter em um cristal de hidroxiapatita; sendo verificado, ainda, que as vesículas isoladas apresentam também a capacidade de depositar sais de cálcio *in vitro* (e.g. ALI; EVANS, 1973; HSU; ANDERSON, 1977, 1978, 1986; REGISTER; WARNER; WUTHIER, 1984; WUTHIER; REGISTER, 1985).

Estudos efetuados por vários pesquisadores, com o objetivo de determinar os tipos de lipídeos e de eletrólitos, mas principalmente para determinar enzimas presentes nas vesículas de matriz extracelular, têm revelado que a fosfatase alcalina não é a única enzima presente na membrana que é importante para o processo de calcificação biológica (e.g. ANDERSON, 1995; PIZAURO et al., 1998). Há, também, elevados níveis de pirofosfatase (PPiase), de adenosina-5'-trifosfatase (ATPase) (ANDERSON, 1995; PIZAURO et al., 1998), de ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase (PC-1), dentre outras (CASWELL; WHYTE; RUSSELL, 1986; JOHNSON et al., 2000; GIJSBERS et al., 2001), onde a PC-1 produz o substrato da ectofosfatase alcalina, o pirofosfato inorgânico (PPi), a partir da hidrólise do ATP presente no fluido extracelular da cartilagem. Porém, já foi demonstrado que

a fosfatase alcalina pode, também, hidrolisar o ATP, liberando fosfato inorgânico (Pi), sendo regulada, alostericamente, pelo ATP e inibida competitivamente pelo produto da reação, o Pi (PIZAURO; CIANCAGLINI; LEONE, 1993).

Estudos demonstraram que o PPi participa da regulação de vários eventos intra e extracelulares de uma grande variedade de tecidos, sugerindo que a regulação de sua síntese, degradação e transporte ocorrem através de mecanismos altamente especializados (LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; LEONE et al., 1998; ADDISON et al., 2007). O papel fisiológico do PPi extracelular tem sido bastante estudado, principalmente, com relação à mineralização biológica, verificando-se que ele é um potente inibidor deste processo (ADDISON et al., 2007), além de inibir a capacidade dos condrócitos de depositar minerais (especificamente cristais de hidroxiapatita e de fosfato de cálcio básico) diretamente na matriz pericelular do tecido ósseo (JONHSON et al., 2000).

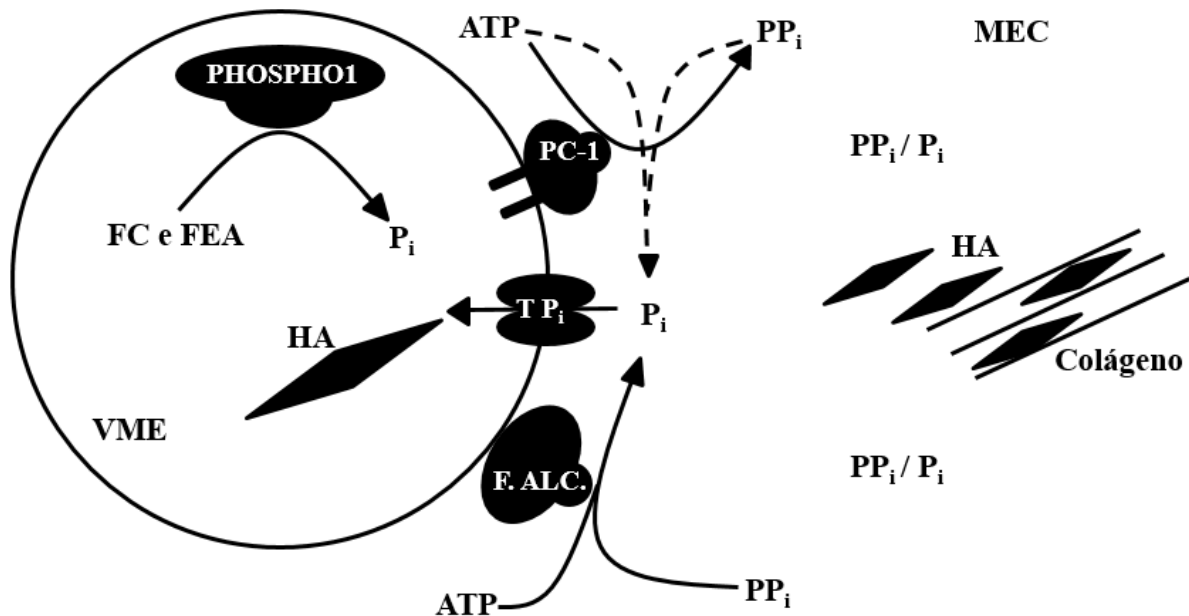
Segundo Terkeltaub (2001) e Addison e colaboradores (2007) o PPi pode representar a molécula sinal responsável pelo controle da calcificação biológica tanto em condições normais como em condições patológicas, sugerindo que o aumento de sua concentração extracelular bloqueia a calcificação da cartilagem articular e de outros tecidos, além de atuar como substrato da fosfatase alcalina (PIZAURO et al., 1988).

Tanto a fosfatase alcalina como a PC-1, presentes na membrana das VME, atuam como ATPase e PPIase, onde a fosfatase alcalina possui um papel primário, enquanto a PC-1 apresenta um papel secundário na liberação de Pi para a calcificação biológica (ANDERSON, 1995; LEONE; PIZAURO; CIANCAGLINI, 1997; MILLÁN, 2012).

O modelo mais recente da calcificação (Figura 1) admite que a mineralização ocorre no interior das VME, organelas que servem como sítio para iniciar a deposição de cristais de hidroxiapatita. Para que haja a formação destes cristais, faz-se necessário a produção e transporte de Pi para o interior das VME, processo realizado por três enzimas: No interior da vesícula de matriz a produção de Pi é realizada pela PHOSPHO1 (fosfatase órfã), que catalisa a hidrólise de fosfocolina e fosfoetanolamina liberando Pi. Já no lado externo da VME, a PC-1 é responsável pela produção do substrato da fosfatase alcalina, o PPi, a partir da hidrólise do ATP, e a fosfatase alcalina hidrolisa o PPi liberando Pi. Finalmente, o cálcio é translocado para o interior da vesícula por anexinas, que atuam como canais de cálcio, enquanto o Pi é translocado para o interior das VME por transportadores. O aumento do produto iônico, cálcio versus fosfato, no interior das vesículas, acarreta a precipitação de fosfato de cálcio, levando à formação de cristais, na forma de pequenas agulhas ou de bastão, que perfuram a membrana da vesícula e extravasam, expondo hidroxiapatita pré-formada para o fluido extracelular,

permitindo a propagação e deposição de hidroxiapatita nas fibras de colágeno presentes na matriz extracelular (MILLÁN, 2012).

Figura 1 – Esquema da Calcificação Biológica.



PHOSPHO1 – fosfatase órfã, PC-1 – ectoenzima fosfodiesterase nucleotídeo pirofosfatase, T Pi – transportador de fosfato inorgânico, F. ALC. – fosfatase alcalina, FC – fosfocolina, FEA – fosfoetanolamina, VME – vesícula de matriz extracelular, HA – hidroxiapatita, ATP – adenosina trifosfato, PP_i – pirofosfato inorgânico, P_i – fosfato inorgânico, MEC – matriz extracelular.

Fonte: Millán (2012) - modificado pelo autor.

A fosfatase alcalina faz o papel principal de regular a concentração de PP_i extracelular, hidrolisando o pirofosfato, para manter a relação de PP_i/P_i que permita a mineralização óssea normal. Além disso, a regulação da concentração do PP_i (um inibidor da mineralização da matriz extracelular) também é realizada pela proteína ANK que possui a habilidade de transportá-lo para o meio extracelular (MILLÁN, 2012).

Hoje, sabe-se que importantes informações sobre a atividade metabólica do tecido ósseo podem ser adquiridas por meio da determinação de marcadores específicos destas células. Com relação a isso, a fosfatase ácida tartarato resistente tem sido amplamente utilizada como um marcador específico de osteoclastos (JOHNSON et al., 2000), células que participam do processo de reabsorção e de remodelação do tecido ósseo, enquanto a fosfatase alcalina tem sido usada como marcador de osteoblastos (JOHNSON et al., 2000), células responsáveis pela formação do tecido ósseo. Os estudos referentes à participação da fosfatase alcalina e da PC-1 no processo de calcificação mostram que elas possuem papéis antagônicos, enquanto a PC-1 é responsável por produzir e enriquecer as vesículas com PP_i , a fosfatase alcalina fica

responsável por hidrolisá-lo, controlando, assim, o nível de PPi no fluido intersticial durante o processo de calcificação (JOHNSON et al., 2000; GJISBERS et al., 2001).

O processo de ossificação dos membros de *Rana pipiens* tem seu início nos ossos proximais (fêmur nos membros posteriores e úmero nos membros anteriores), e progride no sentido proximal-distal, formando as falanges dos membros posteriores e os tarsos e em seguida as falanges dos membros anteriores. Já os carpos são formados após a metamorfose. Tanto a tíbia e a fíbula como o rádio e a ulna, iniciam sua ossificação como ossos distintos e se fundem posteriormente. As diferenças de estágio e tempo de formação e fusão dos ossos estão relacionadas às dimensões destes e à utilização dos membros nas duas fases de sua vida (KEMP; HOYT, 1969).

3.3 Fosfatases

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

As fosfatases são fosfomonohidrolases que utilizam como substrato fosfomonoésteres e encontram-se amplamente distribuídas na natureza em diversas formas moleculares. São classificadas em ácidas, neutras e alcalinas, dependendo do seu pH de atuação (AOYAMA et al., 2003). Geralmente, a catálise é caracterizada pela interação entre substrato e sítio ativo. Uma série de fatores, como a concentração de substrato e da enzima, a composição do meio de reação, a temperatura, o pH, inibidores, a presença ou ausência de íons, entre outros, interferem na atividade enzimática (NELSON; COX, 2011).

