

DANIELSON BAIA AMARAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *Sonic Hedgehog* DURANTE A
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS EM *Lepidosiren paradoxa*

BELÉM-PA

2017

DANIELSON BAIA AMARAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *Sonic Hedgehog* DURANTE A
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS EM *Lepidosiren paradoxa*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao
Colegiado do Curso de Ciências Biológicas,
Modalidade Biologia, da Universidade Federal
do Pará, como um dos requisitos para a obtenção
do grau de Bacharel em Biologia.

BELÉM-PA

2017

DANIELSON BAIA AMARAL

ANÁLISE DA EXPRESSÃO E REGULAÇÃO DO GENE *Sonic Hedgehog* DURANTE A
REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS EM *Lepidosiren paradoxa*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Colegiado
do Curso de Ciências Biológicas, Modalidade Biologia,
da Universidade Federal do Pará, como um dos requisitos
para a obtenção do grau de Bacharel em Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

Avaliador: Prof. Dr. Leonardo Sena

Avaliador: Prof. Dr. Horacio Schneider

BELÉM-PA

2017

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Schneider por todo o tempo e atenção que dedicou à minha formação como pesquisador, sem o qual este trabalho não seria possível, e por criar um ambiente mais descontraído dentro do laboratório.

A Carinne Monteiro por me ensinar as reações de PCR quantitativa, ter disposição para dia a dia me auxiliar em outros experimentos de biologia molecular para trabalhos paralelos e leitura crítica das versões finais do trabalho.

Gostaria de agradecer ao Prof. Leonardo Sena e Prof. Horacio Schneider por gentilmente aceitarem avaliar este trabalho.

Agradeço também à Universidade Federal do Pará e órgãos de fomento à pesquisa FAPESPA e CNPq, que ofereceram suporte financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Gostaria de agradecer Jamily Lima por leitura crítica das versões finais do trabalho e também aos membros do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, por criarem um ambiente de trabalho produtivo e encorajador.

Agradeço por fim, aos meus familiares e amigos, por me darem todo o apoio psicológico e financeiro durante a graduação.

Sumário

Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução	8
1.1. A origem dos dígitos em tetrápodes	8
1.2. Evidência molecular da homologia entre dígitos e radiais	9
1.3. Evidência do papel de <i>Shh</i> na padronização do autopódio	11
1.4. A ativação de <i>Shh</i> pelos genes <i>Hand2</i> e <i>Hoxd13</i>	13
1.5. Mecanismos moleculares compartilhados entre regeneração e desenvolvimento	15
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo Geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Resultados	18
3.1. Expressão de <i>Shh</i> , <i>Ptch1</i> e <i>Gli1</i> durante a regeneração	18
3.2. Expressão gênica diferencial de genes da via de sinalização Shh	19
3.3. Expressão gênica diferencial de fatores de transcrição	20
4. Discussão	21
5. Conclusão	22
6. Material e Métodos	23
6.1. Captura e manutenção dos animais	23
6.2. Anestesia e amputações	23
6.3. Coleta de amostras para PCR Quantitativa	23
6.4. Extração de ácidos nucléicos e construção de cDNA	24
6.5. PCR Quantitativa	24
6.6. Tratamento com agonista da via Shh	25
7. Referências	26

Resumo

O processo de reconstruir partes perdidas do corpo, conhecido como regeneração, recapitula diversos aspectos do desenvolvimento. Após o processo de reparo do tecido danificado, ocorre a reconstrução da parte perdida, resgatando sua forma, tamanho e organização original. Tanto no desenvolvimento quanto na regeneração, a proteína secretada Sonic Hedgehog (Shh) é responsável pelo crescimento e padronização do eixo anteroposterior nos apêndices pares de vertebrados, culminando na formação de radiais em peixes ou dígitos em tetrápodes. No peixe pulmonado Sul-americano (*Lepidosiren paradoxa*), as nadadeiras pareadas são destituídas de radiais distais. Neste trabalho, investigamos o papel da via de sinalização Shh durante a regeneração de nadadeiras peitorais de *L. paradoxa*. Para tanto, analisamos através de PCR quantitativa (qPCR) a expressão de genes da via de sinalização Shh, (*Shh*, *Gli*, *Ptch1*, *Hoxd13* e *Hand2*) ao longo da regeneração da nadadeira peitoral. Além disso, realizamos a ativação ectópica da via de Shh através do uso de molécula agonista. Nossos resultados sugerem que a sinalização via Shh é dispensável para a regeneração das nadadeiras de *L. paradoxa*. Portanto, a ausência de radiais nas nadadeiras pareadas de *L. paradoxa* pode estar relacionada a redução ou perda da ativação da via de Shh.

Palavras-chave: *Lepidosiren*, *Shh*, *Hoxd13*, regeneração, nadadeiras

Abstract

The process of rebuilding missing parts of the body, known as regeneration, recapitulates many aspects of development. After repairing the damaged tissue, the lost part is rebuilt, restoring its original shape, size and organization. In both regeneration and development, the secreted protein Sonic Hedgehog (Shh) is responsible for outgrowth and patterning the anteroposterior axis in vertebrates paired appendages, giving rise to radials in fish fins or digits in tetrapods limbs. In the South American lungfish (*Lepidosiren paradoxa*), fins lack distal radials, being mostly symmetrically in the anteroposterior axis. Here we investigate the role of Shh signaling during *L. paradoxa* pectoral fin regeneration. To that end, we analyzed gene expression profiles of the Shh signaling cascade (*Shh*, *Gli*, *Ptch1*, *Hoxd13* e *Hand2*) by quantitative PCR (qPCR), during pectoral fin regeneration. Additionally, we ectopically activated Shh signaling using an agonist. Our results indicate that Shh signaling is dispensable for *L. paradoxa* fin regeneration. Therefore, the absence of distal radials in *L. paradoxa* might be related to reduction or loss of Shh signaling.

Keywords: *Lepidosiren*, *Shh*, *Hoxd13*, regeneration, fin.

1. Introdução

1.1. A origem dos dígitos em tetrápodes

Os peixes ósseos são classificados como actinoptérgeos ou sarcopterígeos e constituem a maioria dos vertebrados vivos (Kardong, 2015). Os peixes actinoptérgeos compreendem o grupo com maior número de espécies dentre os vertebrados e possuem nadadeiras cujo principal suporte consiste em ossos de origem dérmica, conhecidos como raios. Os peixes sarcopterígeos, por sua vez, possuem nadadeiras robustas, sustentadas por endoesqueleto desenvolvido. Além dos tetrápodes, os sarcopterígeos vivos estão representados por somente quatro gêneros de peixes, classificados em dois grupos: os actinistias (celacantos) e os dipnoicos (peixes-pulmonados).

A presença de dígitos em tetrápodes é considerada uma inovação evolutiva, ou seja, uma nova estrutura do corpo que não possui correspondência (homologia) com qualquer outra estrutura presente na linhagem ancestral (Wagner & Lynch, 2010). Os dígitos, assim como elementos do punho, correspondem ao autopódio, domínio mais distal dos membros. Proximais ao autopódio, estão o zeugopódio (rádio e ulna) e o estilopódio (úmero), respectivamente.

