

ESTUDO DE PADRONIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE FOSFATASES E LPS-DESFOSFORILASE PRESENTES EM FÍGADO DE GIRINOS DE RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Caroline Carla Santana

<http://lattes.cnpq.br/8934181667313550>

Gabriella Cavazzini Pavarina

<http://lattes.cnpq.br/8262436320266804>

Rafael Rodrigues Colosio

<http://lattes.cnpq.br/2567506758527737>

Ligia Maria Neira

<http://lattes.cnpq.br/4172348756813111>

Adriano Marques Gonçalves

<http://lattes.cnpq.br/5448203595628074>

Luiz Flávio José dos Santos

<http://lattes.cnpq.br/5888302973425312>

Joao Martins Pizauro Junior

<http://lattes.cnpq.br/3958124498479090>

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios, em especial os anuros, representam um grupo diversificado e amplamente distribuído, com exceção de regiões extremas como a Antártida e desertos (POUGH; JANIS; HEISER, 2008). Sua sensibilidade a alterações ambientais, dentre outros fatores devido ao ciclo de vida que inclui uma fase larval aquática e uma fase adulta terrestre, os torna importantes bioindicadores ecológicos (POUGH; JANIS; HEISER, 2008; BORGES-MARTINS et al., 2007). No entanto, as populações de anfíbios vêm enfrentando um declínio acentuado em escala global, com diversas

espécies extintas ou ameaçadas (STUART et al., 2004). Entre as causas apontadas estão a destruição de habitats, introdução de espécies exóticas, poluição química e aumento da radiação ultravioleta-B (CAREY; COHEN; ROLLINS-SMITH, 1999; PAHKALA et al., 2002; BLAUSTEIN; JOHNSON, 2003).

A metamorfose é um período crítico no desenvolvimento dos anfíbios, marcada por profundas transformações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, todas induzidas por hormônios tireoidianos (DUELLMAN; TRUEB, 1994; Santos, et al., 2016). Nessa fase, ocorre a reorganização do sistema imunológico, com apoptose de linfócitos mediada por glicocorticoides, tornando os girinos mais susceptíveis a doenças (ROLLINS-SMITH; BARKER; DAVIS, 1997). Além disso, mudanças no trato gastrointestinal, no aparato bucal, no esqueleto e no metabolismo hepático são essenciais para a transição de um organismo aquático herbívoro para um terrestre carnívoro (TRUEB; HANKEN, 1992; POUGH; JANIS; HEISER, 2008).

O fígado desempenha papel central nesse processo, atuando na detoxificação, síntese de proteínas, metabolismo de nutrientes e excreção de compostos nitrogenados (DELLMANN; BROWN, 1982; GUYTON; HALL, 2002). Durante a metamorfose, ocorre a transição da excreção de amônia para ureia, mediada por enzimas do ciclo da ureia (BROWN; BROWN; COHEN, 1959; COHEN; BRUCKER; MORRIS, 1978). Alterações na estrutura e função hepática podem, portanto, comprometer o desenvolvimento e a sobrevivência dos girinos (LANA et al., 2000).

Nesse contexto, as enzimas fosfatases se destacam como biomarcadores relevantes, a fosfatase ácida, associada à atividade lisossomal, atua na digestão intracelular e renovação de organelas (SHIBKO; TAPPEL, 1963; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Já a fosfatase alcalina, presente em diversos tecidos, incluindo o fígado, está envolvida na detoxificação de endotoxinas bacterianas, como o lipopolissacarídeo (LPS), por meio da remoção de grupos fosfato que reduzem sua toxicidade (POELSTRA et al., 1997; KOYAMA et al., 2002). O fígado é o principal órgão responsável pela remoção de LPS, processo que envolve células de Kupffer, hepatócitos e excreção biliar (TREON; THOMAS; BROITMAN, 1993; HORI et al., 1998).

Diante da escassez de informações sobre a bioquímica hepática em anfíbio, e considerando a importância das fosfatases nos processos de detoxificação e adaptação metabólica, este trabalho tem por objetivo identificar parâmetros ótimos

aparentes para determinação das atividades das fosfatases e LPS-desfosforilase extraídas de fígados de girinos de rã touro (*Lithobates catesbeianus*).