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

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

Dentro deste contexto, o presente estudo relacionado às enzimas envolvidas no processo de ossificação dos membros de girinos de *Lithobates catesbeianus*, pode contribuir para a compreensão deste processo não somente em anuros, mas também nos demais vertebrados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

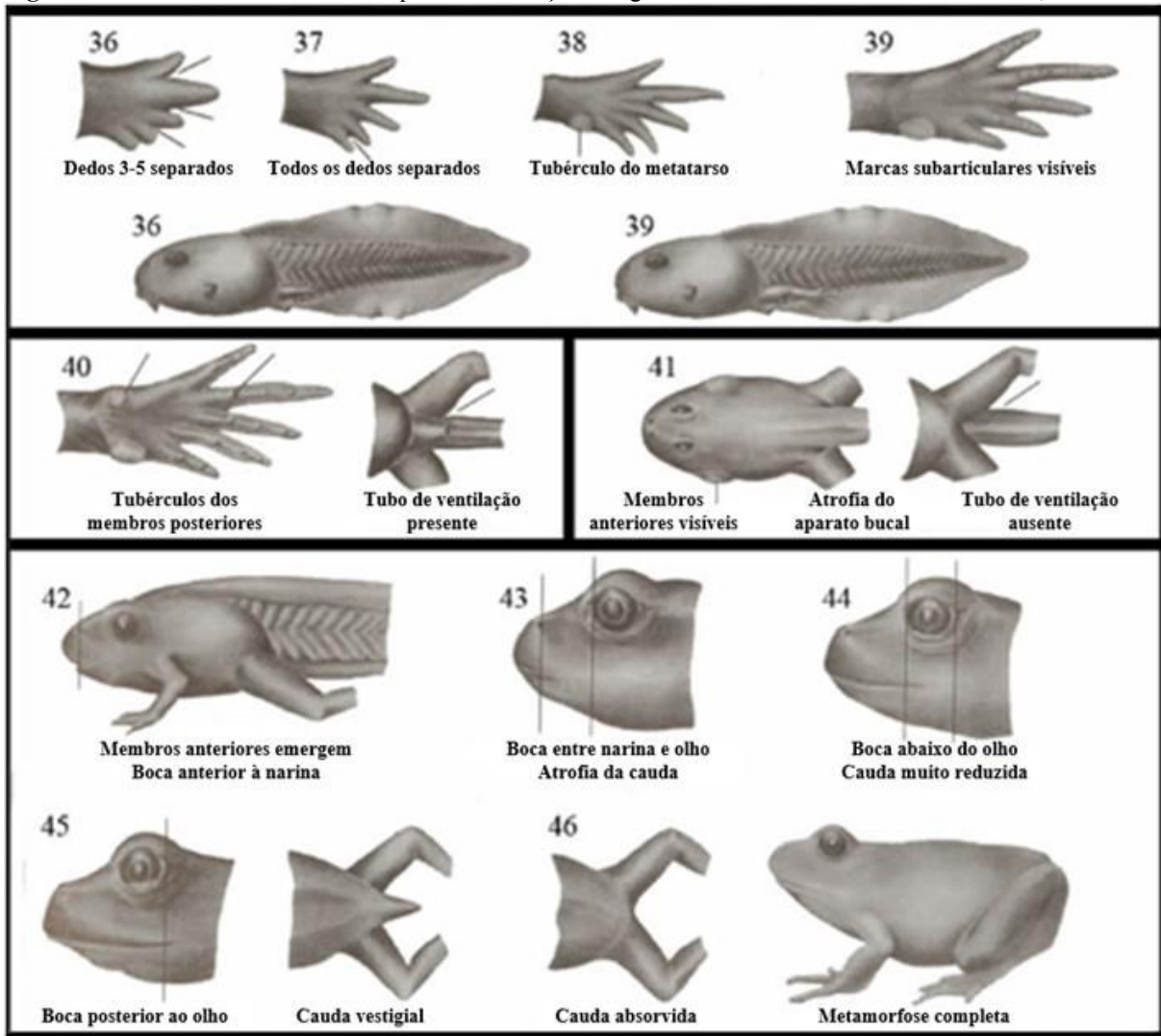
Os experimentos foram conduzidos no setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e no Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA) do Departamento de Tecnologia da UNESP, Câmpus de Jaboticabal – São Paulo.

4.1 Classificação dos girinos

Os girinos foram classificados, em estádios, segundo a tabela de Gosner (1960) (Figura 2), e em períodos segundo Etkin e Gilbert (1968). A tabela de Gosner (1960) classifica o desenvolvimento dos girinos baseada nas alterações morfológicas que ocorrem neste período, sendo esta classificação dividida em 46 estádios de desenvolvimento.

Os estádios que vão do número 1 ao 25, correspondem ao desenvolvimento embrionário; do estádio 26 ao 35, ocorre a fase de crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores; do 36 ao 41, há estabilização do crescimento corporal, maturação dos membros posteriores e desenvolvimento dos membros anteriores; finalmente, do estádio 42 ao 46, período que ocorre o processo de metamorfose propriamente dito, ocorre a maturação dos membros anteriores, a reabsorção da cauda e a reestruturação da mandíbula, sendo considerado desenvolvimento larval o período determinado pelos estádios de 26 a 45.

Figura 2 – Parte da Tabela de Gosner para classificação dos girinos em estádios de desenvolvimento, de 36 a 46.



Fonte: Gosner (1960) – modificado pelo autor.

A tabela de Etkin e Gilbert (1968) define o desenvolvimento dos girinos em períodos de crescimento de acordo com os níveis de hormônios da tireoide, sendo eles: pré-metamorfose, pró-metamorfose e clímax (metamorfose propriamente dita), a qual é subdividida em três fases: inicial, média e tardia. A pré-metamorfose corresponde aos estádios de 1 a 30 (GOSNER, 1960), a pró-metamorfose começa no estágio 31, com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios tireoidianos, e termina no estágio 41 (GOSNER, 1960). Já o clímax inicia-se no estágio 42 e finaliza-se no estágio 45 (GOSNER, 1960).

4.2 Animais experimentais

Os procedimentos com animais, bem como os protocolos de manipulação e sacrifício, foram submetidos a aprovação da comissão de ética no uso de animais da FCAV (Protocolo nº 011551/13), para assim atender aos Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros e a densidade utilizada foi de um girino para cada dois litros, com temperatura média de 27°C. Para alimentação foi fornecida ração comercial farelada de peixes carnívoros, constituída por 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de matéria fibrosa, fornecida três vezes ao dia até aparente saciação. Mensalmente foram realizadas coletas dos girinos que foram separados por estádios de desenvolvimento, do 38 ao 46, segundo a tabela de Gosner (1960). Para a determinação dos estádios 38 ao 41 foi utilizado um estereomicroscópio Zeiss modelo Stemi DV4, devido ao tamanho reduzido dos membros posteriores neste período.

4.3 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para a obtenção dos extratos enzimáticos dos ossos dos membros anteriores e posteriores, foram utilizados cerca de 40 animais de cada estágio de desenvolvimento, do 38 ao 41, devido ao tamanho reduzido dos membros durante este período, e cerca de 20 animais, do estágio 42 ao 46. Os animais foram dessensibilizados em água com gelo a 4°C, guilhotinados (CZESNIK et al., 2006), separando-se a cabeça do corpo e, em seguida, os membros anteriores (ainda na cavidade opercular até o estágio 41) e posteriores foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C, separadamente.

Após o descongelamento, os tecidos moles e aderentes foram removidos dos ossos com o auxílio de pinças. Em seguida, os membros foram homogeneizados em aparelho tipo turrax, marca OMNI, modelo GLH-2511, em tampão TRIS.HCl 5 mmol/L, pH 7,5 contendo MgCl₂ 2 mmol/L e ZnCl₂ 1 µmol/L, na proporção de 1 grama de tecido para 10 mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C. Posteriormente, as amostras foram utilizadas para a determinação das atividades enzimáticas e dosagem de proteína no extrato.

4.4 Métodos de padronização das atividades das fosfatases

Com o objetivo de estabelecer as condições ideais para as atividades das enzimas, foram feitos diferentes ensaios enzimáticos variando-se: o pH de homogeneização e o tempo de armazenamento; os pH, a temperatura e o tempo ótimos aparentes para a reação enzimática; e o tempo e a temperatura necessários para inativação térmica das enzimas.

4.4.1 Efeito do pH sobre a atividade de PNFFase das fosfatases ácida e alcalina

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas, foi estudado utilizando-se soluções tampão acetato de sódio (pH 3,5-7,0), TRIS.HCl (pH 7,0-8,5) e AMPOL (pH 8,5-11,0), em concentração de 87 mmol/L.

4.4.2 Estudo do efeito do pH no armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases

O efeito do armazenamento da amostra sobre a atividade das enzimas foi estudado na faixa de pH compreendida entre 4 e 11, utilizando-se tampão acetato de sódio (pH 4, 5 e 6), TRIS.HCl (pH 7, 7,5 e 8) e AMPOL (pH 9, 10 e 11), em concentração de 5 mmol/L, contendo MgCl_2 2 mmol/L e ZnCl_2 1 $\mu\text{mol/L}$, para homogeneizar os membros, na proporção de 1 grama de tecido para 10 mL de tampão.

Imediatamente após homogeneização, foi realizada a determinação da atividade enzimática em cada um dos diferentes pH de homogeneização, sendo que o restante de cada amostra foi armazenado a -70°C para ensaios posteriores nos tempos: 0,5; 1; 2; 7; 15 e 30 dias.

4.4.3 Estudo do efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade das fosfatases

O efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade das enzimas foi observado utilizando-se amostras homogeneizadas, em solução tampão TRIS.HCl 5 mmol/L, pH 7,5 contendo MgCl_2 2 mmol/L e ZnCl_2 1 $\mu\text{mol/L}$, e armazenadas a -70°C . A determinação das atividades foi realizada nas temperaturas de 20, 25, 27, 30, 35, 37, 40 e 45°C , durante os tempos de 1, 5, 10, 15, 20 e 25 minutos.

4.4.4 Estudo da inativação térmica da atividade das fosfatases

O efeito da inativação térmica das atividades das enzimas foi determinado incubando-se as amostras nas temperaturas de 40, 45, 50, 55 e 60°C, durante os tempos de 1, 5, 10, 20, 30 e 60 minutos, com posteriores ensaios na temperatura de 37°C.

4.5 Determinação da atividade de PNFFase das fosfatases ácida e alcalina nos diferentes estádios de desenvolvimento larval

Após a padronização dos parâmetros cinéticos, foi realizada atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina nos vários estádios estudados.

A atividade de PNFFase das fosfatases ácida e alcalina foi determinada descontinuamente nas condições ótimas de ensaio de pH e temperatura pré-determinados pelos testes de padronização, através da formação do íon *p*-nitrofenolato ($\epsilon=17600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 13), a partir da hidrólise do *p*-nitrofenilfosfato (PNFF) 5 mmol/L, em um volume final de 1 mL, com posterior leitura realizada em espectrofotômetro, da marca Hitachi®, modelo U-2000, a 410 nm.

A reação enzimática foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação e interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 1 mol/L. As determinações foram efetuadas em triplicatas de três homogeneizados diferentes de cada estágio e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise de substrato sempre inferior a 5%. Em cada experimento foram incluídos controles sem a reação enzimática para se estimar a hidrólise espontânea 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, nas condições de ensaio.

4.6 Efeito do pH sobre a atividade da PC-1

O efeito do pH sobre a atividade da enzima PC-1 foi estudado utilizando-se soluções tampão AMPOL (pH 8,5-11,0), em concentração de 79 mmol/L. A atividade da enzima PC-1 foi determinada descontinuamente a 37°C, a partir da hidrólise de timidina 5'-monofosfato *p*-nitrofenil éster (TMPN) 1 mmol/L, em um volume final de 1 mL, com posterior leitura realizada em espectrofotômetro, da marca Hitachi®, modelo U-2000, a 410 nm.

