

CAROLINE CARLA SANTANA

Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose

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

DADOS CURRICULARES

Caroline Carla Santana

1 Informações Pessoais

Nascimento: 24/11/1988 – Jaboticabal/SP – Brasil

Carteira de identidade: 41.776.156-9

CPF: 368.738.788-71

Endereço Profissional: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, Depto. De Tecnologia, Telefone: 16 32092675, Ramal 221

Endereço Eletrônico: carolbio9@yahoo.com.br

2 Formação Acadêmica

2013 - 2015

Mestrado em Biotecnologia

Instituto de Química – UNESP – Araraquara, IQ/UNESP, Brasil.

Título: Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2009 - 2012

Graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado)

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Jaboticabal, FCAVJ/UNESP, Brasil.

Título: Estudo da atividade das fosfatases ácida e alcalina presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

3 Produção Bibliográfica

3.1 Artigos aceitos para publicação

1. GONCALVES, A. M., SANTOS, L. F. J., **SANTANA, C. C.**, COLOSIO, R. R., PIZAURO, J. M. Tail phosphatases activity: a study during growth and metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. Copeia (Online), 2015.

3.2 Resumos publicados em anais de eventos

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

2. 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 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.
3. 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 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.
4. 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, Foz do Iguaçu. Anais da XLIII Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.
5. 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 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.
6. **SANTANA, C. C.**; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of Phosphomonohydrolases Present in the Liver of Bullfrog's Tadpoles During Metamorphosis. In: 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. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; **SANTANA, C. C.**; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of Acid and Alkaline Phosphatases Present in the Bone Tissue of *Lithobates catesbeianus* During the Limbs Development Period. 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. 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.
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 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.

10. SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; **SANTANA, C. C.**; PIZAURO, J. M. Partial Characterization Of Intestinal Alkaline Phosphatase From Tadpoles Bull frog (*Lithobates catesbeianus*). In: XLI 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.

3.2 Resumos expandidos publicados em anis de congresso

1. PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; ALARCON, M. F. F.; **SANTANA, C. C.** Caracterização Parcial de Fosfatase Alcalina de Frangos de Corte. In: XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013, Jaboticabal. Anais do XXV CIC - Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2013.

2. **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.

3. 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.

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.; **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.

3.3 Apresentação de Trabalho

1. **SANTANA, C. C.**; SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of Phosphomonohydrolases Present in the Liver of Bullfrog's Tadpoles During Metamorphosis. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. **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. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. **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*). 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; **SANTANA, C. C.**; PEREIRA, M. C. Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação. 2012. (Apresentação de Trabalho/Outra)
5. **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.
6. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; **SANTANA, C. C.**; PEREIRA, M. C. Desenvolvimento de girinos: estudos para criação, ecologia e conservação. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).

CAROLINE CARLA SANTANA

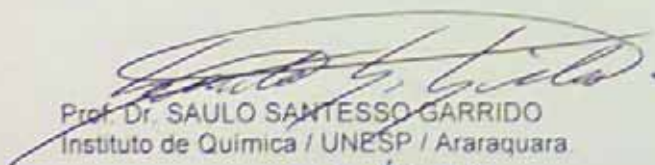
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 16 de abril de 2015.

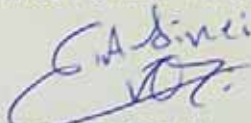
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. SAULO SANTESSO GARRIDO
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ
Centro Universitário Fundação Educacional de Barretos / UNIFEB / Barretos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais por todo incentivo e por mostrarem a importância do estudo na vida de uma pessoa, além de todo amor, carinho e dedicação. E à minha irmã, Fran, que foi essencial na minha construção como pessoa e, claro, com quem aprendi a amar a boa música.

Agradeço ao Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior pela orientação neste trabalho e pela minha formação como bióloga e agora mestre em Biotecnologia. Aos meus companheiros do Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA) que amenizaram todo nervosismo da vida acadêmica e fizeram com que esse trabalho ultrapassasse as barreiras da dificuldade, tornando-se parte de nossos cotidianos.

Às minhas companheiras de República, com quem dividi ótimos momentos e fizeram com que minha vida longe do ninho, fosse extremamente acolhedora e feliz, independente das TPMs, inevitáveis, de muitas mulheres ao mesmo tempo.

Ao Prof. Dr. Claudinei da Cruz e ao Prof. Dr. Saulo Santesso Garrido, membros da banca avaliadora deste trabalho, que muito o enriqueceram com seus elogios, críticas e sugestões.

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

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

E à alguns nomes que durante a minha formação marcaram as construções e experiências e, sem sombra de dúvidas, acompanharão as descobertas, os saberes e sabores que ainda presentearão meu paladar.

“Eu não tenho filosofia: tenho sentidos...
Se falo na Natureza, não é porque saiba o que ela é.
Mas porque a amo, e amo-a por isso,
Porque quem ama nunca sabe o que ama
Nem por que ama, nem o que é amar...”
(Alberto Caeiro - Fernando Pessoa)

RESUMO

O fígado é um órgão importante no metabolismo animal, sendo responsável pelo processamento e distribuição dos nutrientes, por meio da corrente sanguínea, para os outros órgãos e tecidos do organismo. Como o fígado é responsável pela realização de vários processos de síntese e tendo em vista a escassez de informação acerca das funções das fosfatases ácida e alcalina hepáticas, o presente trabalho teve por objetivo analisar as atividades dessas enzimas envolvidas no metabolismo de fósforo de girinos de rã-touro (*L. catesbeianus*) durante a metamorfose, visando gerar maiores informações sobre esse período da vida do animal e obtenção de imagos sadios. A metamorfose é uma etapa crucial no desenvolvimento dos anfíbios, sendo caracterizada por uma série de eventos que possibilitam aos girinos ocuparem o ambiente terrestre. Durante a metamorfose e fase adulta terrestre, a fosfatase ácida presente no fígado atua como um indicador da atividade lisossomal, o que pode ser observado pelo aumento de sua atividade no fim do clímax metamórfico, sugerindo aumento da morte celular devido ao reaproveitamento dos nutrientes. A fosfatase alcalina hepática, uma enzima de membrana, atua como fosfomonohidrolase e na detoxificação, principalmente ésteres de fosfato gerados durante o metabolismo animal. A diminuição da atividade da fosfatase alcalina quando utilizado um substrato artificial, demonstra a queda na geração de compostos secundários, devido a não ingestão de alimentos nessa fase de vida, enquanto que a utilização de um substrato fisiológico sugere um importante papel da mesma na proteção do organismo animal.

Palavras-chave: Rã touro; Fosfatases; Endotoxina; Lisossomos; Cinética de enzimas.

ABSTRACT

The liver is an important organ in animal metabolism, being responsible for the processing and distribution of nutrients through the blood system to other organs and tissues. Since the liver is responsible for various processes of synthesis and concerning the lack of information about the functions of liver acid and alkaline phosphatases, the aim of the study was to analyze the activities of these enzymes involved in phosphorus metabolism of bullfrog's tadpoles (*L. catesbeianus*) during metamorphosis, aiming to a better understanding about this period of life of the animal and to produce healthy juveniles. Metamorphosis is a crucial stage in amphibian's development, it is characterized by a series of events that enable tadpoles to occupy the terrestrial environment. During metamorphosis and terrestrial adult stage, the acid phosphatase present in the liver acts as an indicator of lysosomal activity, it can be observed by the increase in its activity at the end of the metamorphic climax, suggesting increased cell death due to recycling of nutrients. The liver alkaline phosphatase, a membrane bound enzyme, acts as a phosphomonohydrolase and in the detoxification of compounds, especially phosphate esters generated in animal metabolism. The decrease in alkaline phosphatase activity when an artificial substrate is used demonstrates a reduction in the generation of secondary metabolites because there is no food intake at this stage of life, on the other hand the use of a physiological substrate suggests an important role in protecting the organism.

Keywords: Bullfrog; Phosphatases; Endotoxin; Lysosomes; Enzyme kinetic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Animais experimentais	21
4.1.1 Classificação dos girinos.....	22
4.2 Obtenção dos extratos enzimáticos	22
4.3 Padronização e caracterização das atividades enzimáticas.....	23
4.3.1 Estudo do efeito do armazenamento da amostra	23
4.3.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina	23
4.3.3 Estudo do efeito da temperatura e do tempo de reação	24
4.4 Determinação da atividade <i>p</i> -nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases ácida e alcalina.....	24
4.5 Efeito do pH sobre a atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina	25
4.6 Determinação da atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina	25
4.7 Forma de análise estatística	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 Padronização das condições ideais de ensaio enzimático	27
5.2 Estudo das atividades enzimáticas	32
6 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO	47

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os anfíbios estão divididos em três linhagens distintas: Anura, Caudata e Gymnophiona, sendo os anuros, o grupo mais diversificado, que habita todos os continentes, com exceção da Antártida, desertos extremos e algumas ilhas oceânicas (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Os anfíbios são organismos altamente sensíveis a alterações climáticas, devido ao fato de, em geral, possuírem uma fase larval totalmente aquática e uma fase pós-metamórfica terrestre (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), além de necessidades especiais para sua dispersão (BORGES-MARTINS et al., 2007). Sendo assim, esses animais podem ser usados como indicadores ambientais.

A população mundial de anfíbios vem sofrendo acentuado declínio, fato que ainda não foi completamente esclarecido (SILVANO; SEGALLA, 2005; POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Algumas espécies foram extintas e muitas outras estão ameaçadas de extinção (STUART et al., 2004). Pesquisadores admitem a interferência humana como uma das possíveis responsáveis por esse declínio, destruindo seus habitats e modificando o equilíbrio de temperatura e umidade, além de introduzir espécies exóticas que podem predá-los, competir por alimentos e transmitir patógenos (CAREY; COHEN; ROLLINS-SMITH, 1998; ROLLINS-SMITH et al., 2002, 2011; STUART et al., 2004). A poluição do ar, solos e lagos por herbicidas, fungicidas e outros compostos químicos, que contaminam e acidificam os meios (STALLARD, 2001; BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003), bem como, o aumento da radiação ultravioleta-B (PAHKALA et al., 2002), também estão relacionadas com ações antrópicas.

A metamorfose, embora curta, é a etapa crucial no desenvolvimento dos anfíbios (MUNRO, 1953). Ela é caracterizada por uma série de eventos que proporcionam aos girinos de vida aquática condições adaptativas para a vida em ambiente terrestre (NAKAJIMA; YAOITA, 2003). As mudanças morfológicas são claramente visíveis, enquanto as fisiológicas e bioquímicas são difíceis de serem observadas.

Todas as transformações ocorridas durante a metamorfose são induzidas por hormônios tireoidianos (DUELLMAN; TRUEB, 1994), os quais agem individualmente em cada tipo celular (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), induzindo a proliferação de alguns e inibindo a de outros.

Segundo Rollins-Smith, Barker e Davis (1997) durante a metamorfose ocorrem alterações no sistema imunológico dos girinos, haja visto que as células de defesa encontradas nos organismos jovens dão lugar a novas células no animal adulto. Além disso, esses autores propõem que o hormônio glicocorticoide, encontrado em grande quantidade na metamorfose, induz a apoptose dos linfócitos dos girinos. Dessa forma os animais ficam susceptíveis a doenças nessa fase.

