



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**UM MECANISMO MOLECULAR COMPARTILHADO NA PADRONIZAÇÃO DE
NADADEIRAS EM PEIXES PULMONADOS E MEMBROS EM TETRÁPODES**

DANIELSON BAIA AMARAL

Dissertação de Mestrado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em Genética e
Biologia Molecular da UFPA como requisito
final para obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

BELÉM-PA
MAIO 2019

DANIELSON BAIA AMARAL

**UM MECANISMO MOLECULAR COMPARTILHADO NA PADRONIZAÇÃO DE
NADADEIRAS EM PEIXES PULMONADOS E MEMBROS EM TETRÁPODES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Genética e Biologia
Molecular da UFPA como requisito final
para obtenção do grau de Mestre em
Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

BELÉM-PA
MAIO 2019

DANIELSON BAIA AMARAL

**UM MECANISMO MOLECULAR COMPARTILHADO NA PADRONIZAÇÃO DE
NADADEIRAS EM PEIXES PULMONADOS E MEMBROS EM TETRÁPODES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFPA como requisito para obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Igor Schneider
Orientador

Prof. Dr. Julio Cesar Pieczarka
Avaliador

Prof. Dr. Edivaldo de Oliveira
Avaliador

Profa. Dra. Josane Freitas
Avaliadora

Profa. Dra. Cleusa Nagamachi
Avaliadora Suplente

BELÉM-PA
MAIO 2019

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Laboratório de Evolução e Desenvolvimento da Universidade Federal do Pará

Laboratório de Evolução e Ecofisiologia de Tetrápodes da USP-Ribeirão Preto

Museu de História Natural de Berlim - MfN Berlin

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

“Eu não percebi que esta era uma ocasião triste.”
(A series of unfortunate events, L.S.)

Agradecimentos

Sou profissionalmente grato ao meu orientador Prof. Dr. Igor Schneider por toda o tempo e atenção que dedicou à minha formação como pesquisador, sem o qual este trabalho não seria possível. Agradeço às oportunidades e confiança depositada bem como ao reconhecimento dos méritos.

Agradeço aos colaboradores deste projeto do Museu de História Natural de Berlim Msc. Gabriela Lima e Dra. Nadia Fröbisch e do Laboratório de Evolução e Ecofisiologia de Tetrápodes da USP-Ribeirão Preto Msc. Leandro Lofeu e Profa. Dra. Tiana Kohlsdorf.

Gostaria de agradecer aos membros da banca, por gentilmente aceitarem avaliar este trabalho. Bem como à avaliadora suplente pela disposição.

Gostaria de agradecer particularmente aos membros do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento, por criarem um ambiente de trabalho encorajador, em especial à Erika e Rogério por auxílio na manutenção dos nossos peixes pulmonados durante os longos tratamentos com fármacos. Também sou grato aos demais estudantes de iniciação científica pela manutenção dos diversos outros peixes que utilizamos neste e em outros projetos que tenho desenvolvido no laboratório.

Tenho enorme gratidão pessoal aos meus familiares e amigos, por me darem todo o apoio psicológico e financeiro durante a pós-graduação, sem o qual minhas expectativas não teriam se tornado realidade! **Obrigado mãe e família, vocês são meu grande privilégio!**

Sumário

Resumo	8
Abstract	9
1. Introdução	10
1.1. Membros de tetrápodes se originaram a partir de nadadeiras de peixes	10
1.2. Membros e nadadeiras apresentam diferenças morfológicas durante o desenvolvimento	12
1.3. Genes <i>Hoxd</i> têm expressão parcialmente conservada em membros e nadadeiras em desenvolvimento	13
1.4. A via de sinalização SHH é necessária para a padronização de dígitos	16
1.5. Elementos <i>cis</i> -reguladores de <i>Shh</i> e <i>Hoxd</i> em dígitos atuam em nadadeiras de peixes	17
1.6. <i>Shh</i> é necessário para o crescimento e padronização de membros em regeneração	20
1.7. Peixes pulmonados como modelo para a evolução de membros	22
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. Material e Métodos	27
3.1. Obtenção e manutenção de espécimes	27
3.2. Extração de DNA e clonagem do ZRS	27
3.3. Sequenciamento e análise <i>in silico</i> da ZRS	29
3.4. Anestesia e amputações	31
3.5. Extração de RNA e construção de cDNA	31
3.6. Expressão gênica relativa por PCR semi-quantitativa	31
3.7. Tratamentos com fármacos e fotografia	32
3.8. Análise morfológica: Diafanização	33
4. Resultados	34
4.1. As ZRSs de lepidosirenídeos apresentam deleções em sítios de ligação para fatores ativadores	34
4.2. <i>Shh</i> , <i>Gli1</i> e <i>Ptch1</i> são regulados positivamente durante a regeneração de nadadeiras em <i>P. annectens</i>	35
4.3. Inibição da via de SHH bloqueia o crescimento da nadadeira em regeneração de <i>P. annectens</i>	37
4.4. Ativação ectópica da via SHH modifica o endoesqueleto da nadadeira de <i>P. annectens</i>	39
5. Discussão	42
5.1. Mudanças na ZRS estão associadas a diferentes números de radiais distais em peixes pulmonados	42
5.2. A via de SHH é ativada durante a regeneração de nadadeiras em <i>P. annectens</i>	43
5.3. A via de SHH é necessária para a regeneração de nadadeiras em <i>P. annectens</i>	44
5.4. A via de SHH modula a padronização dos radiais distais em <i>P. annectens</i>	45
6. Considerações finais	47
7. Referências	49
8. Anexo 1	58

