

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 15/09/2018.

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



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

**ADRIANO MARQUES GONÇALVES**

Tese de Doutorado

2017

Adriano Marques Gonçalves

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

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

Orientador: João Martins Pizauro Junior

Araraquara

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

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

## ADRIANO MARQUES GONÇALVES

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

Araraquara, 16 de março de 2017.

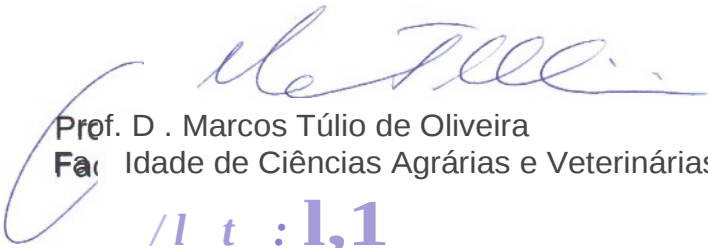
### BANCA EXAMINADORA



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



Prof. O. Árcia Reola Cominetti  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/ UFSCAR / São Carlos - SP



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



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



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

## DADOS CURRICULARES

### IDENTIFICAÇÃO

Nome: Adriano Marques Gonçalves

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

### ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

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

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

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

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

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

### PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

#### Artigos completos publicados em Periódicos:

1. SANTOS, LUIZ FLÁVIO JOSÉ DOS; DE OLIVEIRA-BAHIA, VERONICA REGINA LOBATO; NAKAGHI, LAURA SATIKO OKADA; DE STEFANI, MARTA VERARDINO; **GONÇALVES, ADRIANO MARQUES**; JUNIOR, JOÃO MARTINS PIZAURO. Ontogeny of the Digestive Enzymes of Tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. Copeia. , v.104, p.838 - 842, 2016.

2. **GONÇALVES, ADRIANO M.**; SANTOS, LUIZ F. J.; SANTANA, CAROLINE C.; COLOSIO, RAFAEL R.; PIZAURO, JOÃO M. Activity of Tail Phosphatases: A Study during Growth and Metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. Copeia. , v.103, p.634 - 638, 2015.

3. ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; MORAES, J. R. E.; PIZAURO, J. M.; MORAES, F. R. Histologia dos órgãos e tecidos linfóides de galinhas poedeiras White Leghorn. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. , v.110, p.74 - 78, 2015.

4. ROMBOLA, TIAGO; PEDRINHO, ELIAMAR APARECIDA; DE MACEDO LEMOS, ELIANA; **GONÇALVES, ADRIANO**; DOS SANTOS, LUIZ FLÁVIO; PIZAURO, JOÃO. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. BMC Research Notes. , v.7, p.221 - , 2014.

#### Trabalhos publicados em Anais de eventos científicos:

1. **GONÇALVES, A. M.**; COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; OLIVEIRA, G. M.; VIEIRA, V. I.; FERREIRA, G. C.; ETO, S. F.; FERNANDES, D. C.; PIZAURO, J. M. Identification and kinetic characterization of phosphatases isozymes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles tail during metamorphosis In: XLV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Foz

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

2. FERNANDES, D. C.; ETO, S. F.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Método Imunoenzimático de Elisa Utilizando IgY para Detecção de Proteínas Microbianas de Células Bacterianas de *Streptococcus agalactiae* In: 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental, 2016, Jaboticabal. **Anais do 1º Congresso Brasileiro de Microbiologia Agropecuária, Agrícola e Ambiental.** 2016.

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

4. **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. A Study of Tail's Acid and Alkaline Phosphatases During Bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) Larval Development In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

5. SANTANA, C. C.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; OLIVEIRA, G. M.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Alkaline phosphatase LPS dephosphorylase activity during bullfrog's (*Lithobates catesbeianus*) metamorphosis In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais do 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

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

7. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; NEIRA, L. M.; PIZAURO, J. M. Hydrolases activities during the bone formation process in *Lithobates catesbeianus* In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology, 2015, Foz do Iguaçu. **Anais da 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology.** 2015.

8. COLOSIO, R. R.; SANTOS, L. F. J.; **GONÇALVES, A. M.**; SANTANA, C. C.; MENEZES, M. P.; PIZAURO, J. M. Bone Nucleoside Triphosphate Pyrophosphohydrolase and Alkaline Phosphatase Activities During *Lithobates catesbeianus* Limbs Development In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.** 2014.