O fígado possui múltiplas funções, como excreção de produtos de degradação, secreção da bile, armazenamento de lipídios e glicogênio, síntese globulinas e albumina, esterificação de ácidos graxos livres, participação na hemocitopoese e do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras, regulando a concentração de metabólitos no sangue (DELLMANN; BROWN, 1982; GUYTON; HALL, 2002), dessa forma, alterações em suas funções básicas, bem como sua composição enzimática, podem prejudicar o desenvolvimento desses organismos.

As diferentes formas isozímicas de fosfatases têm sido utilizadas como marcadores biológicos visando compreender o seu papel nos diferentes tecidos. Tendo em vista que o fígado é responsável pela realização de vários processos de síntese e a escassez de informação em anfíbios, o estudo das atividades da fosfatases ácida, um marcador de atividade lisossomal, e da fosfatase alcalina, hepatoprotetora, pode gerar informações acerca do seu papel no processo de detoxificação e na mudança de habitat durante a passagem da forma de girino para a adulta em rã-touro.

2 OBJETIVO

O presente estudo teve por objetivo analisar as atividades das fosfatases ácida e alcalina envolvidas no metabolismo de fósforo de girinos de *L. catesbeianus* durante a metamorfose.

3 REVISÃO DE LITERATURA

O desconhecimento de técnicas adequadas de manejo, alimentação, qualidade da água e instalações são as principais causas de morte nos girinos (RIBEIRO FILHO, 1998). Para criação de girinos e imagos e, conseqüentemente, adultos saudáveis e de boa qualidade, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de manejo adequadas.

Wilbur (1972) demonstrou que os animais possuem tempos de desenvolvimento variáveis, envolvidos com diversos aspectos ecológicos, como a produção de inibidores de crescimento e a disputa por alimento e espaço. Outro aspecto que tem relação com a duração da metamorfose é a origem das proteínas ingeridas pelos girinos. Proteínas de origem vegetal desempenham maior papel no crescimento corporal em detrimento ao tempo de metamorfose (VEIGA, 1989). Esse grande desenvolvimento corporal pode ser prejudicial ao animal jovem, uma vez que suas estruturas de captação de alimentos não estão preparadas para suprir as necessidades energéticas de um corpo tão grande (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Os girinos, na maioria dos casos, são completamente diferentes dos organismos adultos, tanto morfológica como ecologicamente. Os girinos, em geral, são onívoros com tendência à herbivoria, enquanto os pós-metamórficos são carnívoros, possibilitando assim às larvas explorarem recursos que não estão disponíveis aos adultos, não havendo competição entre larvas e animais metamorfoseados (POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

Dentre as várias mudanças morfofisiológicas, que ocorrem durante a metamorfose, destacam-se a adequação do trato gastrointestinal de um animal herbívoro para carnívoro; a absorção da cauda, para o salto e reutilização de nutrientes, devido ao fato de que no clímax metamórfico o animal não obtém alimentos de forma exógena; a diversificação do aparato bucal, período em que os girinos se tornam predadores (POUGH; JANIS; HEISER, 2008); a remodelação de boa parte do esqueleto (TRUEB; HANKEN, 1992); e transformações bioquímicas no fígado (ATKINSON; WARKMAN; CHEN, 1998), possibilitando mudança na excreção dos compostos nitrogenados, de amônia para ureia, na maioria das espécies.

Um evento de grande relevância durante a metamorfose é o destino dos compostos nitrogenados gerados no catabolismo de proteínas e aminoácidos. Nos girinos o produto final de excreção é a amônia, sendo classificados nessa fase de vida como organismos

amoniotélicos; já em meio terrestre, a maioria dos adultos excreta a ureia, sendo denominados ureotélicos (BROWN; BROWN; COHEN, 1959). O metabolismo desses compostos nitrogenados ocorre, principalmente, no fígado e envolve uma série de reações catalisadas por enzimas responsáveis pela produção de amônia ou ureia. Cohen, Brucker e Morris (1978) demonstraram que a conversão da excreção de amônia, nos girinos, para ureia, nas rãs adultas, é acompanhada por um aumento da regulação das enzimas do ciclo da ureia, presentes no fígado, durante a metamorfose.

Ocorrem também transformações em vários outros órgãos e sistemas, como a pele (SUZUKI et al., 2009), os órgãos respiratórios (DODD; DODD, 1976), o sistema imune (ROLLINS-SMITH, 1998), o cérebro e a medula espinhal (KOLLROS, 1981), os olhos (HOSKINS, 1986; MANN; HOLT, 2001), as narinas (HIGGS; BURD, 2001), a pituitária (KIKUYAMA et al., 1993; BUCKBINDER; BROWN, 1993; HUANG et al., 2001), os fibroblastos (BERRY; SCWARTZMAN; BROWN, 1998) e o sistema hematopoiético (WEBER, 1996). Todas essas transformações são induzidas por hormônios tireoidianos (GUDERNATSCH, 1912; apud DUELLMAN; TRUEB, 1994), os quais agem individualmente em cada tipo celular (POUGH; JANIS; HEISER, 2008), induzindo a proliferação de alguns e inibindo a de outros.

O fígado é o centro de processamento, armazenamento e distribuição de nutrientes absorvidos no trato gastrointestinal, da corrente sanguínea para os outros órgãos e tecidos, sendo responsável também pela eliminação de substâncias tóxicas ao organismo, através da bile, além da produção de proteínas plasmáticas (GUYTON; HALL, 2002; NELSON; COX, 2011), dessa forma uma disfunção de suas atividades poderia comprometer o desenvolvimento e a obtenção de imágos sadios e, conseqüentemente, a produção de carne (LANA et al., 2000). Durante a metamorfose o fígado dos girinos passa por mudanças bioquímicas como a indução de enzimas do ciclo da ureia, síntese de albumina e aumento da produção de ácido ribonucleico (BENNETT; GLENN; SHELDON, 1970).

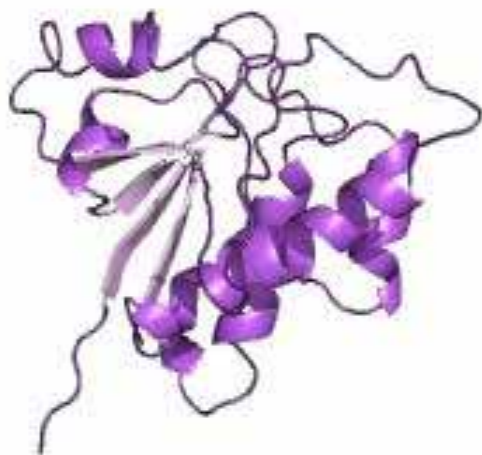
Os hepatócitos são as principais células presentes no fígado produzindo cerca de 95% das proteínas plasmáticas, além de armazenar carboidratos e lipídeos, que são utilizados em períodos que o animal não se alimenta (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). As células de Kupffer também são responsáveis pela síntese de proteínas plasmáticas, além de outras funções como digestão de hemoglobinas e secreção de proteínas ligadas ao

sistema imune. Essas células são muito ativas durante o processo fagocitário. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

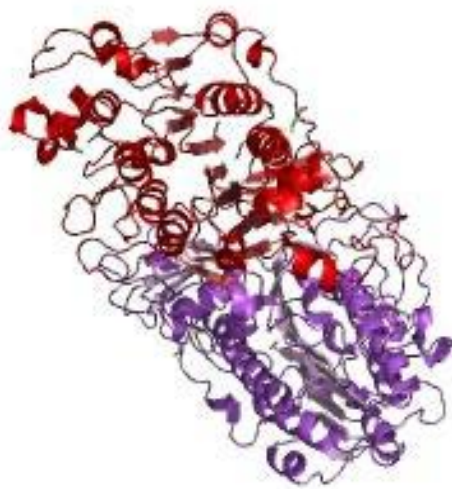
No início do desenvolvimento dos girinos, os hepatócitos apresentam-se arranjados em forma cordonal, ricos em vitelo e lipídios os quais são consumidos com o passar do tempo (VIERTEL; RICHTER, 1999). Durante a metamorfose, são observadas mudanças citológicas nos hepatócitos, e não na histologia do órgão. Tata (1971) e Dauça e colaboradores (1983), observaram alterações na forma do retículo endoplasmático granular, das mitocôndrias e peroxissomais. Assim, as modificações que ocorrem no fígado durante a metamorfose estão associadas às alterações bioquímicas, das quais podemos citar: aumento na produção de albumina e ceruloplasmina (TATA, 1999), modificações da hemoglobina (THEIL, 1973) e produção de enzimas do ciclo da ureia (BROWN; BROWN; COHEN, 1959).

As fosfatases são fosfomonohidrolases capazes de hidrolisar monoésteres de fosfato, bem como catalisar reações de transfosforilação. A classificação das fosfatases pode ser feita de acordo com o pH ótimo de atuação, podendo ser ácidas, neutras e alcalinas. A ação enzimática é caracterizada, em geral, pela interação entre o centro ativo e o substrato. A atividade da enzima pode sofrer interferência de diferentes fatores, tais como concentração do substrato e da enzima, composição do meio de reação, temperatura, pH, presença ou ausência de íons, inibidores, entre outros (NELSON; COX, 2011).

Além dos diferentes pH de atuação, as fosfatases ácida e alcalina se distinguem quanto ao mecanismo de ação. Segundo Neumann (1968), a fosfatase ácida, uma enzima monomérica (Figura 1), necessita de um átomo de oxigênio entre o fosfato e o sítio ativo para que ocorra hidrólise ou síntese de fosfomonoésteres. Enquanto que a fosfatase alcalina, dimérica (Figura 2), necessita de íons metálicos tanto para a manutenção de sua configuração nativa como para a catálise (PIZAURO, 1993), a fosfatase ácida não depende desses íons para manter a sua configuração e atividade (CHAIMOVICH; NOME, 1970).

Figura 1 – Estrutura da fosfatase ácida.

Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/>

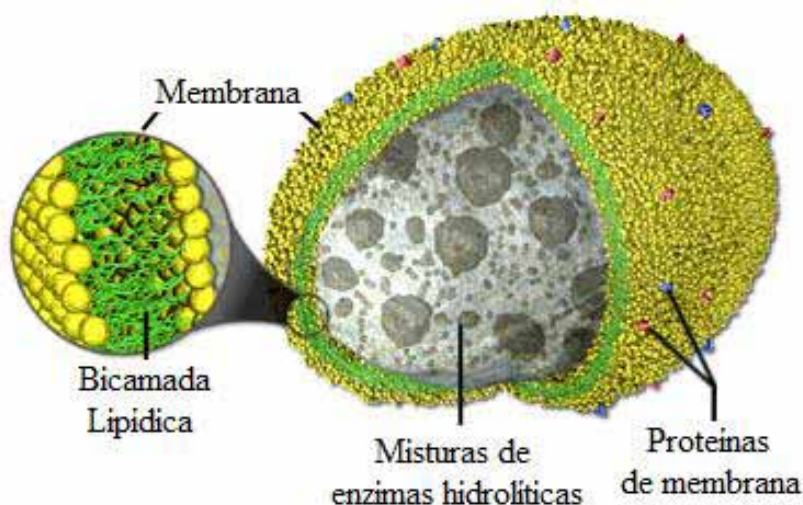
Figura 2 – Estrutura da fosfatase alcalina.

Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/>

É importante ressaltar que o fósforo é o segundo mineral mais abundante no organismo animal, participando da composição do ATP, dos fosfolipídios, dos ácidos nucleicos, de metabólitos fosforilados gerados nos processos degradativos, na regulação da atividade enzimática, na fisiologia do tecido ósseo e calcificação biológica, dentre outras, sendo um nutriente essencial para os seres vivos (PIZAURO et al., 1998).