Resumo

Os primeiros tetrápodes conhecidos apresentavam membros com endoesqueleto proximal (úmero), seguido de dois elementos intermediários (rádio e ulna) e diversos elementos distais (ossos do punho e dígitos). Apesar de membros com dígitos serem considerados a inovação evolutiva de tetrápodes, parte dessa organização já estava presente em peixes sarcopterígeos extintos, grupo irmão de tetrápodes. O endoesqueleto da nadadeira desses peixes apresentava os três elementos proximais seguidos de uma região distal com radiais segmentados (endoesqueleto) e raios (exoesqueleto). Atualmente, os peixes sarcopterígeos são representados por Celacantos e peixes pulmonados e a homologia entre os radiais distais e dígitos ainda é motivo de discussão. Entre os peixes pulmonados modernos, *Neoceratodus forsteri* possui elaborado arranjo de radiais distais, estas estruturas são severamente reduzidas em espécies do gênero *Protopterus* e ausentes em *Lepidosiren paradoxa*. A via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) é essencial para do desenvolvimento de dígitos, visto que camundongos nocaute para *Shh* apresentam a perda de dígitos, enquanto sua ativação ectópica da via SHH leva à polidactilia. A expressão de *Shh* é controlada por um acentuador, altamente conservado chamado ZRS, que está presente mesmo em tetrápodes sem membros, como serpentes. Neste trabalho, investigamos o papel da via de sinalização de SHH na formação do esqueleto de nadadeiras em regeneração de peixes pulmonados por: (i) clonagem e análise *in silico* do ZRS; (ii) análise de expressão relativa de *Shh* e seus genes alvos por semi-qPCR; (iii) modulação global da via de sinalização de SHH por uso de fármacos. A análise *in silico* das sequências de ZRS por alinhamento múltiplo revelam uma deleção de 17 pares de base em um sítio de ligação para um fator de transcrição ETS apenas em *Protopterus* e *Lepidosiren*. Por semi-qPCR mostramos que a via de SHH é ativada durante a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*. Por fim, a inibição da via bloqueia a regeneração e sua ativação ectópica leva ao aumento do número e formação precoce dos radiais distais. Portanto, nossos dados sugerem que a via de SHH, central no desenvolvimento de dígitos em tetrápodes, também atua na formação de radiais distais em peixes pulmonados, suportando a hipótese de homologia entre estas estruturas e dígitos.

Abstract

The first known tetrapods to emerge already display a specifically arranged limb, composed of proximal endoskeletal elements (humerus, radius and ulna) plus distal elements (wrist bones and digits). While limbs with digits have been regarded as an evolutionary novelty, part of their skeletal organization was already in place in fish fins, as the closest relatives to tetrapods, sarcopterygian fishes, possess three proximal bones and a distal endoskeletal region composed of segmented radials. Among modern lungfish, the genus *Neoceratodus* has retained distal radials whereas Lepidosirenids (*Protopterus* e *Lepidosiren*) have lost them. Genetic or pharmacological inactivation of Sonic Hedgehog signaling (SHH) in developing limbs and fins leads to loss of distal endoskeleton, digits or distal radials, respectively. *Shh* expression during appendage development is controlled by a highly conserved enhancer element termed ZRS, present in all vertebrates including snakes. Here, we investigate the role of SHH signaling during lungfish fin regeneration by: (i) cloning and in silico analysis of ZRS from lungfish species of the three living genera; (ii) Semi-quantitative PCR for *Shh*, *Ptch1* and *Gli1* and (iii) pharmacological modulation of SHH signaling during lungfish fin regeneration. Comparative analysis of vertebrate ZRS sequences revealed a 17 bp deletion of a key ETS transcription factor binding site in Lepidosirenid lungfish but not in *Neoceratodus*. Furthermore, as seen in salamander limb regeneration, SHH signaling is activated and is necessary for lungfish fin regeneration. Last, we show that SHH activation increases the number of distal radials in lungfish fin. Overall, our data suggests that SHH signaling, a key pathway underlying digit development in tetrapods, also controls distal radial development in lungfish fins, providing support for the homology of digits and distal radials.

Introdução

1.1. Membros de tetrápodes se originaram a partir de nadadeiras de peixes

Os peixes ósseos são classificados como actinoptérgeos ou sarcopterígeos e constituem a maioria dos vertebrados vivos. Os peixes actinoptérgeos compreendem o grupo com maior número de espécies dentre os vertebrados e possuem nadadeiras cujo principal suporte estrutural é formado por ossos de origem dérmica, conhecidos como raios (peixes de nadadeira raiada). Os peixes sarcopterígeos, por sua vez, possuem nadadeiras rígidas, sustentadas por um endoesqueleto comparativamente mais robusto (peixes de nadadeira lobada) (Kardong, 2015).

Os peixes de nadadeira lobada foram muito mais diversos em espécies no Devoniano, mas atualmente estão representados por somente oito espécies, pertencentes à dois grupos: os actinistias (celacantos) e os dipnoicos (peixes-pulmonados). Durante sua diversificação no Devoniano, uma das linhagens de peixes de nadadeiras lobadas, mais proximamente relacionada aos peixes pulmonados, originou o ancestral comum de todos os anfíbios, répteis, aves e mamíferos que conhecemos, o primeiro tetrápode (Clement, 2019).

Os tetrápodes possuem como principal característica os membros com organização endoesquelética característica e a presença de dígitos, o que os torna capazes de locomoção fora d'água. Os dígitos, assim como elementos do punho, correspondem à região chamada autopódio, domínio mais distal dos membros. As regiões proximais ao autopódio são o zeugopódio (rádio e ulna) e o estilopódio (úmero), respectivamente (Amaral and Schneider, 2017; Figura 1).

De acordo com o registro fóssil, os primeiros tetrápodes possuíam elementos ósseos do estilopódio e zeugopódio correspondentes ao observado em peixes sarcopterígeos, além de um conjunto completo de dígitos e ausência de raios dermais, como em *Acanthostega* (Coates and Clack, 1990). Em concordância, comparações anatômicas revelaram a presença de homólogos de músculos do estilopódio e zeugopódio de salamandras em nadadeiras de celacantos e peixes pulmonados (Diogo et al., 2016). Portanto, os dados anatômicos sustentam o surgimento do estilopódio e zeugopódio nos peixes sarcopterígeos.

Em contrapartida, a presença de dígitos em tetrápodes é considerada por alguns pesquisadores como uma inovação evolutiva (Wagner and Lynch, 2010), ou seja, uma nova estrutura corporal que não possui correspondência (homologia) com qualquer outra estrutura presente na linhagem ancestral (Hall, 2005). Ao comparar anatomicamente membros anteriores e posteriores de salamandras com as nadadeiras dos peixes de nadadeira lobada viventes, Diogo et al., (2016) não encontrou suporte para a homologia entre os músculos destes compartimentos. Em contrapartida, Miyake et al., (2016), adicionando testes funcionais à análise, chegam à conclusão oposta.

Enquanto pouco progresso foi obtido em avaliar anatomicamente as espécies viventes, a busca por fósseis de peixes sarcopterígeos parece favorecer um cenário de homologia entre radiais distais e dígitos. 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* (Shubin et al., 2006), assim como em tetrápodes. Essas evidências apoiam uma transição evolutiva gradual, na qual os radiais distais de peixes sarcopterígeos teriam sofrido uma série de modificações até se estabelecerem como dígitos no autopódio de tetrápodes (Figura 1, elementos em verde-azulado).