De acordo com o registro fóssil, os primeiros tetrápodes possuíam elementos ósseos do estilopódio e zeugopódio correspondentes aos presentes em peixes sarcopterígeos, além de um conjunto completo de dígitos e ausência de raios dermais (Coates & Clack, 1990) (Fig. 1). Entretanto, os peixes elpistostegídeos, grupo irmão já extinto de tetrápodes, apresentam radiais distais achatados e dispostos em forma de arco em *Panderichthys* (Boisvert et al., 2008) e radiais distais cilíndricos, apresentando articulações do tipo sinovial em *Tiktaalik*, assim como em tetrápodes (Shubin et al., 2006). Essas evidências sugerem uma transição evolutiva gradual dos radiais distais em dígitos ao invés do aparecimento repentino, provendo suporte à hipótese de que

os dígitos em tetrápodes são homólogos aos radiais distais em peixes sarcopterígeos (Fig. 1, elementos em amarelo).

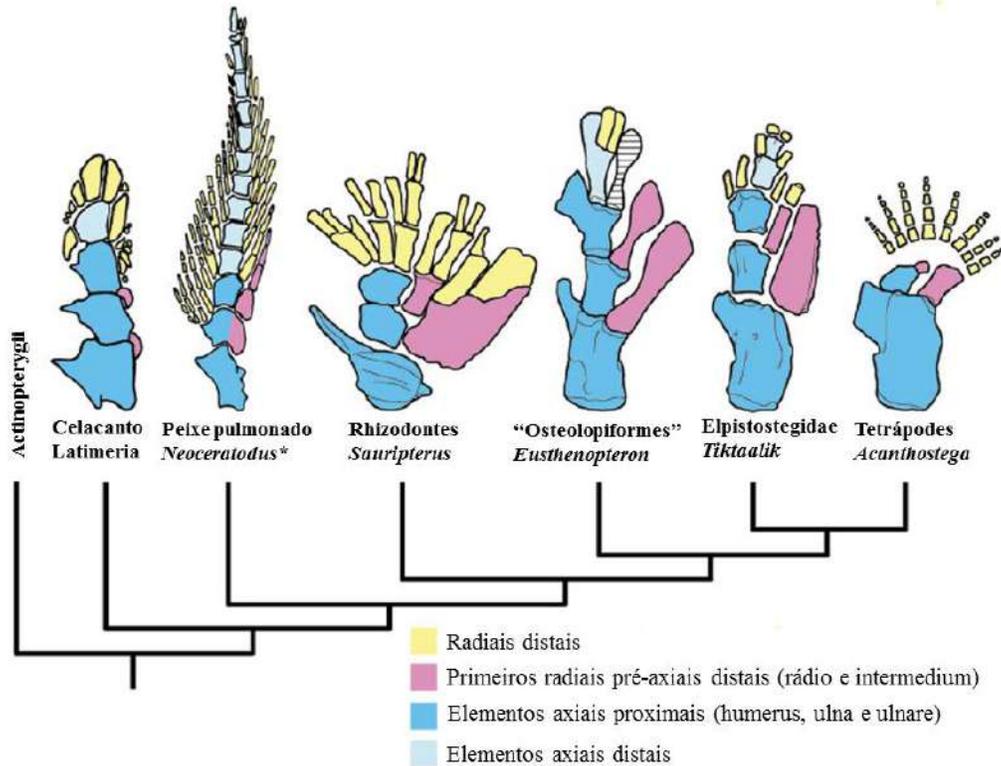


Figura 1. Homologia entre os elementos endocondrais em nadadeiras e membros de sarcopterígeos. Observe a hipótese de homologia entre radiais distais em peixes e dígitos em tetrápodes, ambos em amarelo. * A nadadeira de *Neoceratodus* representa o padrão ancestral entre os peixes pulmonados vivos, com radiais pré-axiais (à direita) e pós-axiais (à esquerda). Adaptado de Johanson et al. (2009).

1.2. Evidência molecular da homologia entre dígitos e radiais

O termo homologia profunda (*deep homology*) é utilizado para descrever estruturas que evoluíram independentemente, porém compartilham mecanismos de desenvolvimento e redes de regulação gênica comuns devido à ancestralidade (Shubin et al., 2009). Nesse contexto, o estudo de mecanismos genéticos do desenvolvimento de nadadeiras de peixes e membros de tetrápodes

forneceram evidências sobre a homologia de tais estruturas, elucidando as mudanças de controle gênico que podem ter ocorrido para o surgimento de dígitos.

Durante o desenvolvimento de membros, duas fases de expressão de genes *Hoxd* são responsáveis pela determinação dos elementos ósseos nos compartimentos proximais (estilopódio e zeugopódio) e distais (autopódio), respectivamente (Tarchini & Duboule, 2006). Em camundongo, durante a primeira fase de expressão de genes *Hoxd*, os parálogos 9-13 se expressam de modo colinear no broto do membro (Fig. 2, dia 10.5), com a expressão de *Hoxd13* sendo a mais restrita, na porção posterior-distal. Já durante a segunda fase de expressão de genes *Hoxd*, *Hoxd13* é expresso por toda a região distal do broto do membro, que posteriormente originará o autopódio.

No desenvolvimento de nadadeiras de peixes actinoptérgios (Davis et al., 2007) e tubarões (Freitas et al., 2007), ambas as fases estão presentes, sendo que a segunda fase está associada à formação de radiais distais (Fig. 2, tubarão e peixe-espátula). Em peixes pulmonados do gênero *Neoceratodus*, a expressão de *Hoxd13*, analisada apenas durante estágios avançados do desenvolvimento, é associada aos radiais distais em formação (Johanson et al., 2007). Esses resultados sugerem que o surgimento de um domínio distal de expressão gênica ocorreu no último ancestral comum de peixes e tetrápodes.

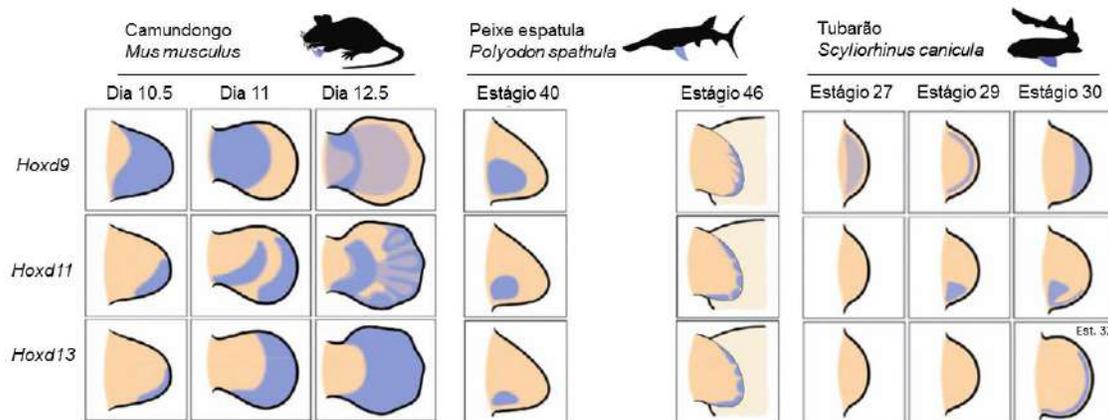


Figura 2. Duas fases de expressão de genes *Hoxd* são observadas no desenvolvimento de apêndices pares de vertebrados. Esse padrão de expressão bifásico possui mecanismos cis-regulatórios altamente conservados entre peixes e tetrápodes. Adaptado de Schneider & Shubin (2013).