A fosfatase ácida atua como um marcador de atividade lisossomal, sendo que cerca de 70-80% dessa enzima pode ser encontrada nos lisossomos e o restante em outras organelas ou na fração solúvel da célula hepática (SHIBKO; TAPPEL, 1963). O lisossomo é uma organela que tem contato direto com a membrana da célula e possui enzimas hidrolíticas, em sua maioria de caráter ácido (Figura 3), responsáveis pela digestão de macromoléculas que entram na célula, sendo de suma importância para proteção do organismo (CRUZ et al., 2012). É responsável também pela renovação e degeneração de outras organelas celulares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Figura 3 – Estrutura anatômica do lisossomo.

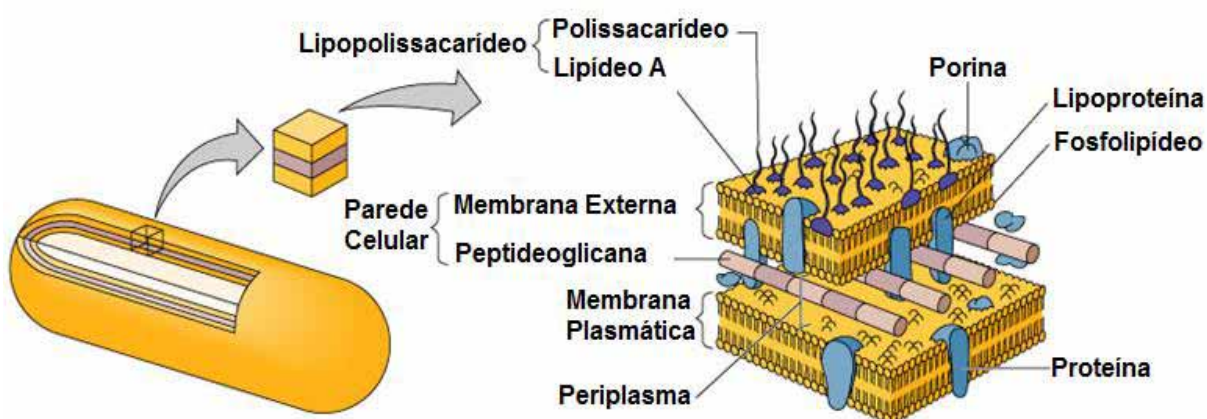


Fonte: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/lysosomes/lysosomes.html> (modificada pela autora)

A fosfatase alcalina hepática é uma enzima tecido não-específica encontrada em vários outros tecidos do organismo (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979), além de estar presente em diversos grupos de seres vivos, como micro-organismos e mamíferos (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979). Álvaro e colaboradores (2000) propuseram que a fosfatase alcalina hepática é uma enzima de membrana que, além de sua atividade de ATPase, possui importante papel na detoxificação de endotoxinas do organismo.

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula tóxica oriunda da membrana de bactérias gram-negativas que colonizam os organismos (Figura 4). O LPS possui uma parte denominada de lipídeo A que determina sua toxicidade. Nesta região são encontrados dois grupos fosfatos ligados a duas glicosaminas (RIETSCHEL et al., 1994). A remoção de um dos grupos fosfatos acarreta na diminuição da toxicidade da molécula (KOYAMA et al., 2002). Poelstra e colaboradores (1997) foram os primeiros a sugerir o papel da fosfatase alcalina na detoxificação de LPS.

Figura 4 – Composição da parede celular de uma bactéria gram-negativa.



Fonte: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap04/ss4.html> (modificada pela autora)

O fígado é o principal órgão responsável pela remoção de endotoxinas. O LPS liberado das membranas bacterianas é transportado da corrente sanguínea pelas células de Kupffer e endoteliais, onde são modificados e encaminhados para os hepatócitos (HORI et al., 1998). O LPS, então, é excretado por meio da bile (TREON; THOMAS; BROITMAN, 1993). Devido ao fato da fosfatase alcalina estar presente no fígado e sofrer influências de várias doenças hepáticas, ela apresenta um papel fundamental na proteção contra endotoxinas presentes nos animais, evidenciando a importância do estudo dessa enzima no processo de metamorfose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

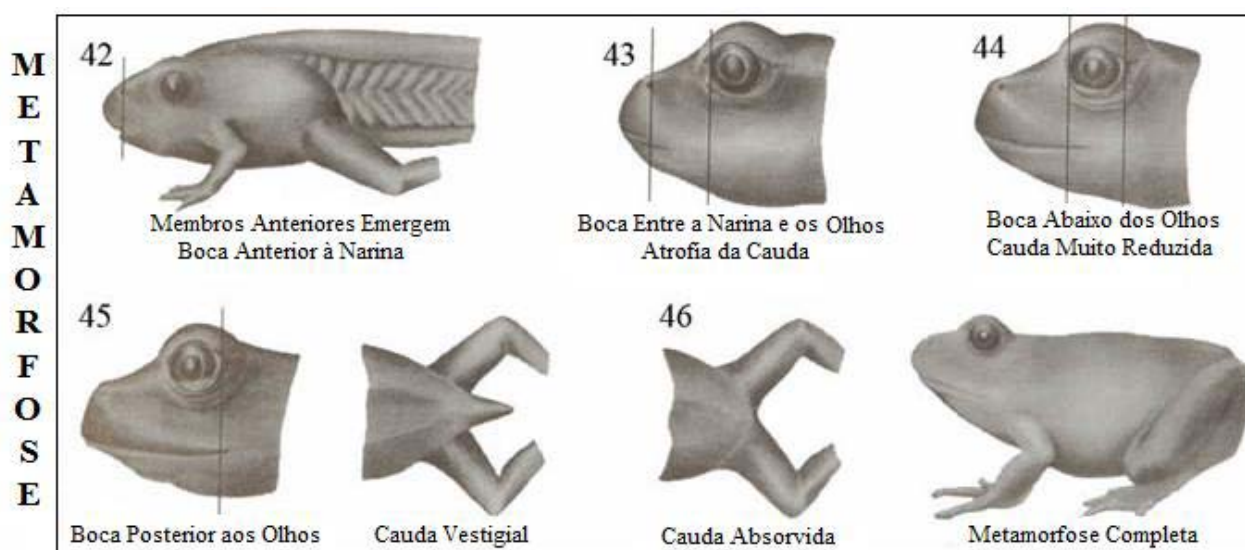
4.1 Animais experimentais

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 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV/UNESP), Campus de Jaboticabal – São Paulo.

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 011552/13, estando, portanto, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os girinos de *L. catesbeianus* foram acondicionados em tanques com capacidade para 2000 litros, onde a densidade utilizada foi de um girino para cada dois litros de água, com temperatura média de 27 °C. Para alimentação foi fornecida ração comercial para peixes, constituída por 40% de proteína bruta, 8% de extrato etéreo e 6% de matéria fibrosa, fornecida três vezes ao dia até aparente saciedade. As coletas foram realizadas semanalmente e os girinos separados por estádios de desenvolvimento no período de metamorfose (do 42 ao 46), segundo a tabela de Gosner (1960) (Figura 5).

Figura 5 – Tabela de Gosner (1960), utilizada para classificar os girinos em estádios de desenvolvimento de 42 ao 46.



Fonte: Gosner, 1960 (modificada pela autora)

4.1.1 Classificação dos girinos

Os girinos de *L. catesbeianus* foram classificados segundo a tabela de Gosner (1960) e a tabela de Etkin (1968). A tabela de Gosner (1960) baseia-se em critérios morfológicos para classificar os animais. Esta classificação é dividida em 46 estádios de desenvolvimento. O desenvolvimento embrionário ocorre do estágio 1 ao 25. Os estádios que vão do 26 ao 35, correspondem a fase de crescimento do corpo e desenvolvimento dos membros posteriores. Do 36 ao 41, há estabilização do crescimento corporal e maturação dos membros posteriores. A metamorfose propriamente dita ocorre do estágio 42 ao 46 (Figura 5), onde há o desenvolvimento dos membros anteriores, a absorção da cauda e a reestruturação da mandíbula.

Etkin (1968) define o desenvolvimento dos girinos em fases de crescimento de acordo com os níveis de hormônios tireoidianos, sendo elas: pré-metamorfose, que compreende os estádios 1 ao 30 (GOSNER, 1960); pró-metamorfose, que começa no estágio 31, com o início do desenvolvimento dependente dos hormônios da tireoide, e vai até o estágio 41 (GOSNER, 1960); e clímax, ou metamorfose propriamente dita, do estágio 42 ao 45 (GOSNER, 1960), a qual é subdividida em três fases: inicial, média e tardia.

4.2 Obtenção dos extratos enzimáticos

Para obtenção dos extratos enzimáticos, trinta girinos de cada estágio da metamorfose foram anestesiados em gelo e guilhotinados (CZESNIK et al., 2006), posteriormente os fígados foram retirados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C para serem utilizados em análises posteriores. Para a padronização das atividades foi realizado um *pool* de 15 fígados a fim de minimizar as diferenças individuais.

Os fígados foram homogeneizados em um aparelho tipo turrax marca OMNI modelo GLH-2511, em tampão TRIS.HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5 contendo MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e ZnCl₂ 1 μmol.L⁻¹, na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 10000 *g* por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em lâ de vidro, aliquoteado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C.

Posteriormente, os mesmos foram utilizados para a determinação das atividades das fosfatases ácida e alcalina e dosagem de proteína presente nos extratos.

4.3 Padronização e caracterização das atividades enzimáticas

Com o objetivo de estabelecer as condições ideais para o estudo das atividades das fosfatases ácida e alcalina, foram realizados diferentes testes enzimáticos. Nos ensaios foram utilizados diferentes pH e tempos para o armazenamento das amostras; e diferentes pH, temperaturas e tempos ótimos para a reação enzimática.

Para a padronização das atividades das fosfatases ácida e alcalina o homogeneizado foi preparado de um *pool* de fígados de girinos de rã-touro do estágio 46 de desenvolvimento, de acordo com a tabela de Gosner (1960). Para a preparação das amostras foram utilizados cerca de 15 animais do referido estágio.

4.3.1 Estudo do efeito do armazenamento da amostra

O efeito do armazenamento da amostra sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi estudado utilizando-se as seguintes soluções tampão: Acetato (pH 4, 5 e 6), TRIS.HCl (pH 7 e 8) e AMPOL (pH 9 e 10), todos em concentração de 5 mmol.L⁻¹ e contendo MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e ZnCl₂ 1 µmol.L⁻¹, para homogeneização de 1 g de tecido hepático para 10 mL de tampão.

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

4.3.2 Efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina foi estudado utilizando-se tampões Acetato (entre pH 4,5 – 7,0), TRIS.HCl (entre pH 7,0 – 8,5) e AMPOL (entre pH 8,5 – 11), em concentrações finais de 87 mmol.L⁻¹. O pH de cada meio de reação foi medido antes e imediatamente após a reação afim de evitar variações maiores que 0,05 unidades. A reação foi iniciada pela adição do extrato enzimático ao meio de

reação, interrompida com 1 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹ e a determinação da atividade PNFFásica baseada na liberação do íon *p*-nitrofenolato.

