



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
FACULDADE DE BIOLOGIA

DANIEL FONSECA DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
REGENERAÇÃO DE PELE DO PEIXE PULMONADO SUL-AMERICANO
(*Lepdosiren paradoxa*)

BELÉM
2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

F676a Fonseca de Carvalho, Daniel.
Avaliação da Expressão de Genes Relacionados à Regeneração
de Pele do Peixe Pulmonado Sul-Americano (*Lepdosiren paradoxa*)
/ Daniel Fonseca de Carvalho. — 2023.
27 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Paula Cruz Schneider
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Faculdade de
Ciências Biológicas, Belém, 2023.

1. Regeneração. 2. Metaloproteinases de Matriz. 3. Genes
TIMP. 4. Genes ADAM. 5. Lâmina Basal. I. Título.

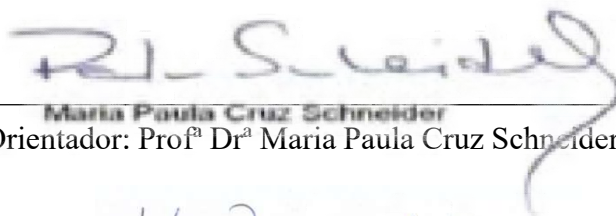
CDD 572.865

DANIEL FONSECA DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À
REGENERAÇÃO DE PELE DO PEIXE PULMONADO SUL-AMERICANO
(*Lepdosiren paradoxa*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Modalidade Biologia, da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

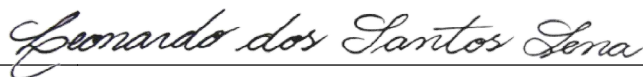
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Paula Cruz Schneider.



Maria Paula Cruz Schneider
Orientador: Prof^ª Dr^ª Maria Paula Cruz Schneider UFPA



Avaliador: Prof^ª Dr^ª Maíra Pompeu Martins UFS



Avaliador: Prof^º Dr^º Leonardo dos Santos Sena UFPA

BELÉM

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, da inteligência e curiosidade dadas. Pela Sua sempre infinita misericórdia para comigo. E agradeço ter tido a oportunidade de estudar e apreciar a beleza, variedade e diferentes formas de Sua criação de modo sistemático e analítico.

Agradeço aos meus pais pelas oportunidades concedidas, pelo amor e confiança. Bases amorosas que nunca abandonarei onde estiver. Ao meu pai agradeço especialmente a fortaleza e o apoio durante os momentos mais difíceis da minha vida, foi um amor que pude tocar. À minha mãe agradeço a consciência e a diligência na nossa educação formal e informal, cultural e técnica, são de gerar frutos até hoje pela visão de uma mãe que deseja o melhor para os filhos. Ao meu irmão, portador de um arrojamento inspirador cuja amizade me é muito cara. À minha avó Nazaré, eu agradeço especialmente pelo entusiasmo com que sempre recebe curiosidades científicas e novidades da minha vida acadêmica, assim como todo apoio e suporte que complementa minha educação e vida. Aos meus avós Brito e Crisantina, que são um modelo de diligência, perseverança e firmeza e que de longe sempre de modo tão próximo e íntimo me motivaram.

Agradeço à Nadyme Assad, companheira formidável e cientista admirável, cujo apoio e conselhos fizeram da jornada acadêmica uma empreitada mais fácil e definitivamente mais executável. Toda a sua ajuda e companheirismo foram de um valor imenso.

Agradeço à minha orientadora, Paula Schneider, pelas oportunidades concedidas de estágio, iniciação científica e TCC. E pelo humor adorável e inofensivamente sarcástico.

Agradeço ao Lucas Silva, pela paciência, ajuda e orientações dadas durante o meu tempo no laboratório, foram essenciais para a realização desse trabalho.

Agradeço à Socorro Carvalho, que me ajudou no suporte doméstico e que facilitava imensamente minha vida fazendo minhas refeições.

Aos amigos Ana Beatriz Pampolha e Gabriel Belich, que foram ótimos parceiros nessa graduação.

Agradeço a todos que me acompanharam em maior ou menor grau durante a graduação ou que fora dela fizeram dos últimos anos um período melhor com sua companhia, orações, torcidas e palavras.

SUMÁRIO

Resumo	página 1
1. Introdução	página 2
Regeneração	página 3
<i>Lepdosiren paradoxa</i> , o peixe pulmonado sul-americano	página 4
<i>Lepdosiren paradoxa</i> e <i>Ambystoma mexicanum</i> : modelos de pesquisa regenerativa.....	página 5
Histologia da pele de <i>Lepdosiren paradoxa</i> e <i>Ambystoma mexicanum</i>	página 6
Regeneração da pele de <i>Lepdosiren paradoxa</i> e <i>Ambystoma mexicanum</i>	página 9
Matriz metaloproteinases e Tissue inhibitors of Matriz Metalloproteinases	página 10
Genes A Desintegrin and Metalloproteinases	página 11
Membrana basal, laminina e colágeno IV	página 11
2 Objetivos.....	página 12
3 Metodologia.....	página 13
4 Resultados e Discussão.....	página 14
Genes MMP	página 14
TIMP4.....	página 16
Genes ADAM	página 16
Genes codificadores de laminina e colágeno IV	página 17
5 Conclusão	página 19
6 Bibliografia.....	página 20

RESUMO

A regeneração é uma resposta adaptativa à perda de uma parte do corpo por algum evento traumático em membros ou estruturas. O peixe pulmonado *Lepdosiren paradoxa*, por sua vez é um vertebrado com alta capacidade regenerativa, pertencente ao grupo dos Dipnoi, o grupo de peixes mais próximos dos tetrápodes. Apesar de haver estudos sobre a regeneração de membros da *Lepdosiren paradoxa*, ainda não há pesquisas sobre a regeneração com foco exclusivo na pele. Para investigar o perfil de ativação de genes relacionados à regeneração, foram avaliados o perfil de ativação dos genes da família Matrix Metaloproteinases (MMP), Tissue inhibitors of matrix metaloproteinases (TIMP), A desintegrin and A metaloproteinases (ADAM). Também são avaliados os padrões de expressão de genes codificadores de laminina e colágeno IV para investigar o desenvolvimento da Lâmina Basal. São feitas avaliações de expressão desses genes e discutidas as consequências para os fenômenos regenerativos da pele que ocorreram durante o período avaliado: controle, dois dias pós lesão e sete dias pós lesão. A base de avaliação comparativa é o urodelo *Ambystoma mexicanum*, devido a semelhança regenerativa entre o animal estudado e o modelo comparativo. O padrão de expressão gênica é bem diferente do padrão apresentado pelo modelo comparativo. Os genes MMP-8 e algumas isoformas de MMP-13 são reprimidos no dia 2 pós injúria e no dia 7 pós injúria são reprimidos os genes MMP-9 e a maior parte das isoformas de MMP-13. A diferença possivelmente é explicada por uma diferença na velocidade em que os fenômenos de hemostasia, inflamação e reepitelização ocorrem. O único gene TIMP expresso foi o TIMP4 e foi reprimido em ambos os dias, isso pode indicar que as proteínas MMP estão sendo inibidas por outras vias. A repressão da maior parte dos genes Adam vai ao encontro do perfil dos genes MMP podendo evidenciar uma homeostasia e inflamação mais prolongadas. De modo similar, os genes codificadores laminina LAMC1 e LAMC3 foram reprimidos, o primeiro no dia 2 e 7 pós injúria e o segundo apenas no dia 7. Os genes codificadores de colágeno IV COL4A1, COL4A1B e COL4A6, foram todos reprimidos no espaço de tempo observado. Esse padrão igualmente parece confirmar de que a homeostasia e inflamação são os fenômenos predominantes e que a produção da lâmina basal ainda não começou em até 7 dias pós injúria.