Nos últimos 15 anos, estudos em camundongos elucidaram os mecanismos cis-regulatórios responsáveis pela ativação da expressão de genes *Hoxd* durante o desenvolvimento do membro. A ativação dos genes *Hoxd* no broto do membro (primeira fase) é controlada por elementos cis-regulatórios (ECR) teloméricos ao agrupamento gênico *Hoxd* (Zákány et al., 2004). Em contrapartida, a ativação dos genes *Hoxd* na região presuntiva do autopódio (segunda fase) é coordenada por ECRs centroméricos (Tarchini & Duboule, 2006). Estudos recentes revelaram que ECRs dos genes *Hoxd* de peixes, quando inseridos em embriões de camundongo, apresentam padrão de expressão de gene-repórter na região do futuro autopódio (Gehrke et al., 2014). Portanto, estudos comparativos revelaram profunda correspondência entre a expressão e a regulação de genes *Hoxd* durante o desenvolvimento de membros e de nadadeiras.

1.3. Evidência do papel de *Sonic Hedgehog* na padronização do autopódio

Durante o desenvolvimento de membros em camundongos, a expressão de *Shh* é restrita a uma região posterior distal chamada de Zona de Atividade Polarizante (*zone of polarizing activity*, ZPA), sendo formado um gradiente da expressão de *Shh* a partir da ZPA (Harfe et al., 2004).

Durante a formação inicial do broto do membro, os genes *Hoxd13* e *Hand2* ativam a expressão de *Shh* na ZPA (Galli et al., 2010). Depois de ativado, o gene *Shh* é, por sua vez, responsável por ativar a segunda fase de expressão dos genes *Hoxd* no domínio distal dos membros durante o desenvolvimento. Dentre os fenótipos observados no nocaute gênico de *Shh* em camundongos, inclui-se a perda de dígitos. Já o duplo-nocaute dos genes *Shh* e de seu antagonista, *Gli3*, resulta em polidactilia (Litingtung et al., 2002), indicando que a interação *Shh-Gli3* é essencial para a formação do autopódio. A segunda fase de expressão de genes *Hoxd* no peixe *Danio rerio* (zebrafish) também depende de *Shh* (Ahn & Ho, 2008), sugerindo que o domínio distal de expressão de *Hoxd* é determinado por um mecanismo comum, que possivelmente surgiu no último ancestral comum de peixes e tetrápodes.

Durante o desenvolvimento de membros em galinha (Pearse et al., 2001) e lagartos (Leal & Cohn, 2016) os genes *Ptc1* e *Gli1* têm domínio de expressão mais forte na região correspondente à ZPA. Assim como nos tetrápodes, a expressão dos genes *Ptc1* e *Gli1* é ativada por *Shh* no desenvolvimento de nadadeiras de zebrafish (Prykhozhiy et al., 2008), peixe-espátula (Davis et al., 2007) e tubarões (Onimaru et al., 2015). Mesmo em serpentes, onde *Shh* têm expressão transiente, *Gli1* e *Ptc1* são detectados (Leal & Cohn, 2016). Portanto, não apenas *Gli1* como também *Ptc1* são excelentes indicadores da ativação da via de sinalização *Shh* em apêndices pares de vertebrados (Fig. 3).

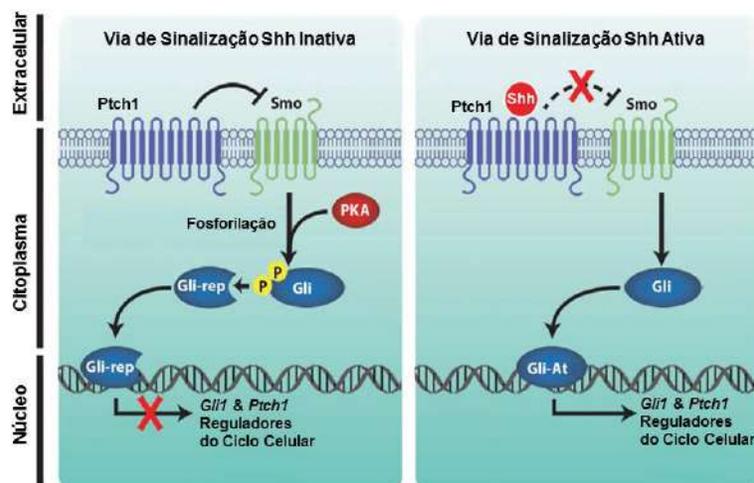


Figura 3. Via de sinalização Shh em membros de tetrápodes. *Gli1* e *Ptch1* são indicadores da ativação da via Shh durante o desenvolvimento. Adaptado de Singh et al. (2015).

No desenvolvimento de apêndices pares de vertebrados, a expressão de *Shh* é dirigida pela Região Reguladora da ZPA (*ZPA regulatory region*, ZRS), um ECR altamente conservado. Nocaute da ZRS em camundongos resulta na perda do autopódio, fenótipo também observado em camundongos nocaute para o gene *Shh* (Sagai et al., 2005). Em contrapartida, mutações específicas em sítios de ligação para fatores de transcrição da família ETS, que ajudam na ativação da expressão de *Shh* na ZPA, estão associados com polidactilia em humanos (Lettice et al., 2012). Em camundongos transgênicos, a análise da atividade do ZRS de baiacu japonês (Lettice et al., 2003) e celacanto (Kvon et al., 2016) demonstrou que estes são capazes de direcionar a expressão de gene-repórter na região da ZPA. Esses dados demonstram o grau de conservação do papel do ZRS e revelam a homologia profunda da regulação de *Shh* em apêndices de vertebrados.

1.4. A ativação de *Shh* pelos genes *Hand2* e *Hoxd13*

Experimentos de imunoprecipitação da cromatina seguida de sequenciamento (*Chromatin Immunoprecipitation-sequencing*, ChIP-Seq) e ensaios da atividade da luciferase demonstraram

que os fatores de transcrição *Hoxd13* e *Hand2* interagem com a ZRS positivamente, sugerindo sua participação no estabelecimento da ZPA em brotos de membros (Galli et al., 2010). A primeira fase de expressão de *Hoxd13* é restrita à região posterior dos brotos de membros de camundongo (Nelson et al., 1996) sobrepondo-se espacialmente à ZPA. Do mesmo modo, *Hand2* é expresso na região posterior e engloba ambas expressões dos genes supracitados (Capellini et al., 2006) (Fig. 4A).

Tanto a inibição específica da expressão de *Hand2* em brotos de membros de camundongos (Osterwalder et al., 2014), quanto o nocaute gênico de *Hoxd13* e *Hoxa13* (Kmita et al., 2005) resultam em membros sem dígitos. Assim como em tetrápodes, o padrão de expressão de *Hand2* em peixe-espátula (Davis et al., 2007) e tubarão (Onimaru et al., 2015), revelado por hibridização *in situ*, engloba tanto a primeira fase de expressão de *Hoxd13* quanto a expressão de *Shh*. Esses dados confirmam o papel de *Hoxd13* e *Hand2* no estabelecimento da ZPA em tetrápodes e sugerem que eles desempenhem a mesma função em peixes.