4.7 Determinação da atividade da PC-1 nos diferentes estádios de desenvolvimento larval

A atividade da PC-1 foi determinada descontinuamente em tampão, previamente estabelecido (item anterior), contendo 1 mmol/L de TMPN.

A reação enzimática foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de reação e interrompida pela adição de 900 μ L de NaOH 100 mmol/L. Após agitação, a absorbância foi determinada a 410 nm.

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

4.8 Efeito do pH sobre a atividade de ATPase e de PPiase da fosfatase alcalina

O efeito do pH sobre a atividade de ATPase e de PPiase foi estudado utilizando-se soluções tampão TRIS.HCl (pH 7,0-8,5) e AMPOL (pH 8,5-10,5), em concentração final de 50 mmol/L.

4.9 Determinação da atividade de ATPase e de PPiase da fosfatase alcalina nos diferentes estádios de desenvolvimento larval

A atividade de ATPase e PPiase foi determinada descontinuamente a 37°C, através da dosagem de fosfato inorgânico liberado a partir da hidrólise de ATP (2 mmol/L) ou de PPi (1 mmol/L), em um volume final de 0,4 mL, de acordo com o método descrito por Heinonen e Lahti (1981), e modificado por Pizauro e colaboradores (1995).

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida com 0,1 mL de solução gelada de TCA 50%, em tempos previamente estabelecidos, sendo imediatamente colocados em banho de gelo para diminuir a hidrólise espontânea do substrato (ATP ou PPi).

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

Em cada experimento foram incluídos controles, sem adição da enzima, para se estimar a hidrólise espontânea do substrato. As determinações foram realizadas em triplicatas, sendo que menos de 5% do substrato foi hidrolisado.

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

4.10 Dosagem de proteína

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

4.11 Forma de análise dos resultados

Foi feita a análise estatística, sendo que as diferenças entre os estádios foram analisadas pelo programa “SAS system” versão 9.0, considerando-se uma repetição biológica com três repetições experimentais. 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

O estudo do efeito do armazenamento da amostra de tecido ósseo dos membros anteriores e posteriores de girinos sobre a atividade das fosfatases ácida (Figura 3) e alcalina (Figura 4) revelou que as enzimas apresentaram comportamento similar em todos os pH testados, tanto para a atividade da fosfatase ácida quanto para a fosfatase alcalina, optando-se assim pelo pH 7,5 para a homogeneização e armazenamento do extrato enzimático uma vez que não foi detectada nenhuma diminuição da atividade enzimática durante pelo menos trinta dias, e pelo fato de estar próximo ao pH fisiológico, permitindo estabelecer uma relação mais próxima dos processos biológicos *in vivo* nos testes *in vitro*. Além disso, o pH 7,5 foi o escolhido entre todos os testados, uma vez que ele se encontra entre os dois pH ótimo aparente de hidrólise do PNFF pelas fosfatases ácida e alcalina e já havia sido empregado anteriormente por outros autores com bons resultados (PIZAURO, 1993; CASANOVA et al., 2008; COLOSIO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2011; SANTANA et al., 2012; SANTOS et al., 2012).

Figura 3 – Estabilidade da fosfatase ácida do tecido ósseo dos membros de *L. catesbeianus* no estágio 46, em diferentes tempos de armazenamento e em diferentes pH.

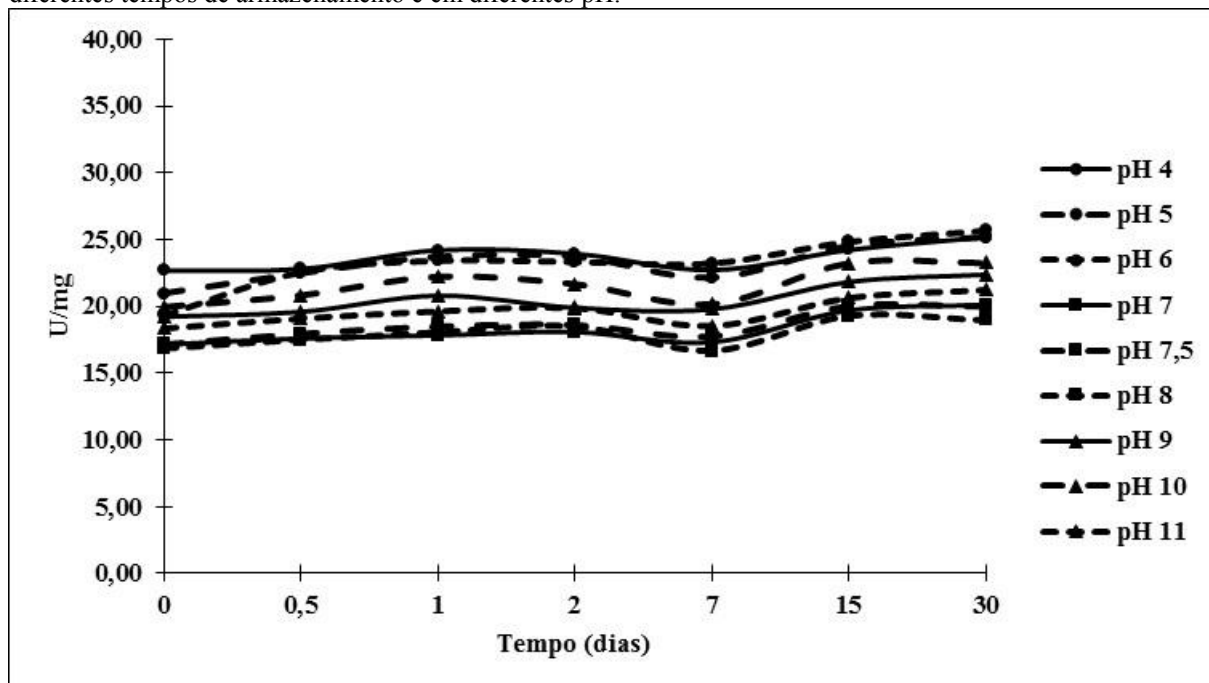
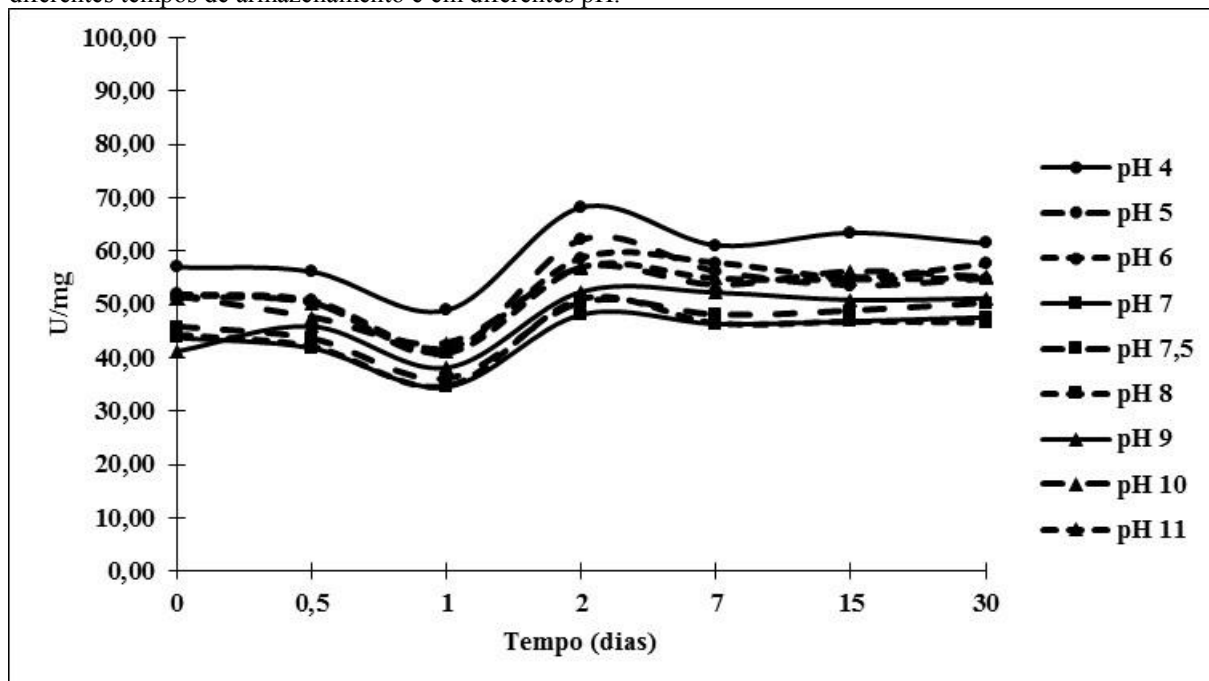


Figura 4 – Estabilidade da fosfatase alcalina do tecido ósseo dos membros de *L. catesbeianus* no estágio 46, em diferentes tempos de armazenamento e em diferentes pH.



O estudo do efeito da temperatura e do tempo de reação, sobre a atividade das fosfatases ácida (Figura 5) e alcalina (Figura 6) revelou que a temperatura e o tempo de reação, ótimos para a atividade da fosfatase ácida foi de 45°C em 5 minutos, enquanto que para a fosfatase alcalina foi de 45°C em 1 minuto. Porém, para possibilitar a comparação entre diferentes trabalhos (PIZAURO, 1993; CASANOVA et al., 2008; COLOSIO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2011; SANTANA et al., 2012; SANTOS et al., 2012) foi adotada a temperatura de 37°C para realização dos ensaios enzimáticos. Os tempos de reação adotados nessa temperatura foram de 5 minutos para a fosfatase alcalina e 10 minutos para a fosfatase ácida, evitando-se assim um consumo de substrato superior a 5% e mantendo-se a linearidade de formação do produto.

Na figura 5 não foram apresentados os resultados de 20 e 25 minutos de hidrólise do substrato realizados nas temperaturas de 35°C a 45°C devido ao excessivo consumo de substrato e consequente liberação de fosfato, um inibidor da atividade das fosfatases (PIZAURO, 1993).

Figura 5 – Atividade da fosfatase ácida do tecido ósseo dos membros de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 45, realizada em diferentes tempos e temperaturas.