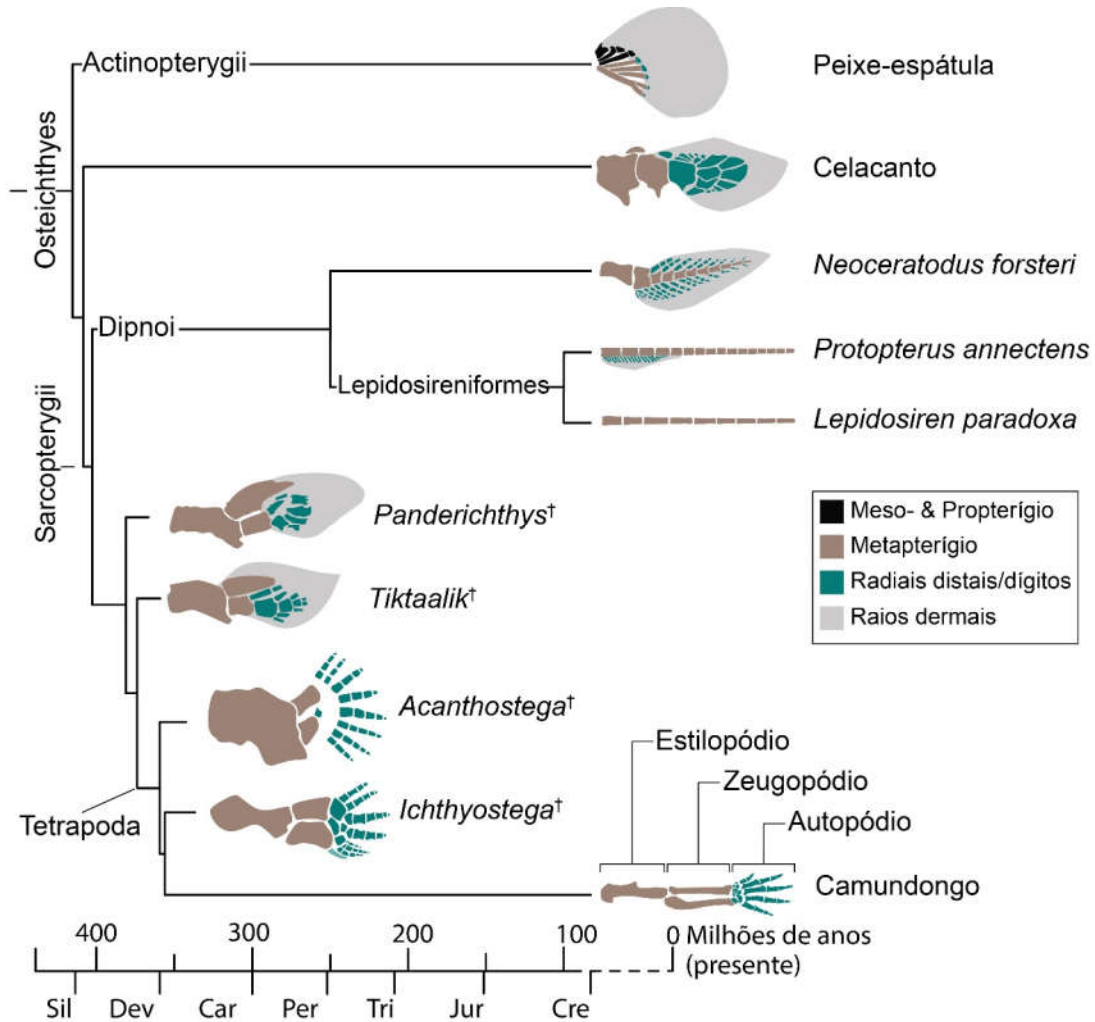


Figura 1. Evolução do esqueleto de membros e nadadeiras em vertebrados. Observe a hipótese de homologia entre radiais distais em peixes e dígitos em tetrápodes, ambos em verde azulado. * A nadadeira de *Neoceratodus* representa o padrão ancestral entre os peixes pulmonados vivos, com radiais distais pré-axiais (acima) e pós-axiais (abaixo). Vista dorsal, anterior acima.

1.2. Membros e nadadeiras apresentam diferenças morfológicas durante o desenvolvimento

Apesar de peixes de nadadeira raiada serem os mais utilizados para o entendimento de mudanças durante a transição de nadadeiras para membros, suas nadadeiras apresentam história de desenvolvimento e filogenética particulares. Durante o desenvolvimento do endoesqueleto de membros em tetrápodes e peixes pulmonados, os elementos ósseos seguem uma ordem próximo-distal de condensação, se bifurcando ou ramificando a partir de elementos mais proximais e menos numerosos (Shubin and Alberch, 1986). Em contrapartida, durante o desenvolvimento de peixes de nadadeira raiada, como paulistinha (*Danio rerio*) e ‘bichir’ (*Polypterus senegalus*), os radiais se formam a partir de perfurações

numa placa cartilaginosa contínua (Bartsch et al., 1997; Grandel and Schulte-Merker, 1998). Portanto, comparações anatômicas se tornam problemáticas devido a estes processos de desenvolvimento apresentarem mecanismos com divergências marcantes.

Esses padrões únicos de desenvolvimento parecem refletir a origem filogenética do endoesqueleto da nadadeira da maioria dos peixes de nadadeira raiada. O ancestral dos vertebrados ósseos vivos apresentava nadadeiras com três radiais pterigiais longos lateralmente dispostos. Estes radiais se articulavam proximalmente com a cintura peitoral ou pélvica e distalmente com os radiais distais (Zhu and Yu, 2009). Os peixes de nadadeiras lobadas, e por consequência os tetrápodes, mantiveram apenas o radial pterigial chamado metapterígio. Em contrapartida os peixes teleósteos, como paulistinha, mantiveram apenas o mesopterígio e propterígio.

Entre os peixes de nadadeira raiada (Actinopterygii), ‘bichir’ (Cladistia), gar (Holostei) e peixe-espátula (Chondrostei) são os três grupos a se separar mais cedo do ramo que originará teleósteos. Estes grupos apresentam tanto características anatômicas consideradas mais ancestrais, como organização genômica considerada parcimoniosamente mais próxima do ancestral dos peixes ósseos (Braasch et al., 2016). No peixe-espátula (*Polyodon spathula*), o metapterígio ainda está presente e se forma por ramificação (Figura 1), enquanto os outros dois radiais pterigiais são formados por perfurações na placa cartilaginosa (Davis et al., 2004).