Após ser ativado por *Hoxd13* e *Hand2*, *Shh* mantém a expressão de *Hand2* e ativa a segunda fase de expressão de *Hoxd13* no domínio distal do membro em desenvolvimento. Em camundongos nocaute para *Shh*, a expressão de *Hand2* diminui significativamente e a expressão da segunda fase de *Hoxd13* não é observada (Litingtung et al., 2002) (Fig. 4B). Em *zebrafish*, o bloqueio da via *Shh* através de tratamento com o inibidor ciclopamina, resulta na redução ou desaparecimento dos domínios de expressão de genes *Hoxd* de segunda fase (Ahn & Ho, 2008). Em contrapartida, a ativação ectópica de *Shh* pelo uso de ácido retinóico durante o desenvolvimento de nadadeiras de tubarão resulta em expansão da expressão de *Ptch1* e *Hand2* (Onimaru et al., 2015), sugerindo que o domínio distal de expressão de *Hoxd*, bem como

manutenção da expressão de *Hand2* são ativados por um mecanismo que envolve *Shh*, tanto em nadadeiras, quanto em membros.

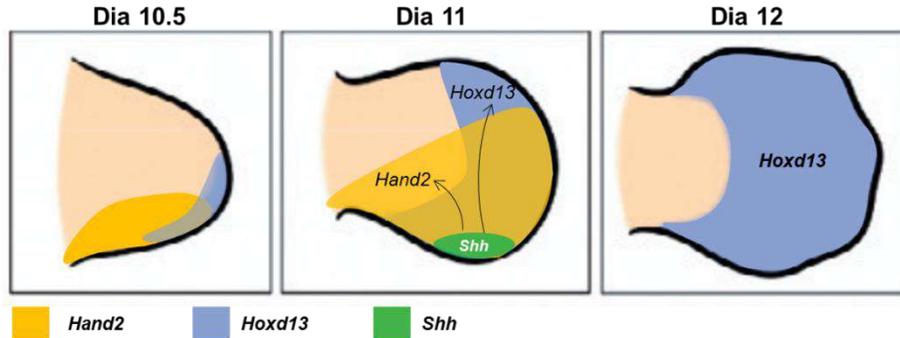


Figura 4. Vista dorsal do broto de membro em desenvolvimento e sinalização de *Hand2* e *Hoxd13*. Nos primeiros estágios do desenvolvimento de membros, *Hand2* e *Hoxd13* se ligam à ZRS, estabelecendo o local da ZPA (dia 10.5). Após a ativação da expressão de *Shh*, ele modula a expressão de *Hand2*, aumentando seu domínio para a região anterior do broto, e ativa a segunda fase de expressão de *Hoxd13* (dia 12), por mecanismos não bem estabelecidos. Adaptado de Schneider & Shubin (2013) e Osterwalder et al. (2014).

1.5. Mecanismos moleculares compartilhados entre regeneração e desenvolvimento

Ao contrário de répteis, aves e mamíferos, as salamandras são capazes de regenerar membros completamente perdidos durante toda sua vida e tais habilidades regenerativas as tornaram um modelo clássico em estudos de biologia regenerativa. Atualmente, evidências do registro fóssil sugerem que a regeneração de membros é uma característica ancestral de tetrápodes que foi mantida apenas em anfíbios (Fröbisch et al., 2015). Estudos recentes baseados na similaridade entre padrões de expressão gênica entre a regeneração de membros em salamandra e nadadeiras de peixes pulmonados por análise de transcriptoma sugerem que os mecanismos genéticos para a regeneração de apêndices surgiram no ancestral comum de sarcopterígeos (Nogueira et al., 2016). Ainda que nenhuma evidência de regeneração em celacantos tenha sido documentada, a capacidade de regeneração no peixe actinopterígeo *Polypterus* (Cuervo et al.,

2012) sugere que tal característica pode ter sido adquirida antes da divergência entre sarcopterígio e actinopterígio.

Durante a regeneração, eventos que ocorrem no desenvolvimento embrionário do membro são recapitulados. Estudos com enxertos de broto dos membros traseiros de salamandra, inseridos em membros anteriores em regeneração, com inversões no eixo anteroposterior, geraram membros múltiplos, resultado idêntico quando os enxertos são realizados entre brotos de membros traseiros direito e esquerdo, indicando que as mesmas vias de sinalização são usadas tanto no desenvolvimento, quanto na regeneração (Muneoka & Bryant, 1982).

Ainda em salamandras, experimentos de hibridização *in situ* em membros em regeneração demonstrou que, assim como no desenvolvimento, a expressão de *Shh* é restrita à ZPA (Imokawa & Yoshizato, 1997). Do mesmo modo, durante a regeneração de *Polypterus*, *Shh* é expresso de maneira intensa na região posterior (Cuervo et al., 2012) assim como durante o desenvolvimento do peixe-espátula (Davis et al., 2007). Embora experimentos com enxertos em peixes ainda não tenham sido realizados, os dados com uso de molécula agonista da via Shh (Fig. 5) sugerem que a regeneração recapitula aspectos essenciais na padronização anteroposterior de membros e nadadeiras em desenvolvimento.

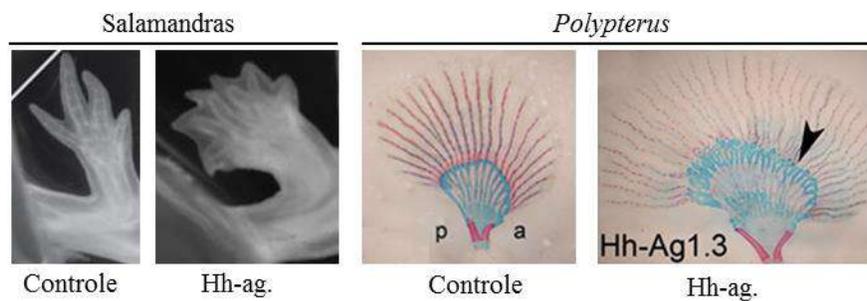


Figura 5. Ativação ectópica da via Shh aumenta número de elementos ósseos no eixo anteroposterior de apêndices peitorais pares de vertebrados. Quando membros de salamandras e nadadeiras de *Polypterus* em regeneração são expostas à molécula agonista da via Shh (Hh-ag.), ocorre um aumento no número de dígitos e radiais distais (ponta de seta). Adaptado de Nacu et al. (2016) e Cuervo et al. (2012).

Atualmente, os dados de morfologia comparada de apêndices peitorais de sarcopterígeos viventes são contraditórios em suas interpretações. Estudos sobre a anatomia da musculatura de celacanto, peixes pulmonados e salamandras encontraram apenas correspondentes musculares e possíveis homologias entre músculos do estilopódio e zeugopódio, sustentando a ideia de que o autopódio e sua musculatura seriam uma novidade evolutiva (Diogo et al., 2016). Alternativamente, Miyake et al. (2016), que realizaram estudos similares, sugerem um cenário no qual a perda de raios dermais durante a transição de nadadeiras para membros acarretou na perda de músculos superficiais, restando apenas as camadas mais profundas de músculos, que teriam sido cooptadas para os dígitos. Estes resultados sugerem que apesar de serem grupo irmão de tetrápodes (Amemiya et al., 2013), peixes pulmonados apresentam nadadeiras muito derivadas.