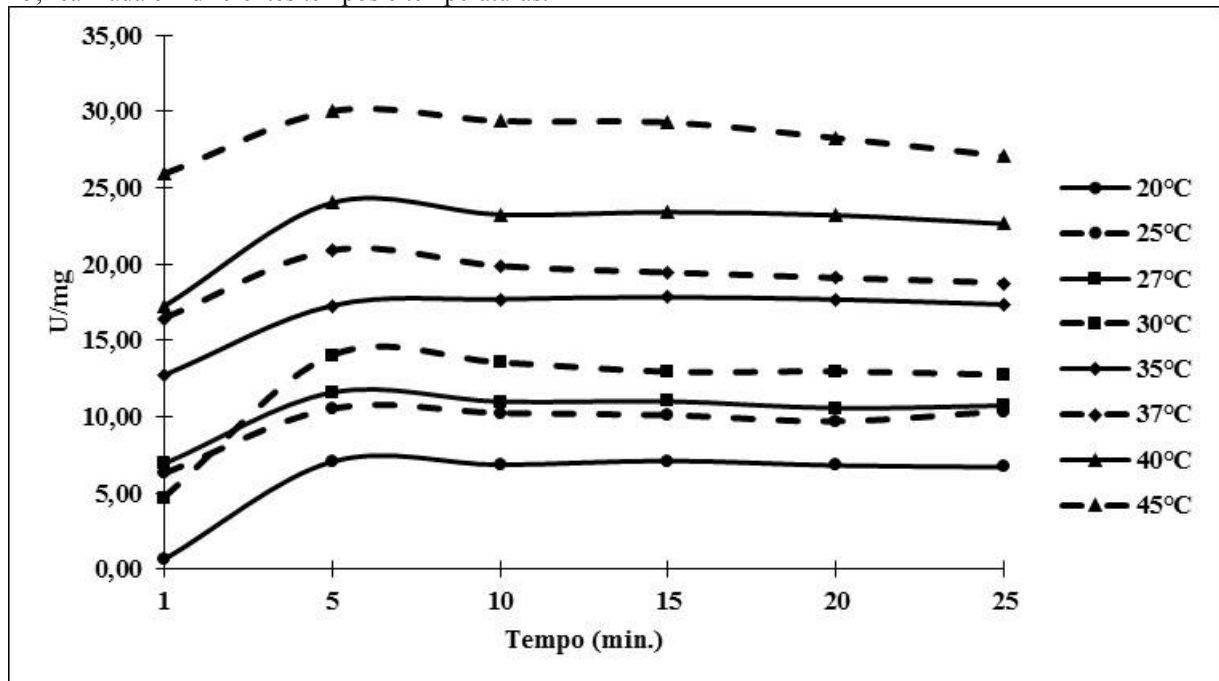
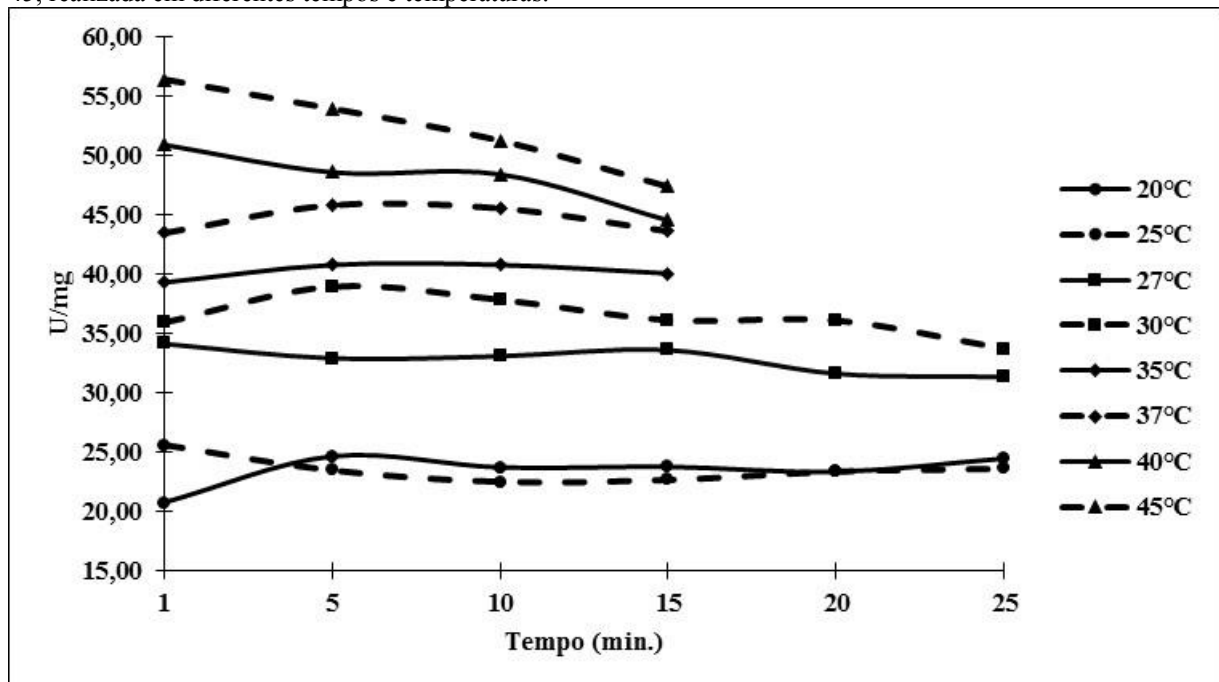


Figura 6 – Atividade da fosfatase alcalina do tecido ósseo dos membros de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 45, realizada em diferentes tempos e temperaturas.

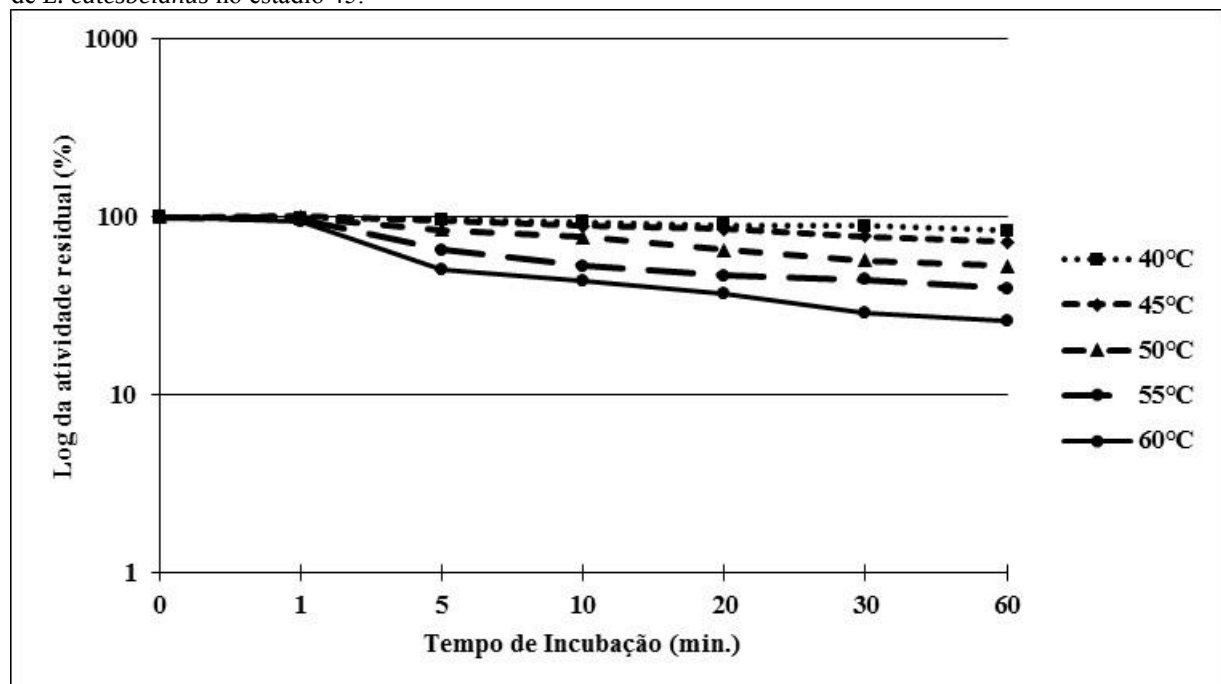


O estudo da inativação térmica das fosfatases revelou que a atividade da fosfatase alcalina (Figura 8) permanece praticamente constante até 45°C, apresentando considerável inativação após 20 minutos a 50°C e após 1 minuto a 55°C, com $t_{1/2}$ em aproximadamente 60 minutos a 55°C e 10 minutos a 60°C, sugerindo que as ligações que mantêm a configuração nativa da fosfatase alcalina foram afetadas. No caso da fosfatase ácida (Figura 7) ocorrem

alterações na atividade a partir dos 40°C, com $t_{1/2}$ em aproximadamente 20 minutos a 55°C e em 10 minutos a 60°C, sugerindo que a temperatura também afeta a conformação desta enzima.

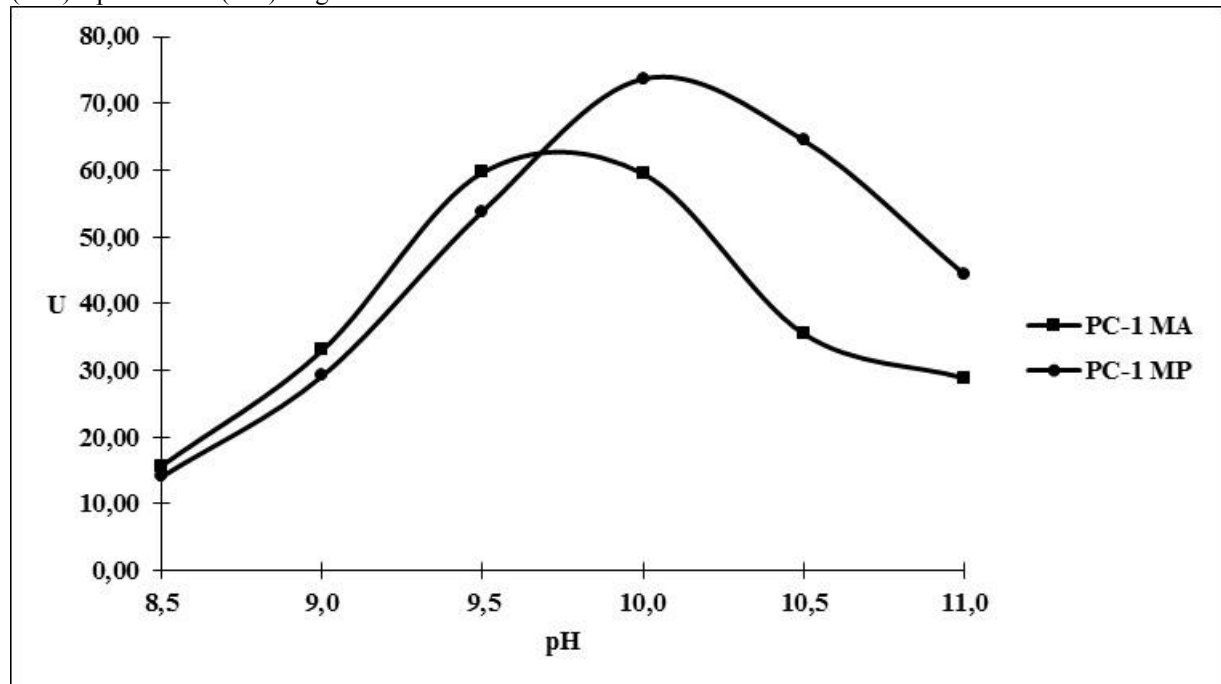
A estabilidade térmica das enzimas estudadas (Figuras 7 e 8) está acima da temperatura corpórea média do animal (aproximadamente 27°C), fato que pode ter relação com a ocupação do animal nos diferentes ambientes, aquático e terrestre, durante as fases de sua vida (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Figura 7 – Efeito da inativação térmica na atividade da fosfatase ácida do tecido ósseo dos membros de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 45.