4.3.3 Estudo do efeito da temperatura e do tempo de reação

O efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina foi observado utilizando-se amostras homogeneizadas em solução tampão TRIS.HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5 contendo MgCl₂ 2 mmol.L⁻¹ e ZnCl₂ 1 µmol.L⁻¹, e armazenadas a -70 °C. As atividades foram determinadas em temperaturas de 20, 25, 27, 30, 35, 37, 40 e 45 °C, durante tempos de 1, 3, 5, 10 e 15 minutos.

4.4 Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (PNFFásica) das fosfatases ácida e alcalina

A atividade PNFFásica das enzimas fosfatase ácida e alcalina foi determinada a 37°C, através da liberação 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⁻¹, em um volume final de 1 mL, em pH ótimos previamente estabelecidos, em 410 nm em espectrofotômetro, da marca Hitachi®, modelo U-2000.

A reação foi iniciada pela adição de 80 µL de extrato enzimático ao meio de reação e interrompida pela adição de 1 mL de NaOH 1 mol.L⁻¹. As determinações foram realizadas em triplicatas e as velocidades iniciais permaneceram constantes durante o tempo de incubação, assegurando-se uma hidrólise de substrato sempre inferior a 5%, a fim de se garantir sempre a velocidade máxima da reação. Em cada experimento foram incluídos controles sem a reação enzimática para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. 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.

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.

4.5 Efeito do pH sobre a atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina

O efeito do pH sobre a atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina foi estudado utilizando-se tampões TRIS.HCl (entre pH 6,5 – 8,5) e AMPOL (entre pH 8,5 – 10,5), em concentrações finais de 50 mmol.L⁻¹. O pH de cada meio de reação foi medido antes e imediatamente após a reação a fim de evitar variações maiores que 0,05 unidades. A determinação da atividade foi realizada como descrita abaixo.

4.6 Determinação da atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina

A atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina foi determinada descontinuamente, a 37 °C, através da dosagem do fosfato inorgânico liberado pela hidrólise do substrato, em tampão TRIS.HCl 50 mmol.L⁻¹, em pH 7,4, contendo MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹, ZnCl₂ 20 µmol.L⁻¹ e LPS (2 mg.mL⁻¹).

A reação foi iniciada pela adição da enzima ao meio de reação e interrompida pela adição de 100 µL de solução gelada de TCA 50% (p/v). Esse meio reacional foi centrifugado por 2 minutos a 10000 g. A dosagem do fósforo inorgânico presente no meio de reação foi efetuada de acordo com o método descrito por Pizauro e colaboradores (1995). 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. 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.

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.

4.7 Forma de análise estatística

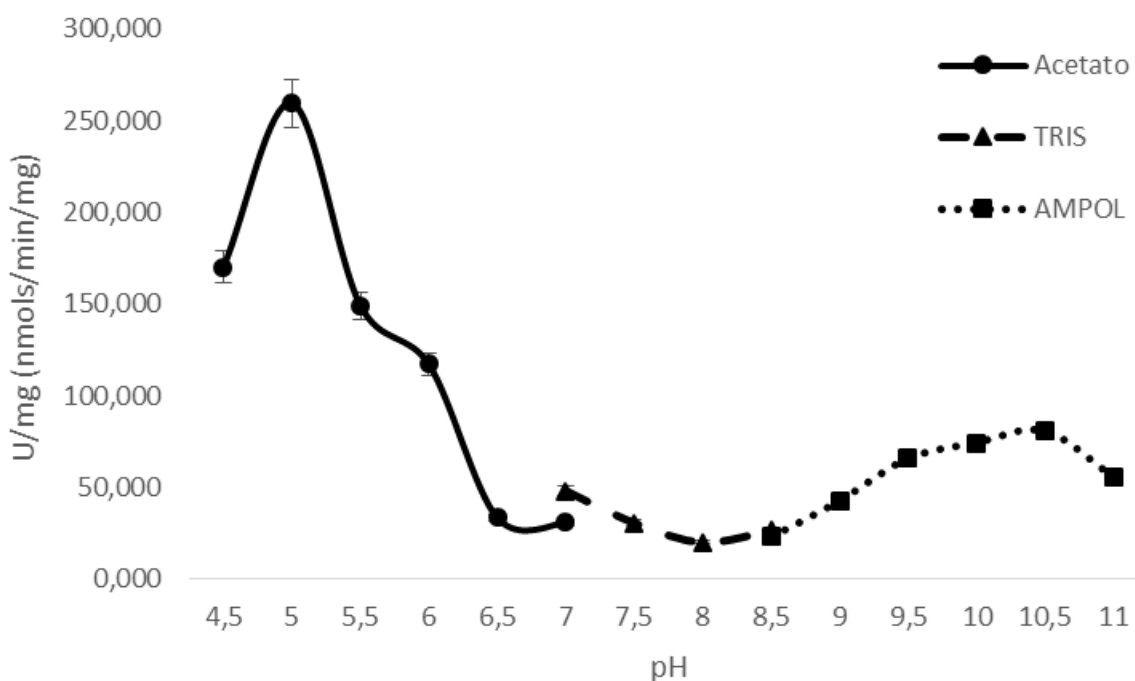
Foram realizadas médias de cada atividade enzimática dos animais de cada estágio da metamorfose. Posteriormente, os dados foram submetidos à Análise de Variância de uma classificação (ANOVA – oneway). Quando encontrada diferenças significativas entre as médias dos diferentes estágios, estas foram comparadas por meio do teste de Tukey. O nível de significância utilizado nos testes e na ANOVA foi 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Padronização das condições ideais de ensaio enzimático

O estudo do efeito do pH sobre a atividade enzimática revelou que os pH ótimos aparentes de hidrólise do PNFF foram de 5,0 e 10,5 para as enzimas fosfatases ácida e alcalina, respectivamente (Figura 6). Esses resultados são semelhantes aos descritos em fosfatases de diferentes origens, como membros e cauda de girinos de *L. catesbeianus* (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979; COLOSIO et al., 2011; GONÇALVES et al., 2011). Dessa forma esses pH foram escolhidos para os demais estudos realizados no presente trabalho.

Figura 6 – Efeito do pH sobre a atividade das fosfatases hepáticas de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 46.



O estudo do efeito do armazenamento na atividade das fosfatases ácida (Figura 7) e alcalina (Figura 8) revelou que ambas as enzimas mantiveram a estabilidade em todos os pH testados durante os estudos realizados.

De acordo com os resultados obtidos os fígados foram homogeneizados em tampão TRIS.HCl 5 mM, pH 7,5 para melhor comparação com outros trabalhos da literatura, que utilizam o mesmo pH em seus ensaios, além de otimizar as coletas, uma vez que uma

mesma amostra pôde ser utilizada para os ensaios de ambas enzimas (PIZAURO, 1993; GONÇALVES et al., 2011; COLOSIO et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Figura 7 – Efeito do pH de armazenamento da amostra sobre a atividade da fosfatase ácida.

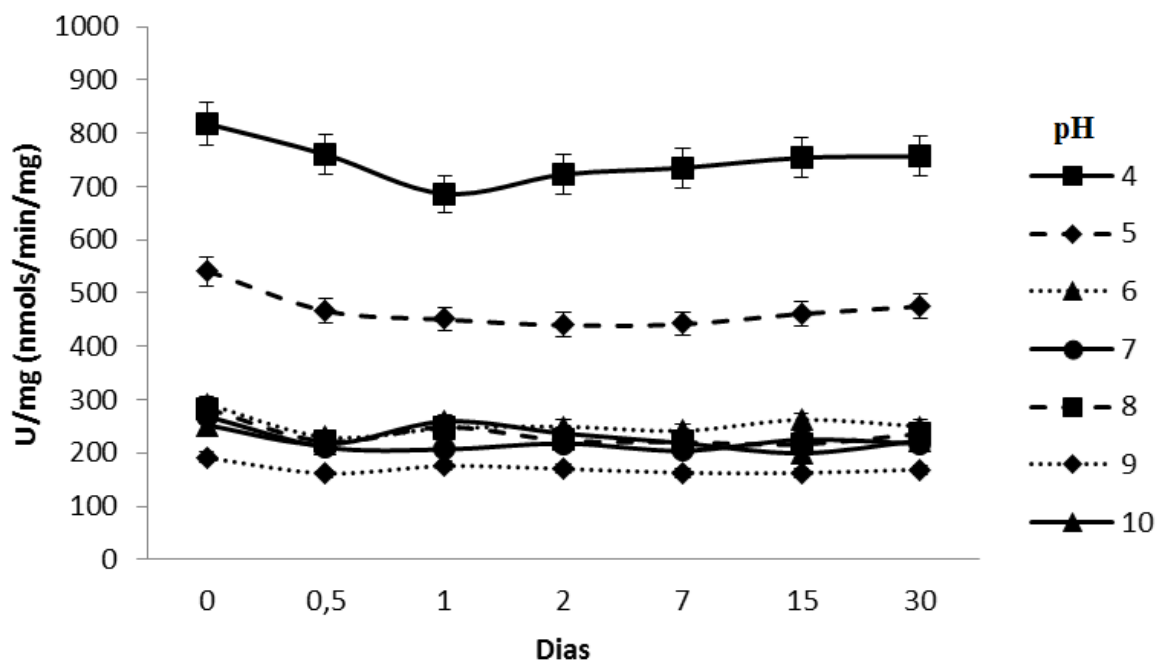
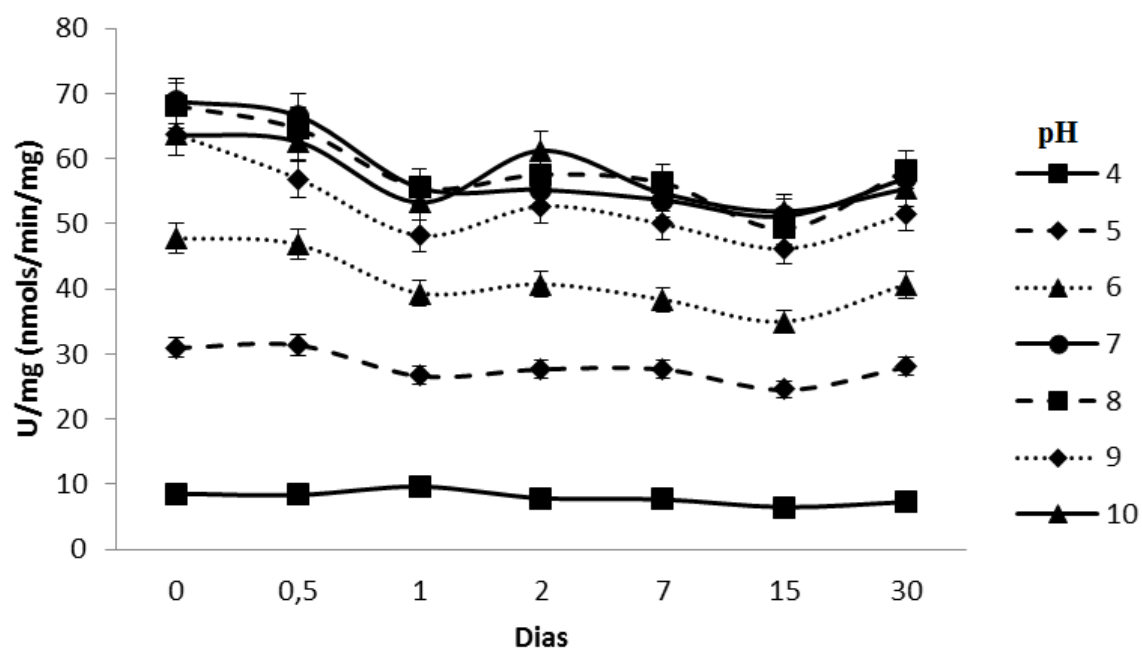


Figura 8 – Efeito do pH de armazenamento da amostra sobre a atividade da fosfatase alcalina.