Em *L. paradoxa*, por exemplo, radiais distais não estão presentes. Entretanto estudos moleculares sobre o desenvolvimento de nadadeiras em Lepidosirenidae ainda não foram realizados para revelar se os mecanismos genéticos por trás dessa morfologia também são muito divergentes dos utilizados na padronização anteroposterior em membros de tetrápodes. Dada a dificuldade de *L. paradoxa* se reproduzir *ex situ*, utilizaremos aqui sua ampla capacidade regenerativa para elucidar aspectos moleculares da padronização anteroposterior de suas nadadeiras peitorais por: (1) análise de qPCR para (1a) *Shh* e genes ativados pela via Shh (*Ptch1*, *Gli1*); (1b) genes que codificam fatores de transcrição que ativam a via Shh (*Hand2* e *Hoxd13*); e (2) ativação ectópica da via de sinalização Shh por uso de molécula agonista.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Analisar a expressão e regulação do gene *Shh* durante a regeneração de nadadeiras em *L. paradoxa*

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão de genes diretamente ligados à via de Shh (*Ptch1*, *Gli1* e *Shh*) e fatores de transcrição ativadores da via de Shh (*Hand2* e *Hoxd13*) em nadadeiras em regeneração de *L. paradoxa* por qPCR;
- Ativar a via de sinalização de *Shh* ectopicamente com uso de molécula agonista.

3. Resultados

3.1. Expressão de *Shh*, *Ptch1* e *Gli1* durante a regeneração

Através de qPCR, realizamos a análise de expressão de genes da via Shh ao longo de 5 semanas. Os níveis de expressão gênica foram estimados usando amostra de tecido maduro, nadadeiras que não estão em processo regenerativo, como referência. Em comparação ao tecido maduro, a expressão de *Gli1* teve seu pico em 2 spa, apresentando-se 23 vezes mais expressa. Já o pico de expressão de *Ptch1* ocorreu em 3 spa, no qual o gene se encontrou 19 vezes mais expresso que em tecido maduro. Apesar disso, *Shh* não apresentou aumento de expressão quando comparado ao tecido controle (Fig. 6).

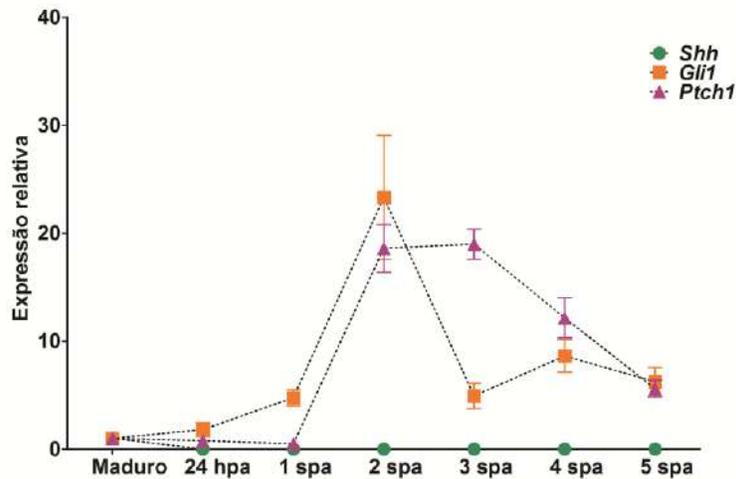


Figura 6. Gráfico de expressão relativa de genes da via Shh. Expressão relativa de genes que atuam na via de sinalização Shh, *Shh*, *Ptch1* e *Gli1*, dada em y-vezes quando comparados à sua expressão no tecido maduro. Barras representam \pm desvio padrão; spa, semanas pós-amputação, n=3 (3 réplicas técnicas a partir de 1 réplica biológica).

3.2. Expressão de *Hoxd13* e *Hand2* durante a regeneração

O gene *Hoxd13* apresentou um pico de expressão em 2 spa (73 vezes mais expresso), decaindo progressivamente nas semanas seguintes. Mudanças na expressão relativa de *Hand2* foram baixas, sempre inferiores a 2 (Fig. 7) o que sugere a ausência de diferenças significativas de expressão do gene *Hand2* entre o tecido maduro e em regeneração. O pico de expressão relativa de *Hand2* ocorreu em 5 spa, onde o gene se encontrou 1,9 vez mais expresso que no tecido maduro (Fig. 7).

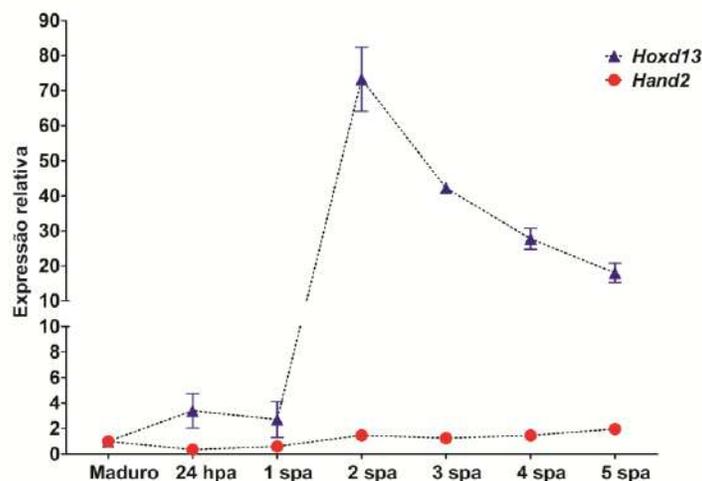


Figura 7. Gráfico de expressão relativa para *Hand2* e *Hoxd13*. Expressão relativa dos fatores de transcrição em y-vezes a expressão do tecido maduro em cada período analisado (eixo x). Barras representam \pm desvio padrão; spa, semanas pós-amputação, n=3 (3 réplicas técnicas a partir de 1 réplica biológica).

3.3. Tratamento com agonista da via Shh

A ativação ectópica da via de sinalização Shh através do uso da molécula agonista Hh-ag 1.5 não resultou em mudanças perceptíveis nas nadadeiras em regeneração de *L. paradoxa*. Tanto o tratamento de 0-7 spa quanto o 3-10 spa não afetaram a morfologia nem a anatomia externa das nadadeiras peitorais em regeneração (Fig. 8).

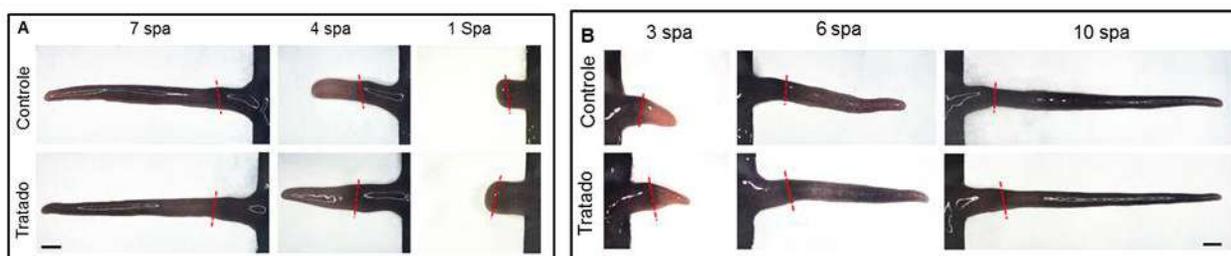


Figura 8. Regeneração de nadadeira peitorais de *L. paradoxa* sob tratamento com Hh-ag 1.5. Nenhuma diferença fenotípica foi observada nos grupos tratados (inferior) de 0-7 spa (a) ou 3-10 spa (B) quando comparados aos grupos controles. Barras pontilhadas indicam o plano do corte; escala 0.5 mm; vista dorsal, proximal ao centro e posterior acima.