1. INTRODUÇÃO:

Regeneração

A regeneração é uma resposta adaptativa à perda de uma parte do corpo por algum evento traumático em membros ou estruturas. Esse processo pode ser encontrado em várias formas em diferentes grupos de animais e em vários estágios diferentes, até mesmo procedendo de processos evolutivos distintos, não sendo uma resposta adaptativa homóloga. Belly e colaboradores (2021) consideram a regeneração um processo de substituição de uma parte e que é precedido de um evento traumático como: amputação, uma lesão induzida externamente que separa parte do corpo de um animal; ou autotomia, uma auto amputação em um plano de ruptura previsível. O processo regenerativo também é definido por ocorrer em alguma parte do ciclo de vida pós embrionário através de qualquer mecanismo de desenvolvimento como: Epimorfose, mecanismos de regeneração envolvendo a proliferação de células e a formação de um blastema, do qual irão surgir as novas estruturas; Morfolaxia, mecanismo que não envolve ou o faz de modo limitado células novas. Nesse caso, as estruturas são formadas por um remodelamento das estruturas já presentes. A consequência do processo regenerativo é a produção de estruturas que são iguais ou muito similares à estrutura corporal perdida.

Em cnidários e platelmintos, a capacidade regenerativa manifesta-se na capacidade de surgir um organismo inteiro de fragmentos de um organismo anterior. Já outros animais, como aves e nematódeos, são incapazes de regenerar qualquer estrutura. A capacidade regenerativa pode variar até mesmo em diferentes partes do mesmo organismo, como em alguns lagartos, capazes de desenvolver uma nova cauda, mas não um membro (BELY; NYBERG, 2010). Essa mesma capacidade pode se diferenciar dependendo do estágio de vida, a exemplos dos anuros, capazes de regenerar membros no estágio larval, mas não quando adultos (BOETHE, 2021). Concomitantemente, muitos anelídeos podem regenerar uma cauda, mas não a cabeça (BELY; NYBERG, 2010). Em suma, a regeneração pode ocorrer nos mais variados níveis: celular, tecidual, nos órgãos, estruturas ou no corpo completo (Figura 1) (BELY; NYBERG, 2010).

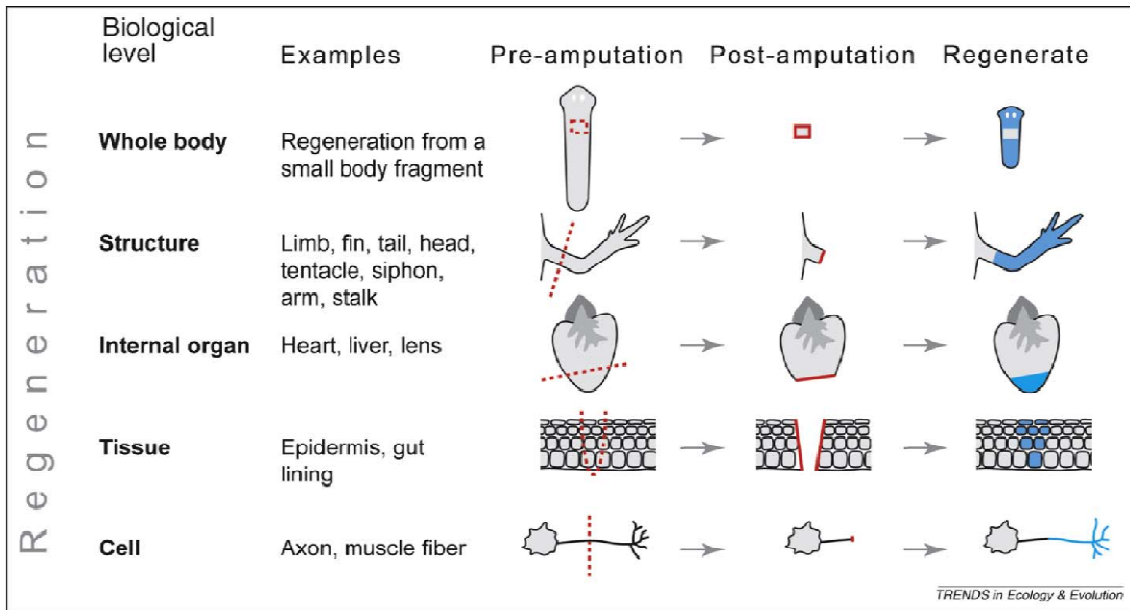


Figura 1: Regeneração em níveis biológicos diferentes. Do corpo completo passando por estrutura, órgão interno, tecido e célula e seus respectivos exemplos: corpo, braço, coração, epiderme e axônio (BELLY, 2009).

***Lepdosiren paradoxa*, o peixe pulmonado sul-americano**

O peixe pulmonado sul-americano, *Lepdosiren paradoxa* (Figura 2), pertence aos Sarcopterígeos não tetrápodes, da Ordem Dipnoi. Popularmente conhecida como Pirambóia, é a única representante desse grupo na América Latina, e pode ser encontrada na Amazônia em lagoas e regiões alagadas, com evidências também para o Paraguai (CARNEIRO et al., 2021) e no Rio Paraná (ROMANO, 2019). Dipnoicos apareceram no início do período devoniano (419 – 392 milhões de anos atrás) (BOTHE et al, 2021) e foram dispersados em ambientes marinhos e de água doce. Esse peixe pulmonado utiliza ar para respirar de modo obrigatório e é o único membro recente de sua família, Lepdoseirenidae. (ROMANO, 2019). Quando jovem, ele se alimenta basicamente de larvas de insetos e lesmas, tornando-se basicamente onívoro quando adulto. Durante o período de seca, eles se escondem na lama formando uma câmara e deixando uma entrada de ar. A pele tem importantes funções durante a estivação e a camada mucosa é utilizada para prender umidade e desacelerar o metabolismo assim como ajudar na respiração (ROMANO, 2019).

Estudos filogenéticos e sequenciamentos genômicos tem revelado que os peixes pulmonados, e não os celacantos, são os parentes mais próximos dos tetrápodes, e assim são também muito importantes nos estudos da transição evolutiva de peixes para

vertebrados terrestres (NOGUEIRA et al, 2016). E dada a sua proximidade com os vertebrados e sua capacidade de regenerar membros que rivaliza com as salamandras, sendo capazes de regenerar cauda e barbatanas (VERISSIMO, 2020; BOETHE, 2021), os peixes pulmonados são um objeto de pesquisa promissor e relevante.



Figura 2: Fotografia da *Lepdosiren paradoxa*. Fonte: Piramboia – MUSA – Museu da Amazônia (museudaamazonia.org.br).

***Lepdosiren paradoxa* e *Ambystoma mexicanum*: modelos de pesquisa regenerativa**

Alguns grupos de animais possuem processos de regeneração mais complexa em que ocorre uma epimorfia sem a formação de cicatriz (uma matriz fibrosa), como o Axolote (*Ambystoma mexicanum*), do grupo dos tetrápodes, que detém uma habilidade regenerativa não encontrada entre os demais vertebrados, sendo capaz de recuperar membros inteiros, como a mandíbula, tecidos cardíacos e até órgãos da visão (BROCKES, 2005). Essa capacidade, em especial de regenerar membros completos, é uma capacidade que permanece ao longo da vida do Axolote. Existem também sapos capazes de regenerar membros, porém essa capacidade é significativamente reduzida após o clímax metamórfico (BOETHE et al, 2021). Os urodelos, grupo ao qual as salamandras pertencem, são o único grupo de vertebrados que mantêm desde o estado larval, a mesma capacidade regenerativa. (BOETHE et al, 2021). Como já dito, o grupo dos Sarcopterígios, no qual encontram-se os peixes pulmonados, classe Dipnoi, é um grupo irmão dos tetrápodes.

A Pirambóia tem bem documentada sua capacidade de regenerar apêndices corporais, de forma comparável à das salamandras. Nogueira e colaboradores (2016), relatam que os mecanismos genéticos da *Lepdosiren paradoxa* que estão por trás da formação do blastema, uma massa de células indiferenciadas que se forma em um local de ferida e que em último lugar dá origem à parte regenerada do corpo (BELY; NYBERG,

2010), é similar ao mecanismo de Salamandras, sugerindo a possibilidade de a regeneração ser uma capacidade adaptativa primitiva que foi perdendo-se ao longo do desenvolvimento de algumas linhagens de seres vivos (NOGUEIRA et al, 2016); registros fósseis reforçam essa teoria, ao mostrar que anfíbios ancestrais, anteriores ao aparecimento de salamandras, já detinham essa capacidade (BOTHE et al, 2021). Após seu surgimento nos seres vivos, essa capacidade sofreu pressões ambientais e ecológicas sendo então selecionada evolutivamente (BELY; NYBERG, 2010).