2 METODOLOGIA

2.1 Animais experimentais e classificação

Os experimentos foram realizados no setor de Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) e no Laboratório de Enzimologia Aplicada (LEA) da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal-SP. Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV (Protocolo nº 011552/13), em conformidade com os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Girinos de *Lithobates catesbeianus* foram mantidos em tanques de 2000 L, com densidade de um girino por dois litros de água, temperatura média de 27 °C, e alimentados com ração comercial para peixes (40% proteína bruta) três vezes ao dia. Os animais foram classificados semanalmente segundo os estádios de desenvolvimento de Gosner (1960) sendo selecionados os do estágio 46.

2.2 Obtenção dos extratos enzimáticos

Foram utilizados 30 girinos que foram anestesiados em gelo e sacrificados por guilhotina (CZESNIK et al., 2006). Os fígados foram coletados, pesados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70 °C, para minimizar variações individuais, 5 fígados foram agrupados em um *pool* que foi considerado como uma amostra.

Os tecidos foram homogeneizados 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 10.000xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em lã de vidro, aliquoteado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C para análises posteriores.

2.3 Determinação da atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (*p*-NFFásica) das fosfatases

A atividade das fosfatases foi determinada espectrofotometricamente a 37 °C, medindo a liberação de *p*-nitrofenolato (*p*-NF) a 410 nm ($\epsilon = 17.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 13), em pHs estabelecidos, a partir da hidrólise de *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NFF) 5 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada com 80 µL de extrato e interrompida com NaOH 1 mol.L⁻¹. A atividade foi expressa em nmol de *p*-NF liberado por minuto por mg de proteína.

2.4 Atividade de LPS-desfosforilase da fosfatase

A atividade de LPS-desfosforilase da fosfatase alcalina foi determinada pela dosagem de fosfato inorgânico liberado da hidrólise de LPS (2 mg.mL⁻¹), em tampão TRIS.HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, com MgCl₂ 1 mmol.L⁻¹ e ZnCl₂ 20 µmol.L⁻¹. A reação foi interrompida com TCA 50% e o fosfato quantificado pelo método de Pizauro et al. (1995), com leitura a 355 nm. A atividade foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto por mg de proteína.

2.5 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Hartree (1972), usando albumina bovina como padrão.

2.6 Padronização e caracterização das atividades enzimáticas

- Efeito do Armazenamento: A estabilidade das enzimas foi avaliada em diferentes tampões (Acetato pH 4–6, TRIS.HCl pH 7–8, AMPOL pH 9–10) contendo MgCl₂ e ZnCl₂. As amostras foram armazenadas a -70 °C e a atividade foi medida em tempos de 0, 0,5, 1, 2, 7, 15 e 30 dias.
- Efeito do pH e da espécie tamponante sobre a atividade: A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi testada em tampões Acetato (pH 4,5–7,0), TRIS.HCl (pH 7,0–8,5) e AMPOL (pH 8,5–11), todos a 87 mmol.L⁻¹. O pH foi monitorado antes e após cada reação.

- Efeito da temperatura e tempo de reação: A atividade enzimática foi avaliada em temperaturas de 20 a 45 °C e tempos de 1 a 15 minutos, utilizando tampão TRIS.HCl pH 7,5 com MgCl₂ e ZnCl₂.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados por ANOVA one-way, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação, todas as determinações foram realizadas em triplicata.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A padronização das condições ótimas para ensaios de atividade das fosfatases (*p*-NFFase) e da LPS-desfosforilase no fígado de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) revelou parâmetros consistentes e comparáveis aos descritos para outros tecidos e espécies de vertebrados. O efeito do pH indicou valores ótimos aparentes de 5,0 para a fosfatase ácida e 10,5 para a fosfatase alcalina (Figura 1), resultados coerentes com achados prévios em cauda e membros de girinos de *L. catesbeianus* (COLOSIO et al., 2024; GONÇALVES et al., 2015; 2021) e também para diferentes isoformas de diferentes espécies (McCOMB; BOWERS; POSEN, 1979).