Desse modo, comparações anatômicas durante o desenvolvimento de nadadeiras e membros têm sido pouco úteis para elucidar a homologia direta entre os seus elementos ósseos, indicando cautela durante a interpretação dos padrões de expressão gênica utilizados para sustentar homologia entre estruturas com desenvolvimento tão diverso.

1.3. Genes *Hoxd* têm expressão parcialmente conservada em membros e nadadeiras em desenvolvimento

Durante a evolução e diversificação das espécies, uma estrutura do corpo presente na população ancestral pode se modificar de modo diferente em cada um dos grupos descendentes. Por vezes, este processo acaba dificultando o reconhecimento de estruturas homólogas em espécies que caem nos extremos da variação. Classicamente, a comprovação

de homologia leva em consideração semelhança em forma, posição relativa e ontogenia das estruturas em questão (Freeman and Herron, 2013).

Recentemente, a elucidação de mecanismos genéticos e celulares comuns, em estruturas que não compartilham ancestralidade direta, levou ao surgimento de um termo mais específico, referente ao processo de evolução molecular. O termo homologia profunda (*deep homology*) é utilizado para descrever estas estruturas anatômicas que evoluíram independentemente e que, no entanto, compartilham mecanismos de desenvolvimento e redes de regulação gênica devido à estes mecanismos moleculares terem surgido no seu último ancestral comum (Shubin et al., 2009).

Durante o desenvolvimento de membros, duas fases de expressão dos genes *Hoxd* são responsáveis pela determinação dos ossos proximais (estilopódio e zeugopódio) e distais (autopódio) (Tarchini and Duboule, 2006) (Figura 1). Em camundongo, durante a primeira fase de expressão de genes *Hoxd*, os parálogos 10-13 se expressam de modo sobreposto no broto do membro, com a expressão de *Hoxd13* sendo a mais restrita na porção posterior-distal. Já durante a segunda fase de expressão, a expressão de *Hoxd13* engloba todo padrão de expressão dos outros parálogos e é restrita à região distal do broto do membro, que posteriormente originará os dígitos. Assim, ambas as fases são separadas temporal e espacialmente, e os genes apresentam um padrão de expressão denominado colinear reverso (Figura 2a).

A expansão na expressão de *Hoxd13* está associada e desempenha importante papel na ativação de regiões reguladoras de genes do programa de desenvolvimento dos dígitos (Sheth et al., 2016). Análise transcriptômica revelou que a deleção de *Hoxd13* resulta na regulação negativa de genes que atuam na formação e padronização dos dígitos no membro em desenvolvimento. Adicionalmente, Sheth et al., (2016) mostraram que a mudança no perfil epigenético proximal vs. distal no broto do membro depende em grande parte da expressão de *Hoxd13*. Durante o desenvolvimento do membro, regiões do genoma que regulam a expressão de genes de padronização dos dígitos encontram-se ativas, identificadas por acetilação da lisina 27 da cauda da histona H3 (H3K27ac). Em camundongos nocautes para *Hoxd13*, entretanto, grande parte dessas regiões não mais estão marcadas por H3K27ac, reflexo da ausência de HOXD13 para ativar suas funções regulatórias.

No desenvolvimento de nadadeiras de peixes actinoptérgios (Nakamura et al., 2016; Tulenko et al., 2016) e peixes cartilagosos (Chondrichthyes) (Freitas et al., 2007; Tulenko et al., 2017), ambas as fases de expressão de *Hoxd* estão presentes, sendo que a segunda fase está associada à formação do esqueleto distal, radiais distais e raios dermais (Figura 2b). Ensaios de mapeamento do destino celular na nadadeira em desenvolvimento do peixe *Danio rerio* (paulistinha), mostram que parte das células positivas para a segunda fase de genes *Hoxd* migram da região de formação dos radiais distais para originarem os raios dermais (Nakamura et al., 2016). Os autores sugerem que a transição de nadadeira para membro possivelmente ocorreu devido a mudanças no destino celular de porções distais do apêndice em desenvolvimento, onde cada vez menos células passaram a migrar para a região de formação de raios dermais, acumulando-se na região de formação dos radiais distais.

Assim, Nakamura et al., (2016) e Tulenko et al., (2017) argumentam em favor da homologia profunda nos mecanismos de regulação gênica de regiões distais em nadadeiras (radiais distais e raios dermais) com os dígitos em membros. Esses resultados sugerem que o surgimento de um domínio distal de expressão gênica ocorreu no último ancestral comum de peixes e tetrápodes e que mudanças no destino celular tiveram importante papel no surgimento do autopódio concomitante à perda de raios dermais.

Apesar de ambas as fases de expressão dos genes *Hoxd* estarem presentes em peixes cartilagosos e de nadadeira raiada, elas diferem grandemente do padrão observado em tetrápodes. Tanto em tubarões quanto em peixes paulistinha, a primeira e segunda fase de expressão são sobrepostas espacialmente na região posterior da nadadeira (Freitas et al., 2007; Ahn and Ho, 2008). O mesmo ocorre em peixe-espátula, que assim como em paulistinha apresenta segunda fase de expressão de *Hoxd* similar a primeira (compare os colchetes da Figura 2a e b). Em ambos foi observada uma expansão no domínio de expressão de *Hoxd13*, entretanto, a expansão de expressão de *Hoxd11-12* é maior (Ahn and Ho, 2008; Tulenko et al., 2016), o que indica que parte dos mecanismos de regulação da expressão dos genes *Hoxd* em peixes de nadadeira raiada não é idêntica à de tetrápodes.