4. Discussão

Consideramos o pico de expressão de *Ptch1* em duas spa, visto que os desvios padrão de 3 spa e 2 spa se sobrepõem quase completamente. Quando comparada à nadadeira madura, a expressão do gene *Shh* se manteve em níveis basais durante todo o período analisado. Por outro lado, *Ptch1* e *Gli1* tiveram um pico de expressão em 2 spa. Esses dados sugerem que a via de sinalização *Shh* é transitoriamente ativada, similar ao que ocorre em serpentes. Algumas serpentes, como a boa, possuem apenas vestígios de membros posteriores, sem dígitos. No desenvolvimento destes membros, *Shh* têm expressão transiente, *Gli1* e *Ptc1* são detectados, mas desaparecem, pois, o sinal de *Shh* não é mantido (Leal & Cohn, 2016).

Durante a regeneração das nadadeiras de *L. paradoxa*, não foi observado aumento significativo da expressão do gene *Hand2*. Nossos dados indicam a ausência de regulação positiva de *Shh* por parte do *Hand2* durante a regeneração em *L. paradoxa*, visto que, em camundongos *Hand2* se liga à ZRS contribuindo significativamente para a regulação positiva de *Shh* (Galli et al., 2010). Considerando o papel de *Hand2* na formação de dígitos em camundongos, nossos dados sugerem que a ausência de radiais distais em *L. paradoxa* pode resultar da ineficiente ativação de *Hand2* e, conseqüentemente, de *Shh* (Osterwalder et al., 2014).

Hoxd13 por sua vez, tem pico de expressão em 2 spa, decaindo progressivamente. Dada a morfologia da nadadeira de *L. paradoxa* e a ausência de expressão de *Shh*, o pico de expressão de *Hoxd13* observado pode corresponder à primeira fase de expressão do gene durante a formação dos elementos proximais de membros em tetrápodes, visto que a segunda fase de expressão desse gene depende de *Shh* (Zàkàny et al., 2004). Desse modo, nossos resultados sugerem que a atenuação da via *Shh* pode estar por trás da ausência de um equivalente da segunda fase de expressão de genes *Hoxd* em *L. paradoxa*.

Em axolotes (Nacu et al., 2016), *Polypterus* (Cuervo et al., 2012) e girinos de *Xenopus* (Yakushiji et al., 2009), a aplicação de agonista da via Shh durante a regeneração resulta em apêndices com maior número de dígitos ou radiais. Entretanto, não foi observada mudança na morfologia externa das nadadeiras de *L. paradoxa* tratadas com o agonista de *Shh* (Frank-Kamenetsky et al., 2013), quando comparadas com o grupo controle (Fig 8), tanto para tratamentos de 0-7 spa quanto 3-10 spa. Assim sendo, nossos resultados favorecem um cenário no qual a regeneração de nadadeiras de *L. paradoxa* ocorre sem influência da via Shh.

5. Conclusão

Os tratamentos realizados com Hh-ag 1.5 não resultaram em mudança fenotípica na nadadeira de *L. paradoxa*, sugerindo que os genes alvo da via Shh não mais respondem a sua ativação. A regulação positiva dos genes alvo da via de sinalização Shh (*Ptch1* e *Gli1*) pode ser resultado de ativação ainda que atenuada, da via Shh, ou que a ativação destes genes ocorra independentemente de Shh. Por fim, a presença de um pico de expressão de *Hoxd13*, mas não de *Hand2*, sugere que *L. paradoxa* mantém apenas a primeira fase de expressão de genes *Hoxd*. Portanto, nossos resultados indicam que a via de sinalização Shh não tem papel essencial na regeneração de nadadeiras peitorais de *L. paradoxa*. Este resultado pode explicar a ausência de radiais distais (pré e pós axiais), cuja formação depende presumivelmente da ação da via Shh. Um cenário evolutivo plausível seria que a forma de locomoção de *L. paradoxa*, majoritariamente baseada em ondulações do corpo alongado (Kerr, 1900), tenha relaxado a pressão seletiva sobre mecanismos de desenvolvimento dos radiais.

6. Material e Métodos

6.1. Captura e manutenção de espécimes

Os espécimes foram capturados no município de Breves em fevereiro de 2016 e trazidos para o Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, onde foram mantidos em tanques individuais de tamanho apropriado, com alimentação diária e trocas de água de acordo com a necessidade. O projeto teve aprovação do IBAMA/SISBIO, número de licença: 47206-1.

6.2. Anestesia e amputações

Os procedimentos descritos abaixo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da UFPA, estando sob número de protocolo: 037-2015. Animais quando submetido à manipulação prolongada (excetuando-se as de troca de água) e amputações foram submetido à anestesia por eugenol (óleo de cravo) à 0,4ml/L pelo tempo necessário para atingir anestesia profunda (revisado por Carter et al., 2011).

6.3. Coleta de amostras para qPCR

Para análise da expressão gênica por qPCR, foram coletadas amostras de nadadeiras maduras e em regeneração nos seguintes momentos (todas em triplicata biológica): 24 hpa, uma, duas, três, quatro e cinco spa. Nas nadadeiras em regeneração, o material coletado se resumia apenas a parte distal ao plano de corte original, evitando a coleta de tecido maduro. Imediatamente após a coleta, as amostras foram armazenadas em RNAlater® (Sigma-Aldrich Co. LLC.) em tubos criogênicos de 1,5 mL, deixadas por aproximadamente 16 horas à 4°C e então armazenadas à -80°C até o dia da extração de RNA.

6.4. Extração de RNA e construção de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando TRIzol Reagent® (Life Technologies) seguindo o protocolo do fabricante. Para a construção de cDNA, por ação da transcriptase reversa, foi utilizado a SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Life Technologies) para 300 nanogramas do RNA total, seguindo as instruções do fabricante. Após a construção das bibliotecas de cDNA as amostras foram guardadas à -20°C.

6.5. qPCR

As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas. Utilizou-se o kit SYBR Green PCR Master Mix e 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems), seguindo as indicações do fabricante para 1 microlitro da amostra de cDNA com volume final de reação de 10 microlitros. Utilizando os mesmos dados citados no item 3.4, os iniciadores específicos de qPCR foram projetados no Primer Express Software Version 3.0 (Applied Biosystems) com configurações padrão. A análise da expressão relativa dos genes foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). A normalização para os genes foi feita com a expressão de Polc1r, gene que codifica a Subunidade C da RNA-Polimerase, expresso constitutivamente em humanos (Uhlen et al., 2015), que também apresentou níveis de expressão idênticos tanto em nadadeiras 3 spa quanto em tecido maduro por análise transcriptômica em *L. paradoxa* (Nogueira et al., 2016). Os dados foram apresentados pela expressão relativa, indicado pela média dos níveis de expressão das réplicas técnicas de uma amostra biológica. A expressão relativa é o quanto à mais ou a menos (níveis abaixo de 1) o gene em questão é expresso no tecido em regeneração, quando comparado ao seu nível de expressão no tecido maduro. Consideramos como regulados positivamente genes com níveis de expressão relativa acima de dois.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores usados. Os genes alvo seguidos de dos iniciadores para a fita *Forward* e *Reverse* para cada gene, respectivamente.