Neste mesmo contexto, Nogueira (2016), avaliou a regeneração em peixes pulmonados, com enfoque direcionado em morfologia e mecanismos moleculares que produzem o blastema. Ele concluiu que em um nível molecular e morfológico a regeneração de barbatanas de peixes pulmonados é bastante similar aos mecanismos das salamandras. Por meio de uma análise de expressão gênica, igualmente foi encontrada uma forte semelhança entre silenciamento de genes codificadores de proteínas musculares e a expressão de genes codificadores de matriz metaloproteinases, dentre outros. Os resultados ao comparar a expressão de genes relacionados à regeneração e outros já identificados como genes específicos de linhagem, apontam a uma origem evolutiva comum com apenas novos genes sendo integrados a uma estrutura já preexistente.

Histologia da pele de *Lepdosiren paradoxa* e *Ambystoma mexicanum*

Muitos peixes desenvolveram o mecanismo de secreção de muco como resposta a agressões provenientes do ambiente em que vivem, e para aqueles com hábito de se enterrar na lama, a histologia da pele e a constituição do muco podem apresentar modificações (COELHO 1972). Ademais, sendo a *L. paradoxa* um peixe pulmonado os mecanismos e tecidos envolvidos nos processos respiratórios são bem diversos e a pele tem um papel importante a ponto de Hughes (1976) declarar que são similares a de anfíbios. A *Lepdosiren paradoxa*, abaixo da camada de muco apresenta uma epiderme com 4 a 5 estratos e contendo um significativo número de macrófagos (IMAKI, 1975). Pode-se observar duas camadas tegumentárias. A camada germinativa é formada de células cúbicas assentado sobre a lâmina basal que separa epiderme da derme (COELHO, 1972). Toda a derme é constituída de tecido conjuntivo frouxo permeado de lâminas de tecido conjuntivo denso, dispostas regularmente em camadas e intercaladas (FIGURA 3). Na derme existe a presença de papilas vasculares que se aprofundam na epiderme chegando a formar dobras na superfície externa do tegumento. (COELHO, 1972).

Em piramboias juvenis encontra-se as camadas clássicas que formam a pele de peixes: epiderme, compondo a derme: estrato esponjoso e estrato compacto, hipoderme e músculo esquelético subjacente (ROMANO, 2019). Assim como no adulto, o epitélio é composto de 4 a 5 camadas de células e estão descansando sobre a membrana basal (MB). Células basais são totipotentes. Abaixo da MB encontra-se o estrato esponjoso da derme, abundante em melanina. No estrato compacto foi observado bastante colágeno, fibras elásticas e estruturas vasculares (ROMANO, 2019) (Figura 4).

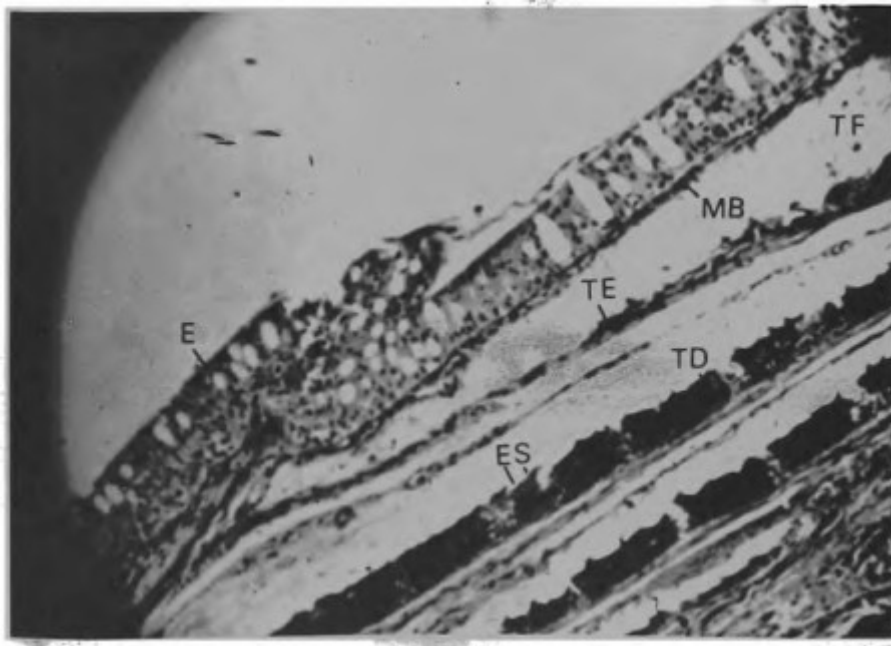


Figura 3 – Diferentes camadas histológicas da *Lepdosiren paradoxa*. Secção transversal do regimento da região ventral. E-epiderme; MB-Membrana Basal; E.S-Esacama; T.F-Tecido conjuntivo frouxo; T.D-Tecido conjuntivo Denso; T.E-Tecido Conjuntivo elástico. (Petrini, 1972).

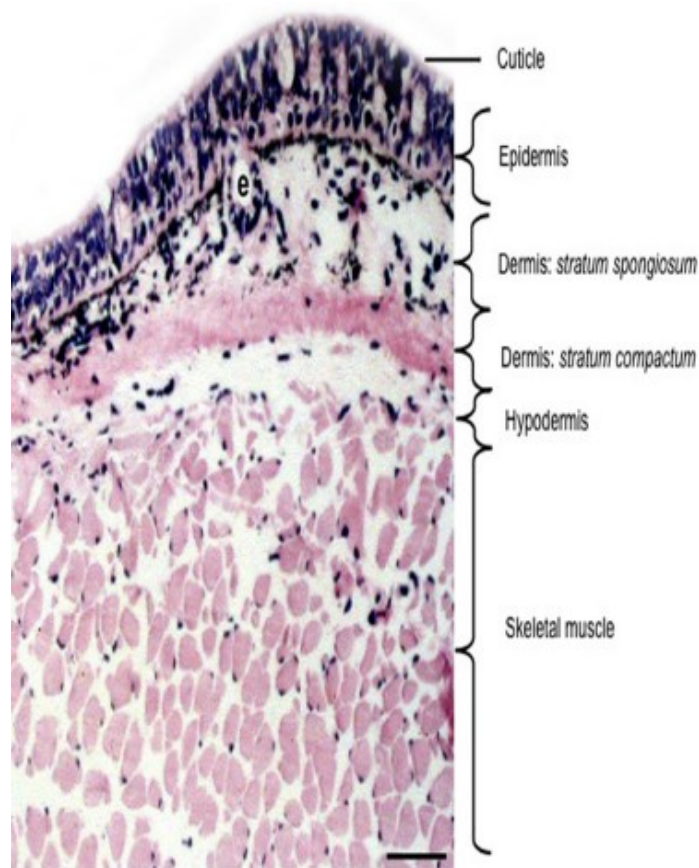


Figura 4. Camadas histológicas da pele de *Lepdosiren paradoxa* juvenil. Composta de cutícula, epiderme, derme (estrato esponjoso e compacto), hipoderme e músculo esquelético subjacente (ROMANO 2019).

A composição da pele do *A. mexicanum*, por sua vez, é composta de uma epiderme pseudoestratificada, contendo células epiteliais e de Leydig. Esta, está apoiada sobre o estrato germinativo e abaixo deste a membrana basal, que separa a derme da epiderme. A derme é composta por uma camada superior, o estrato esponjoso que contém glândulas e fibroblastos dermais, algumas fibras de colágeno e muco da epiderme; e uma camada inferior, o estrato compacto, composto por bastante Matrix extracelular (MEC) e bastante fibras de colágeno. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme e o músculo adjacente, respectivamente (SEIFERT, 2012) (Figura 5).