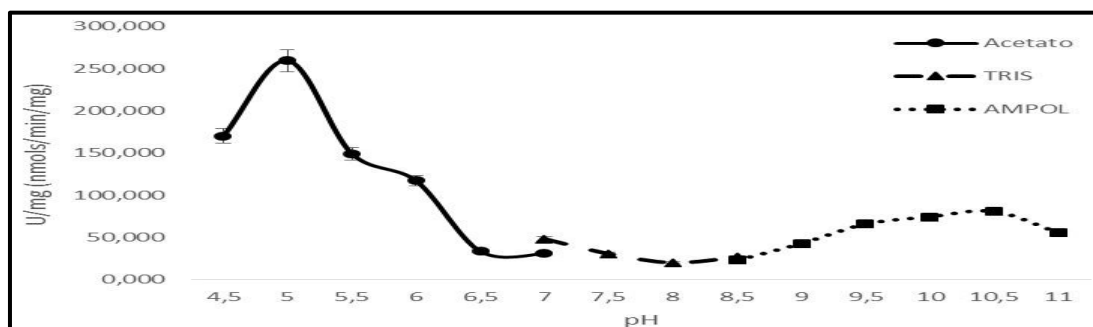


Figura 1 – Efeito do pH sobre a atividade das fosfatases hepáticas de girinos de *L. catesbeianus*.

Fonte: Próprio autor

A estabilidade enzimática frente a diferentes condições de armazenamento mostrou que tanto a fosfatase ácida quanto a alcalina preservaram suas atividades nos intervalos de pH testados, o que reforça a utilização de tampão TRIS-HCl pH 7,5, prática comum em estudos comparativos (PIZAURO, 1993). A influência da temperatura e do tempo de reação (Figuras 2 e 3) revelou ótimos de 40°C/5 min para a fosfatase ácida e 27°C/5 min para a alcalina. Contudo, a padronização final

adotou 37 °C, por ser a temperatura de referência em estudos com enzimas hepáticas de diferentes espécies (KUBICZ; SZALEWICS, 1989; GOSEKI; OIDA; SASAKI, 1990).

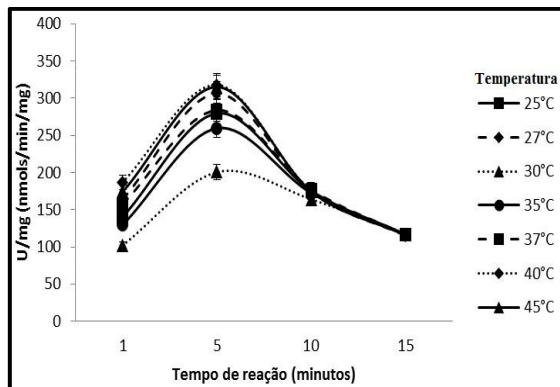


Figura 2 – Efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade da fosfatase ácida.

Fonte: Próprio autor

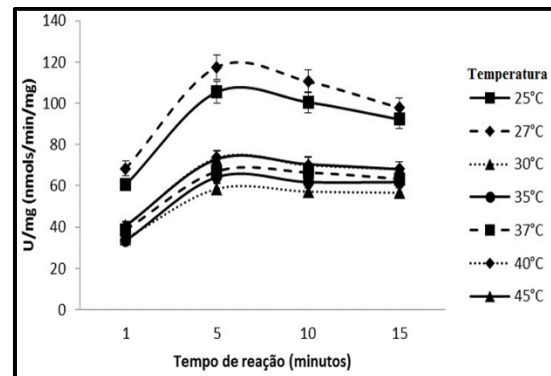


Figura 3 – Efeito da temperatura e do tempo de reação sobre a atividade da fosfatase alcalina.

Fonte: Próprio autor

O estudo da atividade de LPS-desfosforilase associada à fosfatase alcalina hepática, revelou pH ótimo aparente em 9,0 (Figura 4), mas os ensaios foram conduzidos em pH fisiológico (7,4), permitindo comparações mais próximas com modelos de mamíferos (LEVITT et al., 2022).