Alvos	Sequência dos iniciadores (5'→3')
Shh-F	CCACCAACAGTGAGGAACCTTT
Shh-R	CTGGCCAGGTACAACCTTTGCT
Ptch1-F	CCCTGTAGCTTGGTGCTGTATG
Ptch1-R	TGCAATAGCAGATCACATCACTCA
Gli1-F	GAGGGCTGTCGCTTTCCA
Gli1-R	GAGCACGCTTTTTGCTTAACTTT
HoxD13-F	GCGTTTGCGGCTCATTGT
HoxD13-R	CGAGACTGTGCAGGCGAAA
Hand2-F	ACGCCGCACGCAGAGTA
Hand2-R	GGGATGCACTCTCGCAATTC
Polr1c-F	TGGGTTCCCTGGTACATTTGACTT
Polr1c-R	GAGATGAAGAGGGAAGTAAATTGA

6.6. Tratamento com agonista da via de sinalização Shh

Dois espécimes de tamanho similar foram selecionados para o tratamento com o agonista da via Shh, HH-Ag.1.5. Essa molécula interage diretamente com o receptor intracelular da via de Shh, *Smo*, ativando a via de sinalização Shh independente de *Shh* e *Ptch1* (Frank-Kamenetsky et al., 2013). O grupo controle foi colocado em tanques com água contendo Dimetilsulfóxido (DMSO) e o grupo tratado colocado em tanques com água com HH-Ag1.5 à 200nmol. A concentração utilizada de HH-Ag1.5 já se mostrou suficiente para causar alterações na regeneração de nadadeiras (Cuervo et al., 2012) e membros (Yakushiji et al., 2009). O tratamento durou sete semanas com trocas de água (contendo DMSO ou HH-Ag1.5) a cada dois dias. Os efeitos do tratamento foram analisados para duas situações: (i) imediatamente após a amputação (0 à 7 spa) e; (ii) a partir de blastemas já formados (3 à 10 spa). Semanalmente após o início do tratamento, as nadadeiras peitorais em regeneração eram fotografadas. A figura nove resume os passos explicados acima.

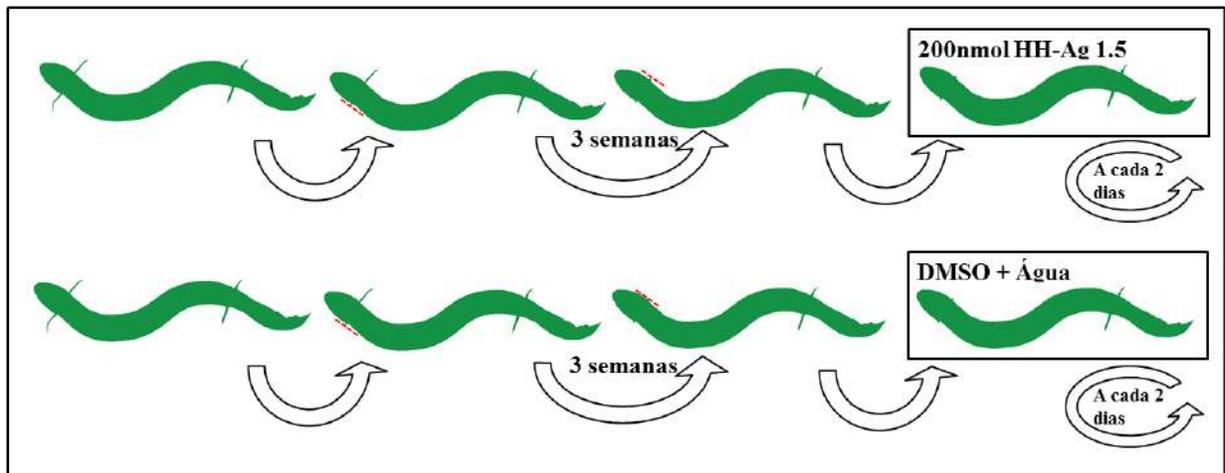


Figura 9. Desenho experimental para os tratamentos com agonista da via Shh (Hh-ag 1.5). Dois espécimes foram utilizados, o grupo tratado (superior) e controle (inferior). As amputações das nadadeiras esquerdas, ocorreram três semanas antes do início do tratamento, quando as nadadeiras direitas foram amputadas. O tratamento seguiu-se por sete semanas, com trocas de água a cada 48 horas.

7. Referências

- Ahn D, Ho RK. 2008. Tri-phasic expression of posterior *Hox* genes during development of pectoral fins in zebrafish: implications for the evolution of vertebrate paired appendages. *Dev Biol.* 322(1):220-33.
- Amemiya CT, Alföldi J, Lee AP, Fan S, Philippe H, MacCallum I, Braasch I, Manousaki T, Schneider I, Rohner N, Organ C, Chalopin D, Smith JJ, Robinson M, Dorrington RA, Gerdol M, Aken B, Biscotti MA, Barucca M, Baurain D, Berlin AM, Blatch GL, Buonocore F, Burmester T, Campbell MS, Canapa A, Cannon JP, Christoffels A, De Moro G, Edkins AL, Fan L, Fausto AM, Feiner N, Forconi M, Gamielien J, Gnerre S, Gnirke A, Goldstone JV, Haerty W, Hahn ME, Hesse U, Hoffmann S, Johnson J, Karchner SI, Kuraku S, Lara M, Levin JZ, Litman GW, Mauceli E, Miyake T, Mueller MG, Nelson DR, Nitsche A, Olmo E, Ota T, Pallavicini A, Panji S, Picone B, Ponting CP, Prohaska SJ, Przybylski D, Saha NR, Ravi V, Ribeiro FJ, Sauka-Spengler T, Scapigliati G, Searle SMJ, Sharpe T, Simakov O, Stadler PF, Stegeman JJ, Sumiyama K, Tabbaa D, Tafer H, Turner-Maier J, van Heusden P, White S, Williams L, Yandell M, Brinkmann H, Volff J, Tabin

- CJ, Shubin N, Schartl M, Jaffe DB, Postlethwait JH, Venkatesh B, Di Palma F, Lander ES, Meyer A, Lindblad-Toh K. 2013. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature*. 496(7445):311-6.
- Boisvert CA, Mark-kurik E, Ahlberg PE. 2008. The pectoral fin of *Panderichthys* and the origin of digits. *Nature*. 456(7222):636-8.
- Capellini TD, Di Giacomo G, Salsi V, Brendolan A, Ferretti E, Srivastava D, Zappavigna V, Selleri L. 2006. *Pbx1/Pbx2* requirement for distal limb patterning is mediated by the hierarchical control of Hox gene spatial distribution and Shh expression. *Development*. 133(11):2263-73.
- Carter KM, Woodley CM, Richard SB. 2011. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fisheries*. 21:51–59
- Coates MI, Clack JA. 1990. Polydactyly in the earliest known tetrapod limbs. 347():66-69.
- Cuervo R, Hernández-martínez R, Chimal-monroy J, Merchant-larios H, Covarrubias L. 2012. Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109(10):3838-3843.
- Davis MC, Danh RD, Shubin NH. 2007. An autopodial-like pattern of *Hox* expression in the fins of a basal actinopterygian fish. *Nature*. 477(7143):473-476.
- Diogo R, Johnston P, Molnar JL, Esteve-altava B. 2016. Characteristic tetrapod musculoskeletal limb phenotype emerged more than 400 MYA in basal lobe-finned fishes. *Sci Rep*. 6:37592.
- Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL, Porter JA. 2002. Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. *J Biol*. 1(2):1-10.
- Freitas R, Zhang G, Cohn MJ. 2007. Biphasic *Hoxd* gene expression in shark paired fins reveals an ancient origin of the distal limb domain. *PLoS ONE*. 2(8):e754.
- Fröbisch NB, Bickelmann C, Olori JC, Witzmann F. 2015. Deep-time evolution of regeneration and preaxial polarity in tetrapod limb development. *Nature*. 527(7577):231-4.