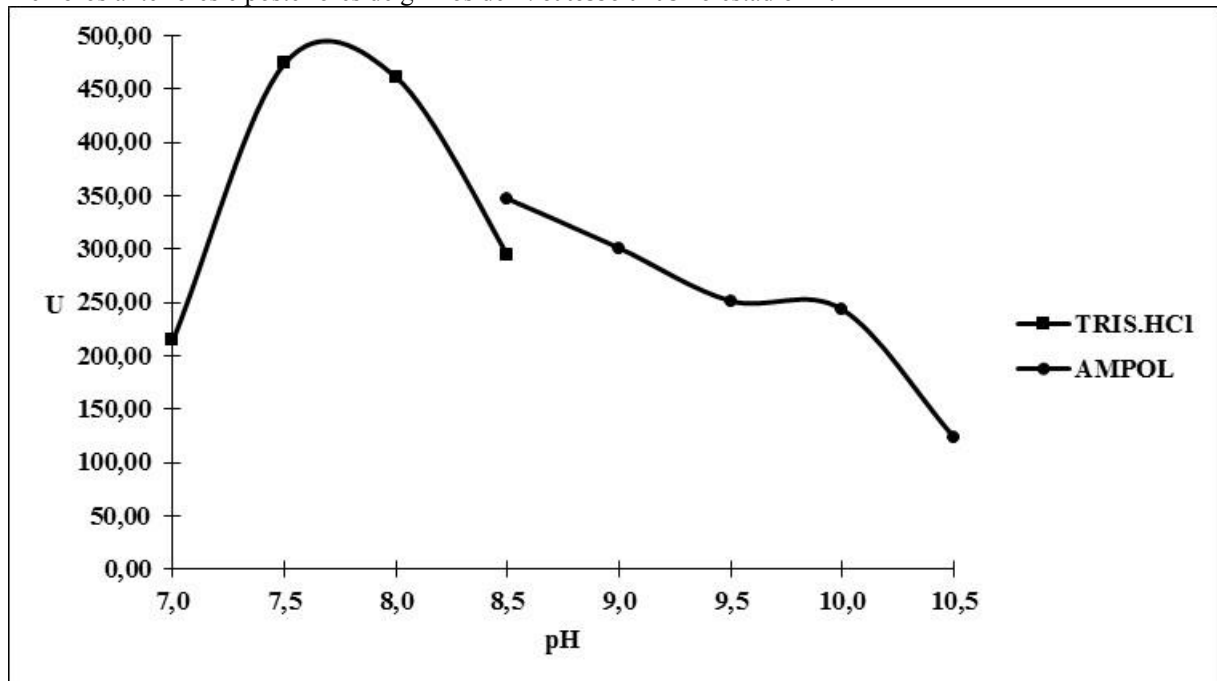
O estudo do efeito do pH sobre a atividade da enzima PC-1 revelou que os pH ótimos aparentes de hidrólise do TMPN, foram, 9,5 e 10,0 (Figura 10), para os membros anteriores e posteriores, respectivamente, optando-se pelo pH 10,0 para facilitar as comparações entre as atividades nos membros.

Figura 10 – Efeito do pH sobre a atividade da PC-1 presente no tecido ósseo ossos dos membros anteriores (MA) e posteriores (MP) de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 41.



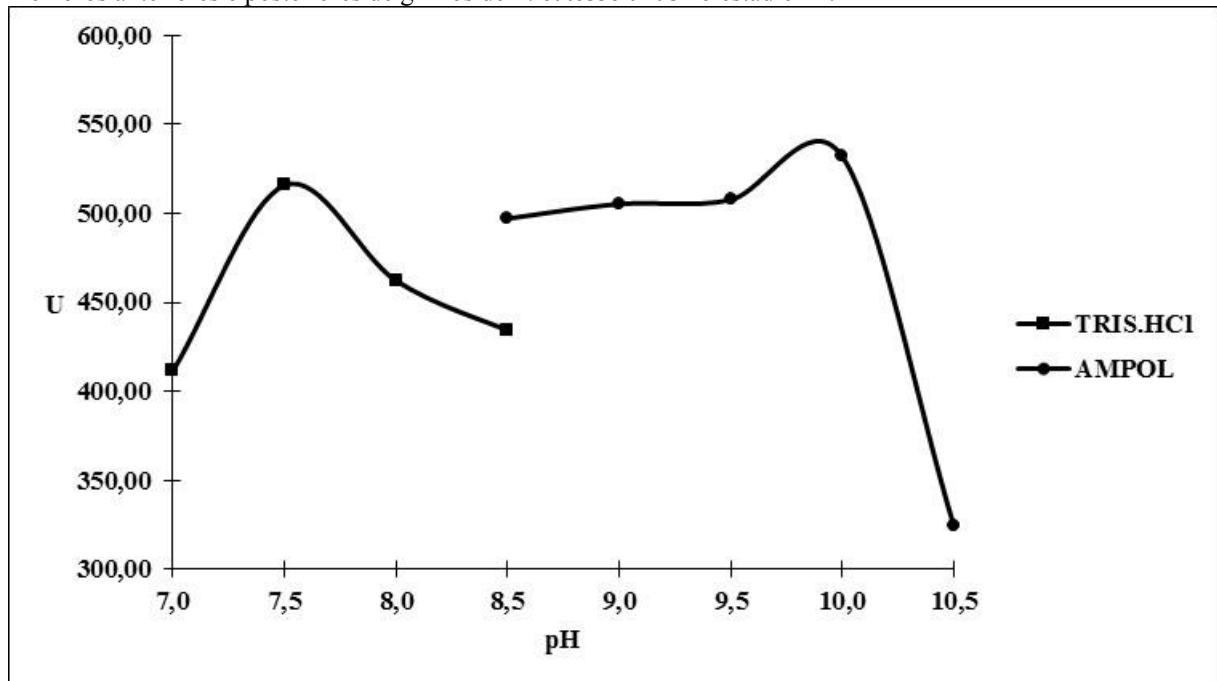
O estudo do efeito do pH sobre a atividade de ATPase revelou que o pH ótimo aparente de hidrólise do ATP, foi de 7,5 (Figura 11), resultado semelhante ao mostrado no trabalho de Pizauro e colaboradores (1998), que propõe a existência de uma ATPase específica que participa do processo de ossificação da placa óssea de rato.

Figura 11 – Efeito do pH sobre a atividade de ATPase da fosfatase alcalina do tecido ósseo, de um *pool* de membros anteriores e posteriores de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



O estudo do efeito do pH sobre a atividade de PPiase revelou dois pH ótimos aparente com valores muito próximos, em 7,5 e em 10,0, (Figura 12), optando-se pelo pH 10,0, no qual a hidrólise do PPi foi levemente maior, e pelo fato de que provavelmente trata-se da atividade da fosfatase alcalina em seu papel principal como uma PPiase, ao invés de indicar a atividade de uma PPiase específica, como sugerido por Leone e colaboradores (1998), que utilizaram placa óssea de rato em seus estudos.

Figura 12 – Efeito do pH sobre a atividade de PPIase da fosfatase alcalina do tecido ósseo de um *pool* de membros anteriores e posteriores de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 44.



As informações sobre o estudo de enzimas envolvidas no processo de ossificação de girinos são escassas na literatura, o que dificulta a comparação dos resultados.

Durante o processo de metamorfose, os anuros passam por transformações morfológicas necessárias à transição da vida aquática para a terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003), sendo uma delas o remodelamento de boa parte do esqueleto (TRUEB; HANKEN, 1992).

O estudo das atividades das fosfatases ácida e alcalina, presentes no tecido ósseo dos membros anteriores e posteriores de girinos de *L. catesbeianus*, durante o período de desenvolvimento dos membros revelou que a fosfatase alcalina (Figura 13) apresenta maior atividade que a ácida (Figura 14) tanto nos membros anteriores quanto nos posteriores, provavelmente devido ao fato de estar ocorrendo formação dos membros (McDIARMID; ALTIG, 1999), pois a fosfatase alcalina é considerada um marcador de osteoblastos, os quais têm como principal função a formação óssea, enquanto a fosfatase ácida é um marcador bioquímico dos osteoclastos, células responsáveis pela remodelação óssea (JOHNSON et al., 2000).

Figura 13 – Atividade de PNFFase da fosfatase alcalina do tecido ósseo dos membros anteriores (FALMA), estágio 41 ao 46, e posteriores (FALMP), estágio 38 ao 46, de girinos de *L. catesbeianus*.