O estudo do efeito da temperatura e tempo de reação revelou que para fosfatase ácida (Figura 9) a temperatura e o tempo ótimo de reação foram de 40 °C e 5 minutos, respectivamente, enquanto que para a fosfatase alcalina as melhores condições foram de 27 °C após 5 minutos de reação (Figura 10). Nessas condições as atividades das enzimas apresentam linearidade, portanto são adequados aos estudos.

Figura 9 – Efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade da fosfatase ácida.

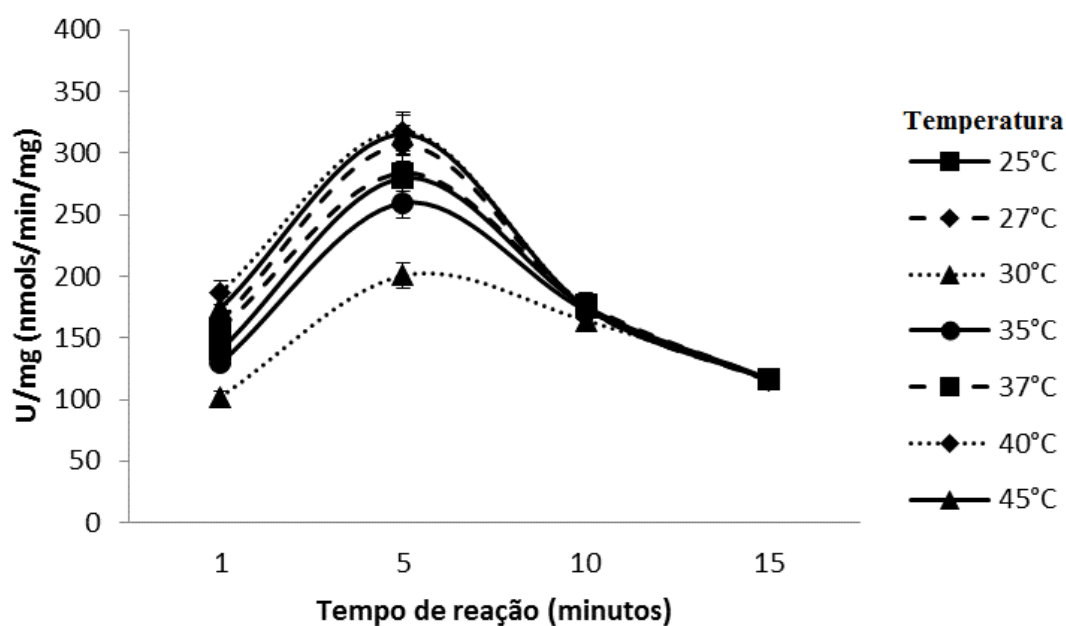
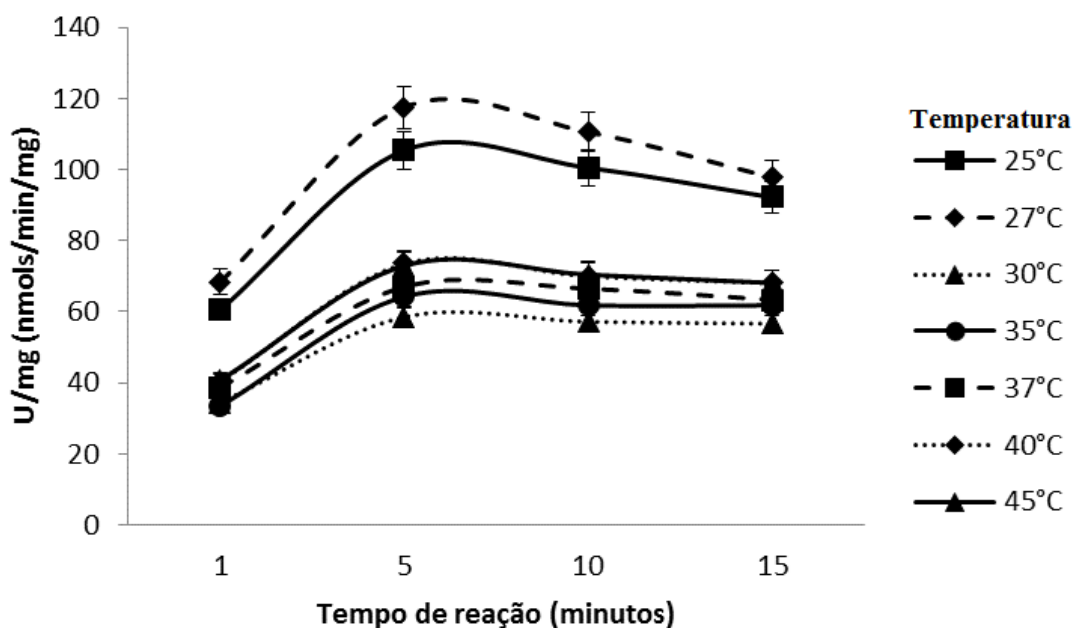


Figura 10 – Efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade da fosfatase alcalina.



A temperatura estabelecida para a realização dos ensaios foi a de 37 °C, pois é a temperatura mais utilizada nos estudos de determinação das atividades de fosfatases do fígado e de diversos tecidos, como rim, intestino e cauda (KUBICZ; SZALEWICS, 1989; GOSEKI; OIDA; SASAKI, 1990; JANSKA; SAAD et al., 2009; GONÇALVES et al., 2015). O tempo de reação escolhido para a realização das atividades das fosfatases ácida e alcalina foi de 5 minutos, garantindo a velocidade máxima da atividade enzimática e um menor tempo de incubação.

O estudo da inativação térmica revelou que a fosfatase ácida (Figura 11) é menos termo sensível à inativação térmica, pois mantém 32% de sua atividade quando incubada a 60 °C durante 20 minutos, enquanto que a alcalina (Figura 12) retém apenas 11% de sua atividade no mesmo tempo e temperatura, sugerindo que a temperatura afeta ligações que estabilizam a configuração nativa das enzimas estudadas, uma vez que estruturas monoméricas, como a fosfatase ácida (Figura 1), são mais estáveis que as oligoméricas, fosfatase alcalina (Figura 2).

A estabilidade térmica apresentada pelas fosfatases ácida e alcalina (Figura 10 e 12) acima da temperatura média dos animais (27 °C) indica que as enzimas contêm domínios conservados, fundamentais para manutenção da atividade enzimática, que foram evolutivamente selecionadas (MILLÁN, 2006; MALONE et al., 2006), podendo conferir ao animal grande plasticidade na ocupação de diferentes ambientes, favorecendo a vida aquática dos girinos e a habitação do meio terrestre pelas rãs adultas (McDIARMID; ALTIG, 1999).

Figura 11 – Inativação térmica da atividade da fosfatase ácida.

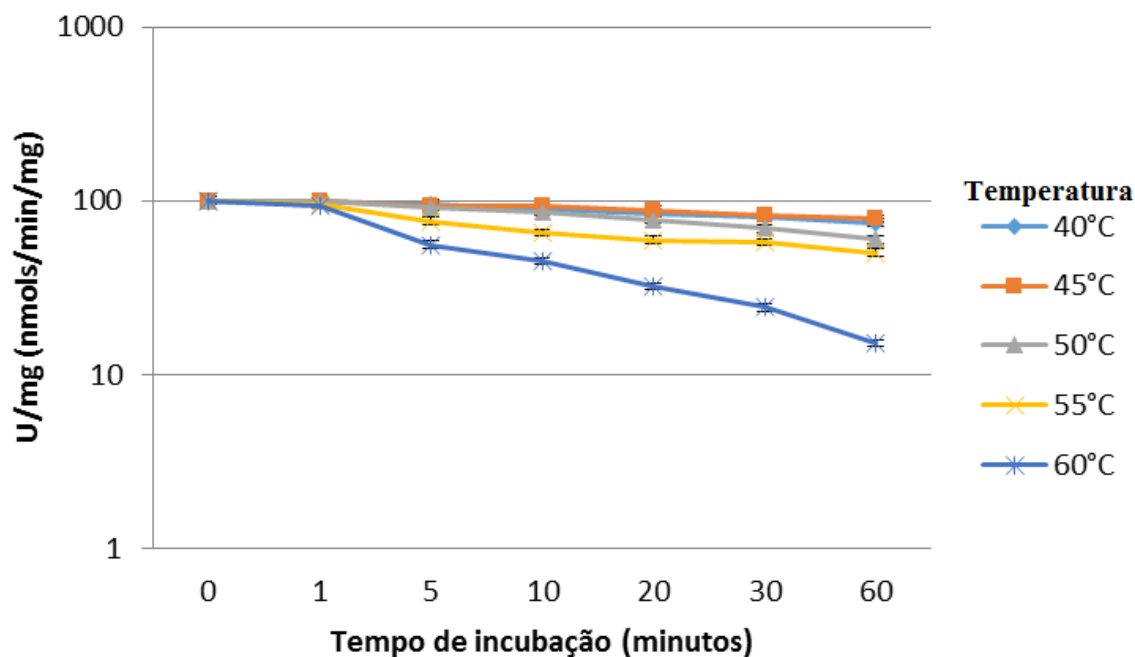
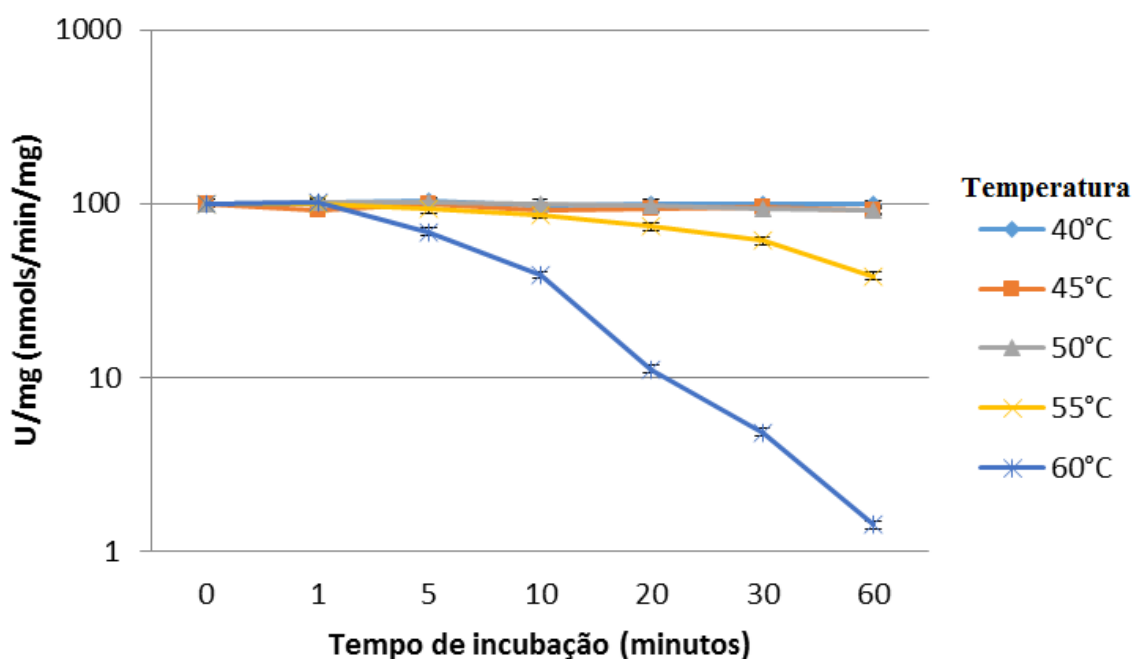


Figura 12 – Inativação térmica da atividade da fosfatase alcalina.