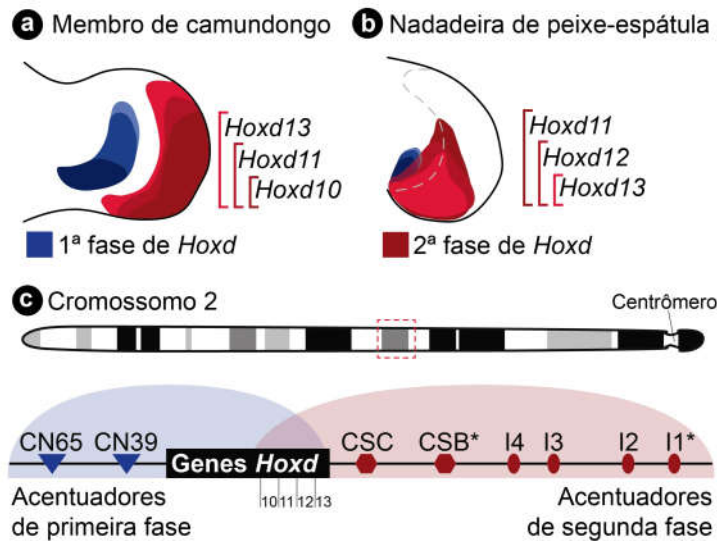


Figura 2. Duas fases de expressão de genes *Hoxd* são observadas no desenvolvimento de apêndices pares (nadadeiras ou membros) de vertebrados. Em membros em desenvolvimento de tetrápodes, os genes *Hoxd* apresentam colinearidade reversa no padrão de expressão, isto é, enquanto na primeira fase de expressão *Hoxd13* apresenta a expressão mais restrita, na segunda fase, *Hoxd13* têm seu domínio de expressão expandido, englobando a expressão de seus parálogos 10-12 (a). Embora ocorra a expansão do domínio de expressão de *Hoxd13* durante a segunda fase de expressão dos genes *Hoxd* em nadadeiras de peixe, ele não engloba a expressão de seus parálogos 10-12, não apresentando, portanto, colinearidade reversa (b). A área delimitada pela linha cinza tracejada em (b) representa o compartimento de desenvolvimento dos raios dermais em peixes. Esse padrão de expressão bifásico possui mecanismos *cis*-regulatórios altamente conservados entre peixes e tetrápodes, entretanto apenas os acentuadores CSB e I1 demonstraram atividade em ensaios em camundongos transgênicos (c). Vista dorsal de apêndices em desenvolvimento, anterior acima. Adaptado com modificações de Amaral and Schneider (2017).

1.4. A via de sinalização SHH é necessária para a padronização de dígitos

Durante o desenvolvimento de membros em camundongos, a expressão do gene *Shh* é restrita a uma região posterior distal chamada de Zona de Atividade Polarizante (*zone of polarizing activity*, ZPA) (Figura 3a, topo), formando um gradiente da expressão de SHH no eixo antero-posterior (Harfe et al., 2004). Durante a formação inicial do broto do membro, HOXD13 e HAND2 ativam a expressão de *Shh* na ZPA (Galli et al., 2010). Depois de ativada, a via de sinalização SHH é, por sua vez, necessária para a ativação da segunda fase de expressão dos genes *Hoxd* no autopódio dos membros em desenvolvimento. Dentre os fenótipos observados gerados pelo nocaute gênico de *Shh* em camundongos, inclui-se a perda de dígitos. Já para o duplo-nocaute dos genes *Shh* e seu antagonista, *Gli3*, resulta em fenótipo de polidactilia (Litingtung et al., 2002), indicando que a interação Shh-Gli3 é essencial para a padronização, determinação do número e identidade dos dígitos. A segunda

fase de expressão de genes *Hoxd* no paulistinha também depende da expressão de *Shh* (Ahn and 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 and Cohn, 2016) os genes *Ptch1* e *Gli1* têm domínios de expressão mais forte na região correspondente à ZPA (Figura 3a). Assim como nos tetrápodes, a expressão dos genes *Ptch1* e *Gli1* é ativada pela via de SHH no desenvolvimento de nadadeiras de paulistinha (Prykhozhiy et al., 2008), peixe-espátula (Tulenko et al., 2017) e tubarões (Onimaru et al., 2015). Mesmo em serpentes, onde *Shh* apresenta expressão transiente, *Gli1* e *Ptch1* são detectados (Leal and Cohn, 2016). Portanto, não apenas *Gli1* como também *Ptch1* são excelentes indicadores da ativação da via de sinalização SHH em apêndices pares de vertebrados (Figura 3b).

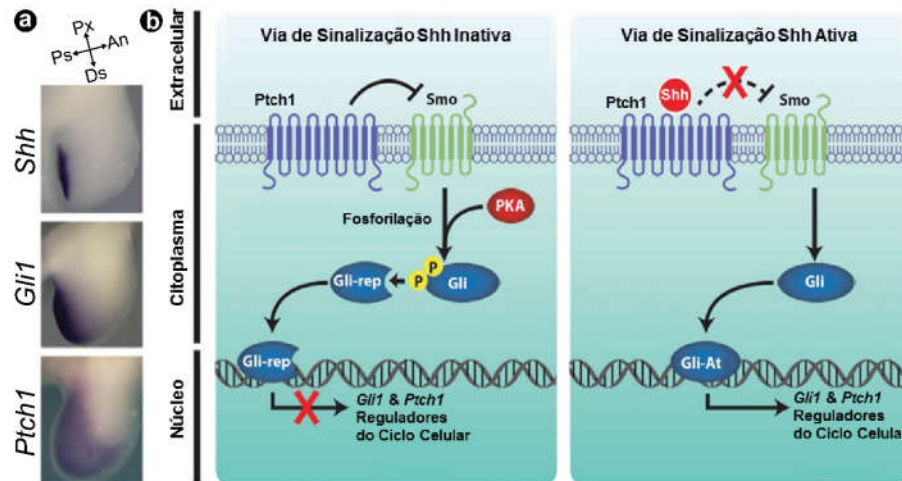


Figura 3. Via de sinalização SHH em membros de tetrápodes. Durante o desenvolvimento de membros em lagartos, *Shh* é expresso na região posterior do broto do membro, *Gli1* e *Ptch1* por sua vez são expressos em todas as células expostas à ativação da via de SHH (a) (resultados da técnica de hibridização *in situ*, adaptado de Leal and Cohn, (2016), as regiões marcadas em roxo indicam o local onde as moléculas de mRNA dos respectivos genes estão presentes) Px = Proximal, Ps = Posterior, An = Anterior, Ds = Distal. Na ausência de SHH, seu ligante, PTCH1 inibe SMO, permitindo a fosforilação dos efetores GLI no citoplasma. Este processo resulta em proteínas GLI repressoras, que migram para o núcleo e inibem a expressão de *Gli1* e *Ptch1* bem como outros reguladores do ciclo celular. Ao se ligar a PTCH1, SHH deixa SMO livre, de modo que as proteínas GLI não-fosforiladas assumem sua forma ativadora e migram para o núcleo, ativando a expressão de seus genes alvo *Gli1* *Ptch1* e outros reguladores do ciclo celular (b). Adaptado de Singh et al., (2015).