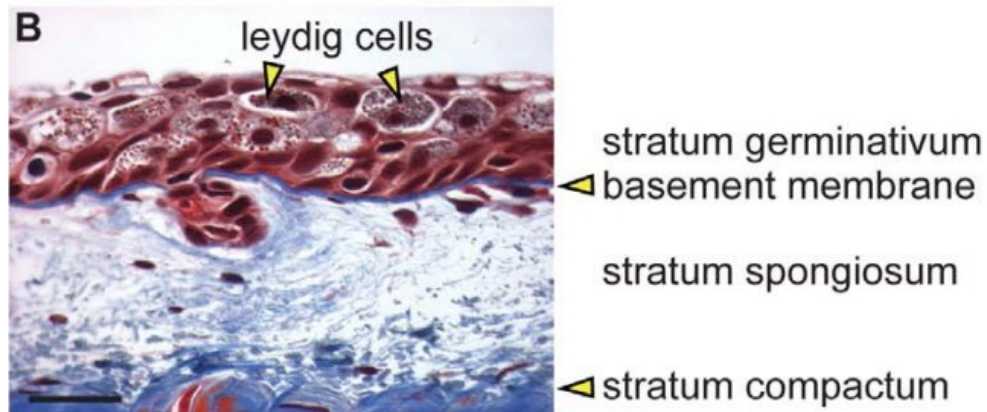


Figura 5. Camadas histológicas da pele do *Ambystoma mexicanum*. No corte apresentado são mostrados apenas as camadas da epiderme, estrato germinativo, membrana basal, estrato esponjoso, estrato compacto. (Seifert et al, 2012).

Regeneração da pele de *Lepdosiren paradoxa* e *Ambystoma mexicanum*

A ordem e os mecanismos pelos quais ocorrem a regeneração em diferentes criaturas pode elucidar as variáveis que compõe todo o processo regenerativo. Nos mamíferos, a regeneração apesar de ser um processo em que muitos mecanismos ocorrem ao mesmo tempo, pode ser descrita como formada por três fases: Inflamação, nova formação de tecido e remodelamento de tecido (SEIFERT, 2012). Depois da Hemostasia restabelecer uma barreira entre o corpo e o ambiente, células imunes são enviadas para limpar bactérias e restos celulares, junto à liberação de citocinas pela MEC adjacente e pelas próprias células imunes. A fase de formação de novos tecidos é caracterizada, pela migração dos queratinócitos sob a crosta para reestabelecer a camada epidermal, concomitante a isso, fibroblastos ao redor da lesão se transformam em miofibroblastos que ao secretar colágeno acabam ao fim sendo os responsáveis pela cicatriz. Na fase de remodelamento, proteínas extracelulares como metaloproteinases da matriz irão rearranjar as fibras de colágeno no tecido da cicatriz (LEVESQUE, 2010). É sempre importante fazer paralelos com a regeneração de mamíferos pois boa parte da motivação por trás de pesquisas regenerativas são seu potencial translacional para regeneração humana.

O estudo de regeneração de Axolotes é predominantemente voltado para a regeneração de membros. Nesse contexto as pesquisas sobre regeneração exclusivamente epidermal são um tanto recentes e menos abundantes, embora com estudos muito detalhados e elucidativos como realizados por Seiferte e colaboradores (2012) e Levesque

e colaboradores (2010), em que estes detalham o processo de regeneração livre de cicatrizes na epiderme do Axolote. Após uma lesão excisional, ou seja, que retira o revestimento até tocar no músculo subjacente, o *A.mexicanum* é capaz de completar a reepitelização de uma área lesionada de 1.5 mm em cerca de 8 horas (LEVESQUE, 2010). Durante um estudo, Seifert (2012) analisou o processo de hemostasia, inflamação, formação de novos tecidos e o remodelamento em uma janela de 180 dias. O processo pode ser assim resumido: no primeiro dia ocorre a reepitelização; no dia 7 havia a presença de células sanguíneas no leito e pouca evidência de fibrina entre a neoepiderme e o músculo adjacente; 14 dias pós-injúria (dpi), fibroblastos são visto abaixo da epiderme onde nova MEC foi depositada e músculos se fragmentaram em mioblastos individuais; 21 dpi já era encontrada uma MEC robusta entre a epiderme e o músculo e colágeno é visível no músculo em regeneração; 47 dpi estrato esponjoso havia sido regenerado, o estrato compacto ainda não totalmente; 80 dpi todas as camadas haviam se regenerado completamente; 180 dpi maturação de glândulas.

Até o presente momento, não existem artigos e estudos que tratem exclusivamente sobre a regeneração de *Lepdosiren paradoxa*, sendo este uma investigação pioneira sobre o assunto. Como *A.mexicanum* e *Lepdosiren paradoxa* parecem compartilhar um programa genético de regeneração ancestral como evidenciados em análises transcriptômicas (NOGUEIRA, 2016), ambos apresentam a formação de um blastema proliferativo, substituição de estruturas originais como músculo, esqueleto e cordão espinhal (VERISSIMO et al., 2020) durante a regeneração de membros (BOTHE et al., 2021), e existe uma forte semelhança entre a histologia de ambas espécies, é natural que o Axolote sirva de modelo comparativo para a pesquisa sobre a regeneração do epitélio de revestimento da Pirambóia, desde a sequência de formação das camadas epiteliais, dos mecanismos celulares envolvidos como também a expressão genética presente.

Metaloproteinases de Matriz e Tissue inhibitors of Metalloproteinases

As Metaloproteinases de Matriz (MMP) pertencem a uma família gênica que produz múltiplas enzimas que possuem propriedades semelhantes. As enzimas produzidas são capazes de degradar vários componentes da matriz extracelular e sua atividade é inibida por *Tissue inhibitors of Metalloproteinases* (TIMPs) (CLARK, 1996). MMPs promovem a proliferação celular, migração e diferenciação sendo capazes de ter um papel muito importante durante o reparo de tecidos em humanos (XI WANG, 2018). Esses genes são expressos por diversas células na pele como queratinócitos, fibroblastos,

células endoteliais e inflamatórias. (Caley et al., 2015). Em caso de dano, genes *MMP* são rapidamente expressos e ativados (Caley et al., 2015).

Os genes da família da *Metaloproteinases de Matriz* (MMP), apresentam uma subdivisão em quatro classes baseadas em sua especificidade: i) *colagenase*, na qual estão incluídos o MMP-1, MMP-8 e MMP-13, que por sua especificidade clivam fibras colágenas; ii) *gelatinases* (MMP-2 e MMP-9), com especificidade maior para colágeno do tipo IV e colágeno desnaturado; iii) *stromelysina* (MMP-3, MMP-10 e MMP-11) e iv) *matrilisina* (MMP-7), que age contra uma variedade de substratos da Matrix extracelular (ECM); um diverso grupo de MMP composto por *metalloelastase* (MMP-12) (BENBOW, 1997).

Durante a recuperação dermal em seres humanos, a primeira colagenase a ser expressa é MMP-8, antes mesmo de MMP-1, o que parece sustentar a tese de que durante a recuperação de tecidos existem diferentes janelas de tempo para cada MMP (XI WANG, 2018).

Os genes *TIMP* parecem controlar a atividade dos genes *MMP*, pois são inibidores dos fatores destes (VICENTI, 2001). Existem quatro classes de genes *TIMP* e, apesar de *in vitro*, qualquer classe parece ser capaz de inibir todas as classes de genes *MMP*, parece que existe uma especificidade restrita em tecidos sugerindo uma função específica para cada *TIMP* (VICENTI, 2001).

Foi demonstrado por Seifert (2012) que a expressão epidérmica e a atividade enzimática de serina proteinases e metaloproteinases de matriz afetam a migração de queratinócitos e a degradação de matriz extracelular em Axolotes após injúrias epidérmicas superficiais. Desse modo, é relevante entender a expressão de genes que controlam e afetam essas enzimas e estruturas, como os genes da família das Matrix Metaloproteinases (MMP), *Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases* (TIMP). (SEIFERT, AW, 2018) na *L.paradoxa*.