- Galli A, Robay D, Osterwalder M, Bao X, Bénazet JD, Tariq M, Paro R, Mackem S, Zeller R. 2010. Distinct roles of *Hand2* in initiating polarity and posterior *Shh* expression during the onset of mouse limb bud development. *PLoS Genet.* 6(4):e1000901.
- Gehrke AR, Schneider I, De la calle-mustienes E, Tena JJ, Gomez-Marin C, Chandran M, Nakamura T, Braasch I, Postlethwait JH, Gómez-Skarmeta JL, Shubin NH. 2015. Deep conservation of wrist and digit enhancers in fish. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(3):803-8.
- Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP, Tabin CJ. 2004. Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell.* 118(4):517-528.
- Imokawa Y, Yoshizato K. 1997. Expression of Sonic hedgehog gene in regenerating newt limb blastemas recapitulates that in developing limb buds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 4(17):9159-9164.
- Johanson Z, Joss J, Boisvert CA, Ericsson R, Sutija M, Ahlberg, PE. 2007. Fish fingers: digit homologues in Sarcopterygian fish fins. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 308B:757–768.
- Kardong, KV. 2015. *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution.* New York: McGraw-Hill Education. p. 82-127.
- Kerr JG. 1900. The External Features in the Development of *L. paradoxa*, Fritz. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 192:299-330.
- Kmita M, Tarchini B, Zàkány J, Logan M, Tabin CJ, Duboule D. 2005. Early developmental arrest of mammalian limbs lacking *HoxA/HoxD* gene function. *Nature.* 435(7045):1113-1116.
- Kvon EZ, Kamneva OK, Melo US, Dickel DE, Barozzi I, Osterwalder M, Mannion BJ, Pickle CS, Plajzer-frick I, Lee EA, Kato M, Garvin TH, Akiyama JA, Afzal V, Lopez-rios J, Rubin EM, Dickel DE, Pennacchio LA. Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell.* 2016;167(3):633-642.e11.
- Leal F, Cohn MJ. 2016. Loss and Re-emergence of Legs in Snakes by Modular Evolution of Sonic hedgehog and *HOXD* Enhancers. *Curr Biol.* 26(21):2966-2973.
- Lettice LA, Heaney SJH, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E. 2003. A long-range *Shh* enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Development.* 12(14):1725-1735.

- Lettice LA, Williamson I, Wiltshire JH, Peluso S, Devenney PS, Hill AE, Essafi A, Hagman J, Mort R, Grimes G, DeAngelis CL, Hill RE. 2012. Opposing functions of the ETS factor family define *Shh* spatial expression in limb buds and underlie polydactyly. *Dev Cell*. 22(2):459-67.
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. 2002. *Shh* and *Gli3* are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 418(6901):979-83.
- Livak KJ & Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Miyake T, Kumamoto M, Iwata M, Sato R, Okabe M, Koie H, Kumai N, Fujii K, Matsuzaki K, Nakamura C, Yamauchi S, Yoshida K, Yoshimura K, Komoda A, Uyeno T, Abe Y. 2016. The pectoral fin muscles of the coelacanth *Latimeria chalumnae*: Functional and evolutionary implications for the fin-to-limb transition and subsequent evolution of tetrapods. *Anat Rec (Hoboken)*. 299(9):1203-23.
- Muneoka K, Bryant SV. 1982. Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature*. 298 (5872):369-371.
- Nacu E, Gromberg E, Oliveira CR, Drechsel D, Tanaka EM. 2016. *FGF8* and *SHH* substitute for anterior-posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature*. 533(7603):407-10.
- Nelson CE, Morgan BA, Burke AC, Laufer E, DiMambro E, Murtaugh LC, Gonzales E, Tessarollo L, Parada LF, Tabin C. 1996. Analysis of *Hox* gene expression in the chick limb bud. *Development*. 122:1449-1466.
- Nogueira AF, Costa CM, Lorena J, Moreira RN, Frota-Lima GN, Furtado C, Robinson M, Amemiya CT, Darnet S, Schneider I. 2016. Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. *Nat Commun*. 7:13364.
- Onimaru K, Kuraku S, Takagi W, Hyodo S, Sharpe J, Tanaka M. 2015. A shift in anterior-posterior positional information underlies the fin-to-limb evolution. *Elife* 2015;4.
- Osterwalder M, Speziale D, Shoukry M, Mohan R, Ivanek R, Kohler M, Beisel C, Wen X, Scales SJ, Christoffels VM, Visel A, Lopez-Rios J, Zeller R. 2014. *HAND2* targets define a

- network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell*. 31(3):345-357.
- Pearse RV, Vogan KJ, Tabin CJ. 2001. *Ptc1* and *Ptc2* transcripts provide distinct readouts of Hedgehog signaling activity during chick embryogenesis. *Dev Biol*. 239(1):15-29.
- Prykhozhiy SV, Neumann CJ. 2008. Distinct roles of *Shh* and *Fgf* signaling in regulating cell proliferation during zebrafish pectoral fin development. *BMC Dev Biol*. 8:91.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushina Y, Tamura M, Shiroishi T. 2005. Elimination of a long-range cis-regulatory module causes complete loss of limb-specific *Shh* expression and truncation of the mouse limb. *Development*. 132(4):797-803.
- Schneider I, Shubin NH. 2013. The origin of the tetrapod limb: from expeditions to enhancers. *Trends Genet*. 29(7):419-26.
- Singh BN, Koyano-nakagawa N, Donaldson A, Weaver CV, Garry MG, Garry DJ. 2015. Hedgehog Signaling during Appendage Development and Regeneration. *Genes (Basel)*. 6(2):417-435.
- Shubin NH, Daeschler EB, Jenkins FA. 2006. The pectoral fin of *Tiktaalik roseae* and the origin of the tetrapod limb. *Nature*. 440(7085):764-71.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S. 2009. Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature*. 457(7231):818-823.
- Tarchini B, Duboule D, Kmita M. 2006. Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature*. 443(7114):985-8.
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto C A-K, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 347(6220):1260419.
- Wagner GP, Lynch VJ. 2010. Evolutionary novelties. *Curr Biol*. 20(2):R48-52.

Yakushiji N, Suzuki M, Satoh A, Ide H, Tamura K. 2009. Effects of activation of hedgehog signaling on patterning, growth, and differentiation in *Xenopus* froglet limb regeneration. *Dev Dyn.* 238(8):1887-1896

Zákány J, Kmita M, Duboule D. 2004. A dual role for *Hox* genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science.* 304(5677):1669-72.