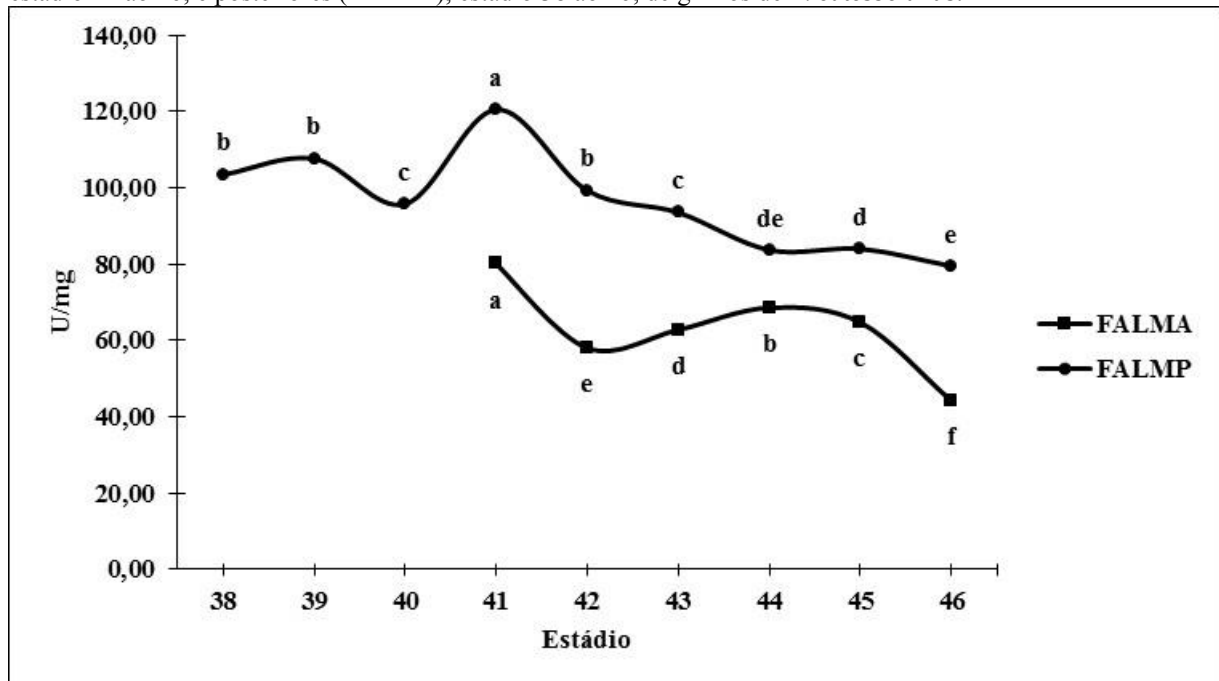
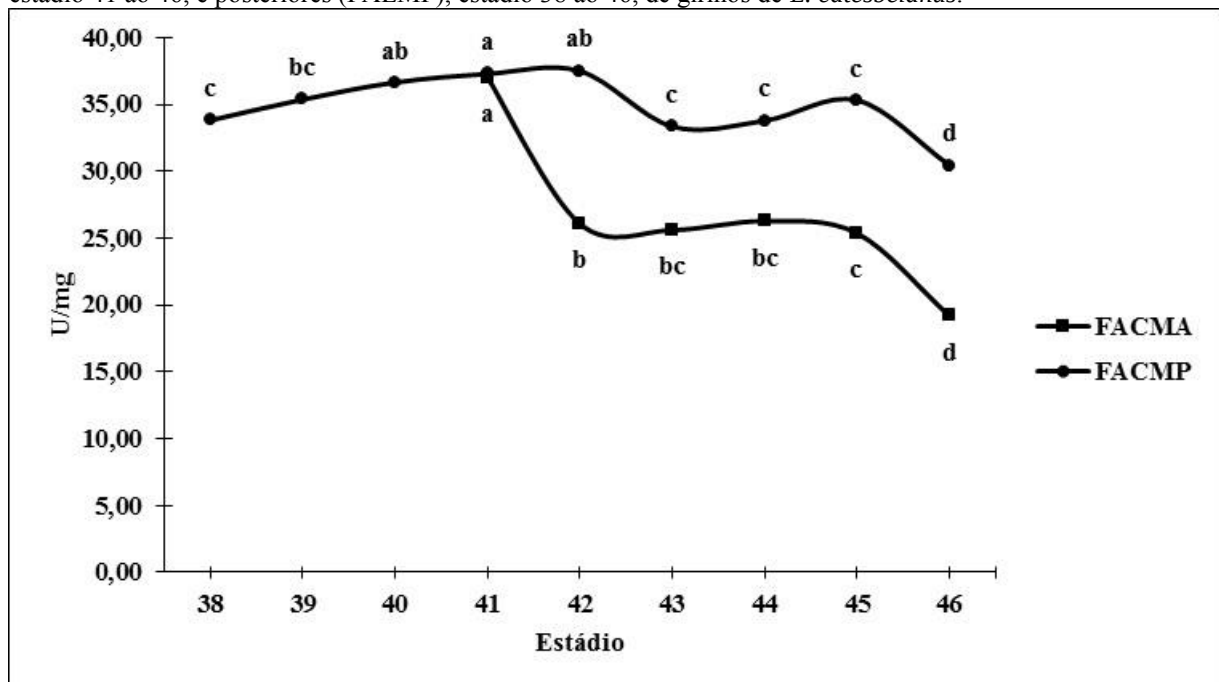


Figura 14 – Atividade de PNFFase da fosfatase ácida do tecido ósseo dos membros anteriores (FALMA), estágio 41 ao 46, e posteriores (FALMP), estágio 38 ao 46, de girinos de *L. catesbeianus*.



Nos membros anteriores, a atividade da fosfatase alcalina (Figura 13 e Tabela 1) apresentou maior atividade no estágio 41. Segundo Kemp e Hoyt (1969) esse comportamento pode ser atribuído à formação dos ossos em *Rana pipiens*, ainda dentro da cavidade opercular, primeiramente do úmero, seguido por rádio e ulna, separadamente, com posterior fusão. A transição do estágio 41 para o 42 é marcada por uma queda desta atividade, coincidindo com

o momento de exteriorização dos membros anteriores, sendo necessária a manutenção destes, devido ao início da mudança de ambientes, seguido por aumento até o estágio 44, período de crescimento e enrijecimento do tecido ósseo para a locomoção terrestre, e por fim ocorre queda nos estádios 45 e 46, o que pode ser explicado pela mudança no tipo de ossificação, pois com o final da metamorfose termina a calcificação periosteal e, inicia-se a endocondral na fase adulta do animal (McDIARMID; ALTIG, 1999; FELISBINO, 2001). Durante todo este período, a atividade da fosfatase ácida (Figura 14 e Tabela 1) apresenta o mesmo padrão da fosfatase alcalina, porém sempre menos ativa, revelando a dependência que existe entre a formação e a remodelação óssea. (JOHNSON et al., 2000).

No caso dos membros posteriores, a atividade da fosfatase alcalina (Figura 13 e Tabela 2) apresenta aumento do estágio 38 ao 41. Estudos realizados por Kemp e Hoyt (1969) com *Rana pipiens*, mostraram que nesta fase ocorre formação óssea, no sentido proximal-distal e fora da cavidade corporal, primeiramente do fêmur e depois da tíbia e da fíbula, separadamente, seguido por fusão dos dois últimos. A partir do estágio 42 ocorre diminuição da atividade, provavelmente devido à manutenção do tecido ósseo, já formado, capacitando o animal a explorar o ambiente terrestre, além de utilizar mais os membros para a natação, já que a absorção da cauda é iniciada, e o animal necessita de maior rigidez na estrutura óssea ao invés de crescimento deste tecido, até o estágio 46 (McDIARMID; ALTIG, 1999).

A atividade da fosfatase ácida (Figura 14 e Tabela 2) aumenta de forma discreta do estágio 38 ao 42, o que pode estar relacionado com a remodelação óssea dos membros posteriores sem prejuízo do crescimento. A partir do estágio 42 houve decréscimo com discreta variação até o 46, possibilitando a manutenção e rigidez dos membros (McDIARMID; ALTIG, 1999).

Tabela 1 – Médias e coeficientes de variação das atividades (U/mg) das enzimas do tecido ósseo dos membros anteriores de girinos de *Lithobates catesbeianus*.

Média da atividade enzimática (Membros Anteriores)					
Estádio de Desenvolvimento	Fosfatase Ácida	Fosfatase Alcalina	PC-1	ATPase	PPiase
41	37,17 ^a	80,58 ^a	19,36 ^d	484,09 ^a	333,15 ^a
42	26,20 ^b	57,62 ^e	22,45 ^{cd}	342,55 ^b	287,00 ^b
43	25,78 ^{bc}	64,05 ^d	27,32 ^{ab}	205,83 ^d	290,04 ^b
44	26,00 ^{bc}	72,19 ^b	28,18 ^a	260,27 ^c	245,73 ^c
45	25,14 ^c	68,45 ^c	27,89 ^{ab}	255,73 ^c	247,48 ^c
46	19,01 ^d	46,78 ^f	24,18 ^{bc}	155,97 ^e	227,58 ^c
CV%	1,29	1,21	5,45	5,25	4,35

As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2 – Médias e coeficientes de variação das atividades (U/mg) das enzimas do tecido ósseo dos membros posteriores de girinos de *Lithobates catesbeianus*.

Média da atividade enzimática (Membros Posteriores)					
Estádio de Desenvolvimento	Fosfatase Ácida	Fosfatase Alcalina	PC-1	ATPase	PPiase
38	33,64 ^c	103,51 ^b	25,44 ^e	186,33 ^c	319,27 ^c
39	35,10 ^{bc}	103,55 ^b	26,90 ^e	232,54 ^b	378,72 ^b
40	36,44 ^{ab}	90,85 ^c	27,42 ^e	302,39 ^a	425,70 ^a
41	37,16 ^a	122,33 ^a	42,33 ^a	145,06 ^d	391,36 ^{ab}
42	36,74 ^{ab}	100,24 ^b	40,47 ^{ab}	113,67 ^e	288,10 ^c
43	33,85 ^c	91,84 ^c	34,35 ^d	122,20 ^e	320,70 ^c
44	33,97 ^c	82,39 ^{de}	36,67 ^{cd}	89,56 ^f	239,34 ^d
45	34,54 ^c	82,96 ^d	40,38 ^{ab}	83,39 ^f	202,44 ^{de}
46	29,52 ^d	77,89 ^e	38,11 ^{bc}	80,95 ^f	195,97 ^e
CV%	1,71	1,77	3,08	3,63	4,75

As médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

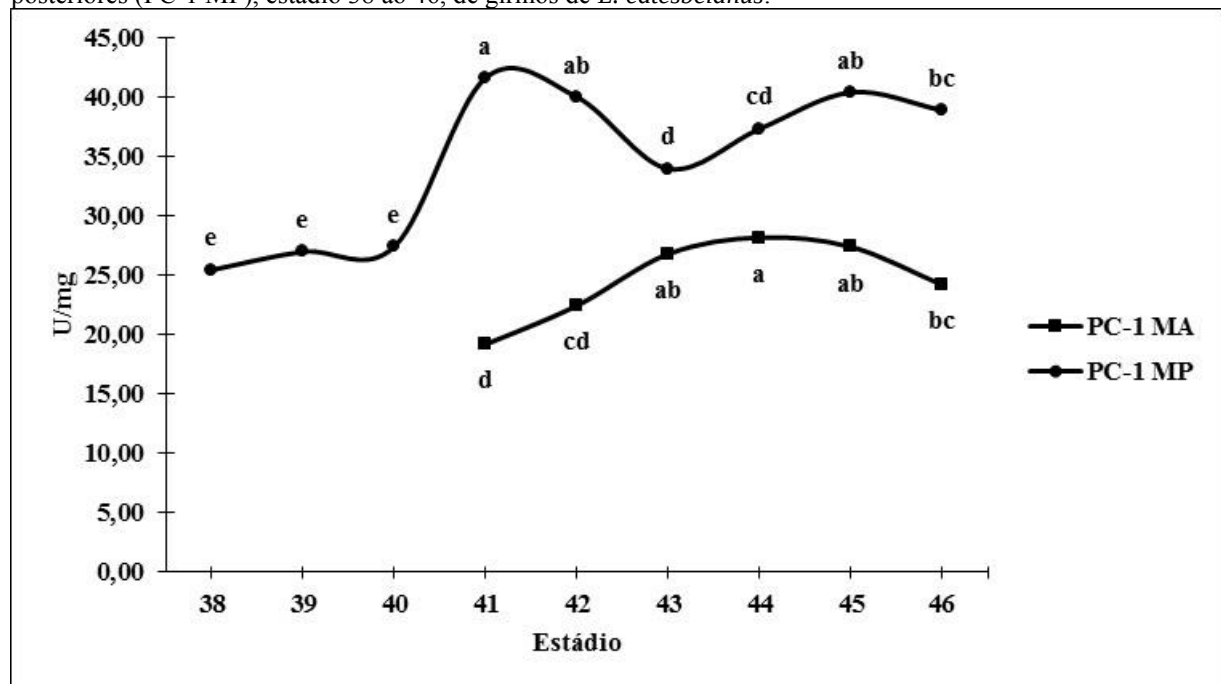
Os girinos de anuros, em sua maioria, são classificados como herbívoros filtradores, porém na fase adulta, tornam-se carnívoros, explorando, assim, diferentes recursos durante as fases de sua vida (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Devido a esta mudança no hábito alimentar, os girinos ficam sem se alimentar durante o clímax metamórfico, apresentando grande redução da atividade das enzimas digestivas (SANTOS et al., 2010) e obtendo energia e fósforo através da absorção da cauda (GONÇALVES et al., 2011).