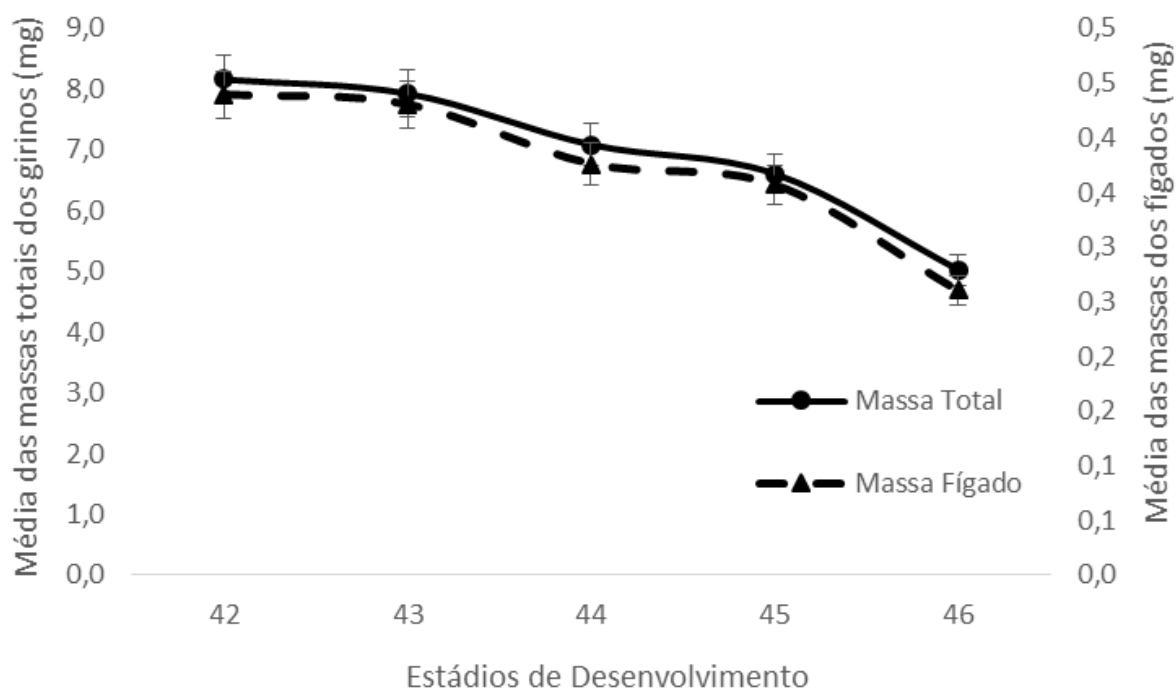
Os estudos realizados para a padronização dos métodos de ensaios para as atividades das fosfatases ácida e alcalina revelaram resultados semelhantes aos encontrados em cauda e membros de girinos de rã-touro, sugerindo que as enzimas encontradas em diferentes

tecidos do animal podem ser isoenzimas (GONÇALVES et al., 2011; COLOSIO et al., 2011; SANTANA et al., 2012). De fato, Millán (2006) classifica as fosfatases alcalinas em três grupos: placentária, intestinal e rim-fígado-osso (ou tecido não específica).

5.2 Estudo das atividades enzimáticas

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram diminuição da massa corpórea dos girinos, bem como redução da massa do fígado. Durante a metamorfose desse animal, Wilbur e Collins (1973) demonstraram que o desenvolvimento dos girinos é caracterizado por três períodos: crescimento rápido; período de desaceleração do crescimento; e redução de peso durante o clímax metamórfico. A perda de massa corporal dos indivíduos pode ser atribuída a não ingestão de alimentos durante essa fase de vida (SANTOS et al., 2010). Nesse período, a energia obtida de forma endógena pelo organismo, é direcionada para o desenvolvimento de estruturas necessárias aos animais adultos e não ao crescimento corporal (McDIARMID; ALTIG, 1999).

Figura 13 – Média das massas totais (linha cheia) e massas dos fígados (linha tracejada) dos girinos de rã-touro durante a metamorfose.



A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida (Figura 14) apresentou aumento nos estádios estudados, alcançando seu maior valor (111,29 U/mg) no estádio 46. Já a atividade da fosfatase alcalina (Figura 15) diminuiu durante a metamorfose.

Figura 14 – Atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase ácida presente em fígado de girinos de rã-touro durante a metamorfose.

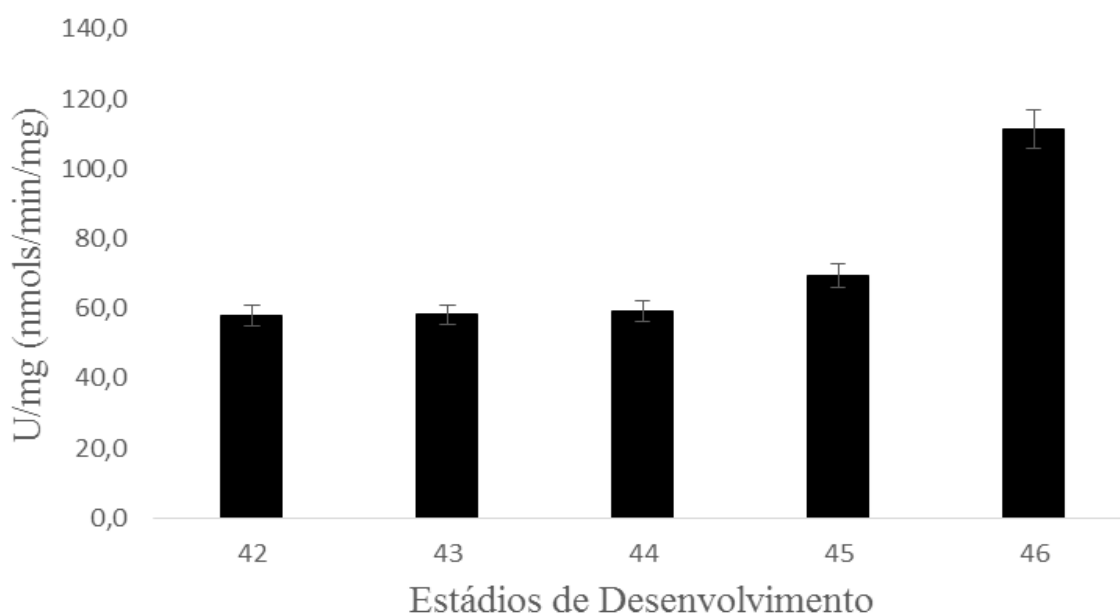
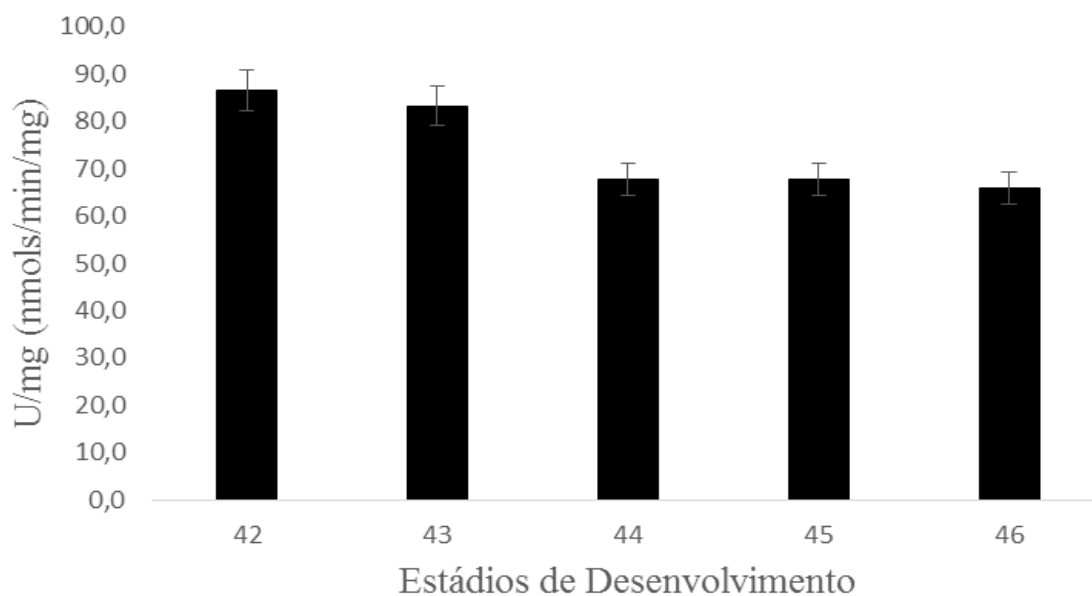


Figura 15 – Atividade *p*-nitrofenilfosfatásica da fosfatase alcalina presente em fígado de girinos de rã-touro durante a metamorfose.



Segundo Saad e colaboradores (2009), durante a metamorfose de *Bufo regularis* e *Bufo viridis*, principalmente no final do clímax metamórfico, há considerável aumento de apoptose nas células hepáticas. Esse aumento de morte celular é acompanhado por maior atividade de células fagocitárias (HENSEY; GAUTIER, 1998; SZALEWICZ et al., 2003).

Os processos de morte celular são induzidos por hormônios tireoidianos e são responsáveis por várias mudanças ocorridas nos girinos durante a metamorfose, sendo imprescindíveis na remodelação de estruturas necessárias aos adultos, porém já existentes nas formas juvenis, como intestino, pele e fígado, e regressão de estruturas larvais, como cauda e brânquias, desnecessárias às rãs adultas (DODD; DODD, 1976; NISHIKAWA; HAYASHI, 1994; SHI, 2000; NAKAJIMA, FUJIMOTO, YAOITA, 2005). Esse aumento da atividade da fosfatase ácida (Figura 14) está diretamente relacionado com os resultados apresentados na Figura 13, uma vez que acompanha a diminuição do peso corporal e do fígado dos girinos, sugerindo a ação lisossomal nesse órgão.

O aumento da atividade da fosfatase ácida, um biomarcador de atividade lisossomal, nos estádios finais da metamorfose, coincide também com a regressão da cauda (GONÇALVES et al., 2015), da diminuição massa corporal e do fígado (Figura 13), sugerindo a participação da fosfatase ácida na degradação de compostos fosfatados durante o clímax metamórfico. Essa suposição é baseada no fato de que o lisossomo é rico em hidrolases ácidas como fosfatases, proteases, lipases, peptidases, nucleases e glicosidases, importantes na hidrólise de macromoléculas celulares como proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos (SUN et al., 2008) e, que também atuam no processo de morte celular (GONÇALVES et al., 2015).

Tabela 1: Médias das atividades (U/mg) das fosfatases ácida e alcalina hepáticas de *L. catesbeianus* durante a metamorfose.