Genes ADAM

Os genes da família *A desintegrin and metalloproteinases* ADAM são uma família que codifica e age sobre proteínas transmembranares. Suas funções estão associadas a adesão celular, processamento proteolítico dos ectodomínios de células e moléculas sinalizadoras. Alguns genes ADAM geram produtos com sítio de metaloproteinases enquanto outros não. O seu papel durante a cicatrização de lesões de mamíferos ainda é

pouco compreendido. Por sua capacidade de clivar domínios ligados a membrada de diferentes células e sinalizadores como citocinas, fatores de crescimento e receptores de fatores de crescimento. Em Axolotes os genes ADAM não parecem estar envolvidos em um papel vital durante a regeneração livre de cicatrizes, entretanto, parecem trabalhar de modo sinérgico concomitante à migração de queratinócitos. (SEIFERT, 2012).

Muitos estudos identificam genes ADAM como sendo capazes de promover a clivagem de proteínas, fatores de crescimento e enzimas da membrana celular de tecidos somáticos por meio de proteases chamadas de shedases. (EDWARDS, 2008).

Membrana Basal, Laminina e Colágeno IV

Durante a regeneração de membros de salamandras, a formação da Membrana Basal (BM), parece facilitar a regeneração dermal, enquanto seu atraso promove a formação do blastema (SEIFERT et al., 2012). Experimentos realizados por Seifert (2012) mostraram que já tem indícios de formação da membrana basal em Axolotes, no início da regeneração, já no dia 1 pós lesão, com 7 a 21 dias pós lesão sinais mais claros de formação da BM estando completamente regenerada no dia 47 pós lesão. Já no estudo conduzido por Levesque et al. (2016), não havia sinais da formação da membrana basal 9 dias após a injúria, começando a apresentar sinais de reconstituição a partir de 12 a 18 dias e é completamente reconstituída entre 45 e 90 dias pós injúria. A membrana basal subdivide-se em lâmina lúcida, composta especialmente por laminina e a lâmina densa, composta por colágeno tipo IV. Em Axolotes a lâmina lúcida desenvolve-se primeiro que a lâmina densa e a finalização desta corresponde à produção de matriz extracelular no leito da ferida.

Estudos comparativos têm mostrado cada vez mais semelhanças na regulação gênica e transcricional durante a formação do blastoma em peixes pulmonados e salamandras (NOGUEIRA et al. 2016) o que tem despertado interesse maior em conhecer e descrever os mecanismos morfológicos e regenerativos dos Dipnóicos. Entretanto, concomitantemente, ainda são escassos estudos comparativos que contribuam para um maior entendimento das semelhanças entre a regeneração de barbatanas, tecidos de revestimento e membros de peixes pulmonados e salamandras, respectivamente (BOTHE et al, 2021). Dessa forma, é importante ampliar o conhecimento de expressão gênica da *Lepdosiren paradoxa* após injúrias, para entender melhor o maquinário genético responsável pela formação dos tecidos de regeneração epimórfica. Sob uma perspectiva de ciência translacional, compreender a as características moleculares envolvidas na

formação histológica epimórfica de um tecido lesionado, como o encontrado na *L. paradoxa*, pode gerar tratamentos eficazes para a regeneração humana sem cicatrizes. O próprio ser humano tem alguma capacidade regenerativa homeostática, todavia, tecidos e órgãos complexos em geral não são regenerados em resposta à uma injúria (SEIFERT, A. MUNEOKA, K. 2017).

Apesar de muito avançado o conhecimento molecular e genético que compõe o processo regenerativo de salamandras, os estudos direcionados à *L. paradoxa* ainda necessitam de esforços, tanto para entender quais são os mecanismos genéticos compartilhados entre vertebrados com alto poder regenerativo, quanto quais são as especificidades e as diferenças nas dinâmicas de ativação genética, o que pode esclarecer como e porque a regeneração ocorre. Assim, a primeira proposta do presente trabalho é avaliar o diferencial de expressão de genes de MMPs e da família ADAM e o gene TIMP4 em tecido epitelial de *L. paradoxa* sob regeneração dois e sete dias depois do ferimento (2- e 7-dpi), a fim de compreender a dinâmica de modulação da expressão desses genes no processo regenerativo em um organismo próximo de tetrápodes. A segunda proposta consiste em avaliar a expressão de genes codificadores de laminina e colágeno IV e comparar se esse perfil de expressão corresponde à formação da lâmina lúcida seguida da lâmina densa, as duas camadas formadoras da lâmina basal.

Dessa forma, é relevante avaliar a proximidade filogenética dos genes e proteínas envolvidos no processo de regeneração, assim como os níveis de expressão gênica, para avaliar a validade da hipótese da regeneração como traço pertencente ao ancestral comum dos tetrápodes e Sarcopterígeos e obter um padrão do modelo de regeneração livre de cicatrizes da *Lepdosiren paradoxa*.

2. OBJETIVOS:

Avaliar o diferencial de expressão de genes de MMPs e da família genica ADAM no processo de regeneração epitelial de *L. paradoxa* em intervalos de 2 dias (2-dpi) e 7 dias pós-injúria (7-dpi) e caracterizar a ordem e momento do desenvolvimento da membrana basal da área lesionada avaliando os genes codificadores de Colágeno IV e Laminina.

- Avaliar o diferencial de expressão de 9 genes de MMP; 7 genes ADAM e o gene TIMP4 em regeneração epitelial de *L. paradoxa*;
- Avaliar o diferencial de expressão dos genes codificadores de laminina e colágeno IV para cada um dos dias analisados para definir um padrão de desenvolvimento da membrana basal e seus componentes lâmina lúcida, composta principalmente por laminina e lâmina densa, composta majoritariamente de colágeno IV

3. METODOLOGIA:

Obtenção de amostras e processo experimental:

Espécimes de peixe pulmonado sul-americano (*Lepdosiren paradoxa*) foram obtidos de fontes naturais no Estado do Pará, Brasil (licença SISBIO n° 79802-2). Os peixes foram aclimatados às condições de laboratório por pelo menos uma semana. Durante o período de adaptação, os peixes foram alimentados com ração (36% PV) uma vez ao dia. Os cuidados com os animais foram conduzidos seguindo o Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Pará sob o protocolo CEUA N° 8251300622. Foram realizados cortes circulares de 6x2 milímetros distantes entre si 7 centímetros ao longo do dorso do animal. Para o presente estudo foram utilizados três cortes para avaliar as condições controle (D0, dia do corte), dois dias (D2) e sete dias após o corte (7D).

Extração de RNA e sequenciamento:

O isolamento de RNA de amostras de 2 e 7 dias pós-lesão superficial na pele foi realizado com TRIzol (Sigma-Aldrich, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade, concentração e integridade das amostras de RNA foram determinadas por espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher, EUA) e eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras de RNA foram sequenciadas na Novogene Co (CA, EUA): as bibliotecas foram geradas (enriquecimento poli-A) e sequenciadas em uma plataforma Illumina® Novaseq com leituras pareadas de 150 pb (número do projeto NCBI Sequence Read Archive PRJNA1001397).

Processamento de leituras, análise e obtenção de sequências gênicas:

Usamos o FastQC v0.11.9 para verificar a qualidade média das leituras e o Trimmomatic v0.40 para recuperar as leituras de alta qualidade. As bibliotecas foram então individualmente utilizadas para o mapeamento e a quantificação de transcritos utilizando o Salmon v e um cDNA a partir do genoma humano como referência. O DE2seq foi utilizado para as análises de expressão gênica no R. Para obter os transcritos dos genes, realizamos duas montagens *de novo*: um transcriptoma de referência usando todas as bibliotecas e montagens por condição (2 e 7 dpi), ambos usando Trinity v2.15.0 [26] e verificamos a qualidade das montagens com assembly- estatísticas v1.0.1 e BUSCO v3 [27]. Os transcritos do transcriptoma de referência foram anotados com BLASTx (BLAST+ 2.13.0) e bowtie2 v2.5.1 usado para realizar um mapeamento contra as montagens por condição e identificar genes da família MMP, ADAM e TIMP, LAM, COL4 expressos no transcriptomas e obtenção das sequências.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Transcriptoma realizado dos tecidos controle, e dos tecidos no 2º dia e 7º dia após a lesão permitiram a identificação de 9 genes de MMPs, 7 genes de ADAM, 1 gene de TIMP4, 2 genes codificadores de laminina e 3 genes codificadores de colágeno IV no total. Genes MMP-13 aparentemente homólogos foram identificados de A-F. Para o MMP13 foram encontrados 6 genes, enquanto para o ADAM12 foram identificados 4.