Estudos sugerem que, pelo fato dos girinos não se alimentarem durante o clímax metamórfico, armazenam cálcio, antes deste período, em uma estrutura denominada saco endolinfático (PILKINGTON; SIMKISS, 1966), com o objetivo de subsidiar, dentre outros processos, a ossificação dos membros e a calcificação de todo o esqueleto, processos que dependem também do fósforo liberado durante a absorção da cauda (GONÇALVES et al., 2011).

Pilkington e Simkiss (1966) estudando *Rana temporaria* observaram decréscimo da reserva de cálcio no saco endolinfático durante o clímax metamórfico. Tal fato pode estar relacionado com o decréscimo das atividades das fosfatases alcalina (Figura 13) e ácida (Figura 14) nos membros, a partir do estágio 41, e com o aumento da atividade destas mesmas enzimas na cauda de girinos de *Lithobates catesbeianus* (GONÇALVES et al., 2011) durante este importante período, já que os processos de ossificação e calcificação são caracterizados pela deposição de fósforo de cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita (PIZAURO et al., 2002).

Durante o período estudado, a enzima PC-1 (Figura 15) apresentou tendência de aumento de sua atividade, tanto nos membros anteriores quanto nos membros posteriores, apresentando picos de atividade nos estádios 41 e 45, nos membros posteriores. Considerando-se que a PC-1 hidrolisa ATP em PPi (substrato da fosfatase alcalina), e a fosfatase alcalina também pode hidrolisar ATP em Pi, sugere-se que a atividade destas duas enzimas são dependentes, porém, devido a uma série de outros fatores, como a regulação alostérica da ATPase (PIZAURO et al., 1993) e da PPiase (LEONE et al., 1998), e como os níveis destes compostos no meio extracelular não estão perfeitamente estabelecidos (PIZAURO et al., 1993), ainda não se pode ter uma conclusão irrefutável. Além disso, o PPi pode ser considerado um potente inibidor do processo de calcificação biológica, logo, a sua produção pela PC-1 e degradação pela fosfatase alcalina devem ocorrer de forma a controlar a formação e fortalecimento ósseo nos diferentes estádios, dependendo da utilização dos membros nas diferentes fases de vida do animal (ADDISON et al., 2007). Portanto, o sincronismo entre as atividades da PC-1 e da fosfatase alcalina, bem como de outras moléculas envolvidas no processo, determina se a formação e fortalecimento do tecido ósseo estão ocorrendo durante o desenvolvimento dos membros dos girinos (*COLOSIO et al., 2014*).

Figura 15 – Atividade da PC-1 presente no tecido ósseo dos membros anteriores (PC-1 MA), estádio 41 ao 46, e posteriores (PC-1 MP), estádio 38 ao 46, de girinos de *L. catesbeianus*.



A atividade da PC-1 (Figura 15) tende a aumentar enquanto a da fosfatase alcalina (Figura 13), a diminuir, tanto nos membros anteriores quanto nos membros posteriores, porém com valores relativamente menores. De acordo com Millán (2012), o principal papel da PC-1 é a síntese do PPi e a função secundária é de liberação do fósforo para calcificação no interior da vesícula. Enquanto que a fosfatase alcalina seria a principal responsável pela produção do Pi por meio de sua atividade de PPiase e de ATPase. Segundo Millán (2012), o primeiro passo da mineralização mediada pelas vesículas extracelulares envolve a convergência de duas vias independentes. No primeiro estágio a geração de Pi intravesicular depende da ação da PHOSPHO1 e o influxo de Pi, via Pi transportador, gerado no espaço perivesicular por meio da ação da fosfatase alcalina e da PC-1. Além disso, este autor admite ainda que a calcificação fora das vesículas é dependente primariamente da atividade de PPiase da fosfatase alcalina e secundariamente da atividade da PC-1, as quais disponibilizam o Pi para a deposição de cristais nas fibras do colágeno.

De acordo com o modelo proposto por Millán (2012), faz-se necessária a interação entre três enzimas para iniciar o processo de ossificação, sendo elas a PHOSPHO1, a fosfatase alcalina e a PC-1, o que coincide com a suposição de Felisbino (2001) de que, na cartilagem de crescimento, a fosfatase alcalina é constitutiva e somente sua atividade não é suficiente para realizar a calcificação da cartilagem hipertrófica. Este fato corrobora com o resultado da atividade da PC-1 que está presente de forma crescente durante o período estudado, sendo necessário mais estudos com a enzima PHOSPHO1 para se esclarecer o mecanismo de calcificação biológica.

Apesar da atividade da PC-1 representar cerca da metade dos valores da fosfatase alcalina, o aumento de sua atividade durante o período estudado, ao contrário da fosfatase alcalina que mostra queda, pode-se inferir que, inicialmente, ambas as enzimas liberam Pi para o processo de ossificação, porém em um segundo momento, o controle do processo de calcificação seria realizado por meio da relação PPi/Pi presentes no fluido extravascular. Nestas condições a fosfatase alcalina passaria a atuar como PPiase e a PC-1 com sua função de ATP pirofosfotidrolase, exercendo seu papel como PPiase somente em situações de níveis extremos de PPi presente no meio, sendo a PC-1 uma enzima auxiliar à fosfatase alcalina em ambas as funções (MILLÁN, 2012).

A fosfatase alcalina presente em condrócitos e vesículas de matriz extracelulares de cartilagem calcificada, é uma fosfomonohidrolase não-específica, que tem a capacidade de hidrolisar uma variedade de substratos *in vitro*, dentre eles o ATP e o PPi (LEONE et al., 1998).

Os resultados do efeito do pH sobre a atividade de ATPase (Figura 11) da fosfatase alcalina mostrou que o pH ótimo aparente foi em 7,5, o qual encontra-se distante do pH ótimo aparente para hidrólise do PNFF (10,5), sugerindo que ou esta é uma atividade da fosfatase alcalina ou trata-se de uma ATPase específica, como demonstrado por Pizauro e colaboradores (1998). Entretanto, somente após estudos de competição de substrato e de inibidores é que poder-se-á obter resultados que contribuirão para a compreensão de qual é a enzima responsável por esta atividade.

Por outro lado, no caso da PPiase (Figura 12), o pH ótimo aparente foi em 10,0, relativamente próximo ao da hidrólise do PNFF (10,5), o que permite afirmar a possibilidade de ser a atividade da fosfatase alcalina sobre seu substrato fisiológico (PPi), conclusão fortalecida pela presença de outro pico de atividade em 7,5 que provavelmente indique a existência de uma PPiase específica, como defendido por Leone e colaboradores (1998).

Comparando-se as atividades de ATPase (Figura 16) e de PPiase (Figura 17) da fosfatase alcalina, tanto nos membros anteriores como nos membros posteriores, pode-se observar comportamentos semelhantes durante os estádios de desenvolvimento do animal, o que indica uma relação importante entre estas atividades, haja visto que o ATP é um modulador alostérico da fosfatase alcalina (PIZAURO et al., 1998), enquanto o PPi é considerado atualmente o verdadeiro substrato da enzima (LEONE et al., 1998).

Figura 16 – Atividade de ATPase do tecido ósseo dos membros anteriores (ATPase MA), estágio 41 ao 46, e posteriores (ATPase MP), estágio 38 ao 46, de girinos de *L. catesbeianus*.

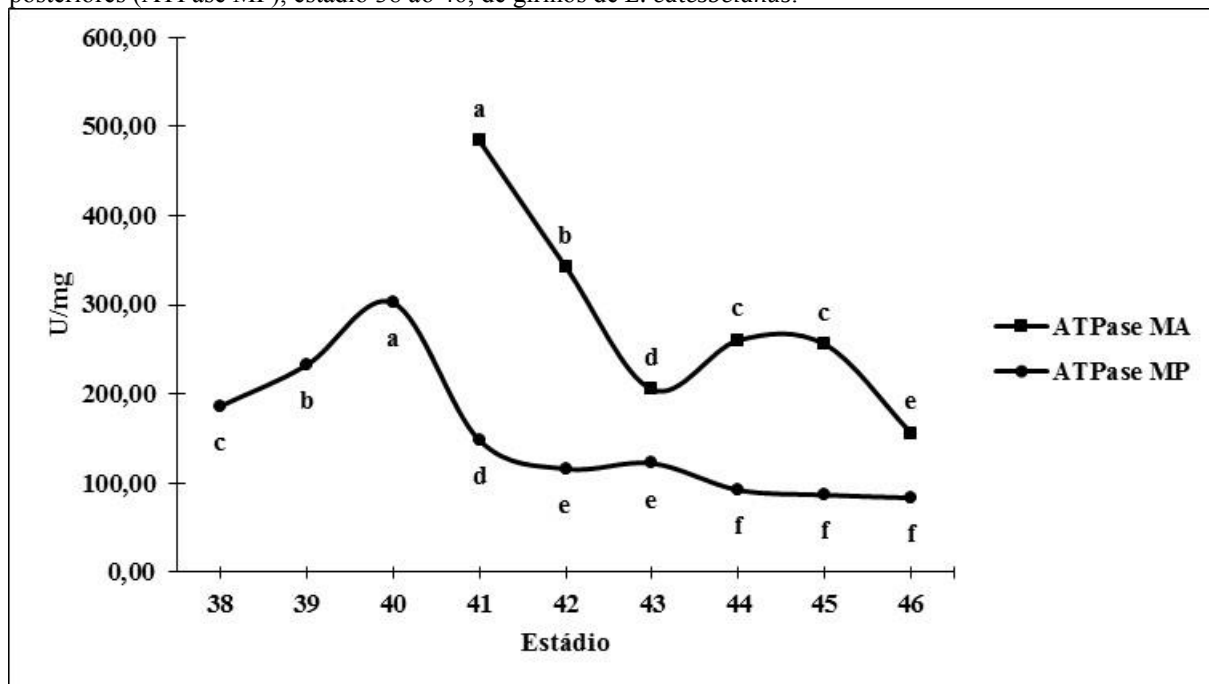
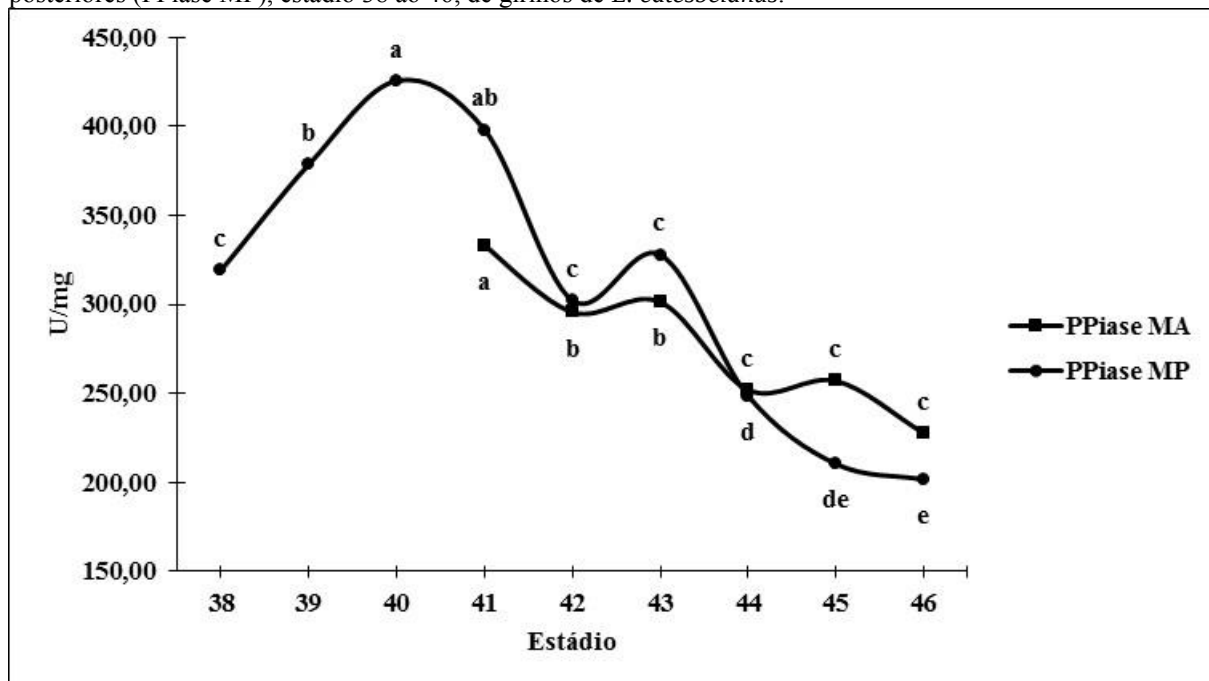


Figura 17 – Atividade de PPIase do tecido ósseo dos membros anteriores (PPIase MA), estágio 41 ao 46, e posteriores (PPIase MP), estágio 38 ao 46, de girinos de *L. catesbeianus*.



Nos membros posteriores, há um aumento das atividades de ATPase (Figura 16) e de PPIase (Figura 17) da fosfatase alcalina, do estágio 38 ao 40, seguido por decréscimo até o estágio 46. Já nos membros anteriores ocorre a diminuição destas atividades desde o estágio 41 até o 46. Estes resultados, assim como o da atividade de PNFFase (Figura 13) da fosfatase alcalina, confirmam o fato de que inicialmente ocorre a formação do tecido ósseo seguido de remodelação para formar osso trabecular nos membros dos girinos, de acordo com as necessidades de locomoção do animal nos diferentes ambientes, aquático e terrestre, podendo-se observar diminuição das atividades enzimáticas até o final da metamorfose (McDIARMID; ALTIG, 1999).

As atividades de ATPase (Figura 16) e de PPIase (Figura 17) da fosfatase alcalina apresentam valores maiores quando comparados ao da atividade de PNFFase (Figura 13), mostrando a importância da presença destes substratos livres no fluido intersticial, e da velocidade de liberação do fosfato para o processo de calcificação. O fluxo de nucleotídeos, que pode emanar das células para o fluido extracelular da cartilagem, provoca elevação da concentração dos nucleotídeos trifosfato, neste fluido, durante o processo de calcificação (HOWELL et al., 1968; PIZAURO et al., 1998). Logo, a utilização de concentrações saturantes de ATP, mimetizando aquela do fluido extracelular da cartilagem, apoia nossa suposição da importância do papel do ATP e do PPI no processo de ossificação durante o desenvolvimento dos membros dos girinos.

Segundo Wuthier e Register (1985), os níveis de nucleotídeo mono e difosfato no fluido extracelular é da ordem de 350 $\mu\text{mol/L}$, enquanto os de trifosfato estão muito baixos, o que dificulta a sua detecção. Níveis elevados de nucleotídeos defosforilados sugere uma possível atividade de ATPase da enzima em condições fisiológicas. Segundo Pizauro e colaboradores (1998), os níveis de NTP no fluido intersticial da cartilagem são muito baixos e insuficientes para acarretar efeito alostérico significativo na atividade enzimática. Uma possibilidade que não pode ser descartada é a de que durante o processo de calcificação pode ocorrer um fornecimento de ATP pelas células deste tecido acarretando aumento local dos níveis de ATP. Apesar do fluxo de compostos fosforilados para o fluido extracelular ainda não ter sido demonstrado *in vivo*, a concentração de fosfato inorgânico no fluido extracelular é significativamente mais elevada do que a do plasma sanguíneo (WUTHIER, 1977).

Para uma melhor compreensão do papel fundamental de cada enzima, na calcificação biológica, e dos mecanismos necessários para que este processo ocorra de forma precisa, faz-se necessário estudos mais aprofundados.

6 CONCLUSÕES

As atividades das fosfatases ácida e alcalina apresentaram comportamento similar, tanto nos membros anteriores quanto nos posteriores, sendo a da alcalina maior que a da ácida, o que sugere a participação destas enzimas no processo de ossificação, seja ele periosteal ou endocondral, durante o período de formação dos referidos membros.

O sincronismo entre as atividades da PC-1 e da fosfatase alcalina, bem como de outras enzimas e biomoléculas envolvidas no processo são essenciais para o entendimento da formação do tecido ósseo tanto em condições normais como patológicas.

Os padrões das atividades das enzimas estudadas mostram que o processo de ossificação ocorre de acordo com os períodos de formação e fortalecimento dos membros do animal, evidenciando as diferentes necessidades durante sua vida.

Mais estudos serão necessários para delimitar as diferenças entre os tipos de ossificação nas diferentes fases de vida do animal.

REFERÊNCIAS

- ADDISON, W. N.; AZARI, F.; SORENSSEN, E. S.; KAARTINEN, M. T.; MCKEE, M. D. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15872-15883, 2007.
- ALI, S. Y. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. **Federation Proceedings**, v. 35, n. 2, p. 135-142, 1976.
- ALI, S. Y.; EVANS, L. The uptake of [^{45}Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 2, p. 647-650, 1973.
- ANDERSON, H. C. Calcium-accumulating vesicles in the intercellular matrix of bone. In: **HARD tissue growth: repair and remineralization**. Amsterdam: Elsevier, 1973. p. 213-226. (Ciba foundation symposium, 11).
- ANDERSON, H. C. Matrix vesicle calcification. **Federation Proceedings**, v. 35, p. 105-108, 1976.
- ANDERSON, H. C. Molecular biology of matrix vesicles. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 314, p. 266-280, 1995.
- AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.
- BONUCCI, E. The locus of initial calcification in cartilage and bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 78, p. 108-139, 1971.
- CASANOVA, D. C.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; SANTOS, L. F. J.; SANDRINI, G. B. Comparison of mineralization process key enzymes in normal and tibial dyschondroplastic chickens. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 37.; CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO PAN-AMERICANA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 11., 2008, Águas de Lindóia. **Anais...** São Paulo: SBBQ, 2008. p. 91.
- CASWELL, A. M.; WHYTE, M. P.; RUSSELL, R. G. Normal activity of nucleoside triphosphate pyrophosphatase in alkaline phosphatase-deficient fibroblasts from patients with infantile hypophosphatasia. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 63, n. 5, p. 1237-1241, 1986.
- COLOSIO R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 40., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2011.

COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; MENEZES, M. P.; PIZAURO, J. M. Bone nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase and alkaline phosphatase activities during *Lithobates catesbeianus* limbs development. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 43., 2014, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2014.

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

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

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

ETKIN, W.; GILBERT, L. T. **Metamorphosis: a problem in developmental biology**. New York: Appleton Century Crofts, 1968. 459 p.

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

FELISBINO, S. L. **Aspectos celulares da cartilagem epifisária de rãs: elementos envolvidos nos processos de calcificação e crescimento ósseo**. 2001. 84 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

FROST, D. R. **Amphibian species of the world: an online reference**. Version 6.0. New York: American Museum of Natural History, 2014. Disponível em: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.html>>. Acesso em: 27 jan. 2015.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. Angiogenesis and bone growth. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 10, n. 5, p. 223-238, 2000.

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

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Partial characterization of phosphomonohydrolases from *Lithobates catesbeianus* tail during metamorphosis. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 40., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2011.

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

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

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

HOWELL, D. S.; PITA, J. C.; MARQUEZ, J. F.; MADRUGA, J. E. Partition of calcium, phosphate, and protein in the fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 47, n. 5, p. 1121-1132, 1968.

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

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

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

JEFFERIES, D.; HOUSTON, B.; LESTER, D.; WHITEHEAD, C. C.; THORP, B. H.; BOTMAN, M.; FARQUHARSON, C. Expression patterns of chondrocyte genes cloned by differential display in tibial dyschondroplasia. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1501, n. 2/3, p. 180-188, 2000.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 8, p. 135-152.

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

KEMP, N. E.; HOYT, J. A. Sequence of ossification in the skeleton of growing and metamorphosing tadpoles of *Rana pipiens*. **Journal of Morphology**, v. 129, n. 4, p. 415-443, 1969.

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

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

LEONE, F. A.; REZENDE L. A.; CIANCAGLINI, P.; PIZAURO, J. M. Allosteric modulation of pyrophosphatase activity of rat osseous plate alkaline phosphatase by magnesium ions. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 89-97, 1998.

LOVERIDGE, N.; FARQUHARSON, C. Studies on growth plate chondrocytes in situ: cell proliferation and differentiation. **Acta Paediatrica**, v. 82, 391, p. 42-48, 1993. Supplement.

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

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

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

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

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

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

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

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

PILKINGTON, J. B.; SIMKISS, K. The mobilization of the calcium carbonate deposits in the endolymphatic sacs of metamorphosing frogs. **Journal of Experimental Biology**, v. 45, n. 2, p. 329-341, 1966.

PIZAURO, J. M. **Fosfatase alcalina de placas ósseas: características cinéticas da enzima solubilizada com fosfolipase C de *B. thuringiensis***. 1993. 91 f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

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

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 121-129, 1995.

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

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

PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, n. 1, p. 108-114, 1998.

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

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

SANTANA, C. C.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO R. R.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Partial kinetic characterization of acid and alkaline phosphatases from different tissues of bull frog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 41., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2012.

SANTOS, L. F. J.; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; NAKAGHI, L. S. O.; STÉFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases activities in *Lithobates Catesbeianus* tadpoles digestive system during larval development. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 39., 2010, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2010.

SANTOS, L. F. J.; COLOSIO R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. Partial characterization of intestinal alkaline phosphatase from tadpoles bull frog (*Lithobates catesbeianus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 41., 2012, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2012.

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

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

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

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

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

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

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