Estádios de Desenvolvimento	Médias das atividades		
	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina	
	<i>p</i> -nitrofenilfosfatásica	<i>p</i> -nitrofenilfosfatásica	LPS-defosforilase
42	58,02 ^{AB}	86,49	3,94
43	58,24 ^{AB}	83,21	4,02
44	59,21 ^{AB}	67,79	4,12
45	69,39 ^{AB}	67,69	4,61
46	111,29 ^A	65,92	5,15
CV%	21,06	24,46	22,95

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

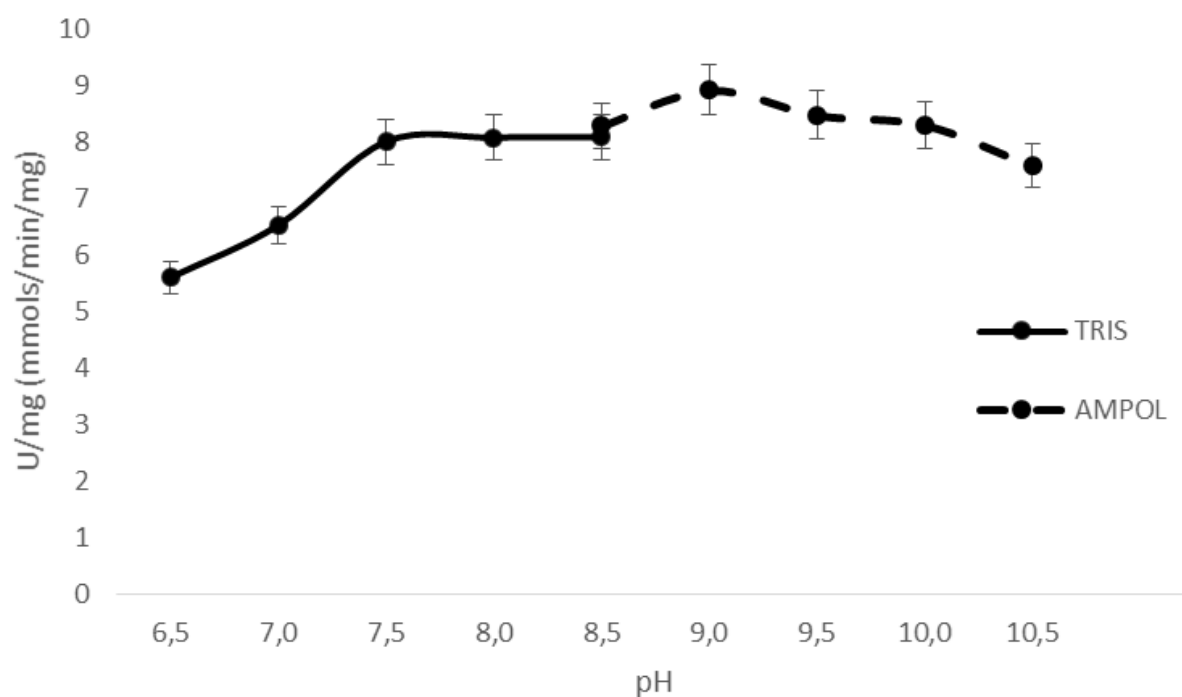
A fosfatase alcalina apresenta diminuição de atividade do estágio 42 (86,49 U/mg) até o estágio 46 (65,92 U/mg). No final da metamorfose a atividade apresenta pouca alteração (Figura 15). Esse comportamento da atividade enzimática pode estar relacionado com a não ingestão de alimentos durante a fase de clímax metamórfico (SANTOS et al., 2010), diminuindo a formação de metabólitos secundários oriundos do metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos (NELSON; COX, 2011). Outro papel importante dessa enzima nos animais é o de atuar no processo de detoxificação, por meio da desfosforilação do LPS convertendo-o em uma substância praticamente não tóxica (POELSTRA et al., 1997).

Observa-se na Tabela 1 que não houve diferença significativa na atividade da fosfatase alcalina durante a metamorfose, porém a manutenção de sua atividade está relacionada à degradação dos metabólitos secundários provenientes da reutilização dos nutrientes do próprio organismo por morte celular (de DUVE, 1983), uma vez que o

animal não se alimenta durante metamorfose, além da produção de LPS por microrganismos da microbiota intestinal (SANTOS et al., 2010; KOHL et al., 2013)

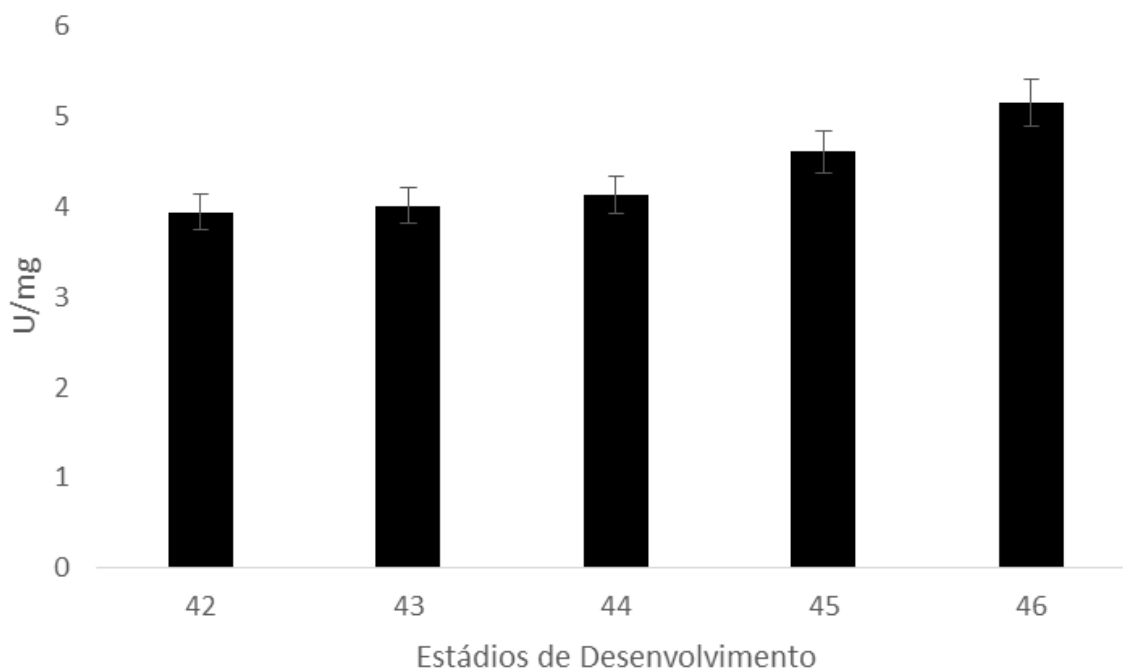
O estudo do efeito do pH sobre a atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina revelou que o pH ótimo aparente foi 9 (Figura 16). Entretanto, no presente trabalho optou-se pela determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina nos estádios da metamorfose em pH fisiológico (pH 7,4), visando comparar tais resultados com aqueles obtidos com outros organismos, como ratos e humanos (POELSTRA et al., 1997; TUIN et al., 2006; KIFFER-MOREIRA et al., 2014). Outro fato que foi levado em consideração na escolha desse pH é que a diminuição da atividade de 9,0 para 7,5 é de apenas 11% e que o tampão também influencia na atividade enzimática.

Figura 16 – Efeito do pH sobre a atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina hepática de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 46.



Não ocorreu efeito significativo durante os estádios da metamorfose, embora tenha sido observado tendência de aumento da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina hepática. No início da metamorfose, estágio 42, a atividade era de 3,94 U/mg, seguido de aumento no estágio 43 (4,02 U/mg), alcançando 5,15 U/mg no estágio 46 (Figura 17).

Figura 17 – Atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina hepática de girinos de rã-touro durante a metamorfose.



Kohl e colaboradores (2013) em estudos realizados com rã-leopardo (*Lithobates pipiens*), demonstram um aumento da densidade de bactérias gram-negativas nos animais adultos em relação aos girinos. Durante a metamorfose ocorrem mudanças na microbiota intestinal dos animais, visando adequá-los para a conquista do meio terrestre. Nesse período, as espécies de microrganismos que povoam os animais jovens, em sua maioria bactérias gram-positivas, são substituídas por bactérias gram-negativas. Essa mudança na microbiota está relacionada com a alimentação, que no organismo larval é, de um modo geral, composta de matéria vegetal e que no animal metamorfoseado se constitui principalmente de insetos (KOHL et al., 2013). O aumento da atividade LPS-defosforilase da fosfatase alcalina hepática durante a metamorfose (Figura 17) acompanha esse aumento da densidade de bactérias gram-negativas, demonstrando assim o papel de detoxificação da fosfatase alcalina hepática nesse período e, possivelmente, que se trata de uma enzima induzida.

Outro aspecto a ser destacado é a supressão do sistema imune durante a metamorfose, necessária para que não haja resposta imune contra as novas células e/ou tecidos formados (ROLLINS-SMITH, 1998). Com o aumento de bactérias gram-negativas e, conseqüentemente, maior liberação de LPS, ocorre rápida produção de mediadores de

resposta inflamatória como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), óxido nítrico (NO) e interleucinas (PARRATT, 1998; BEISHUIZEN; VERMES; HAANEN, 1999; KARIMA et al., 1999).

Tuin e colaboradores (2006) utilizando ratos Wistar, demonstraram que a defosforilação do LPS pela fosfatase alcalina diminui os níveis desses mediadores, reduzindo o risco de ocorrência de choque séptico. Dessa forma o aumento na atividade de LPS-defosforilase da fosfatase alcalina durante o clímax metamórfico pode estar relacionado com a proteção do organismo nessa fase da vida.

6 CONCLUSÕES

O aumento da atividade específica da fosfatase ácida durante a metamorfose demonstra que a enzima desempenha papel importante no processo de reutilização de compostos fosfatados nos estádios onde os girinos não se alimentam.

A atividade da fosfatase alcalina se correlaciona com a não ingestão de alimentos pelos girinos e a mobilização dos nutrientes da cauda, sugerindo uma relação com a menor formação de metabólitos secundários.

A atuação da fosfatase alcalina como LPS-defosforilase *in vitro* sugere que ela desempenha papel crucial na proteção do organismo durante a metamorfose, na qual ocorre mudanças na microbiota intestinal e supressão do sistema imune.

No sentido de ampliar o conhecimento acerca do mecanismo de ação e de regulação das fosfatases durante a metamorfose, estão sendo conduzidos estudos *in vitro*, utilizando-se os substratos biológicos, ATP e PPi, encontrados no fluído extracelular *in vivo* em pH fisiológico, visando ampliar a compreensão do papel dessas enzimas no referido processo.