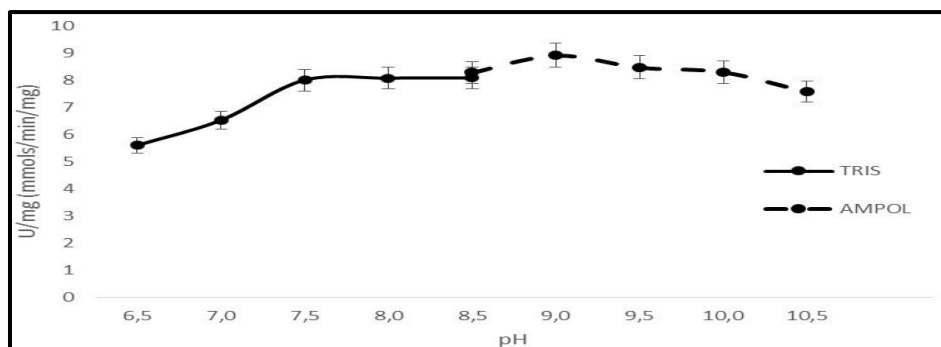


Figura 16 – Efeito do pH sobre a atividade de LPS-desfosforilase da fosfatase alcalina hepática de girinos de *L. catesbeianus* no estágio 46.

Fonte: Próprio autor

Comparando-se os dados obtidos com outros vertebrados, observa-se que as características cinéticas e de estabilidade das fosfatases hepáticas dos girinos aproximam-se de padrões já descritos para peixes (VILLANUEVA et al., 1997), aves (SAVOVA; KIREV, 1992), répteis (YORA; SAKAGISHI, 1986) e mamíferos (DE BROE et al., 1985).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para *L. catesbeianus*, os resultados aqui descritos demonstram que as condições experimentais ótimas são, para fosfatase: pHs ótimos 5 e 10,5, temperatura 40°C para a fosfatase ácida e 27°C para a alcalina, ambas com 5 minutos de reação. E a LPS-desfosforilase teve o pH ótimo aparente estabelecido em 9.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Jaboticabal pela infraestrutura cedida.

A Fapesp e ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

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.

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

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.; PIZAULO, J. M. Activity of acid and alkaline phosphatase in endochondral ossification of *Lithobates catesbeianus* during the metamorphic climax. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 40., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBBQ, 2011.

COLOSIO, R. R. et al. Enzymatic activity of bone markers on *Lithobates catesbeianus* growth during the ossification process. **Brazilian Journal of Biology**, v. 84, e251970, 2024.

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.

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

DE BROE, M. E. et al. Liver plasma membrane: the source of high molecular weight alkaline phosphatase in human serum. **Hepatology**, v. 5, n. 1, p. 118-128, 1985.

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.; PIZAURRO, 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.

GONÇALVES, A. M.; SANTOS, L. F. J.; SANTANA, C. C.; COLOSIO, R. R.; PIZAURRO, J. M. Activity of Tail Phosphatases: A Study during Growth and Metamorphosis of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 103, n. 3, p. 634-638, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1643/OT-14-131>.

GONÇALVES, A. M. et al. Identification and characterization of acid and alkaline phosphatases and protein phosphatases in *L. catesbeianus* tail during metamorphosis. **Biological**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00877-9>.

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.

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.

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.

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.

LEVITT, M. D.; HAPAK, S. M.; LEVITT, D. G. Alkaline phosphatase pathophysiology with emphasis on the seldom-discussed role of defective elimination in unexplained elevations of serum ALP. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, v. 15, p. 41-49, 2022.

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

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.

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.

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.

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.

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

SANTOS, L. F. J. et al. Ontogeny of the Digestive Enzymes of Tadpoles of *Lithobates catesbeianus*. **Copeia**, v. 104, n. 4, p. 838-842, 2016.

SAVOVA, M.; KIREV, T. Alkaline phosphatase activity in serum of guinea fowl bearing bone tumours induced by osteopetrosis virus. **Avian Pathology**, v. 21, p. 667-673, 1992.

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.

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.

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.

VILLANUEVA, J. et al. Intestinal and hepatic alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 279, n. 4, p. 347-354, 1997.

YORA, T.; SAKAGISHI, Y. Comparative biochemical study of alkaline phosphatase isozymes in fish, amphibians, reptiles, birds and mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 85B, p. 649-658, 1986.