Genes MMP

Cada gene MMP parece ter uma função determinada para momentos diferentes do processo regenerativo. Em ratos deficientes em MMP-8, apresentaram uma demora na recuperação de feridas cutâneas e maior resposta inflamatória (XU WANG, 2019). O que, ao analisar o perfil de manutenção basal no dia 2 (FIGURA 6), momento em que está ocorrendo o processo de hemostasia e formação da neoepiderme, não se esperaria uma diferença no perfil de expressão. Entretanto, a repressão vista no dia 7 dpi, período em que se pode, com segurança, supor que ainda ocorre o processo inflamatório, parece ir de encontro à resposta inflamatória mais suave, como ocorre com o Axolote ao se comparar à mamíferos (SEIFERT, et al. 2012). Além disso, essa regulação parece corroborar a hipótese de que uma resposta inflamatória mais avançada e expressiva, foi uma troca pelas capacidades regenerativas (SEIFERT, et al. 2012).

Estudos em Camundongos Knockout, indicam que queratinócitos no tecido adjacente à uma lesão cutânea expressam MMP-9 e MMP-13 e que estes genes estão envolvidos com a migração de queratinócitos durante a reepitelização (HATTORI et al. 2009). Em Axolotes a resposta de MMPs é alta diante de uma lesão cutânea, assumindo dois padrões: 1) forte expressão em 1dpi, diminuição em 3dpi e uma contínua diminuição ou estabilização em 7dpi; 2) forte expressão em 1dpi, se manteve acima da média em 3dpi e foi reprimido em 7dpi. O que faz o resultado do transcriptoma da *L. paradoxa* ser bem diferente das expectativas de similaridade entre *A. mexicanum* e *L. paradoxa*.

No perfil transcriptômico pode ser observado uma repressão de diferentes genes MMP, e muitos deles análogos. Isso ocorre de modo acentuado no período do 2º dia com sete genes reprimidos variando entre -2.67 e -9.42 Log2 FoldChange, mas parece retornar ao normal já no 7º dia com apenas dois genes MMP (MMP8 e MMP13-F) sendo significativamente reprimidos entre -7.13 e -8.21 Log2 FoldChange. Esse perfil de expressão parece indicar que a formação da neoepiderme parece acontecer em um período mais longo do que sete dias. É possível argumentar que a demora na ação de queratinócitos possa ser explicado pela presença do muco que forma uma barreira de defesa mecânica contra agentes externos e permita uma regeneração menos estressante e mais lenta, diferentemente do que ocorre com o Axolote (SEIFERT, et al. 2012). Faz-se necessário uma comparação da expressão gênica com estudos histológicos para visualizar os efeitos dos padrões de expressão.

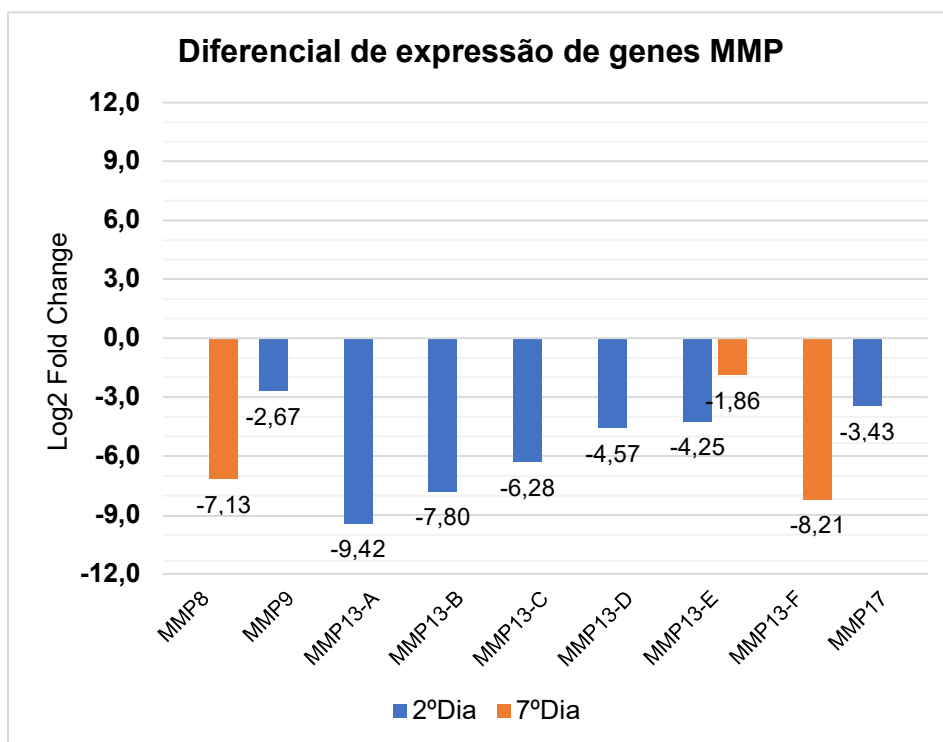


Figura 6. Diferencial de expressão de genes de Matrix Metaloproteinases nos dias 2-dpi (azul) e 7-dpi (laranja).

Gene TIMP4

No resultado visualizado, o TIMP4 foi o único gene que teve alguma mudança expressiva relevante dentre os membros dessa família, mas não parece ter sido específica a nenhum dos genes MMP visualizados, visto que nenhum gene MMP teve sua expressão aumentada de modo significativo durante o 2° e 7° dia correspondendo com a repressão do TIMP4 em ambas as condições (FIGURA 7).

Esse dado também é inesperado, visto que a regulação de MMP se dá com genes TIMPs que os inibem e mesmo que um TIMP possa regular diversos MMP (XU WANG, 2019), ainda não explica exatamente essa ausência de correlação. Entretanto, isso pode mostrar que para os genes MMPs apresentados, a regulação pode-se dar de modo exógeno ou endógeno a partir de expressão de mRNA, ativação da proenzima para a enzima ativa.

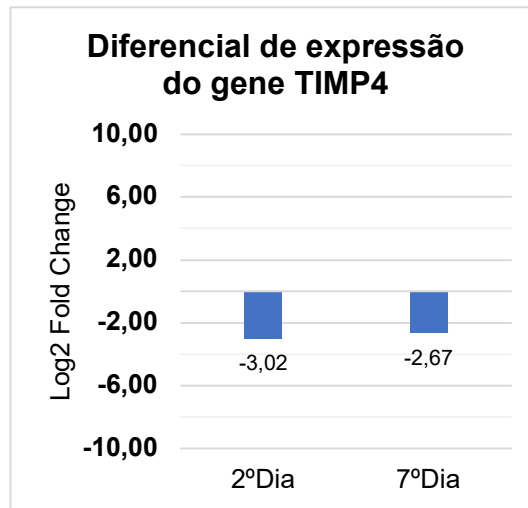


FIGURA 7. Diferencial de expressão do gene TIMP4 nos dias 2-dpi e 7-dpi.

GENES ADAM

De modo inverso aos genes da família MMP, os genes da família ADAM mostram um padrão de repressão expressivo durante 7ºdia se comparado ao padrão transcriptômico sem lesão, com indução do gene ADAM12-C (Figura 7). Durante o sétimo dia, a repressão de ADAM pode ser capaz de interferir em substratos celulares adesivos que foram produzidos durante os dias anteriores, promovendo já uma resposta de maior deposição de proteínas adesivas a lâmina basal do novo tecido em desenvolvimento. Em comparação, em Axolotes, os genes adam não parecem ser vitais para a regeneração epimórfica, mas são ativados concomitantemente à migração de queratinócitos, o mesmo parece ser possível de ocorrer na lesão da *L. paradoxa*.

O Gene ADAM-12 tem sua expressão mais acentuada em tecidos caracterizados por fusão celular, crescimento ou reparo, promovendo adesão celular e reestruturação da MEC, também se liga à células fibroblásticas (NYREN-ERICKSON et al., 2013). É possível argumentar que sua pouca expressão e maior repressão pode ser explicada por uma reepitelização mais lenta, o que é coerente com as repressões de MMP. Nesse espaço de 7 dias, em que possivelmente está ocorrendo ainda a transição da inflamação para a reepitelização, não é exigido a possível função de remodelamento que o gene ADAM-12 parece apresentar (NYREN-ERICKSON et al., 2013) o que possivelmente se assemelharia com o Axolote que apresenta a deposição de fibroblastos e MEC por volta apenas do 14dpi (SEIFERT et al, 2012), embora com a Piramboia esse processo deve ocorrer mais vagorosamente.

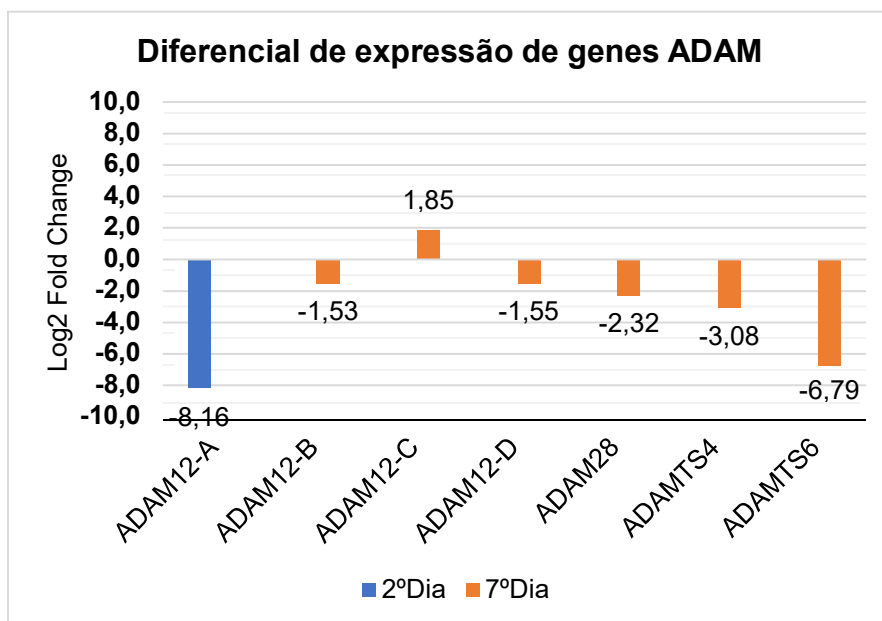


Figura 7. Diferencial de expressão de genes de Matrix Metaloproteinases nos dias 2-dpi (azul) e 7-dpi (laranja).

GENES CODIFICADORES DE LAMININA E COLÁGENO IV

Apenas dois genes codificadores de laminina e três de colágeno IV apresentaram uma expressão diferenciada. Os genes de laminina LAMC1 e LAMC2 foram reprimidos, sendo o LAMC2 reprimido no dia 2dpi e 7dpi enquanto LAMC1 apenas em 7dpi. Já para os genes produtores de colágeno IV, foram analisados três genes: COL4A1, COL4A1B e COL4A6, todos reprimidos no espaço de tempo observado (Figura 8 e 9).

Em Axolotes, o processo de regeneração se dá primeiro com a reepitelização, formação, não necessariamente total, e então a deposição de MEC.

Até o momento, na janela de 7 dias em que esse estudo se debruça, os processos de regeneração tecidual da *L. paradoxo* parece ocorrer de modo mais lento que do *A. mexicanum*. Sendo assim, levando em conta o programa genético comum e a semelhança na regeneração de membros, é natural que os genes produtores de laminina, o composto presente na lâmina lúdica, estejam sendo reprimidos pois a reepitelização ainda não ocorreu – o que a imensa repressão de genes MMP nos leva a concluir- e esta é o primeiro processo depois do qual, a membrana basal é produzida mais vigorosamente.

Desse mesmo modo, é esperado que genes que codificam o colágeno 4 sejam reprimidos, pois é necessário antes a produção da lâmina lúdica para então ser produzida a lâmina densa, cujo principal componente é o colágeno IV.

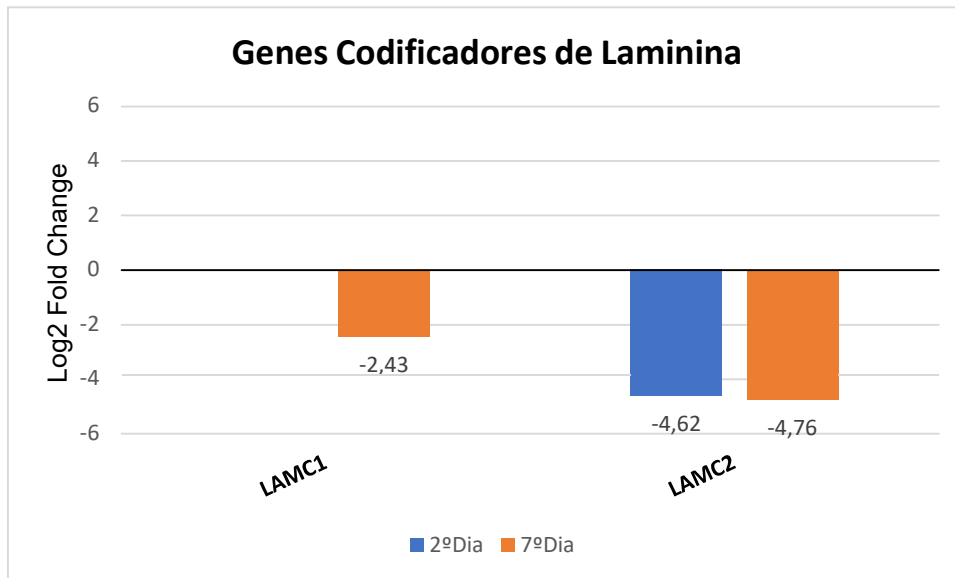


Figura 8. Diferencial de expressão de genes codificadores de laminina nos dias 2-dpi (azul) e 7-dpi (laranja).

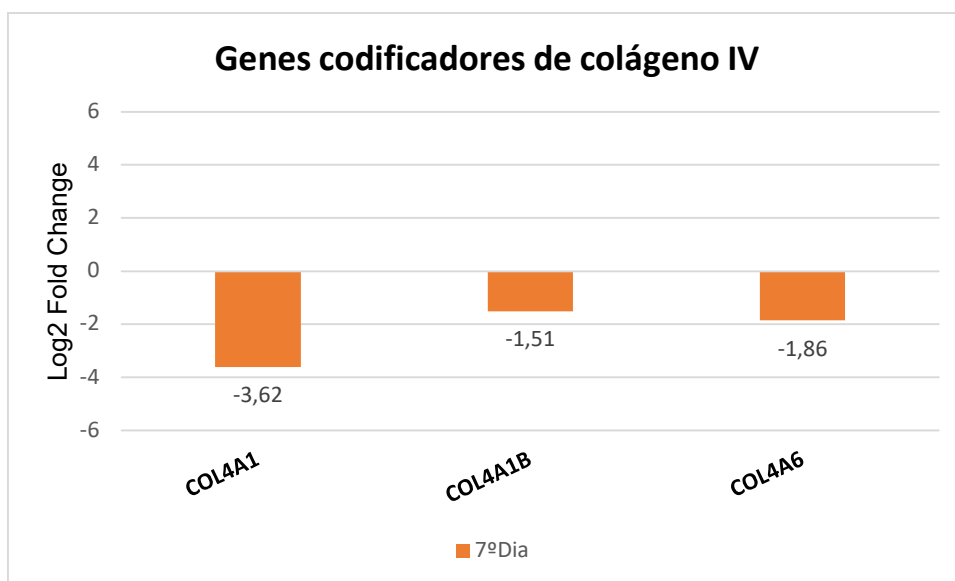


Figura 9. Reepitelização seguida de deposição de MEC Repressão pois precede a neoepiderme

5. Conclusão:

Este trabalho procurou, de modo pioneiro, por meio de uma análise transcriptômica, analisar e inferir efeitos histológicos durante o processo de regeneração, a partir dos níveis de expressão de genes da família MMP, ADAM, TIMP, codificadores de Laminina e Colágeno IV.

Os genes MMP foram fortemente reprimidos durante o primeiro dia, provavelmente o animal está ainda em processo de homeostasia e inflamação, e a maior parte deles voltam aos níveis basais no dia 7, em que a reepitelização já deve estar ocorrendo. A repressão do gene MMP-8 parece sugerir uma menor resposta inflamatória e a repressão dos genes MMP-9 e MMP-13 parecem evidenciar a demora no início da reepitelização.

Embora os genes TIMP sejam genes de regulação inibitória das Matrix metaloproteinases, só o TIMP-4 apresentou um resultado diferenciado, um resultado de repressão. Isso ocorrer nos dois dias analisados pode significar que a regulação de MMPs na *Lepdosiren paradoxa* se dê por outros meios durante a regeneração.

Os genes da família ADAM continuam sendo bem intrigantes quanto à sua atuação no processo de regeneração de tecidos. Isoformas diferentes de ADAM-12 foram reprimidas de forma desigual nos dois dias analisados, com a maior parte deles apresentando a repressão no 7dpi. Considerando que o produto deste gene se liga à fibroblastos, é possível que essa repressão ainda esteja causada pelo atraso da produção da lâmina basal e da MEC.

Tanto os genes codificadores de laminina quando de colágeno IV, foram reprimidos no espaço de tempo estudado. Isso é coerente com a hipótese de que embora lentamente, as camadas da pele da Pirambóia surjam na mesma ordem que do Axolote. E assim, como o processo de reepitelização ainda estava em andamento, não houve tempo para a produção da lâmina basal, e por sua potencial sequência de formação lâmina lúcida seguida pela lâmina densa.

A escassez de dados histológicos e de estudos regeneração exclusivamente epidérmica da *Lepdosiren paradoxa* fez entender que é imprescindível complementar essa investigação com visualizações histológicas e análises transcriptômicas que cubram uma janela de tempo de pelo menos 80 dias.

Sendo assim, a *Lepdosiren paradoxa* compõe e se conserva como um belo modelo nacional de estudo tanto dos mecanismos de regeneração exclusivos da espécie como para comparar seus processos regenerativos com o de outros vertebrados de formidáveis

capacidades de recuperação de tecidos e membros. O estudo da *Lepidosiren paradoxa* se mostra um campo de estudo fascinante e com bastante possibilidades de pesquisa e investigação.

6. BIBLIOGRAFIA

Abreu-Velez AM, Howard MS. Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *N Am J Med Sci*. 2012 Jan;4(1):1-8. doi: 10.4103/1947-2714.92892. PMID: 22393540; PMCID: PMC3289483.

Bely, A. E., & Nyberg, K. G. (2010). Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(3), 161–170.

Bothe, V., Schneider I., Fröbisch N. B. (2021). A Morphological and Histological Investigation of Imperfect Lungfish Fin Regeneration. *Frontiers in Ecology and Evolution*. V.9.

Brockes, J. P. (2005). Appendage Regeneration in Adult Vertebrates and Implications for Regenerative Medicine. *Science*, 310(5756), 1919–1923. CALEY, M. P.; MARTINS, V. L. C.; O'TOOLE, E. A. Metalloproteinases and Wound Healing. *Advances in Wound Care*, v. 4, n. 4, p. 225-234, 2015. DOI: 10.1089/wound.2014.0581.

Carneiro, Jeferson, et al. Evidence of cryptic speciation in South American lungfish. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 59.3 (2021): 760-771.

COELHO, L. M. P. S.; SAWAYA, P. Fisiologia de Tambaqui M'Boya - *Lepidosiren paradoxa* (Fitzinger) da Amazônia (Peixe - Dipnóico) - Estrutura do Tegumento. *Boletim do Instituto Oceanográfico, Nova Série*, v. 29, p. 65-118, São Paulo, 1972. Universidade de São Paulo, Departamento de Fisiologia Geral e Instituto de Biologia Marinha.

Dylan R. Edwards, Madeleine M. Handsley, Caroline J. Pennington, The ADAM metalloproteinases, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 29, Issue 5, 2008, Pages 258-289, ISSN 0098-2997, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>.

Fisher G, Rittié L. Restoration of the basement membrane after wounding: a hallmark of young human skin altered with aging. *J Cell Commun Signal*. 2018 Mar;12(1):401-411. doi: 10.1007/s12079-017-0417-3. Epub 2017 Oct 30. PMID: 29086203; PMCID: PMC5842181.

Hattori, N.; Mochizuki, S.; Kishi, K.; Nakajima, T.; Takaishi, H.; D'Armiento, J.; Okada, Y. MMP-13 Plays a Role in Keratinocyte Migration, Angiogenesis, and Contraction in Mouse Skin Wound Healing. *The American Journal of Pathology*, v. 175, n. 2, p. August 2009. DOI: 10.2353/ajpath.2009.081080

Le´vesque M, Villiard E´, Roy S. 2010. Skin wound healing in axolotls: a scarless process. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 314B:684–697.

Mathew-Steiner, S.S.; Roy, S.; Sen, C.K. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* 2021, 8, 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>

Neufeld, D.A., Day, F.A. and Settles, H.E. (1996), Stabilizing role of the basement membrane and dermal fibers during newt limb regeneration. *Anat. Rec.*, 245: 122-127. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199605\)245:1<122::AID-AR17>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199605)245:1<122::AID-AR17>3.0.CO;2-R)

Nogueira, A. F., Costa, C. M., Lorena, J., Moreira, R. N., Frota-Lima, G. N., Furtado, C., ... Schneider, I. (2016). Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. *Nature Communications*, 7, 13364.

Nyren-Erickson EK, Jones JM, Srivastava DK, Mallik S. A disintegrin and metalloproteinase-12 (ADAM12): function, roles in disease progression, and clinical implications. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1830(10):4445-55. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.011. Epub 2013 May 13. PMID: 23680494; PMCID: PMC3740046.

Primakoff, P., & Myles, D. G. (2000). *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. *Trends in Genetics*, 16(2), 83–87. doi:10.1016/s0168-9525(99)01926-5

ROMANO LA, LÓPEZ AIH, BUITRAGO JR AND PEDROSA VF. 2019. Histology of juvenile skin of *Lepidosiren paradoxa* Fitzinger, 1837 (Sarcopterygii, Dipnoi). *An Acad Bras Cienc* 91: e20190822. DOI 10.1590/0001-3765201920190822.

Seifert, A. W., & Muneoka, K. (2018). The blastema and epimorphic regeneration in mammals. *Developmental Biology*, 433(2),

Ulrike Benbow, Constance E. Brinckerhoff, The AP-1 site and MMP gene regulation: What is all the fuss about?, *Matrix Biology*, Volume 15, Issues 8–9, 1997, Pages 519-526, ISSN 0945-053X, [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90026-3](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90026-3).

Untergasser, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, v. 40, n. 15, p. e115–e115, ago. 2012.

Verissimo KM et al. 2020 Salamander-like tail regeneration in the West African lungfish. *Proc. R. Soc. B* 287: 20192939. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2019.2939>

Vincenti, M. P. (n.d.). The Matrix Metalloproteinase (MMP) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP) Genes: Transcriptional and Posttranscriptional Regulation, Signal Transduction and Cell-Type-Specific Expression. *Matrix Metalloproteinase Protocols*, 121–148. doi:10.1385/1-59259-046-2:121

WANG, X.; KHALIL, R. A. Matrix Metalloproteinases, Vascular Remodeling, and Vascular Disease. *Advances in Pharmacology*, v. 81, p. 241–330, 2018. DOI: 10.1016/bs.apha.2017.08.002.

WRIGHT, D. E. Morphology of the Gill Epithelium of the Lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *Cell and Tissue Research*, v. 153, p. 365-381, 1974. Springer-Verlag.