9. **GONÇALVES, A. M.**; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; BALDISSERA, G.; PIZAURO, J. M. Membrane Interaction Study of Acid and Alkaline Phosphatases from Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles Tail In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da**

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

10. SANTOS, L. F. J.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. PC-1, Alkaline and Acid Phosphatases Activities in Normal and Affected by Tibial Dyschondroplasia Chickens In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014.**

11. MENEZES, M. P.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; CURSINO, M. S.; DUARTE, J. M. B.; PIZAURO, J. M. Seminal Evaluation and Determination of Protein Concentration Present in Seminal Plasma of Two Species of Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira* and *M. nemorivaga*) Maintained in Captivity In: XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014, Foz do Iguaçu. **Anais da XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2014.**

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

13. SANTANA, C. C.; GONÇALVES, A. M.; COLOSIO, R. R.; PEREIRA, M. C.; PAVARINA, G. C.; PIZAURO, J. M. Activity of Phosphomonohydrolases Present in the Liver of Bullfrog's Tadpoles During Metamorphosis In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz Iguaçu. **Anais da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2013.**

14. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. Pyrophosphatase And ATPase Activities From Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles' Tail During Development And Metamorphosis In: XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013, Foz Iguaçu. **Anais da XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2013.**

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

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

17. COLOSIO, R. R.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Activity of Acid and Alkaline Phosphatase in Endochondral Ossification of *Lithobates catesbeianus* During the Metamorphic Climax In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2011, Foz do Iguaçu. **Anais da XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2011.**

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

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

#### **Apresentação de trabalho ou Palestras:**

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

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

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

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

5. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; BALDISSERA, G.; PIZAURO, J. M. **Membrane Interaction Study of Acid and Alkaline Phosphatases from Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles Tail**, 2014. (Apresentação de Trabalho)

6. GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R.; SANTANA, C. C.; PIZAURO, J. M. **Pyrophosphatase And ATPase Activities From Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles' Tail During Development And Metamorphosis**, 2013. (Apresentação de Trabalho)

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

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

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

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

11. GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M.; SANTOS, L. F. J.; COLOSIO, R. R. **Caracterização da atividade de fosfomono-hidrolases da cauda de *Lithobates catesbeianus* durante a metamorfose**, 2010. (Apresentação de Trabalho)

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

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

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

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

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

#### **Pedidos de patente:**

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

#### **Participação em eventos científicos:**

1. TICs no Ensino, 2016. (Oficina)

2. 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology, 2015. (Congresso)

3. VIII EPEA - Encontro Pesquisa em Educação Ambiental - A avaliação da década da educação para o Desenvolvimento Sustentável e perspectivas futuras, 2015. (Congresso)

4. XLIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2015. (Congresso)

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. (Congresso). Membrane Interaction Study of Acid and Alkaline Phosphatases from Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles Tail.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2013. (Congresso). Pyrophosphatase And ATPase Activities From Bull Frog (*Lithobates catesbeianus*) Tadpoles' Tail During Development And Metamorphosis.

7. XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012. (Congresso)

8. Avaliador no I Fórum de Extensão Universitária, 2011. Avaliador de Trabalhos.

9. I Fórum de Extensão Universitária, 2011.

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

#### **Orientações:**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*A gente muda o mundo na mudança da mente.*

Gabriel, o Pensador

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

*Quanto mais eu aprendo, menos eu sei com certeza.*

Daniel Gildenlöw

## RESUMO

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

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

## ABSTRACT

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

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

## LISTA DE FIGURAS

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

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

## LISTA DE TABELAS

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

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF1 - *Apoptosis protease-activating factor-1*

BAD - *Bcl-2 antagonist of cell death*

BAK - *Bcl-2 antagonistic killer*

BAX - *Bcl-2 associated X protein*

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

BCL-XL - *Bcl-extra long*

BID - *Bcl-2 interacting domain death agonist*

CASPASE - *cysteine-dependent aspartate-specific*

DNTR - receptor de hormônio da Tireoide negativo dominante

FADD - *Fas-associated death domain protein*

MIT - fração mitocondrial

MOMP - permeabilização da membrana externa da mitocôndria

OMI - *Mammalian serine protease*

pHMB - *p-hydroxymercuribenzoate*

PIPLC - fosfolipase C

PSMs - Peptide-spectrum matches

pNPP - *p-nitrofenilfosfato*

PP1 - serina/treonina proteína fosfatase tipo 1

PP2A - serina/treonina proteína fosfatase tipo 2A

PTP - proteína tirosina fosfatase

PTP-LMW - tirosina proteína fosfatase de baixa massa molecular

SMAC - *Second mitochondrial activator of caspase*

SMP - proteínas solúveis de membrana plasmática

TNF - *Tumor necrosis factor*

XIAP - *X-linked inhibitor of apoptosis protein*

## SUMÁRIO

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

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

## 7 CONCLUSÃO

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

## 8 PERSPECTIVAS

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

## REFERÊNCIAS

- ALBINATI, R. C. B. Avanço na nutrição de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw 1802). In: ENCONTRO NACIONAL DE RANICULTURA, 1., 1999, São Miguel do Iguaçu. **Anais...** São Miguel do Iguaçu: ABETRA, 1999. p. 13-31.
- ALEXANDER, M. A.; EISCHEID, J. K. Climate variability in regions of amphibian declines. **Conservation Biology**, v. 15, p. 930-942, 2001.
- AOYAMA, H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, M. A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosina fosfatase: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.
- ATKINSON, B. G.; WARKMAN, A. S.; CHEN, Y. Thyroid hormone induces a reprogramming of gene expression in the liver of premetamorphic *Rana catesbeiana* tadpoles. **Wound Repair Regeneration**, v. 6, n. 4, p. 323-337, 1998.
- BLOTT, E. J.; GRIFFITHS, G. M. Secretory lysosomes. **Nature Reviews**, v. 3, p. 122-131, 2002.
- BREDESEN, D. E.; RAO, R. V.; MEHLEN, P. Cell death in the nervous system. **Nature**, v. 443, p. 796-802, 2006.
- BROWN, D. D.; CAI, L. Amphibian metamorphosis. **Developmental Biology**, v. 306, p. 22-33, 2007.
- BUCKBINDER, L.; BROWN, D. D. Cloning and developmental expression of *Xenopus laevis* prolactin and thyrotropin genes. **Proceedings of the National Academy of Science United States of America**, v. 90, n. 9, p. 3820-3824, 1993.
- BUZALAF, M. A. R.; GRANJEIRO, J. M.; FERREIRA, C. V.; LOURENÇÃO, V. A.; ORTEGA, M. M.; POLETO, D. W. Kinetic characterization of bovine lung low molecular-weight protein tyrosine phosphatase. **Experimental Lung Research**, v. 24, n. 3, p. 269-272, 1998.
- CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.
- CHIARUGI, P.; CIRRI, P.; MARRA, F.; RAUGEI, G.; FIASCHI, T.; CAMICI, G. The Src and signal transducers and activators of transcription pathways as specific targets for low molecular weight phosphotyrosine-protein phosphatase in platelet-derived growth factor signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 6776-6785, 1998.
- CHIPUK, J. E.; GREEN, D. R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends in Cell Biology**, v. 18, n. 4, p. 157-164, 2008.
- CZESNIK, D.; KUDUZ, J.; SCHILD, D.; MANZINI, I. ATP activates both receptor and sustentacular supporting cells in the olfactory epithelium of *Xenopus laevis* tadpoles. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 119-128, 2006.

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

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

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

DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. **Biology of amphibians**. New York: McGaw-Hill, 1994. 696 p.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURO, J. M. Activity of tail phosphatases: a study during growth and metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 103, n. 3, p. 634-638, 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ISHIZUYA-OKA, A.; SHI, Y. B. Molecular mechanisms for thyroid hormone-induced remodeling in the amphibian digestive tract: a model for studying organ regeneration. **Development and Growth Differentiation**, v. 47, p. 601-607, 2005.

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

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

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

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

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

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

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

KOLLROS, J. J. Transitions in the nervous system during amphibian metamorphosis. In: GILBERT, L. I.; FRIEDEN, E. (Ed.). **Metamorphosis: a problem in developmental biology**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1981. Chap. 36, p. 445-459.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L.; BUTLER, L. V. L.; STÉFANI, M. V.; SANTOS, L. F. J.; NAKAGHI, L. S. O. Development of the gastroenteric region in *Rana catesbeiana* tadpoles during the metamorphosis process. **Brazilian Journal Morphological Sciences**, v. 22, p. 158-159, 2005.

PFISTER, N.; EICKELBERG, O.; MEINERS, S. Proteasome function in lung fibrosis. **European Respiratory Journal**, v. 42, 2013. Suppl. 57. Disponível em: <[http://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl\\_57/P4886](http://erj.ersjournals.com/content/42/Suppl_57/P4886)>. Acesso em: 09 fev. 2017.

PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. **Molecular Cellular Biochemistry**, v. 22, p. 121-129, 1995.

- PIZAURO, J. M.; CURTI, C.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic properties of triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. **Cellular and Molecular Biology**, v. 34, p. 921-926, 1988.
- PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. A. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1368, p. 108-114, 1998.
- POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. Salamandras, anuros e cecílias. In: \_\_\_\_\_. **A vida dos vertebrados**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 10, p. 220-263.
- RATHAUR, S.; RAI, R.; SRIKANTH, E.; SRIVASTAVA, S. Setaria cervi dual specific phosphatase: characterization and its effect on eosinophil degranulation. **Parasitology**, v. 136, p. 895-904, 2009.
- RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 941-949, 2002.
- ROBINSON, H. Acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 173, n. 2, p. 215-224, 1970.
- ROBINSON, H. An eletrophoretic and biochemical analysis of acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis. **Journal of Experimental Zoology**, v. 180, p. 127-140, 1972.
- ROCHE, J. Blood-phosphatases. **Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1724-1733, 1931.
- ROLLINS-SMITH, L. A. Metamorphosis and the amphibian immune system. **Immunology Reviews**, v. 166, p. 221-230, 1998.
- ROLLINS-SMITH, L. A. Amphibian immunity stress, disease, and climate change. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 66, p. 111-119, 2017.
- ROMBOLA, T. H.; PEDRINHO, E. A.; LEMOS, E. G. M.; GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; PIZAURO, J. M. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. **BMC Research Notes**, v. 7, 2014. doi:10.1186/1756-0500-7-221.
- SANTOS, L. F. J. dos; OLIVEIRA-BAHIA, V. R. L. de; NAKAGHI, L. S. O.; DE STEFANI, M. V.; GONÇALVES, A. M.; PIZAURO, J. M. Ontogeny of the digestive enzymes of tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 104, n. 4, p. 838-842, 2016.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**. Version 9. Cary, 2002.
- SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2856-2860, 2007.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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