REFERÊNCIAS

- ALVARO, D.; BENEDETTI, A.; MARUCCI, L.; MONACHE, M. D.; MONTERUBBIANESE, R.; COSIMO, E.; PEREGO, L.; MACARRI, G.; GLASER, S.; SAGE, G.; ALPINI, G. The function of alkaline phosphatase in the liver: regulation of intrahepatic biliary epithelium secretory activities in the rat. **Hepatology**, v. 32, n. 2, p. 174-184, 2000.
- ATKINSON, B. G.; WARKMAN, A. S.; CHEN, Y. Thyroid hormone induces a reprogramming of gene expression in the liver of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles. **Wound Repair Regeneration**, v. 6, n. 4, p. 323-337, 1998.
- BEISHUIZEN, A.; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 33, p. 55-131, 1999.
- BENNETT, T. P.; GLENN, J. S.; SHELDON, H. Changes in the fine structure of tadpoles (*Rana catesbeiana*) liver during thyroxine-induced metamorphosis. **Developmental Biology**, v. 22, p. 232-248, 1970.
- BERRY, D.; SCWARTZMAN, R.; BROWN, D. D. The expression pattern of thyroid hormone response genes in the tadpole tail identifies multiple resorption programs. **Developmental Biology**, v. 203, p. 12-23, 1998.
- BLAUSTEIN, A. R.; JOHNSON, P. T. J. The complexity of deformed amphibians. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 1, p. 87-94. 2003.
- BORGES-MARTINS, M.; COLOMBO, P.; ZANK, C.; BECKER, F. G.; MELO, M. T. Q. Anfíbios. In: BECKER, F. G.; RAMOS, R. A.; MOURA, L. A. (Org.). **Biodiversidade: Regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, Planície Costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 2007. p. 276-291.
- BROWN, G. W.; BROWN, W. R.; COHEN, P. P. Levels of urea cycle enzymes in metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 234, n. 7, p. 1775-1780, 1959.
- BUCKBINDER, L.; BROWN, D. D. Cloning and developmental expression of *Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3820-3824, 1993.
- CAREY, C.; COHEN, N.; ROLLINS-SMITH, L. Amphibian declines: an immunological perspective. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 459-472, 1999.
- CHAIMOVICH, H.; NOME, F. Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 139, n. 1, p. 9-16, 1970.
- COHEN, P. P.; BRUCKER, R. F.; MORRIS, S. M. Cellular and molecular aspects of thyroid hormone action during amphibian metamorphosis. In: LI, C. H. (Ed.). **Thyroid hormones**. New York: Academic Press, 1978. Chap. 5, p. 273-381. (Hormonal proteins and peptides, v. 6).

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.

CRUZ, A. C. S.; LEITE, M. B. N. L.; RODRIGUES, L. E. A.; NASCIMENTO, I. A. Estimation of biodiesel cytotoxicity by using acid phosphatase as a biomarker of lysosomal integrity. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, p. 219-224, 2012.

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.

DAUÇA, M.; CALVERT, R.; MENARD, D.; HUGON, J. S.; HOURDRY, J. Developmental of peroxisomes in amphibians. III. Study on liver, kidney, and intestine during thyroxine-induced metamorphosis. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 227, p. 413-422, 1983.

DE DUVE, C. Lysosomes revisited. **Europe Journal Biochemistry**, v. 137, p. 391-397, 1983.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 397 p.

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

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

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

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.

GONCALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Tail phosphatases activity: a study during growth and metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, n. 2, 2015. In press.

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

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

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. 972 p.

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.

HENSEY, C.; GAUTIER, J. Programmed cell death during *Xenopus* development: a spatio-temporal analysis. **Developmental Biology**, v. 203, p. 36-48, 1998.

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

HORI, Y.; TAKEYAMA, Y.; UEDA, T.; NISHIKAWA, J.; YAMAMOTO, M.; SAITOH, Y. Impaired transport of lipopolysaccharide across the hepatocytes in rats with cerulein-induced experimental pancreatitis. **Pancreas**, v. 6, p. 148-153, 1998.

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

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

JANSKA, H.; KUBICZ, A.; SZALEWICZ, A. The lower molecular weight acid phosphatase from the frog liver: isolation of homogeneous AcPase III and IV representing glycoforms with different bioactivity. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 92B, n. 2, p. 341-346, 1989.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Órgãos associados ao trato digestivo. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004. Cap. 16, p. 324-334, 2004.

KARIMA, R.; MATSUMOTO, S.; HIGASHI, H.; MATSUSHIMA, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Molecular Medicine Today**, v. 5, p. 123-132, 1999.

KIFFER-MOREIRA, T.; SHEEN, C. R.; GASQUE, K. C. S.; BOLEAN, M.; CIANCAGLINI, P.; ELSAS, A.; HOYLAERTS, M. F.; MILLÁN, J. L. Catalytic signature of a heat-stable, chimeric human alkaline phosphatase with therapeutic potential. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0089374&representation=PDF>>. Acesso em: 13 maio 2015.

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

KOHL, K. D.; CARY, T. L.; KARASOV, W. H.; DEARING, M. D. Restructuring of the amphibian gut microbiota through metamorphosis. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 6, p. 899-903, 2013.

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

KOYAMA, I.; MATSUNAGA, T.; HARADA, T.; HOKARI, S.; KOMODA, T. Alkaline phosphatases reduce toxicity of lipopolysaccharides in vivo and in vitro through dephosphorylation. **Clinical Biochemistry**, v. 35, p. 455-461, 2002.

LANA, G. R. Q.; ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; LANA, A. M. Q. Efeito da temperatura ambiente e da restrição alimentar sobre o desempenho e a composição da carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 4, p. 1117-1123, 2000.

MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINNECK, E.; PESKE, S. T. Prospecção de genes em bibliotecas de cDNA. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 1, p. 7-13, 2006.

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

MARTOF, B. Growth and development of the green frog, *Rana clamitans*, under natural conditions. **American Midland Naturalist**, v. 55, p. 101-117, 1956.

McCOMB, R. B.; BOWERS, G. N. Jr.; POSEN, S. **Alkaline phosphatase**. New York: Plenum, 1979. 986 p.

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

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

MUNRO, A. F. The ammonia and urea excretion of different species of amphibia during their development and metamorphosis. **Biochemical Journal**, v. 54, p. 29-36, 1953.

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

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 1273 p.

NEUMANN, H. Substrate selectivity in the action of alkaline and acid phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 18, p. 4671-4676, 1968.

NISHIKAWA, A.; HAYASHI, H. Isoform transition of contractile proteins related to muscle remodeling with an axial gradient during metamorphosis in *Xenopus laevis*. **Developmental Biology**, v. 165, p. 86-94, 1994.

PAHKALA, M.; RASANEN, K.; LAURILA, A.; JOHANSON, U.; BJORN, L.O.; MERILA, J. Lethal and sublethal effects of UV-B/pH synergism on common frog embryos. **Conservation Biology**, v. 16, p. 1063-1073, 2002.

PARRATT, J. R. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, p. 31-39, 1998.

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

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

POELSTRA, K.; BAKKER, W. W.; KLOK, P. A.; KAMPS, J. A. A. M.; HARDONK, M. J.; MEIJER, D. K. F. Dephosphorylation of endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. **American Journal of Pathology**, v. 151, n. 4, p. 1163-1169, 1997.

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.

RIBEIRO FILHO, O. P.; LIMA, S. L.; ANDRADE, D. R.; SEIXAS FILHO, J. T. Reprodução induzida de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802) com o uso de extrato bruto hipofisário. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 2, p. 216-223, 1998.

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZAHNINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **FASEB Journal**, v. 8, p. 217-225, 1994.

ROCHE, J. Blood-phosphatases. **Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1724-1733, 1931.

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

ROLLINS-SMITH, L. A.; BARKER, K. S.; DAVIS, A. T. Involvement of glucocorticoids in the reorganization of the amphibian immune system at metamorphosis. **Developmental Immunology**, v. 5, p. 145-152, 1997.

ROLLINS-SMITH, L. A.; DOERSAM, J. K.; LONGCORE, J. E.; TAYLOR, S. K.; SHAMBLIN, J. C.; CAREY, C.; ZASLOFF, M. A. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, p. 63-72, 2002.

ROLLINS-SMITH, L. A.; RAMSEY, J. P.; PASK, J. D.; REINERT, L. K.; WOODHAMS, D. C. Amphibian immune defenses against chytridiomycosis: impacts of changing environments. **Integrative and Comparative Biology**, 2011. Disponível em: <<http://icb.oxfordjournals.org/content/early/2011/08/03/icb.icr095.full.pdf+html>>. Acesso em: 13 maio 2015.

SAAD, A. H.; AZIZ, A. A.; YEHIA, I.; EL-GHAREEB, A. W.; ISMAIL, H. Programmed cell death in the liver of different species of anuran amphibians during metamorphosis. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 4644-4655, 2009.

SANTANA, C. C.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO R. R.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURIO, 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.; PIZAURIO, 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.; PIZAURIO, 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.

SHI, Y. B. **Amphibian metamorphosis**. New York: John Wiley & Sons, 2000. 304 p.

SHIBKO, S.; TAPPEL, A. L. Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 73, p. 76-86, 1963.

SILVANO, D. L.; SEGALLA, M. V. Conservation of brazilian amphibians. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 653-658. 2005.

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

STUART, S. N.; CHANSON, J. S.; COX, N. A.; YOUNG, B. E.; RODRIGUES, A. S. L.; FISCHMAN, D. L.; WALLER, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, v. 306, p. 1783-1786, 2004.

SUN, P.; SLEATA, D. E.; LECOCQ, M.; HAYMAN, A. R.; JADOTB, M.; LOBEL, P. Acid phosphatase 5 is responsible for removing the mannose 6-phosphate recognition marker from lysosomal proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16590-16595, 2008.

SUZUKI, K.; MACHIYAMA, F.; NISHINO, S.; WATANABE, Y.; KASHIWAGI, K.; KASHIWAGI, A.; YOSHIZATO, K. Molecular features of thyroid hormone-regulated skin remodeling in *Xenopus laevis* during metamorphosis. **Development, Growth and Differentiation**, v. 51, p. 411-427, 2009.

SZALEWICZ, A.; STRZELCZYK, B.; SOPEL, M.; KUBICZ, A. The 35 kDa acid metallophosphatase of the frog *Rana esculenta* liver: studies on its cellular localization and protein phosphatase activity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2. p. 555-566, 2003.

TATA, J. R. Protein synthesis during amphibian metamorphosis. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 6, n. 6, p. 79-110, 1971.

TATA, J. R. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. **Biochimie**, v. 81, p. 359-366, 1999.

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

TREON, S. P.; THOMAS, P.; BROITMAN, S. A. Lipopolysaccharide (LPS) processing by Kupffer cells releases a modified LPS with increased hepatocyte binding and decreased tumor necrosis factor-alpha stimulatory capacity. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 202, p. 153-158, 1993.

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

TUIN, A.; VLAG, A. H.; LOENEN-WEEMAES, A. M. A.; MEIJER, D. K. F.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, p. 377-385, 2006.

VEIGA, N. Importância da alimentação e nutrição em ranicultura. In: MINI SIMPÓSIO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 3., 1989, Botucatu. **Anais...** Botucatu: [s.n.], 1989. p. 45-69.

VIERTEL, B.; RICHTER, S. Anatomy: viscera and endocrines. In: McDIARMID, R. W.; ALTIG, R. **Tadpoles: the biology of anuran larvae**. Chicago: Chicago Press, 1999. p. 92-148.

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, p. 567-597, 1996.

WILBUR, H. M. Competition, predation, and the structure of the *Ambystoma-Rana sylvatica* community. **Ecology**, v. 53, n. 1, p. 3-21, 1972.

WILBUR, H. M.; COLLINS, J. P. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. **Science**, v. 182, n. 4119, p. 1305-1314, 1973.

ANEXO

Parecer do comitê de ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

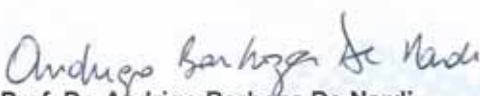


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 011552/13 do trabalho de pesquisa intitulado "**Atividade de fosfomonohidrolases presentes em fígado de girino de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante a metamorfose**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. João Martins Pizauro Junior está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião extraordinária de 4 de junho de 2013.

Jaboticabal, 4 de junho de 2013.


Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA