

ERIKA MONTEIRO DOS SANTOS

O PAPEL DA VIA *Sonic Hedgehog* (*Shh*) NA PADRONIZAÇÃO E
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS DO PEIXE PULMONADO
AFRICANO *Protopterus annectens*

BELÉM

2021

ERIKA MONTEIRO DOS SANTOS

O PAPEL DA VIA *Sonic Hedgehog* (*Shh*) NA PADRONIZAÇÃO E
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS DO PEIXE PULMONADO
AFRICANO *Protopterus annectens*

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

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

BELÉM

2021

ERIKA MONTEIRO DOS SANTOS

O PAPEL DA VIA *Sonic Hedgehog* (*Shh*) NA PADRONIZAÇÃO E
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS DO PEIXE PULMONADO
AFRICANO *Protopterus annectens*

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

Orientadora: Prof^{fa} Dr^a Maria Paula Cruz Schneider

Avaliadora: Dr^a Louise Neiva Perez

Avaliadora: Msc. Gabriela Patrícia Martins de Almeida Bernardes

BELÉM

2021

*“Nada na Biologia faz sentido exceto à
luz da evolução”*

(Theodosius Dobzhansky)

Agradecimentos

Agradeço imensamente à Profª Drª Maria Paula Cruz Schneider, a qual tenho enorme admiração como professora e pesquisadora, que aceitou me orientar nessa última fase da graduação.

Agradeço também grandemente ao Prof. Dr. Igor Schneider que me acolheu no Laboratório de Evolução e Desenvolvimento (LED) no início da minha graduação em 2017 e por toda atenção dedicada à minha formação profissional no campo científico.

À Profª Drª Josane Sousa do LED, por toda paciência, dedicação e ensinamento no decorrer dos últimos anos da minha graduação.

À Drª Aline Dragalzew por toda a paciência, orientação, ensinamentos e compreensão no que diz respeito às atividades de laboratório e para a realização desse trabalho de conclusão de curso.

Ao Msc. Danielson Amaral com quem pude trabalhar inicialmente no LED, o qual agregou grandemente para o meu crescimento como profissional no mundo da ciência.

Agradeço à Universidade Federal do Pará e ao CNPq, os quais forneceram todo o suporte financeiro necessário para a realização desse trabalho.

Gostaria também de agradecer à toda equipe do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, que se mostraram incríveis ao longo dos anos, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão desse trabalho, em especial ao aluno de iniciação científica Rogério Côrrea por toda ajuda e suporte na manutenção dos animais e realização dos longos experimentos.

Por último, mas não menos importante, àqueles que me ajudaram a chegar até aqui: **meus pais e meus avôs**, os quais eu só tenho a agradecer grandemente por todo apoio financeiro e emocional. Sem eles nada disso teria sido possível. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por nunca terem desistido e por sempre terem me motivado.

Aqui fica o meu muito obrigada aos meus familiares, professores, orientadores, colegas de laboratório, amigos de curso e a todos que me ajudaram até aqui. Foi uma honra poder fazer parte disso junto com vocês!

SUMÁRIO

Lista de Figuras	7
Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução	10
1.1 Evidências de regeneração em Metazoa	10
1.2 A origem evolutiva dos dígitos em membros tetrápodes	12
1.3 A via de sinalização de <i>Shh</i> é necessária para a formação dos dígitos	17
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. Material e Métodos	22
3.1 Obtenção e manutenção dos animais	22
3.2 Amputação	22
3.3 Tratamentos com fármacos	23
3.4 Análise morfológica	25
4. Resultados e Discussão	26
5. Conclusão	33
6. Referências Bibliográficas	33

Lista de Figuras

Figura 1 – Processo da regeneração em vertebrados	10
Figura 2 – Estágios do processo regenerativo	12
Figura 3 – Evolução morfológica de nadadeiras de peixes Sarcopterygii e de membros Tetrapoda	14
Figura 4 – Crescimento proximal-distal do broto do membro e membro superior humano	16
Figura 5 – Esquemática da via de sinalização de Sonic Hedgehog (Shh)	18
Figura 6 – Expressão de <i>Shh</i> no broto do membro de <i>Xenopus laevis</i> em desenvolvimento ...	19
Figura 7 – Fenótipos resultantes de membros portadores de alelos nulos de <i>Shh</i> e da ativação ectópica da via de sinalização de Shh	20
Figura 8 – Variação na quantidade de radiais distais entre espécies de peixes pulmonados	21
Figura 9 – Morfologia da nadadeira do peixe pulmonado <i>Protopterus annectens</i>	23
Figura 10 – Esquema experimental dos ensaios com Ciclopamina 1µg/mL e SAG 200nmol com <i>P. annectens</i>	24
Figura 11 – Progressão da nadadeira em regeneração de <i>Protopterus annectens</i>	26
Figura 12 – CT Scan da nadadeira de 12 semanas pós amputação de <i>P. annectens</i>	27
Figura 13 – Ativação ectópica de Shh durante a 2ª semana de regeneração de nadadeiras de <i>Protopterus annectens</i>	28
Figura 14 – Ativação ectópica de Shh durante a 3ª semana de regeneração de nadadeiras de <i>Protopterus annectens</i>	29
Figura 15 – Nadadeiras em regeneração de <i>Protopterus annectens</i> tratadas com inibidor da via de sinalização de Shh	30
Figura 16 – Nadadeiras em regeneração de <i>Protopterus annectens</i> tratadas com inibidor da via de sinalização de Shh a partir de 4ª semana pós amputação	31
Figura 17 – Teste T não pareado <i>two-tailed</i> $p < 0.05$ realizado para as nadadeiras de 12 spa do grupo controle vs. nadadeiras de 12 spa tratadas com Ciclopamina	32

Resumo

Os peixes pulmonados são valiosos modelos para se entender a transição do ambiente aquático para o terrestre durante a evolução dos organismos tetrápodes. O peixe-pulmonado *Protopterus annectens* é um peixe Sarcopterygii (grupo irmão dos Tetrapoda), que possui radiais distais vestigiais localizados na bainha das nadadeiras peitorais. Os tetrápodes e os peixes sarcopterígeos compartilham uma proteína conhecida como Sonic Hedgehog (SHH), a qual é responsável pela formação dos radiais distais em peixes e os dígitos em tetrápodes. Estudos mostram que *Shh* é fundamental durante o desenvolvimento de tetrápodes, alterações nos níveis dessa proteína podem levar a más formações, especialmente nos dígitos. Essa proteína também possui papel fundamental durante a regeneração dos membros, em salamandras a ativação ectópica de SHH provoca fenótipos como a polidactilia. Sendo assim, nossa hipótese questiona se há compartilhamento das funções de SHH no estabelecimento dos radiais distais de peixes pulmonados e sua provável homologia profunda com os dígitos de tetrápodes, por compartilharem mecanismos moleculares específicos usados para construir estruturas sem relação filogenética ou morfológica evidente. Portanto, o objetivo desse trabalho é analisar o papel da via de SHH na regeneração e na padronização de nadadeiras do peixe pulmonado africano *P. annectens*. O presente estudo foi realizado por meio de amputações das nadadeiras de *P. annectens*, as quais foram tratadas com fármacos que interferem diretamente na via de SHH, a molécula agonista (SAG) e a antagonista (Ciclopamina), em diferentes estágios de regeneração, tornando possível analisar qual o papel da via de sinalização de SHH para que a regeneração ocorra, com principal enfoque na formação dos radiais distais presentes na nadadeira. Como conclusão nossos resultados sugerem a existência de uma homologia profunda entre radiais distais em peixes e dígitos de tetrápodes, tendo em vista que ambos as estruturas necessitam de SHH para a sua formação.

Palavras-chave: regeneração; SHH; peixe pulmonado; radiais distais; homologia profunda

Abstract

The lungfishes are valuable models to understand the transition from the aquatic to the terrestrial environment during the evolution of tetrapods organisms. The lungfish *Protopterus annectens* is a Sarcopterygii fish (sister group of Tetrapoda), which has vestigial distal radials localized in the pectoral fin hem. The tetrapods and the sarcopterygian fishes share a protein known as Sonic Hedgehog (SHH), which is responsible for the formation of distal radials in fishes and the digits in tetrapods. Studies have shown that *Shh* is critical during the development of tetrapods, changes in the levels of this protein can lead to malformations, especially in the digits. This protein also has a fundamental role during the regeneration of the limbs, in salamanders the ectopic activation of SHH causes phenotypes such as polydactyly. Therefore, our hypothesis questions whether SHH functions are shared in the establishment of distal radials of lungfishes and it is a probable deep homology with the digits of tetrapods, since it shares specific molecular mechanisms used to build structures with no apparent phylogenetic or morphological relationship. Therefore, the objective of this work is to analyze the role of the SHH pathway in the regeneration and patterning of the african lungfish *P. annectens*. The present study was carried out through amputations of the fins of *P. annectens*, which were treated with drugs that directly interfere in the SHH pathway, the agonist molecule (SAG) and the antagonist (Cyclopamine), in different stages of regeneration, making it is possible to analyze the role of the SHH signaling pathway for regeneration to occur, with a primary focus on the formation of distal radials present in the fin. As a conclusion, our results suggest the existence of a deep homology between distal radials in fishes and digits of tetrapods, considering that both structures need SHH for their formation.

Keywords: regeneration; SHH; lungfish; distal radials; deep homology

1. INTRODUÇÃO

1.1 Evidências de regeneração em Metazoa

A regeneração é a restauração de uma parte do corpo que foi perdida após uma injúria (Figura 1). Esta pode ocorrer em diferentes níveis de organização biológica, podendo ser desencadeada por uma variedade de injúrias. Ela pode ocorrer a partir de uma única célula, a qual foi parcialmente destruída até mesmo a regeneração de um indivíduo inteiro a partir de uma pequena porção do corpo. A regeneração é amplamente estudada em estruturas mais complexas como órgãos e até mesmo o corpo todo, nesse sentido, a regeneração de partes mais complexas requer uma organização multitecidual mais elaborada. Como na comparação entre organismos como as planárias, conhecida por sua alta capacidade regenerativa, em relação aos vertebrados que possuem uma capacidade regenerativa mais reduzida, e são organismos mais complexos e que possuem ossos e sistema nervoso (Bely & Nyberg, 2009; Baguña, 2012).

Dentre os vertebrados, existem organismos que possuem uma grande capacidade regenerativa, como as salamandras, que são capazes de regenerar membros, enquanto outros organismos como os seres humanos possuem essa capacidade muito reduzida. Entender os mecanismos genéticos de regeneração em diferentes organismos, com diferentes capacidades regenerativas, pode elucidar pontos como a identificação dos genes responsáveis por levar uma estrutura a se regenerar, trazendo luz para estudos aplicados futuramente no contexto da terapia regenerativa em humanos. Os seres humanos são capazes de prosseguir sua vida após a perda de membros e dígitos, porém tal lesão pode afetar consideravelmente a qualidade de vida de uma pessoa, assim, através de estudos na área regenerativa, há a esperança que se possa induzir a regeneração de novos membros (Alibardi, 2018; Satoh *et al.*, 2015; Dinsmore, 1996).

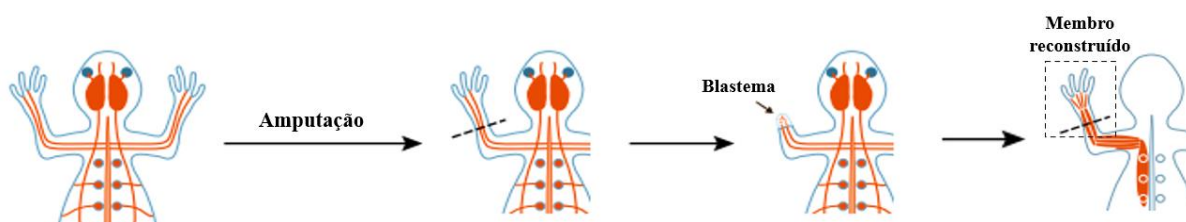


Figura 1. Progresso da regeneração em vertebrados. Após um organismo sofrer uma injúria, seja por uma amputação ou qualquer outro tipo de lesão, o mesmo forma um blastema, o qual dará origem a diferentes tipos de tecidos para reconstruir o membro ou parte do corpo que foi perdida (Adaptada de SLACK, 2017).

A medicina regenerativa é um campo hoje bem estabelecido tendo como objetivo curar ou substituir tecidos e órgãos que foram perdidos ou danificados seja por idade, doença ou algum tipo de lesão (Mao & Mooney, 2015; Ruiz & Regueiro, 2012). Atualmente, existem aplicações de terapia regenerativa no tratamento de órgãos fundamentais para a sobrevivência do ser humano, como fígado, intestino, coração, etc (Bely & Nyberg, 2009; Jaklenec *et al.*, 2012; Bailey *et al.*, 2014; Mendelson & Frenette, 2014). No entanto a regeneração de estruturas mais complexas em humanos, como membros, ainda é uma possibilidade distante, tendo em vista o tamanho da estrutura e principalmente os diferentes tipos teciduais que os constituem e aos sistemas que estão interligados, como o sistema nervoso (Bely & Nyberg, 2009; Alibardi, 2018).

A regeneração possui quatro estágios distintos: formação do epitélio da ferida, formação do blastema, proliferação e diferenciação celular (Figura 2). Cada uma das etapas possui assinaturas moleculares definidas que ocorrem em uma cascata de sinalização levando a regeneração (Brockes & Kumar, 2002; Rose, 1948; Brockes & Kumar, 2005). Após uma lesão, as células do local da ferida acionam uma série de vias de sinalização, dentre elas, vias de sinalização também utilizadas durante o desenvolvimento embrionário são recrutadas na regeneração, fazendo com que haja inicialmente o reconhecimento da lesão seguida do reparo da lesão (Sabin *et al.*, 2019). Imediatamente após uma lesão, células do sistema imune estimulam a liberação de citocinas inflamatórias presentes no sistema imunológico, sugerindo que os progenitores blastemais possam apresentar um papel na regulação do sistema imune (Russo *et al.*, 2014; Yoshimura, 2015). Já as etapas de formação do blastema e proliferação celular são marcadas pela desdiferenciação celular e pela ativação de genes que estão presentes no ciclo celular (Rose, 1948; Knopf *et al.*, 2011; Jopling *et al.*, 2010). Por último, a diferenciação celular, último estágio da regeneração, é marcada pelo reestabelecimento da identidade celular e reentrada de células no ciclo celular (Maki *et al.*, 2010; Knopf *et al.*, 2011; Jopling *et al.*, 2010).

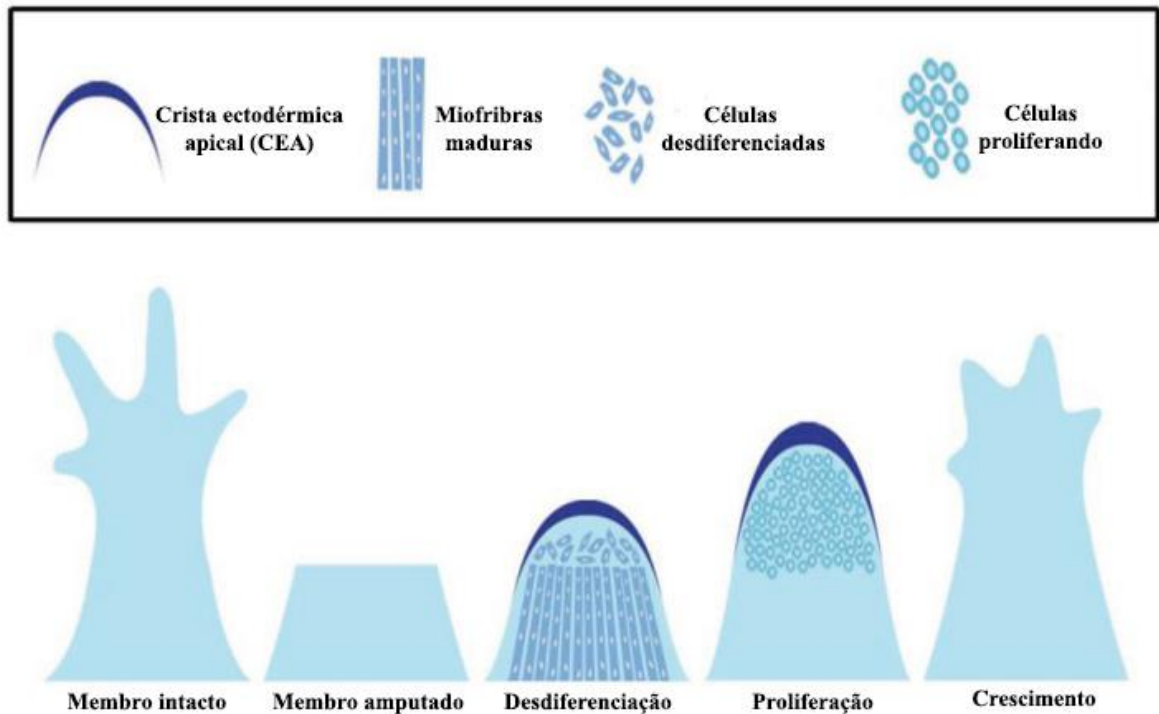


Figura 2. Estágios do processo regenerativo. Após uma injúria, o processo regenerativo se dá por 4 passos, sendo eles: (i) formação do epitélio da ferida, onde as células epiteliais se proliferam para cobrir a área lesionada e assim formar a crista ectodérmica apical; (ii) formação do blastema, contendo um aglomerado de células desdiferenciadas; (iii) proliferação celular e (iv) diferenciação celular, etapas as quais vão ajudar a formar diferentes tipos de tecidos para reconstruir a parte do corpo que foi perdida (Adaptada de SINGH *et al.*, 2015).

Diversos genes expressos durante o desenvolvimento embrionário também são ativados durante o processo de regeneração, atuando para que partes do corpo que foram perdidas após o organismo sofrer uma lesão física se regenerem, resultando na recuperação das estruturas ou órgãos que foram danificados (Darnet *et al.*, 2019). Nesse contexto, o fenômeno regenerativo pode ser considerado um exemplo de “desenvolvimento pós-embrionário” (Gilbert, 2000), permitindo, assim, utilizar órgãos ou estruturas como membros em regeneração para estudar mecanismos genéticos envolvidos no estabelecimento e formação de estruturas em organismos que possuem capacidade regenerativa, mas cujo acesso aos embriões é muito difícil, um exemplo é a nadadeira em regeneração do peixe pulmonado africano *Protopterus annectens* que será objeto de estudo no presente trabalho de conclusão de curso.

1.2 A origem evolutiva dos dígitos em membros tetrápodes

O Devoniano (416 – 359 M.a.) é conhecido como a “Era dos Peixes”, pois foi neste período geológico em que coexistiram todas as principais linhagens de peixes (vivos e extintos),

seja em ambiente marinho ou de água doce (Pough *et al.*, 2006). Atualmente, os peixes são classificados em duas linhagens principais: os Chondrichthyes (peixes cartilagosos) abrangendo os tubarões, raias e quimeras e outra linhagem chamada Teleostomi (peixes ósseos), sendo esse o grupo com maior diversidade dentre os vertebrados, e grupo do qual surgiram os tetrápodes (Kardong, 2016).

Os Teleostomi constituem um clado muito abrangente no mundo dos peixes, sendo composto pelos Osteichthyes (peixes ósseos) e os Acantodii, que apesar de ser um grupo já extinto, é grupo irmão dos peixes ósseos. Os Osteichthyes dividem-se em Actinopterygii (peixes de nadadeira raiada) e Sarcopterygii (peixes de nadadeira lobada), constituindo a maioria dos vertebrados viventes. Embora os Actinopterygii sejam o grupo dominante desde o Paleozoico, os Sarcopterygii representam uma importante janela taxonômica para se entender a transição do ambiente aquático para o ambiente terrestre e o surgimento do grupo Tetrapoda e seus descendentes (Kardong, 2016).

Os tetrápodes são grupo irmão dos peixes sarcopterígeos (Figura 3), que embora tenham sido muito diversos em questão de espécies durante o Devoniano, atualmente são representados apenas pelos Dipnoi (peixes pulmonados) e Actinistia (celacantos) (Pough *et al.*, 2006; Clement, 2019). De acordo com Amaral & Schneider (2017), peixes sarcopterígeos, como os peixes pulmonados, representam um valioso objeto de estudo em evolução para se entender a transição do ambiente aquático para o terrestre durante a evolução dos tetrápodes. A linhagem Tetrapoda caracteriza-se por apresentar membros com anatomia esquelética característica e pela presença de dígitos (Kardong, 2016; Amaral & Schneider, 2017).

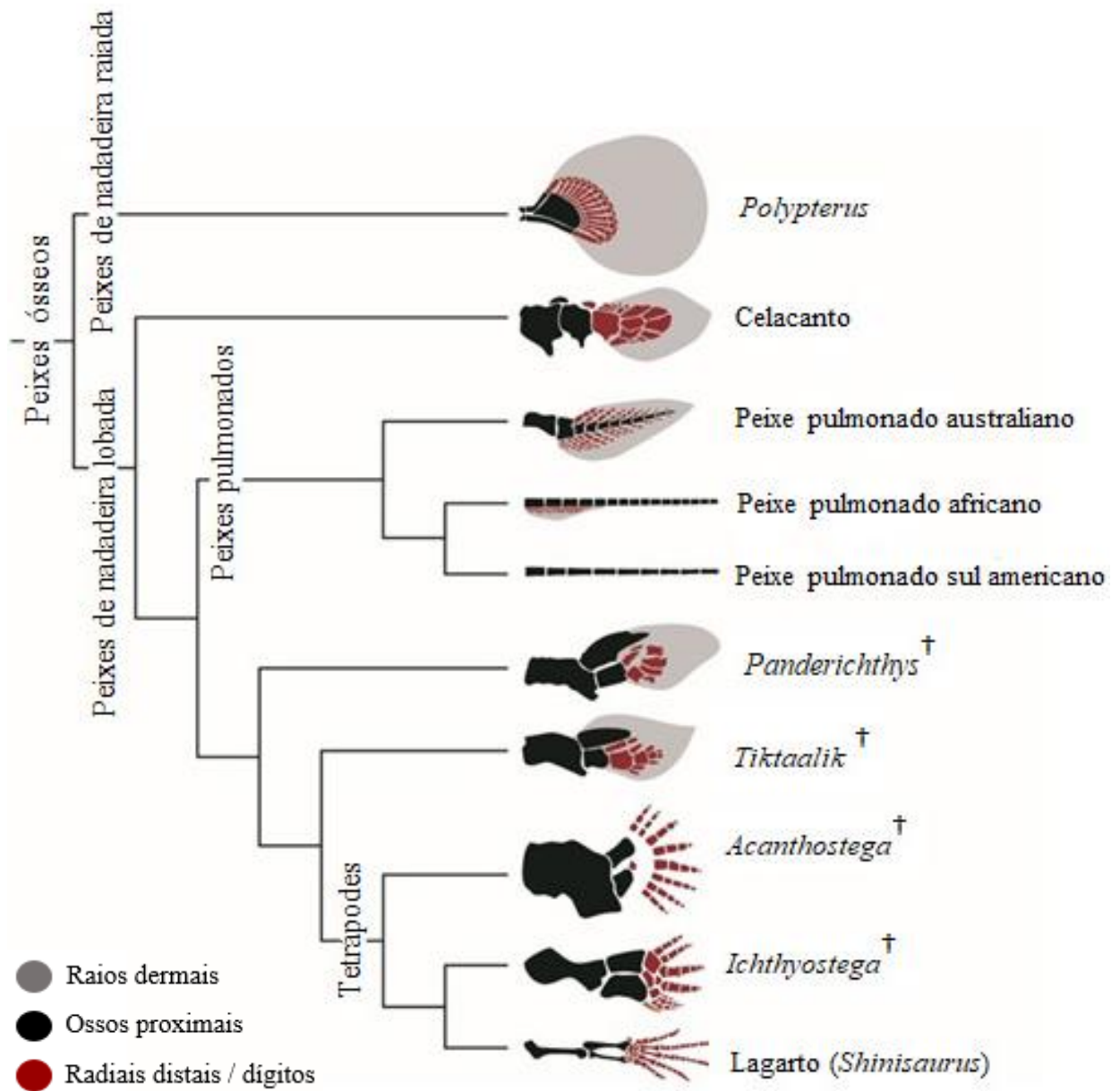


Figura 3. Evolução morfológica de nadadeiras de peixes Sarcopterygii e de membros Tetrapoda. Esta filogenia traz a hipótese de homologia entre estruturas das nadadeiras de peixes sarcopterígeos e membros tetrápodes. Em vermelho, estão destacadas na árvore filogenética a existência de homologia entre os radiais distais das nadadeiras de peixes e dígitos no membro tetrápode (Adaptada de AMARAL & SCHNEIDER., 2017).

O surgimento de nadadeiras pareadas constituiu uma importante transformação morfológica do plano corporal dos vertebrados. Apesar, de sua origem evolutiva ainda ser discutida, a hipótese de que elas se originaram a partir de nadadeiras dorsais ganhou força, devido a conservação em função e história filogenética dos elementos cis-regulatórios (CREs) envolvidos no desenvolvimento e padronização desses dois tipos de apêndices (Letelier *et al.*, 2018). Dado o seu papel chave na vida de muitas espécies de peixes, modificações nas nadadeiras podem estar relacionadas às características da história de vida desses organismos aquáticos. Entre essas modificações estruturais está o surgimento dos membros a partir de nadadeiras. Esse processo foi iniciado no Devoniano, quando alguns peixes sarcopterígeos se aventuraram na terra, deixando como descendentes os tetrápodes. Além de diversas adaptações que lhes permitem sobreviver e reproduzir em terra, este grupo apresenta mudanças morfológicas e funcionais significativas no sistema apendicular, como o desenvolvimento de um esqueleto distal com dígitos, chave nas primeiras etapas da conquista do ambiente terrestre (King *et al.*, 2011). Entre os peixes sarcopterígeos viventes, os peixes pulmonados, incluindo *P. annectens*, são o grupo-irmão dos tetrápodes (Amemiya *et al.*, 2013; Brinkmann *et al.*, 2004) e, como tal, são o modelo ideal para entender a evolução do membro tetrápode a partir de seus ancestrais com nadadeiras.

Acredita-se que dentre as principais mudanças na transição de nadadeiras para membros está a perda dos raios e o aumento na complexidade anatômica e funcional do tecido endocondral. Em comparação com os peixes de nadadeira raiada (actinopterígeos), os peixes de nadadeira lobada (sarcopterígeos) apresentam esqueletos endocondrais expandidos. Sendo assim, pode-se dizer que parte dessa transição estava em andamento antes da origem dos membros com dígitos (Schneider & Shubim, 2013).

No desenvolvimento de membros em amniotas, à medida que o broto do membro cresce as células ectodérmicas distais dão origem a uma crista ectodérmica apical (CEA), que é uma estrutura essencial para o crescimento do broto do membro (Garcia & Fernández, 2009; Zeller, 2010). As células que constituem a CEA possuem um importante papel, pois secretam fatores de crescimento de fibroblastos (Fgfs) e outras proteínas que vão especificar o domínio distal dos membros, mantendo, assim, a proliferação e crescimento celular no eixo proximal-distal (Guéro, 2018; Bell *et al.*, 1959). Estudos mostram que a remoção da CEA do broto do membro faz com que o crescimento do membro pare imediatamente (Bell *et al.*, 1959).

Vários estudiosos reconheceram uma organização fundamental para o membro tetrápode, que consiste em três segmentos, sendo eles: estilópódio (úmero), zeugopódio (ulna e rádio) e autopódio (carpo, metacarpo e falanges) (Figura 4). Esta organização foi a base para uma ampla radiação adaptativa, como a transição de nadadeiras para membros com dígitos. Há a hipótese de que o estilópódio possua um homólogo nas nadadeiras de peixes existentes, estando presentes em nadadeiras de Condrithyians, Actinopterígeos basais e Sarcopterígeos. Em Actinopterígeos e Condrithyians essa estrutura, quando presente, é uma série de ossos endocondrais proximais que se articulam com o ombro. Já peixes sarcopterígeos possuem apenas um único osso proximal que se articula com a cintura peitoral, arranjo estrutural este que é parecido ao encontrado no estilópódio tetrápode (Schneider & Shubim, 2013; Holmgren, 1933; Rosen *et al.*, 1981).

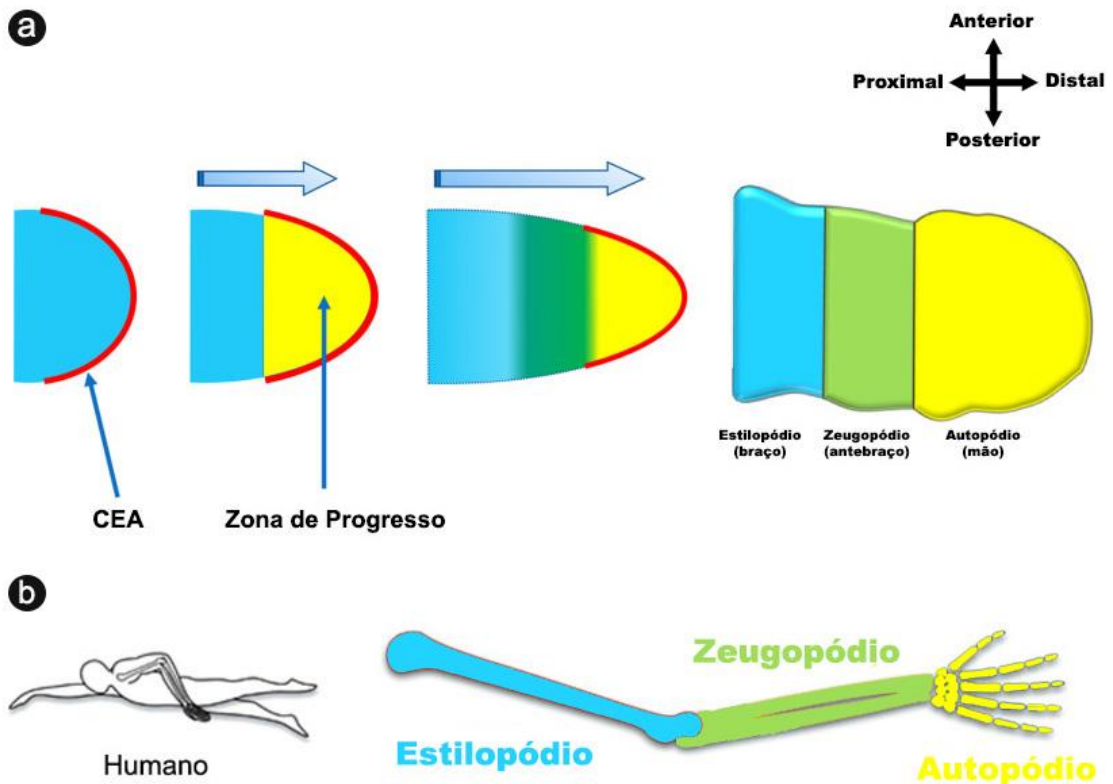


Figura 4. Crescimento proximal-distal do broto do membro e membro superior humano. (a) células mesodérmicas na CEA estimulando a proliferação e crescimento celular na zona de progresso, à medida que o broto do membro cresce, a zona de progresso se expande cada vez mais, o que dará origem aos três segmentos fundamentais do membro tetrápode: estilópódio (braço), zeugopódio (antebraço) e autopódio (mão). (b) braço humano evidenciando a arquitetura esquelética típica encontrada em membros tetrápodes, composta pelos três segmentos fundamentais já descritos (Adaptado de GUÉRO, 2018; SCHNEIDER & SHUBIN, 2013).

1.3 A via de sinalização de *Shh* é necessária para a formação dos dígitos

As proteínas Hedgehog (Hh) são proteínas sinalizadoras que foram descobertas juntamente com outros componentes de sua via de sinalização pela primeira vez em moscas do gênero *Drosophila*. As proteínas Hh são altamente hidrofóbicas e tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário em animais, sendo uma via de sinalização altamente conservada evolutivamente. A sinalização de Hedgehog encontrada em vertebrados é iniciada pela ligação de um de seus três ligantes: Sonic, Indian ou Desert Hedgehog, tendo Ptch1 como o seu receptor (Rubin & Sauvage, 2006; Mcmillan & Matsui, 2012).

Ptch1 é uma proteína transmembranar com 12 domínios (Kumamoto *et al.*, 2004; Mcmillan & Matsui, 2012). Essa proteína forma um complexo receptor heterodimérico com *Smoothened* (Smo), também uma proteína transmembranar possuindo 7 domínios (Evangelista *et al.*, 2006; Choudhry *et al.*, 2014).

Na ausência de Shh no meio extracelular, Ptch1, seu receptor, inibe atividade de Smo, que em sua ausência a proteína cinase A (PKA) fosforila as proteínas Gli, as quais quando fosforiladas assumem uma forma repressora, migrando para o núcleo celular e inibindo a expressão de *Gli1* e *Ptch1*, resultando na inativação da via de sinalização de HH (Figura 5) (Singh *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2015).

Já com a presença de Shh no meio extracelular, o mesmo se liga a Ptch1, resultando na ativação da dinâmica de Smo, devido a perda de atividade de Ptch1, facilitando a localização de Smo na superfície celular, que uma vez ativado impede que a PKA fosforile as proteínas Gli, onde Gli na sua forma não fosforilada assume uma forma ativadora, a qual migra para o núcleo celular, induzindo a expressão de *Gli1* e *Ptch1* e outros reguladores do ciclo celular (Singh *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2006; Rubin & Sauvage, 2006). Assim, Smo traduz o sinal de ativação de Gli (Gli-Act) e da transcrição de alvos *downstream* a Shh (Figura 5) (Singh *et al.*, 2015).

Em vertebrados há a existência de três proteínas pertencentes a família Gli, que são Gli1, Gli2 e Gli3. Gli1 e Gli3 induzem e reprimem, respectivamente, os genes alvos da cascata de sinalização de Shh, que incluem Ptch1, ciclina D1, c-Myc e Bcl-2. Sendo assim, Gli1 e Gli3 são importantes reguladores do ciclo celular (Singh *et al.*, 2015; Evangelista *et al.*, 2006; Ruiz, 1998; Mcmillan & Matsui, 2012).

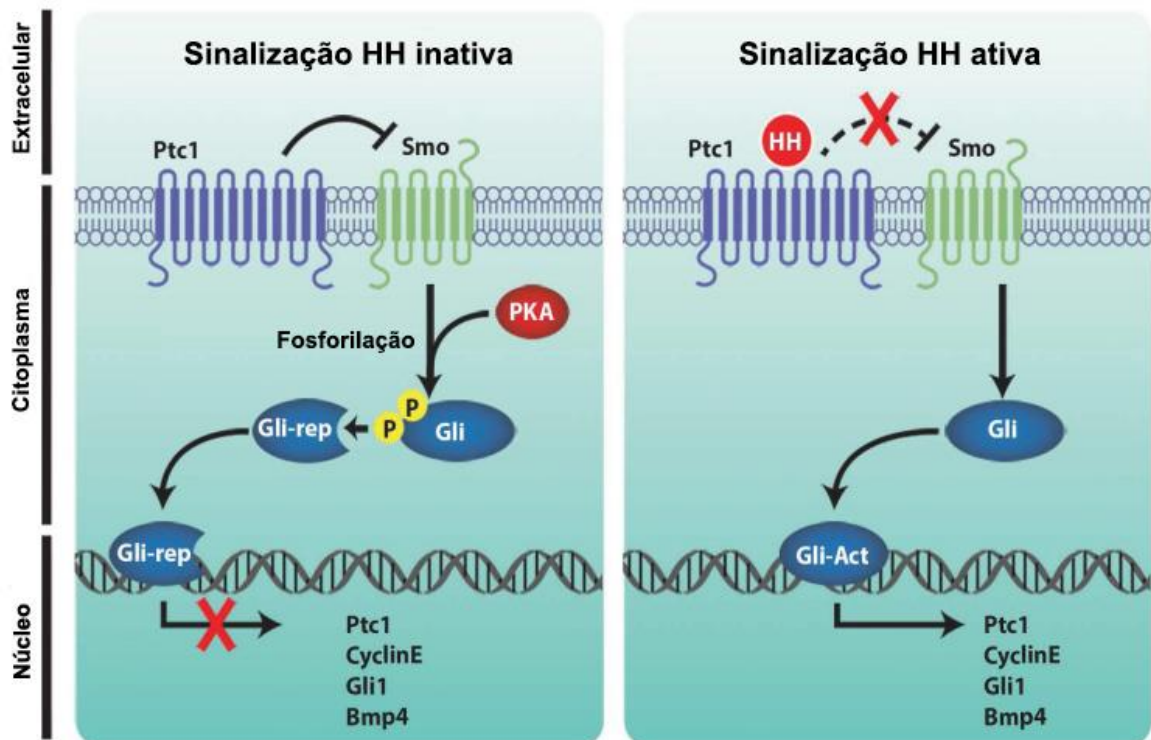


Figura 5. Esquematização da via de sinalização de Sonic Hedgehog (Shh). À esquerda temos a via de sinalização de Shh inativa devido ausência de Shh no meio extracelular, inibindo a atividade de Smo. À direita temos a via de sinalização de Shh ativa, onde na presença de Shh no meio extracelular, Ptc1 perde a sua atividade e promove a atividade de Smo, facilitando a sua localização superficial (Adaptada de SINGH *et al.*, 2015).

A proteína Smo pode ter a sua atividade modulada diretamente por algumas moléculas, como antagonistas e agonistas (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002). A ciclopamina é uma molécula teratogênica derivada da planta *Veratrum californicum* que inibe a via de sinalização de Hedgehog, tendo como alvo direto o receptor transmembranar de Hh, o Smo (Chen, 2016). Ao se ligar em Smo, a ciclopamina ocasiona uma mudança conformacional no receptor, bloqueando efetivamente a ativação dos fatores de transcrição Gli, assim, a via de sinalização de Shh é interrompida (DeSesso, 2020). Em contrapartida, *Smoothened Agonist* (SAG) atua como um agonista, estimulando a via de sinalização de Shh, também modulando a atividade de Smo. Estudos mostram que a ação desses compostos sobre a via de Hh é totalmente independente do receptor Ptc1, tendo em vista que cada um destes se liga diretamente a Smo (Frank-Kamenetsky *et al.*, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário de tetrápodes, a padronização dos membros é amplamente direcionada pela sinalização de moléculas que atuam nos três eixos principais: proximal-distal, dorsal-ventral e anteroposterior. A sinalização ao longo do eixo

anteroposterior, responsável pela formação de dígitos, é mediada pela proteína Shh que é secretada a partir da margem posterior do broto do membro, perto da extremidade distal, região chamada ZPA (zona de atividade polarizadora) (Stopper, 2007).

A ZPA consiste em uma região de células mesenquimais posteriores, a qual possui um papel importantíssimo no desenvolvimento dos membros (Figura 6). Essa região é altamente caracterizada pela secreção da proteína Shh, que padroniza os membros no eixo anteroposterior durante o desenvolvimento (Schneider & Shubin, 2013; Guéro, 2018).

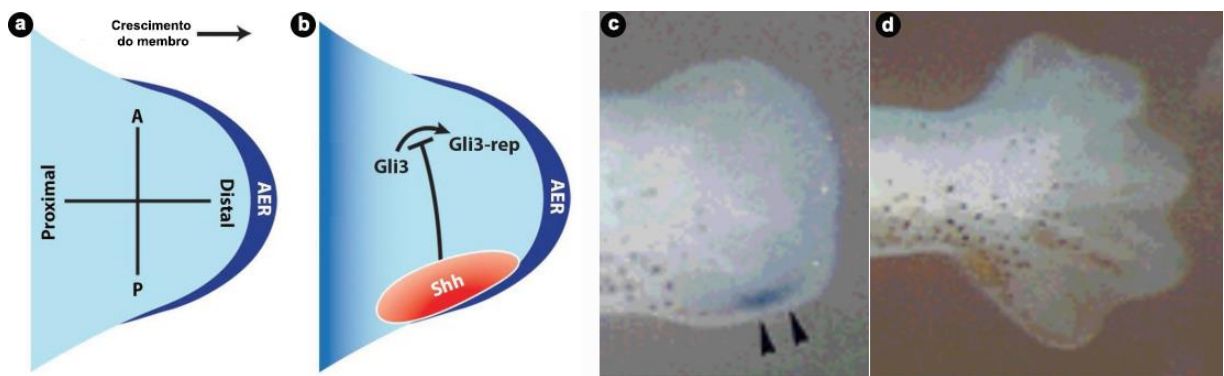


Figura 6. Expressão de *Shh* no broto do membro de *Xenopus laevis* em desenvolvimento. (a) e (b) esquematização do broto do membro em desenvolvimento, evidenciando que *Shh* é expresso na região posterior do membro. (c) técnica de hibridização *in situ* confirmando a expressão posterior do *Shh* em broto do membro em desenvolvimento de vertebrados, cabeça de seta aponta a região de expressão de *Shh* marcado em azul. (d) broto do membro de *X. laevis* em desenvolvimento (Adaptado SINGH *et al.*, 2015; ENDO *et al.*, 1997).

O fenótipo dos membros de camundongo portadores de alelos *Shh* nulos mostram anormalidades distais, caracterizadas por um zeugopódio com um único osso, e um número reduzido de dígitos, apresentando o que parece ser um único dígito, enquanto a ativação ectópica de *Shh* em salamandras leva a polidactilia (Litingtung *et al.*, 2002; Chiang *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2018). Portanto, *Shh* é necessário para regular a formação e padronização dos diferentes tipos e números de dígitos formados (de anterior para posterior) (Zeller, 2004; Towers & Tickle, 2009). Tanto no desenvolvimento, quanto na regeneração de membros em salamandras, *Shh* é responsável pelo crescimento e padronização do eixo anteroposterior e formação dos dígitos (Figura 7) (Ingham & McMahon, 2001; Mariani & Martin, 2003; Tickle, 2003; Lewis *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 1997).

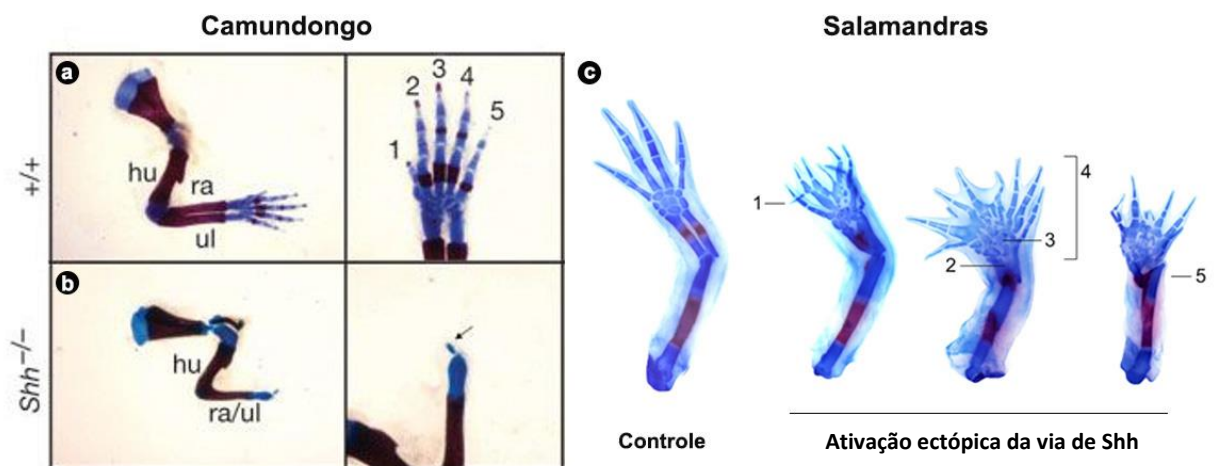


Figura 7. Fenótipos resultantes de membros portadores de alelos nulos de *Shh* e da ativação ectópica da via de sinalização de *Shh*. (a) fenótipo controle de membro anterior de camundongo, morfologicamente apresentando cinco dígitos (b) fenótipo de membro anterior de camundongo nocaute de *Shh*, apresentando número reduzido de dígitos e também evidenciando a despadronização do membro (c) fenótipo controle de membro de salamandras apresentando seu padrão normal de quatro dígitos, e ao lado direito a ativação ectópica da via de *Shh* em um membro em regeneração, resultando no aumento no número de dígitos (hu: úmero; ra: rádio; ul: ulna) (Adaptado de LITINGTUNG *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Segundo Goodrich (1931), as nadadeiras de peixe-pulmonados existentes possuem radiais distais bem evidentes (*Neoceratodus forsteri*), vestigiais (*Protopterus annectens*) (Coates & Ruta, 2007) ou ausentes (*Lepidosiren paradoxa*) (Figura 8). Tendo em vista a impossibilidade de obtenção de embriões de peixes pulmonados, devido à dificuldade de reproduzi-los em cativeiro, visamos investigar aqui o papel da via de sinalização SHH na formação de radiais distais em peixes-pulmonados modulando esta via de sinalização utilizando-se moléculas agonista e antagonista da via durante a regeneração de nadadeiras do peixe pulmonado africano *Protopterus annectens*.

Sendo os peixes pulmonados grupo irmão dos tetrápodes (Amaral & Schneider, 2017), os mesmos são importantíssimos para o entendimento da evolução do membro tetrápode a partir de nadadeiras de peixes, de modo a também elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na regeneração devido sua alta capacidade regenerativa. Posto isso, nossa hipótese é que radiais distais de peixes e dígitos de tetrápodes possuem uma homologia profunda, pois compartilham mecanismos específicos de regulação gênica, no caso a via de sinalização de *Shh*.

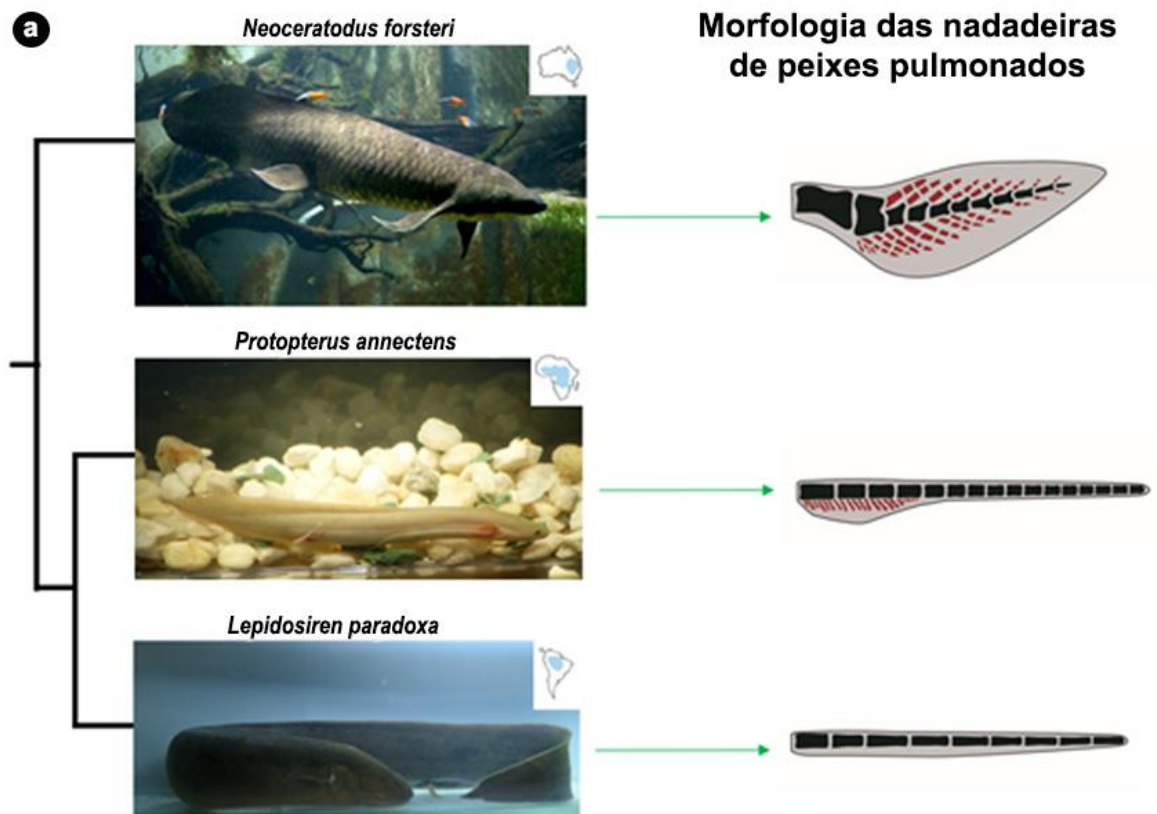


Figura 8. Variação na quantidade de radiais distais entre espécies de peixes pulmonados. (a) a nadadeira de *N. forsteri*, o peixe pulmonado australiano, apresenta radiais distais (em vermelho) pré-axiais (acima) e pós-axiais (abaixo) bem evidentes, diferentemente de *P. annectens* que apresenta radiais distais vestigiais restritos apenas a região posterior, porém na porção mais proximal da nadadeira, havendo, assim, uma redução no número de radiais em relação a *N. forsteri*, já *L. paradoxa* não apresenta radiais distais ao longo de sua nadadeira. (b) exemplar juvenil do peixe pulmonado africano *P. annectens* (Laboratório de Evolução e Desenvolvimento).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o papel da via de sinalização de *Shh* na regeneração e padronização de nadadeiras do peixe pulmonado africano *P. annectens*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a progressão da regeneração das nadadeiras de *P. annectens* e seus aspectos morfológicos;
- Inibir a via de Shh em diferentes estágios de regeneração através do uso de molécula antagonista;
- Ativar a via de Shh em diferentes estágios de regeneração através do uso de molécula agonista.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção e manutenção dos animais

Indivíduos juvenis de *Protopterus annectens* foram obtidos em lojas de aquarismo autorizadas. Um total de 40 espécimes foram utilizados, os quais possuíam comprimento médio de 13-28cm. Estes animais foram mantidos em tanques individuais no laboratório, sendo alimentados diariamente, com trocas de água e limpeza de tanques duas vezes por semana ou conforme o necessário.

Todos os experimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal, CEUA-UFPA N° 47206-1.

3.2 Amputação

Os animais foram anestesiados em solução de triclaína metanosulfonada MS-222 0,2% (Catálogo 886-86-2) a uma concentração de 0,2% em 300 ml de água sem cloro e então tiveram suas nadadeiras peitorais direita e esquerda amputadas a 0,1-0,5 cm distal da inserção do corpo do animal de modo que fosse totalmente retirada a porção da bainha (que é a estrutura de interesse, e corresponde a região na nadadeira na qual estão localizados os radiais distais no peixe pulmonado africano) (Figura 9). Os animais foram fotografados antes e após a amputação para posterior análise morfológica. Todos os animais amputados foram destinados para experimentos com fármacos ativadores e inibidores da via de sinalização de Shh e também como grupo controle. As nadadeiras amputadas foram fixadas em PFA 4% e mantidas a 4°C (geladeira) em PBS 0,1M.



Figura 9. Morfologia da nadadeira do peixe pulmonado *Protopterus annectens*. Acima a morfologia externa da nadadeira de *P. annectens* e abaixo a porção da bainha de uma nadadeira diafanizada, evidenciando a presença de radiais distais na bainha localizada na região posterior do apêndice. As cabeças de seta mostram o ponto de amputação (acima) e os radiais distais marcados em azul (abaixo). Escala 1 cm (acima) e 0,2 cm (abaixo).

3.3 Tratamentos com fármacos

Para análise da via de sinalização de Shh durante a regeneração foram utilizados dois fármacos: Ciclopamina e SAG, atuando como antagonista e agonista da via de Shh, respectivamente.

Inicialmente, foi feita uma curva de dose de Ciclopamina (SelleckChem, Catálogo Nº S1146), testando-se concentrações de 0.5µg/mL, 1µg/mL e 2µg/mL (n = 9, sendo 3 animais para cada concentração de Ciclopamina). A concentração mais alta (2µg/mL) foi considerada letal, uma vez que os animais em experimentos morreram na terceira semana de exposição ao fármaco. Para os experimentos posteriores, utilizou-se a concentração de 1µg/mL, tendo em vista que essa foi a dose permissiva ao crescimento da bainha da nadadeira e, assim, permitindo verificar se haveria interferência apenas no surgimento dos radiais distais especificamente.

A diluição do antagonista Ciclopamina foi feita em Etanol P.A., ficando a uma concentração estoque de 25mM. Cada animal foi disposto em 400 ml de água sem cloro com 40µL de Ciclopamina, chegando a uma concentração final de 2,5µM ou 1µg/mL do fármaco para cada animal independentemente do tamanho e peso do mesmo.

Os tratamentos com o inibidor da via de Shh aconteceram em cinco grupos, os quais diferiam nos estágios de regeneração: 0, 1, 2, 3 e 4 semanas pós-amputação (spa). Os tratamentos iniciados em 0, 1, 2 e 3 spa até a quinta semana pós-amputação (5 spa), com fotografias no início e fim do tratamento (n = 12, sendo 3 animais para cada estágio). Os animais desses grupos foram transferidos para um aquário com água limpa para regenerar por mais uma

semana após o final do tratamento e foram fotografados em 6 spa. Já o tratamento iniciado em 4 spa (n = 4) se estendeu por mais seis semanas, terminando em 10 spa. Os animais em questão foram transferidos para um aquário com água limpa para regenerar sem a presença do inibidor por mais 2 semanas e, então, tiveram suas nadadeiras coletadas em 12 spa. Esse tempo adicional em água limpa permitia que a estrutura analisada, bainha da nadadeira, crescesse um pouco mais para futura análise da presença e morfologia dos radiais distais em seu interior (Figura 10).

A diluição do agonista SAG (Sigma-Aldrich, Catálogo N° SML1314) foi feita em DMSO. Após a diluição do fármaco, cada animal foi disposto em 400 ml de água sem cloro com 160µL de SAG, ficando cada animal a uma concentração final de 200nmol. Os tratamentos para ativação ectópica da via de Shh começaram na 2ª e 3ª spa, estendendo-se por mais cinco semanas após o início do tratamento, sendo coletadas em 7 e 8 spa, respectivamente (n = 6, sendo 3 animais para cada estágio) (Figura 10).

Os animais do grupo controle foram tratados com DMSO (n = 9), o qual não possui nenhum efeito no processo de regeneração ou formação de estruturas.

Uma vez que os fármacos utilizados nesse experimento eram fotossensíveis (podem perder sua capacidade medicamentosa se ficarem expostos à luz), os animais foram mantidos em uma sala com a luz apagada, com trocas das soluções a cada 24h, sendo eles alimentados em água limpa sem cloro por 1h antes da troca diária das soluções com os fármacos.

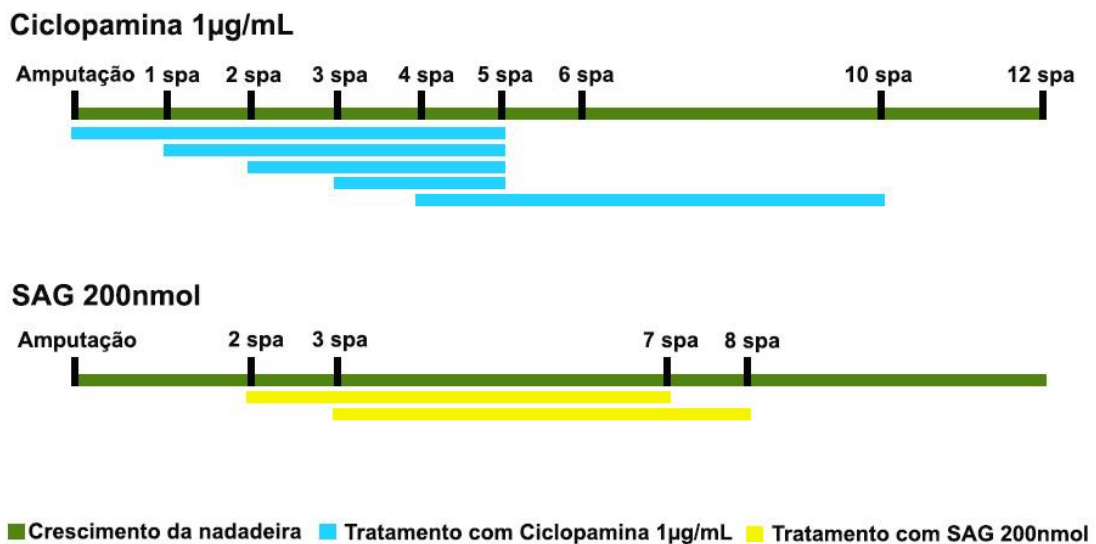


Figura 10. Esquema experimental dos ensaios com Ciclopamina 1µg/mL e SAG 200nmol com *P. annectens*. Acima esquema dos experimentos realizados com Ciclopamina em diferentes estágios de regeneração. Abaixo esquema dos experimentos realizados com o agonista SAG.

Algumas nadadeiras controles e algumas tratadas com Ciclopamina tiveram seu comprimento total medido 12 semanas após amputação, com isso foi realizado teste estatístico do tipo Teste T não pareado *two-tailed*, para comparação entre os dois grupos (controle vs. tratadas), com a finalidade de testar se há diferença estatística entre comprimento das nadadeiras entre os grupos. O teste foi realizado com auxílio do programa GraphPad Prism V 5.01.

3.4 Análise morfológica

Para fins de análise morfológica as nadadeiras peitorais intactas e as regeneradas ao final do tratamento com fármacos foram coletadas e fixadas em Álcool Etílico 100% ou Formalina tamponada 10%. Em seguida, algumas destas nadadeiras (SAG e grupo controle) foram submetidas aos passos descritos por Taylor & Van Dyke (1985) para coloração esquelética diferencial, marcando em azul as estruturas cartilaginosas através do corante Azul de Alcian e marcando em vermelho as estruturas ossificadas por meio do corante Alizarina Vermelha. Em outro grupo de nadadeiras tratadas (Ciclopamina) foi realizado escaneamento pela técnica de CT scan.

Após o final do processo de diafanização, as nadadeiras foram armazenadas em Glicerina 100% e fotografadas em lupa para posterior análise morfológica

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos ensaios demonstraram que após a amputação das nadadeiras peitorais, o peixe pulmonado *Protopterus annectens* é capaz de regenerar, após algumas semanas, a nadadeira igual a nadadeira que foi perdida. Foi observado também que a nossa região de interesse, a bainha da nadadeira, local onde se encontram os radiais distais, começa a se formar na 3ª semana pós-amputação (Figura 11).



Figura 11. Progressão da nadadeira em regeneração de *Protopterus annectens*. A nadadeira de *P. annectens* é filiforme, apresentando na região proximal, no eixo posterior, a bainha da nadadeira, onde estão localizados os radiais distais. Observa-se que há a formação da bainha da nadadeira em 3 spa. Escala 0,5cm.

Os dados encontrados nos experimentos iniciais corroboram com resultados encontrados em estudos que datam de mais de 50 anos atrás, que mostram que *Protopterus annectens* é capaz de regenerar as nadadeiras peitorais após uma lesão (Conant, 1970), adicionalmente, nossos resultados trazem maior detalhamento acerca desse processo no espécime em questão, onde constatou-se que a bainha da nadadeira se forma na 3ª semana de regeneração. Outro estudo documentou que o peixe pulmonado sul-americano *Lepidosiren paradoxa* também é capaz de regenerar as nadadeiras peitorais em estágios morfológicos semelhantes aos encontrados em *P. annectens* (Nogueira *et al.*, 2016).

A posição filogenética dos peixes pulmonados nos proporciona melhores informações acerca da origem evolutiva da regeneração de membros, pois este pertence ao grupo irmão vivo mais próximo dos tetrápodes (Nogueira *et al.*, 2016; Amaral & Schneider, 2017). Estudos com *L. paradoxa* mostram profundas similaridades moleculares entre a regeneração do peixe pulmonado e urodelos, estabelecendo o peixe pulmonado como um modelo importante para estudos sobre evolução da capacidade regenerativa em vertebrados (Nogueira *et al.*, 2016).

Para que fosse determinado em que estágio de regeneração os radiais distais se formam na nadadeira de *P. annectens*, foi feita uma análise esquelética durante o processo de regeneração em diferentes estágios de regeneração. Nossos resultados demonstram, ao longo dos estágios de regeneração analisados, que o aparecimento dos radiais distais se dá na 12^a semana pós-amputação na região da bainha da nadadeira (Figura 12).

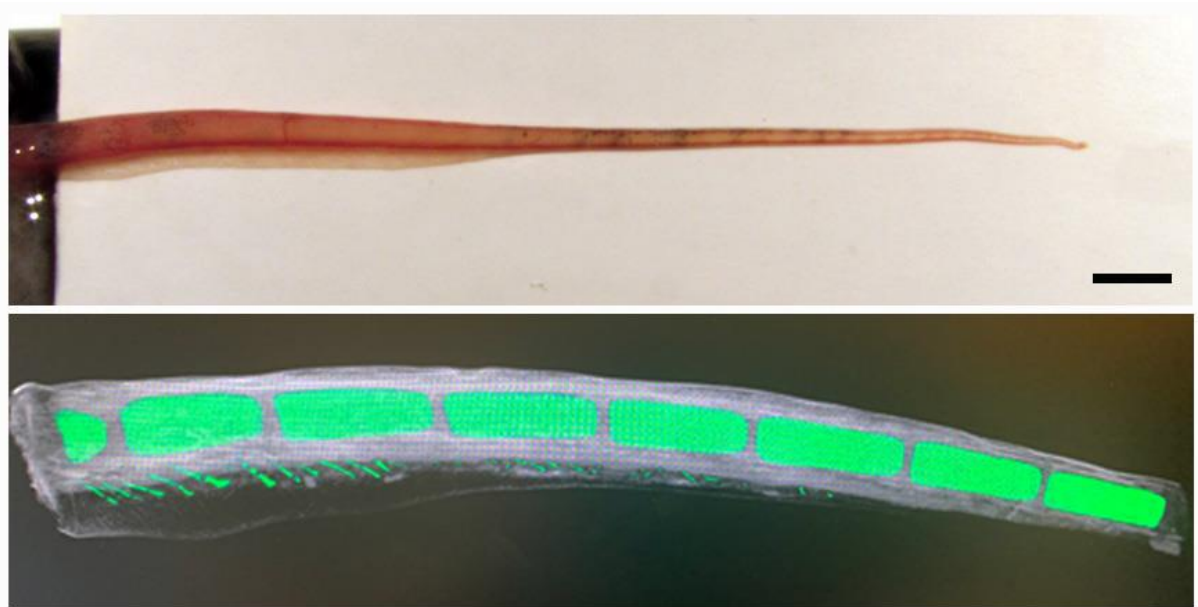


Figura 12. CT Scan da nadadeira 12 semanas pós amputação de *P. annectens*. Acima morfologia externa da nadadeira de *P. annectens* com 12 semanas de regeneração. Abaixo a técnica de CT Scan revela que os radiais distais se fazem presente na nadadeira regenerada de *P. annectens* 12 semanas pós amputação. Escala 0,5 cm.

A ativação ectópica da via de Shh nas nadadeiras em regeneração dos peixes *Protopterus annectens* resultou em diversos fenótipos que se mostraram bastantes diferentes do observado nas nadadeiras dos animais expostos à DMSO (grupo controle), os quais apresentaram uma nadadeira recuperada idêntica ao observado na pré-amputação. Os fenótipos da ativação ectópica de Shh encontrados foram semelhantes em todos os espécimes tratados com SAG, apresentando um fenótipo aberrante (Figura 13).

As nadadeiras tratadas com SAG a partir da 2ª spa apresentaram ramificações a partir do plano de corte e expansão no eixo posterior onde se localiza a bainha da nadadeira (Figura 13), semelhante ao que foi visto em peixes do gênero *Polypterus*, onde a ativação ectópica de Shh durante a regeneração resultou no aumento do número dos radiais presentes na nadadeira (Cuervo *et al.*, 2012). Pode-se observar na região posterior da nadadeira várias estruturas segmentadas, apresentando cartilagens disformes em diversas regiões das nadadeiras.

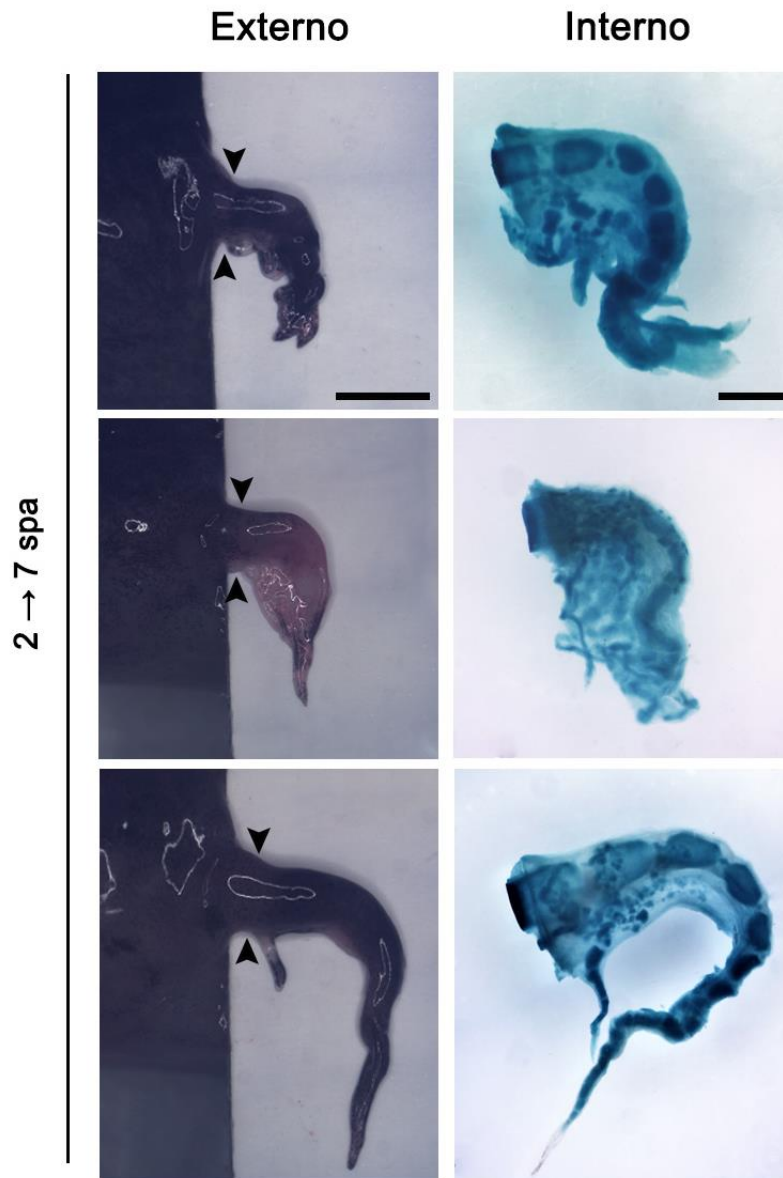


Figura 13. Ativação ectópica de Shh durante a 2ª semana de regeneração de nadadeiras de *Protopterus annectens*. Ao final das 5 semanas de tratamento observou-se que todas as nadadeiras possuíam um fenótipo semelhante, consistindo na curvatura da nadadeira a partir do plano de amputação (à esquerda). A coloração azul revela o aumento do número de elementos esqueléticos no eixo posterior (à direita). A cabeça de seta marca o plano de amputação. Escala 0,3 cm (externo); 0,1 cm (interno).

Já em tratamentos com SAG iniciados na 3ª spa e estendidos até a 8ª spa, podemos observar alguns fenótipos um pouco mais semelhantes ao observado em nadadeiras do grupo controle. Ao final do tratamento em 8 spa, pôde ser observado nadadeiras com o surgimento de estruturas menos segmentadas e restritas a região posterior, região onde está localizada a bainha da nadadeira em nadadeiras maduras (Figura 14).

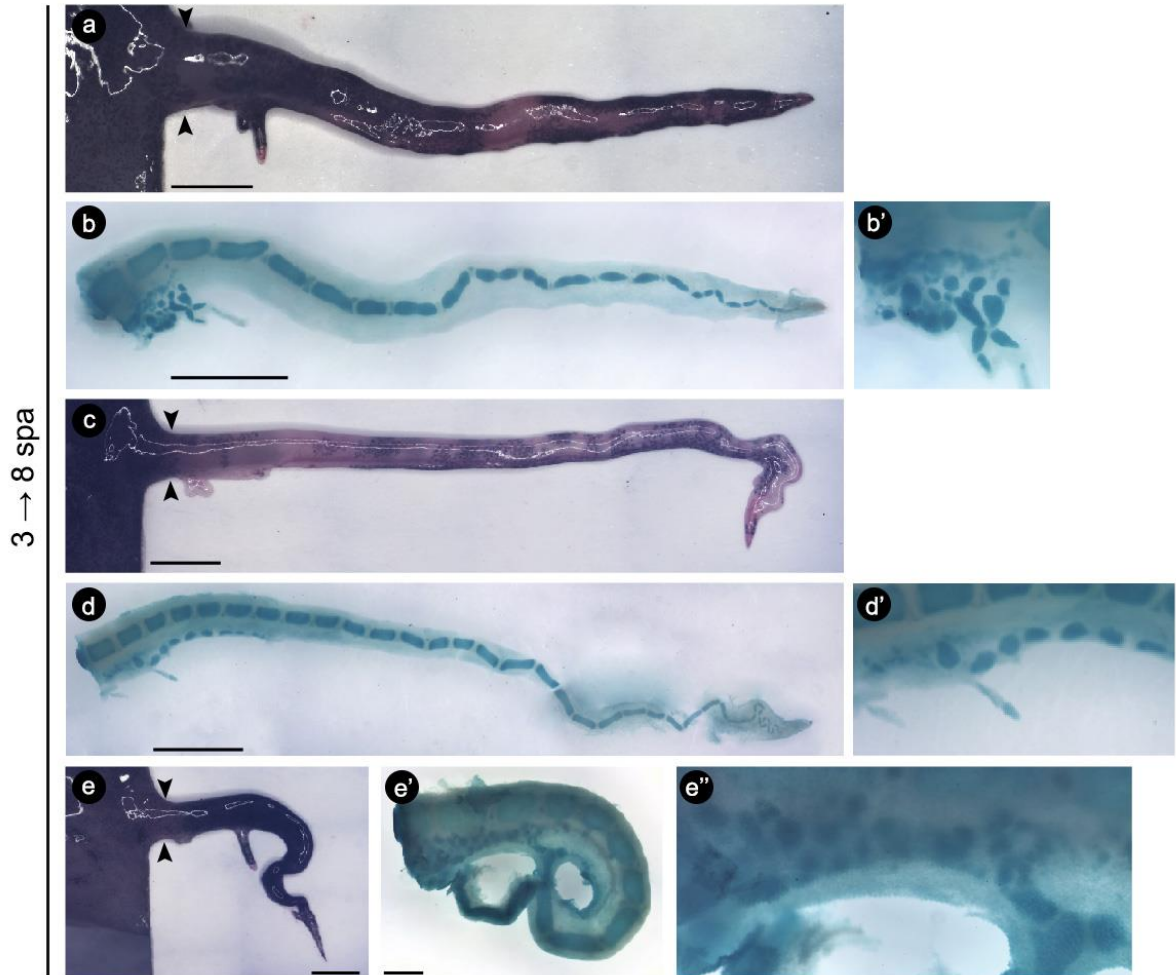


Figura 14. Ativação ectópica de Shh durante a 3ª semana de regeneração de nadadeiras de *Protopterus annectens*. Ao final da 8ª semana de tratamento com a molécula agonista da via de sinalização de Shh observou-se a presença de estruturas menos segmentadas em relação aos experimentos anteriores, podendo ser observado o surgimento precoce de radiais distais em algumas nadadeiras (b', d', e''), os quais estão mais restritos ao eixo posterior. Escala 0,3 cm em a-e; e 0,1 cm em e'.

Os ensaios com Ciclopamina, inibidor da via de Shh, em períodos iniciais de regeneração (0 e 1 semana) ocasionou o bloqueio total da regeneração, podendo-se constatar que houve uma regressão da nadadeira amputada (Figura 15b). Os tratamentos iniciados em 0 e 1 spa impediram a regeneração, levando ao bloqueio total da regeneração (Figura 15a). Diferentemente dos tratamentos iniciados na 2ª e 3ª spa que não ocasionaram o bloqueio da regeneração, porém resultou em uma diminuição da taxa de regeneração em comparação com o grupo controle (Figura 15).

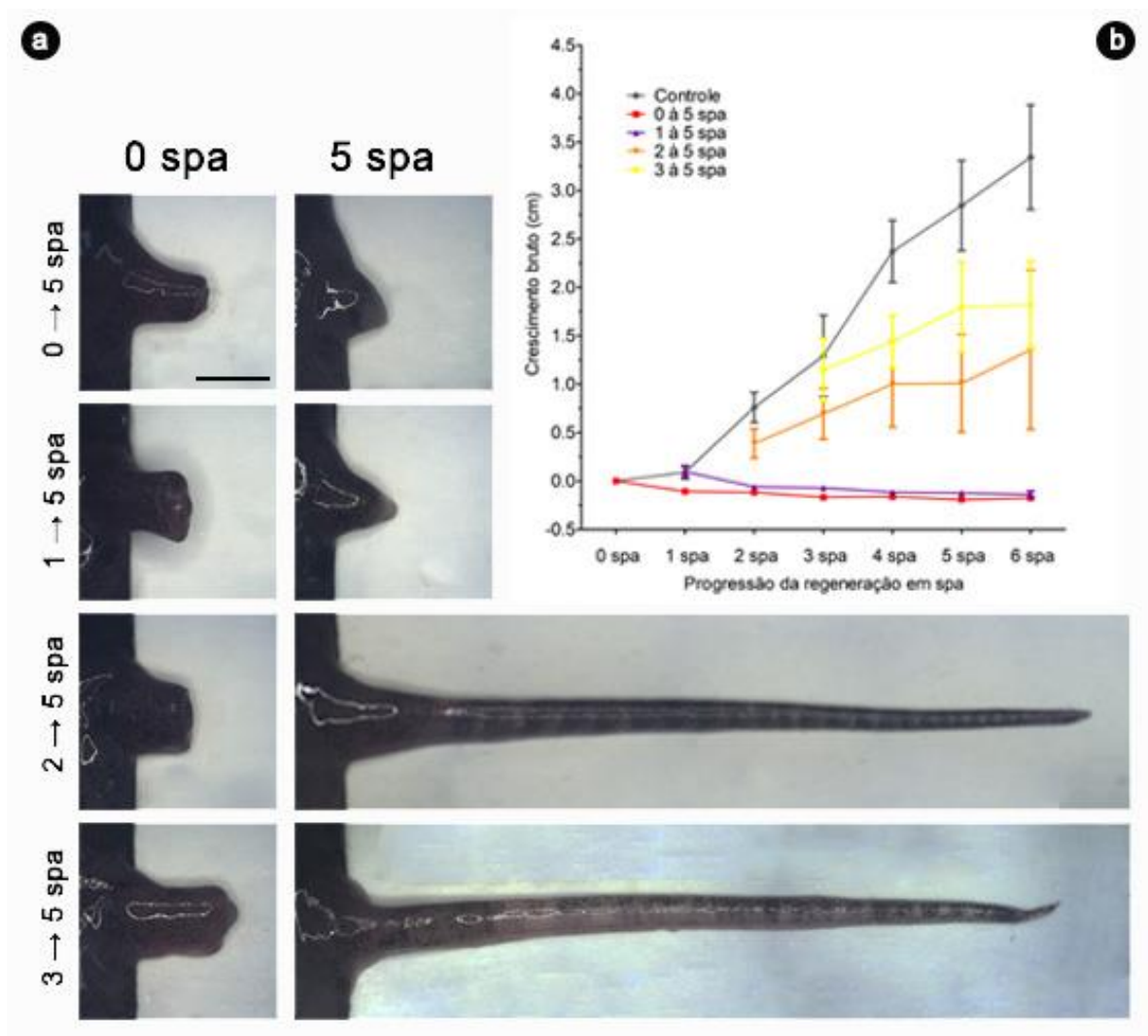


Figura 15. Nadadeiras em regeneração de *Ptopterus annectens* tratadas com inibidor da via de sinalização de Shh. (a) observa-se um bloqueio na regeneração em tratamentos iniciados em períodos mais precoces (0 e 1 spa), já tratamentos mais tardios (2 e 3 spa) dão progresso no processo regenerativo, porém observa-se uma diminuição em comparação ao grupo controle. (b) gráfico do crescimento bruto (cm) das nadadeiras tratados com o inibidor, mostrando a regressão e diminuição da regeneração em comparação com o grupo controle. Escala 0,2 cm.

Já em tratamentos iniciados em períodos mais tardios – 4ª semana de regeneração – (Figura 16) houve uma redução no crescimento da nadadeira constatada por teste estatístico (Teste T) e uma provável redução ou ausência nos radiais distais tendo em vista que em 12 spa a bainha da nadadeira é menor que a do grupo controle no mesmo estágio (Figura 12). Um resultado semelhante foi visto em estudos realizados em membros de salamandras, onde o número de dígitos nos membros tratados era dose-dependente da concentração de Ciclopamina, tendo a maior redução dos elementos esqueléticos em doses maiores de Ciclopamina (Roy, 2002). Experimentos futuros de CT Scan das nadadeiras com 12 spa tratadas com Ciclopamina esclarecerão se houve alteração na morfologia e número dos radiais distais presentes na nadadeira de *P. annectens*.

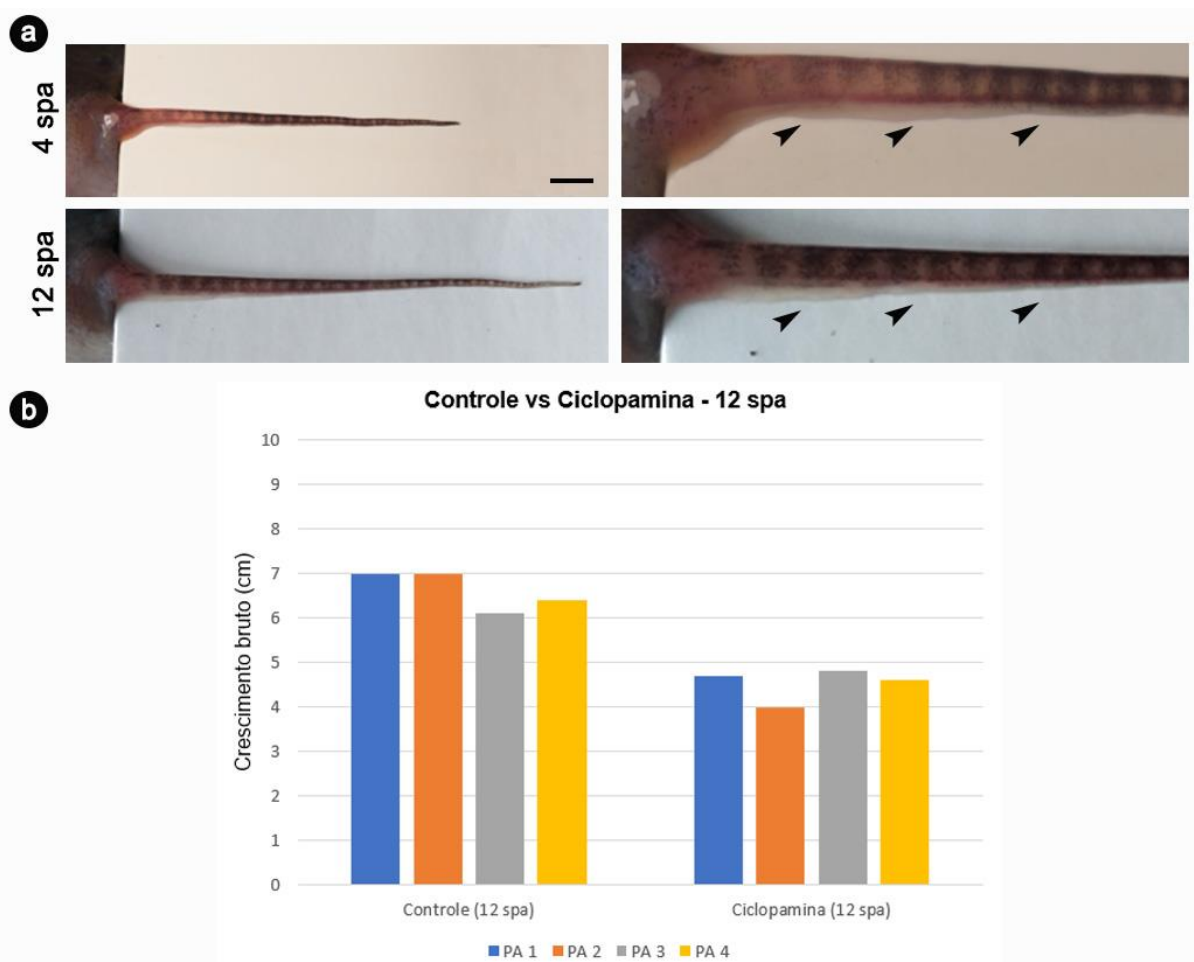


Figura 16. Nadadeiras em regeneração de *Ptopterus annectens* tratadas com inibidor da via de sinalização de Shh a partir da 4ª semana pós amputação. (a) nota-se que a bainha da nadadeira tratada com Ciclopamina 1µg/mL (indicada pela cabeça de seta) não cresceu em comparação com a estrutura no mesmo estágio no grupo controle. (b) gráfico evidenciando a diminuição do crescimento do grupo tratado com o grupo controle em 12 spa (Teste T não pareado *two-tailed*, $p < 0,05$). Escala 0,5 cm.

A análise do Teste T, que consiste na comparação de dois grupos para verificar se há diferença entre eles, revela que houve diferença estatística significativa na redução do crescimento das nadadeiras de 12 spa tratadas com Ciclopamina em relação ao grupo controle, evidenciado pelo $p < 0.05$ (Figura 17).

Table Analyzed	Data 1
Column A	12wpa Control
vs	vs
Column B	12wpa Cyc
Unpaired t test	
P value	0.0003
P value summary	***
Are means signif. different? ($P < 0.05$)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7.293 df=6

Figura 17. Teste T não pareado *two-tailed* $p < 0.05$ realizado para as nadadeiras de 12 spa do grupo controle vs. nadadeiras de 12 spa tratadas com Ciclopamina. O valor de p mostrou-se menor que 0.05, sendo este de 0.0003, logo, há uma diferença significativa no crescimento das nadadeiras no grupo tratado com Ciclopamina em relação ao grupo controle.

Nossos experimentos revelam que a via de sinalização de SHH atua diretamente no processo de regeneração de nadadeiras de peixes pulmonados *P. annectens*, uma vez que quando essa via foi inibida pelo seu antagonista ocasionou prejuízos na regeneração, tais como: (i) bloqueio total da regeneração quando a via de sinalização de Shh foi inibida nos estágios iniciais de regeneração (0 e 1 spa) e (ii) redução no crescimento das nadadeiras ao longo do processo regenerativo quando o tratamento foi iniciado em estágios mais tardios (2, 3 e 4 spa). Em contrapartida, a ativação ectópica da via de Shh resultou em anormalidades esqueléticas nas nadadeiras analisadas.

Sabe-se que Sonic Hedgehog está intimamente envolvido no desenvolvimento embrionário e que a sua ausência ocasiona defeitos estruturais centrais, como no sistema nervoso, inviabilizando o desenvolvimento do embrião (Singh *et al.*, 2015). Os fatores Hh são expressos de forma precoce na região posterior do broto do membro, fornecendo ao blastema uma memória posicional, sendo o centro de sinalização para o padrão anteroposterior do membro (Brockes & Kumar, 2002; Imokawa & Yoshizato, 1997).

Diversos estudos demonstraram a importância de Shh para o estabelecimento dos dígitos tanto no desenvolvimento quanto na regeneração, por exemplo, a ativação ectópica de Shh em salamandras resulta em polidactilia, enquanto sua inibição bloqueia a progressão da regeneração do membro (Nogueira *et al.*, 2016), tais papéis também são semelhantes com os resultados encontrados neste estudo, onde observamos fenótipos aberrantes nas nadadeiras de *P. annectens* tratados com o agonista de Shh, já em nadadeiras tratadas com o antagonista podemos observar uma redução do crescimento da nadadeira e uma provável redução no número de radiais distais.

5. CONCLUSÃO

Em vertebrados que regeneram membros, salamandras e girinos de sapo, a aplicação de uma molécula agonista da via Shh durante a regeneração acarreta no aumento do número de dígitos (elementos do esqueleto distal). Os peixes pulmonados são considerados evolutivamente próximos aos tetrápodes e os elementos esqueléticos distais (radiais distais) podem estar relacionados a origem dos dígitos em tetrápodes. Em *P. annectens* esses radiais são muito reduzidos e restritos apenas ao lado posterior do eixo principal. Considerando o papel de *Shh* na formação de dígitos em tetrápodes, nossos resultados sugerem que o aumento das estruturas esqueléticas laterais ao eixo principal da nadadeira de peixes pulmonados é dependente da ativação da via de Shh, assim como ocorre com os dígitos, que são os elementos distais dos membros tetrápodes.

Portanto, nossos resultados somam-se a evidências de que os radiais distais de peixes e os dígitos dos tetrápodes possuem homologia profunda, pois compartilham mecanismos moleculares específicos (como a via de sinalização de Shh) que são recrutados para construção de radiais distais e dígitos, estruturas sem relação filogenética ou morfológica evidente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBARDI, L. Review: Limb regeneration in humans: Dream or reality?. **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 217, p. 1-6, 2018.
- AMARAL, D. B. & SCHNEIDER, I. Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish. **genesis**, 56(1), e23052, 2017.
- AMEMIYA, C. T. *et al.* The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, 496(7445), 311-316, 2013.

- BAGUÑÀ, J. The planarian neoblast: the rambling history of its origin and some current black boxes. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 1-2-3, p. 19-37, 2012.
- BAILEY, A. M.; MENDICINO, M. & AU, P. An FDA perspective on preclinical development of cell-based regenerative medicine products. **Nature biotechnology**, **32**(8), 721-723, 2014.
- BELL, E.; SAUNDERS, J. J. W.; ZWILLING, E. Limb development in the absence of ectodermal ridge. **Nature**, **184**(4700), 1736-1737, 1959.
- BELY, A. E. & NYBERG K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. **Trends in ecology & evolution**, **25**(3), 161-170, 2009.
- BRINKMANN, H.; VENKATESH, B.; BRENNER, S. & MEYER, A. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 101(14)4900-4905, 2004.
- BROCKES, J. P. & KUMAR, A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. **Science**, 310(5756), 1919-1923, 2005.
- BROCKES, J. P. & KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 3(8), 566-57, 2002.
- CARLSON, B. M. **Principles of regenerative biology**. Elsevier, 2007.
- CHEN, J. K. I only have eye for ewe: the discovery of cyclopamine and development of Hedgehog pathway-targeting drugs. **Natural product reports**, v. 33, n. 5, p. 595-601, 2016.
- CHIANG, C.; LITINGTUNG, Y; HARRIS, M. P.; SIMANDI, B. K.; LI, Y.; BEACHY, P. A. & FALLON, J. F. Manifestation of the limb prepatter: Limb development in the absence of sonic hedgehog function. **Dev Biol**, **236**:421–435, 2001.
- CHOUDHRY, Z.; RIKANI, A. A.; CHOUDHRY, A. M.; TARIQ, S.; ZAKARIA, F.; ASGHAR, M. W.; SARFRAZ, M. K.; HAIDER, K.; SHAFIQ, A. A. & MOBASSARAH, N. J. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. **Ann Neurosci**, **21**(1):28-31, 2014.
- CLEMENT, A. M. **Heads, Jaws, and Muscles**. Springer, Cham, 2019.
- COATES, M. I. & RUTA, M. **Skeletal changes in the transition from fins to limbs**. Chicago: Univ. of Chicago Press, 2007.
- CONANT, E. B. Regeneration in the African lungfish, *Protopterus*. I. Gross aspects. **Journal of Experimental Zoology**, **174**(1), 15-31, 1970.

CUERVO, R.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; CHIMAL-MONROY, J.; MERCHANT-LARIOS, H. & COVARRUBIAS, L. Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **109**(10), 3838-3843, 2012.

DARNET, S.; DRAGALZEW, A. C.; AMARAL, D. B.; SOUSA, J. F.; THOMPSON, A. W.; CASS, A. N.; LORENA, J.; PIRES, E. S.; COSTA, C. M.; SOUSA, M. P.; FRÖBISCH, N. B.; OLIVEIRA, G.; SCHNEIDER, P. N.; DAVIS, M. C.; BRAASCH, I. & SCHNEIDER, I. Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 30, p. 15106-15115, 2019.

DESESSO, J. M. Of embryos and tumors: Cyclopia and the relevance of mechanistic teratology. **Birth defects research**, v. 112, n. 3, p. 219-233, 2020.

DINSMORE, C. E. Urodele limb and tail regeneration in early biological thought: an essay on scientific controversy and social change. **International Journal of Developmental Biology**, v. 40, n. 4, p. 621-627, 1996.

ENDO, T. *et al.* *Shh* expression in developing and regenerating limb buds of *Xenopus laevis*. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 209, n. 2, p. 227-232, 1997.

EVANGELISTA, M.; TIAN, H. & SAUVAGE, F. J. The hedgehog signaling pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, **12**(20 Pt 1):5924-28, 2006.

FRANK-KAMENETSKY, M.; ZHANG, X. M.; BOTTEGA, S.; GUICHERIT, O.; WICHTERLE, H.; DUDEK, H.; BUMCROT, D.; WANG, F. Y.; JONES, S.; SHULOK, J.; RUBIN, L. L. & PORTER, J. A. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. **Journal of biology**, **1**(2), 10, 2002.

GARCIA, S. M. L. & FERNÁNDEZ, C. G. Embriologia. Artmed Editora, 2009.

GILBERT, S. F. **Developmental biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.

GOODRICH, E. S. Studies on the Structure and Development of Vertebrates. **The Journal of Nervous and Mental Disease**, **74**(5), 678, 1931.

GOSS, R. **Principles of regeneration**. New York: Academic Press, 1969.

- GUÉRO, S. Developmental biology of the upper limb. **Hand surgery and rehabilitation**, v. 37, n. 5, p. 265-274, 2018.
- HOLMGREN, N. On the origin of the tetrapod limb. **Acta Zool.** 14, 185–295, 1933.
- IMOKAWA, Y. & YOSHIZATO, K. Expression of Sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 94(17), 9159-9164, 1997.
- INGHAM, P. W. & MCMAHON, A. P. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & development**, 15(23), 3059-3087, 2001.
- JAKLENEC, A.; STAMP, A.; DEWEERD, E.; SHERWIN, A. & LANGER, R. Progress in the tissue engineering and stem cell industry “are we there yet?”. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 18(3), 155-166, 2012.
- JOPLING, C.; SLEEP, E.; RAYA, M.; MARTÍ, M.; RAYA, A. & BELMONTE, J. C. I. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. **Nature**, 464(7288), 606-609, 2010.
- KARDONG, K. V. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. Roca, 2016.
- KING, H. M.; SHUBIN, N. H.; COATES, M. I. & HALE, M. E. Behavioral evidence for the evolution of walking and bounding before terrestriality in sarcopterygian fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 108(52), 21146-21151, 2011.
- KNOPF, F.; HAMMOND, C.; CHEKURU, A.; KURTH, T.; HANS, S.; WEBER, C. W.; ... & WEIDINGER, G. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. **Developmental cell**, 20(5), 713-724, 2011.
- KUMAMOTO, H.; OHKI, K. & OOYA, K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, 33:185–90, 2004.
- LETELIER, J.; CALLE-MUSTIENES, E.; PIERETTI, J.; NARANJO, S.; MAESO, I.; NAKAMURA, T.; PASCUAL-ANAYA, J.; SHUBIN, N. H.; SCHNEIDER, I.; MARTINEZ-MORALES, J. R. & GÓMEZ-SKARMETA, J. L. A conserved Shh cis-regulatory module highlights a common developmental origin of unpaired and paired fins. **Nature genetics**, 50(4), 504, 2018.

LEWIS, P. M.; DUNN, M. P.; MCMAHON, J. A.; LOGAN, M.; MARTIN, J. F.; ST-JACQUES, B. & MCMAHON, A. P. Cholesterol modification of sonic hedgehog is required for long-range signaling activity and effective modulation of signaling by Ptc1. **Cell**, **105** (5), 599-612, 2001.

LITINGTUNG, Y.; DAHN, R. D.; LI, Y.; FALLON, J. F. & CHIANG, C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. **Nature**, **418**:979–983, 2002.

MAKI, N.; MARTINSON, J.; NISHIMURA, O.; TARUI, H.; MELLER, J.; TSONIS, P. A. & AGATA, K. Expression profiles during dedifferentiation in newt lens regeneration revealed by expressed sequence tags. **Molecular vision**, 16, 72, 2010.

MAO, A. S. & MOONEY, D.J. Regenerative medicine: current therapies and future directions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 112(47), 14452-14459, 2015.

MARIANI, F. V. & MARTIN, G. R. Deciphering skeletal patterning: clues from the limb. **Nature**, **423**(6937), 319, 2003.

MCMILLAN, R. & MATSUI, W. Molecular pathways: the hedgehog signaling pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, **18**(18):4883-88, 2012.

MENDELSON, A. & FRENETTE, P. S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. **Nature medicine**, **20**(8), 833, 2014.

MESCHER, A. L. & NEFF, A. W. Limb regeneration in amphibians: immunological considerations. **The Scientific World Journal**, v. **6**, p. 1-11, 2006.

MISHRA, P. *et al.* Sonic hedgehog signalling pathway and ameloblastoma—a review. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 11, p. ZE10, 2015.

NOGUEIRA, A. F.; COSTA, C. M.; LORENA, J.; MOREIRA, R. N.; FROTA-LIMA, G. N.; FURTADO, C.; ROBINSON, M.; AMEMIYA, C. T.; DARNET, S. & SCHNEIDER, I. Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. **Nature communications**, **7**, 13364, 2016.

OLIVEIRA, C. R.; LEMAITRE, R.; MURAWALA, P.; TAZAKI, A.; DRECHSEL, D. N. & TANAKA, E. M. Pseudotyped baculovirus is an effective gene expression tool for studying molecular function during axolotl limb regeneration. **Developmental biology**, **433**(2), 262-275, 2018.

- POUGH, F. H.; HEISER, J. B. & MCFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu, 2006.
- REICHMAN, O. J. Evolution of regeneration capabilities. **American Naturalist**, **123**, 752-763, 1984.
- ROSE, S. M. Desdiferenciação epidérmica durante a formação de blastema em membros em regeneração de *Triturus viridescens*. **Journal of Experimental Zoology**, **108**(3), 337-361, 1948.
- ROSEN, D. E; FOREY, P. L.; GARDINER, B. G. & PATTERSON, C. Lungfishes, tetrapods, paleontology, and plesiomorphy. **Bull. Am. Museum Nat. Hist.** **167**, 163–275, 1981.
- ROY, S. & GARDINER, D. M. Cycloamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs. **Journal of Experimental Zoology**, **283**(2), p. 186-190, 2002.
- RUBIN, L. L. & SAUVAGE, F. J. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, **5**(12):1026-33, 2006,
- RUIZ, A. A. Combinatorial Gli gene function in floor plate and neuronal inductions by Sonic hedgehog. **Development**, **125**(12):2203-12, 1998.
- RUIZ, M. M. & REGUEIRO, J. R. **Stem Cell Transplantation**. Springer, New York, 2012.
- RUSSO, R. C.; GARCIA, C. C.; TEIXEIRA, M. M. & AMARAL, F. A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. **Expert review of clinical immunology**, **10**(5), 593-619, 2014.
- SABIN, K. Z. *et al.* AP-1 cFos/JunB/miR-200a regulate the pro-regenerative glial cell response during axolotl spinal cord regeneration. **Communications biology**, v. 2, n. 1, p. 1-13, 2019.
- SATOH, A.; MITOGAWA, K. & MAKANAE, A. Regeneration inducers in limb regeneration. **Development, growth & differentiation**, v. 57, n. 6, p. 421-429, 2015.
- SCHNEIDER, I. & SHUBIN, N. H. The origin of the tetrapod limb: from expeditions to enhancers. **Trends in genetics**, v. 29, n. 7, p. 419-426, 2013.
- SINGH, B. N.; KOYANO-NAKAGAWA, N.; DONALDSON, A.; WEAVER, C. V.; GARRY, M. G. & GARRY, D. J. Hedgehog signaling during appendage development and regeneration. **Genes**, **6**(2), 417-435, 2015.

- SLACK, J. M. W. Animal regeneration: ancestral character or evolutionary novelty?. **EMBO reports**, v. 18, n. 9, p. 1497-1508, 2017.
- STOCUM, D. L. Tissue restoration through regenerative biology and medicine. **Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology**, **176**, 1-101, 2004.
- STOPPER, G. F. & WAGNER, G. P. Inhibition of Sonic hedgehog signaling leads to posterior digit loss in *Ambystoma mexicanum*: parallels to natural digit reduction in urodeles. **Developmental dynamics**, **236**(1), 321-331, 2007.
- TANAKA, E.M. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. **Cell**, **165**, 1598–1607, 2016.
- TAYLOR, W.R. & VAN DYKE, G. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. **Cybium**, v. **9**, 107–119, 1985.
- TICKLE, C. Patterning systems: from one end of the limb to the other. **Developmental cell**, **4**(4), 449-458, 2003.
- TOWERS, M. & TICKLE, C. Growing models of vertebrate limb development. **Development**, **136**:179–190, 2009.
- YANG, Y.; DROSSOPOULOU, G.; CHUANG, P. T.; DUPREZ, D.; MARTI, E.; BUMCROT, D.; VARGESSON, N.; CLARKE, J.; NISWANDER, L.; MCMAHON, A. & TICKLE, C. Relationship between dose, distance and time in Sonic Hedgehog-mediated regulation of anteroposterior polarity in the chick limb. **Development**, **124**(21), 4393-4404, 1997.
- YOSHIMURA, T. Discovery of IL-8/CXCL8 (the story from Frederick). **Frontiers in Immunology**, **6**, 278, 2015.
- ZELLER, R. It takes time to make a pinky: unexpected insights into how SHH patterns vertebrate digits. **Science Signaling**, **2004**(259), pe53-pe53, 2004.
- ZELLER, R. The temporal dynamics of vertebrate limb development, teratogenesis and evolution. **Curr. Opin. Genet. Dev.** **20**, 384–390, 2010.