1.5. Elementos *cis*-reguladores de *Shh* e *Hoxd* em dígitos atuam em nadadeiras de peixes

O locus do agrupamento gênico *Hoxd* se encontra entre duas regiões reguladoras com atividades opostas, possuindo papel na delimitação de sua própria expressão bifásica no broto do membro em desenvolvimento (Rodríguez-carballo et al., 2017). A ativação dos genes *Hoxd* no broto do membro (primeira fase) é controlada por elementos *cis*-regulatórios (ECR) teloméricos ao agrupamento gênico (Zákány et al., 2004). Em contrapartida, a ativação dos genes *Hoxd* na região presuntiva do autopódio (segunda fase) é coordenada por ECRs centroméricos (Tarchini and Duboule, 2006). Ao testar ambas as regiões teloméricas e centroméricas de baiacu japonês (*Fugu rubripes*) em camundongos transgênicos, Woltering et al., (2014) demonstraram que os genes *Hoxd* de peixes apresentam apenas expressão na região proximal do broto do membro. Adicionalmente, Woltering and Duboule (2010) interpretam que a ausência de colinearidade reversa na expressão de genes *Hoxd* em peixes de nadadeira raiada indica a ausência da segunda fase presente em tetrápodes (Figura 2a-b). Os autores sugerem que a expansão do domínio de expressão *Hoxd* observada é comparável à expansão da primeira fase *Hoxd*, observada em membros de camundongo em desenvolvimento antes do início da segunda fase (Tarchini and Duboule, 2006).

Em contrapartida, estudos recentes revelaram que ECRs individuais da região centromérica dos genes *Hoxd* de peixes apresentam alta conservação com sequências ortólogas de camundongo (Amemiya et al., 2013; Montavon et al., 2011). Estas sequências (I1 e CSB), quando inseridos em embriões de camundongo, apresentam padrão de expressão de gene repórter na região do futuro autopódio (Gehrke et al., 2014). Análises de conservação por alinhamento múltiplo, indicam que as sequências I2, I4 e CsC são únicas de tetrápodes, portanto não tendo sido testadas por atividade do gene repórter em camundongos.

Adicionalmente, apesar de apresentar conservação alta em peixes e tetrápodes, I3 de gar (actinoptérigeo não teleósteo) falhou em estimular atividade do gene repórter em camundongos transgênicos (Gehrke et al., 2014). Entre peixes de nadadeira lobada, o sequenciamento do genoma de celacanto revelou apenas conservação parcial da atividade de I1 em membros em desenvolvimento de camundongo (Amemiya et al., 2013). Portanto, apenas parte dos ECRs responsáveis pela expressão de segunda fase de *Hoxd* está presente em peixes de nadadeira raiada (Figura 2c).

No desenvolvimento de apêndices locomotores de vertebrados, a expressão de *Shh* é dirigida por dois acentuadores ou *enhancers*. A Região Reguladora da ZPA (*ZPA regulatory region*, ZRS) é um ECR altamente conservado e os camundongos nocautes para ZRS perdem o autopódio, fenótipo que também é observado em camundongos nocaute para o gene *Shh* (Sagai et al., 2005). Mais recentemente, outro ECR de *Shh* no desenvolvimento de membros foi descoberto, o *shadow ZRS* (sZRS) presente no genoma de tetrápodes (como elefante, cães, galinha e sapos) e peixes actinoptérgios, mas ausente no genoma de camundongos (Letelier et al., 2018). Letelier et al., (2018) mostraram por transgenia em embriões do peixe teleóstio medaka (*Oryzias latipes*) que tanto a sZRS humana quanto a de paulistinha ativam expressão de gene repórter na ZPA, evidenciando sua provável origem em um ancestral comum à mamíferos e peixes (Figura 2d).

Enquanto pouco se sabe sobre a sZRS, já existem muitos estudos demonstrando papel do ZRS, o primeiro acentuador de *Shh* específico de membros descrito. Uma série de deleções em regiões específicas da ZRS no genoma de camundongos demonstraram que o acentuador possui uma região responsável pela ativação da expressão de *Shh* na ZPA e outra por sua repressão em outras regiões do membro em desenvolvimento (Lettice et al., 2012). Adicionalmente, sítios de ligação para fatores de transcrição (SLFTs) de HAND2 e HOXD13 foram descobertos em anos consecutivos (Osterwalder et al., 2014; Leal et al., 2016) e a deleção destes e outros quatro SLFTs adicionais para HOXD afetam o número de dígitos em camundongos (Lettice et al., 2017).

Lettice et al., (2017) descreveram SLFTs em regiões do ZRS e propõem dois blocos funcionais para o acentuador, que atuam mediando os níveis de expressão de *Shh* e regulando a atividade do acentuador à longa distância. Os autores ainda sugerem um mecanismo de ligação entre a primeira e segunda fase de expressão de genes *Hoxd* por meio da regulação da expressão de *Shh* em tais regiões da ZRS (Figura 4b).

Em camundongos transgênicos, a análise da atividade do ZRS do baiacu japonês (*Fugu rubripes*), gar (*Lepisosteus oculatus*), raia (*Leucoraja erinacea*) e celacanto (*Latimeria menadoensis*) demonstrou que estes são capazes de direcionar a expressão de gene-repórter na região da ZPA em níveis diferentes (Lettice et al., 2003; Letelier et al., 2018). Notavelmente, a ZRS de celacanto é capaz de substituir totalmente a função da ZRS de camundongo no controle de expressão de *Shh* e padronização de dígitos, como

demonstrado por experimentos de transgênicos (Kvon et al., 2016). Esses dados demonstram o alto grau de conservação na função e sequência da ZRS por mais de 400 milhões de anos e revelam homologia profunda na regulação da expressão de *Shh* em apêndices pares de vertebrados.

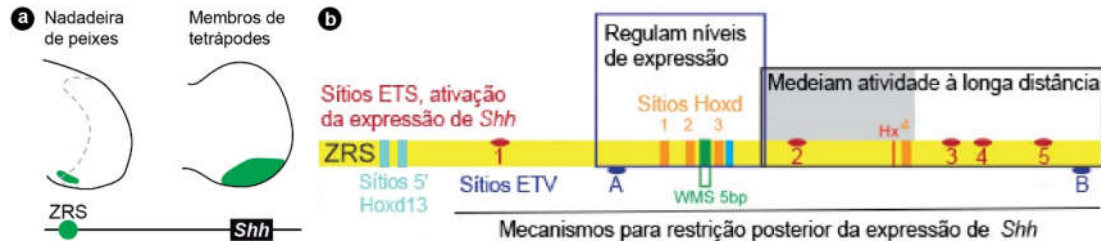


Figura 4. A ZRS apresenta módulos de controle da expressão de *Shh* que contêm sítios para ligação de fatores de transcrição conservados. Expressão de *Shh* na ZPA é ativada pela ZRS em membros e nadadeiras em desenvolvimento, padrão de expressão de *Shh* em peixe-espátula e camundongo adaptado de Tulenko et al., (2016) e Lettice et al., (2012) respectivamente (a). Adaptado de Lettice et al., (2017). Fatores de transcrição HOXD de primeira fase se ligam aos sítios Hoxd 1-3 da ZRS para estabelecer os níveis de expressão de *Shh* nos primeiros estágios do desenvolvimento do membro. SHH, em seguida é essencial para a mudança da expressão do agrupamento Hoxd, iniciando o padrão de expressão distal dos genes, em particular *Hoxd13*. HOXD13 então se liga aos sítios 5' do ZRS, mantendo a expressão de *Shh* nos estágios consequentes. A região 3' do ZRS atua facilitando a atividade do acentuador à longa distância, possuindo uma parte redundante (área em cinza), deleções dessas regiões impactam a capacidade de interação entre o acentuador e o promotor de *Shh*. Por fim, a expressão espacial de *Shh* é regulada pelos fatores de transcrição da família ETS, que se ligam aos sítios em vermelho (1-5), atuando em conjunto para ativação da expressão de *Shh* na ZPA, em contrapartida, o sítio WMS-5bp e a ligação de fatores de transcrição ETV aos sítios A e B atuam para inibir a expressão de *Shh* em outras regiões do membro em desenvolvimento (b).

1.6. *Shh* é necessário para o crescimento e padronização de membros em regeneração

Ao contrário de répteis, aves e mamíferos, as salamandras são capazes de regenerar completamente membros perdidos e isso pode ocorrer durante toda sua vida. Tais habilidades regenerativas as tornaram um modelo clássico em estudos de biologia regenerativa. Atualmente, evidências de registros fósseis sugerem que a regeneração de membros é uma característica ancestral dos tetrápodes e 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 dos sarcopterígeos vivos (Nogueira et al., 2016). Ainda que a regeneração de nadadeiras em celacantos não tenha sido documentada, a capacidade de regeneração no peixe actinopterígeio *Polypterus* (Nikiforova

and Golichenkov, 2012; Cuervo et al., 2012) sugere que tal característica pode ter sido adquirida antes da divergência entre sarcopterígeos e actinopterígeos.

Durante o processo de regeneração, eventos que ocorrem no desenvolvimento embrionário do membro são recapitulados. No decorrer do estágio larval, salamandras Mexicanas conhecidas como axolotes (*Ambystoma mexicanum*) desenvolvem primeiro os membros anteriores e, apenas quando estes já estão formados, os brotos dos membros posteriores emergem. Assim, ao transplantar brotos de membros traseiros em desenvolvimento para membros anteriores recém amputados, foram obtidos resultados idênticos aos de transplantes entre os dois membros em regeneração, indicando que as mesmas vias de sinalização celular e gênica são usadas tanto no desenvolvimento quanto na regeneração (Muneoka and Bryant, 1982).

Ainda em salamandras, análise de expressão gênica espacial por hibridização *in situ* em membros em regeneração demonstrou que, assim como no desenvolvimento, a expressão de *Shh* é restrita à ZPA (Imokawa and Yoshizato, 1997). Do mesmo modo, durante a regeneração de nadadeiras em *Polypterus* (Cuervo et al., 2012) e desenvolvimento de nadadeiras no peixe-espátula (Tulenko et al., 2017) *Shh* é expresso na região posterior, ambos peixes actinopterígeos não-teleósteos. Em resumo, os estudos citados acima sugerem que o papel da via SHH durante a regeneração recapitula aspectos essenciais do desenvolvimento.

Embora a ativação ectópica da via de SHH durante a regeneração e desenvolvimento resulte em ganho de dígitos (Figura 5a), o bloqueio da via gera respostas diferentes em cada processo. Em axolotes, a inibição da via de sinalização SHH tanto no desenvolvimento (Stopper and Wagner, 2007), como na regeneração de membros (Roy and Gardner, 2002) resultam na perda de dígitos de maneira dependente da dose e estágio de exposição ao antagonista, ciclopamina. Entretanto, estudos recentes mostram que doses mais altas de ciclopamina bloqueiam a regeneração de membro por completo (incluindo braço e antebraço), devido ao papel da via de SHH em estimular o crescimento do membro por retroalimentação positiva com o fator de crescimento fibroblástico 8, FGF8 (Nacu et al., 2016).

Já em tritões (anfíbios, *Notophthalmus viridescens*), a exposição do membro em regeneração à ciclopamina durante os primeiros 14 dias pós-amputação (dpa) só resulta em perda de dígitos (Singh et al., 2012). Por outro lado, se o tratamento for estendido até o 60° dpa, a regeneração é completamente bloqueada. (Figura 5b). Ainda que a função da via de SHH durante a regeneração de membros não seja restrita à padronização de dígitos, como parece acontecer no desenvolvimento (Stocum, 2017), ela se encontra conservada tanto durante a regeneração de nadadeiras, como de membros. De fato, estudos recentes com análise transcriptômica de células individuais (*single cell RNA-seq*) revelaram que estágios mais avançados de regeneração têm perfil de expressão gênica mais correlacionado ao desenvolvimento de membros do que os estágios iniciais (Gerber et al., 2018). Portanto, estes dados indicam que estágios mais avançados da regeneração recapitulam aspectos moleculares do membro em desenvolvimento.

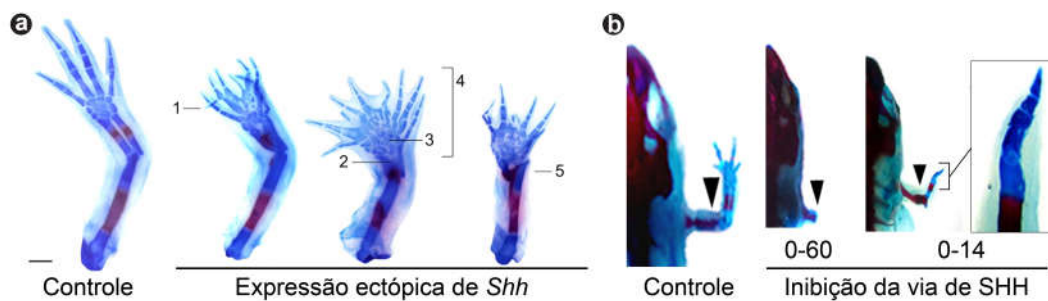


Figura 5. Ativação ectópica da via de sinalização SHH aumenta número de dígitos durante a regeneração de membros. Utilizando baculovirus como vetor para expressão ectópica de *Shh* durante a regeneração de membros em axolote Oliveira et al., (2017) à 1- dígitos secundários ectópicos, originados a partir de dígitos proximais, 2- fusão radio-ulnar com redução em tamanho e morfologia achatada, 3- duplicações nos carpos, 4- expansão do número de dígitos e elementos do punho, 5- sumiço ou redução extrema da articulação do cotovelo (escala = 1 mm) (Oliveira et al., 2018) (a). Em membros em regeneração de tritões a inibição da via de SHH de 0 à 60 ou 0 à 14 dias pós-amputação bloqueiam a regeneração ou levam a perda de dígitos, respectivamente (cabeça de seta indica o plano de corte) (Singh et al., 2012) (b).

1.7. Peixes pulmonados como modelo para a evolução de membros

Como grupo vivente irmão de tetrápodes (Amemiya et al., 2013), os peixes pulmonados representam organismos chave no entendimento das modificações que ocorreram durante a evolução dos primeiros vertebrados terrestres. A expressão de *Hoxd13*, por exemplo, analisada apenas durante estágios avançados do desenvolvimento da nadadeira do peixe pulmonado australiano (*Neoceratodus forsteri*), está associada aos radiais distais em formação (Johanson et al., 2007). Devido a sua proximidade filogenética e mecanismo

de formação do endoesqueleto por ramificação, este dado têm apoiado fortemente a hipótese de homologia entre radiais distais e dígitos.

Entretanto, Langelotto et al., (2018) sugeriram que os radiais distais em *N. forsteri* correspondem ao estilopódio/zeugopódio de tetrápodes baseado na expressão de *HoxA11*, *Meis1* e *Meis3*, genes que são expressos apenas na região proximal do membro de camundongo em desenvolvimento. A ausência de testes funcionais em nadadeiras de peixes pulmonados e escassez de dados de expressão gênica de outros parálogos *Hoxd* dificultam uma conclusão a respeito dos mecanismos responsáveis pela padronização dos radiais distais neste e outros peixes sarcopterígeos.

Até o presente, uma visão mais global sobre expressão de genes *Hoxd* e conservação de seus elementos *cis*- e *trans*-reguladores foi apenas realizada em peixes de nadadeira raiada. E, como discutido anteriormente, estes ensaios se mostraram insuficientes para que biólogos do desenvolvimento chegassem a um consenso sobre a homologia de radiais distais e dígitos (Tarchini and Duboule, 2006; Gehrke and Shubin 2016). Em especial, o conceito de homologia profunda tem sido amplamente usado para explicar que mecanismos moleculares compartilhados não indicariam homologia entre as estruturas, mas apenas conservação no comportamento dos genomas (Tulenko et al., 2017; Nakamura et al., 2016; Onimaru et al., 2016).

Ainda que esta seja uma explicação parcimoniosa, a ausência de dados de regulação gênica em peixes pulmonados constitui um grande vazio filogenético sobre a evolução de mecanismos de regulação de genes *Hoxd*. Adicionalmente, enquanto diferenças na expressão e regulação de diversos genes de controle da padronização de dígitos, estão associados com adaptações morfológicas de dígitos em diversas espécies de tetrápodes (Petit et al., 2017) não se têm informação sobre a evolução destes mecanismos durante a diversificação morfológica das nadadeiras de peixes. Como a maior parte do esqueleto de peixes de nadadeira raiada é composta por raios dermais em detrimento do endoesqueleto, a diversificação de radiais distais parece ser baixa na maioria das espécies que são usadas como modelo.

Em paralelo a avanços no campo experimental da biologia evolutiva do desenvolvimento, discussões epistemológicas a respeito da definição de homologia e

novidade evolutiva não chegaram a um conceito unificador. Wagner and Lynch (2010) definem novidade evolutiva como quaisquer carácter individualizado sem estruturas homólogas correspondentes em outras espécies. O *status* de novidade evolutiva vs. adaptação evolutiva proposto por Wagner e Larsson (2006), sugere que dígitos são uma novidade evolutiva pois eles originaram novas oportunidades de variação em membros de tetrápodes sem precedentes em nadadeiras peixes. Entretanto, peixes sarcopterígeos fósseis e vivos apresentam variação considerável no número, forma e organização dos radiais distais (Figura 1).

Neste contexto, as nadadeiras de peixes pulmonados vivos constituem um modelo de estudo excepcional para a elucidação de mecanismos relacionados a padronização dos radiais distais. Elas possuem um alongado eixo central de elementos ósseos, chamados mesômeros (Coates and Ruta, 2007; Figura 6). A espécie australiana, (*Neoceratodus forsteri*) apresenta o padrão ancestral de organização esquelética, como indicado pelo registro fóssil, com radiais distais pré- e pós-axiais e raios dermais em seu entorno (Jude et al., 2014). Em contrapartida, os lepidosirenídeos apresentam redução do esqueleto distal, visto que radiais distais e raios dermais são vestigiais e estão restritos à uma bainha na região posterior em espécies africanas (genus *Protopterus*, Figura 6) ou completamente ausentes na espécie sul-americana (*Lepidosiren paradoxa*) (Goodrich, 1931). Desse modo, o entendimento dos mecanismos moleculares por trás dessa morfologia e sua modulação, podem elucidar semelhanças com a padronização de dígitos em tetrápodes.

A obtenção de embriões de peixes pulmonados é pouco viável, de modo que utilizaremos aqui sua ampla capacidade regenerativa para elucidar aspectos moleculares da padronização anteroposterior de suas nadadeiras peitorais. Neste trabalho visamos compreender como a via de sinalização SHH contribui para a padronização dos radiais distais de peixes pulmonados. Para isso, isolamos e analisamos a sequência reguladora ZRS de três espécies de peixes pulmonados. Em seguida, avaliamos a expressão de genes a jusante da via de sinalização de SHH. Também, buscamos compreender o papel da via de SHH na regeneração de nadadeiras peitorais de *Protopterus annectens*, utilizando uma molécula antagonista. Por fim, por uso de molécula agonista, avaliamos o impacto da ativação ectópica da via SHH sobre a padronização do endoesqueleto em estágios mais tardios da regeneração de nadadeiras em *P. annectens*. Nossos dados fornecem evidências funcionais sem

precedentes do uso de vias essenciais do desenvolvimento de dígitos, em nadadeiras de peixes sarcopterígeos.

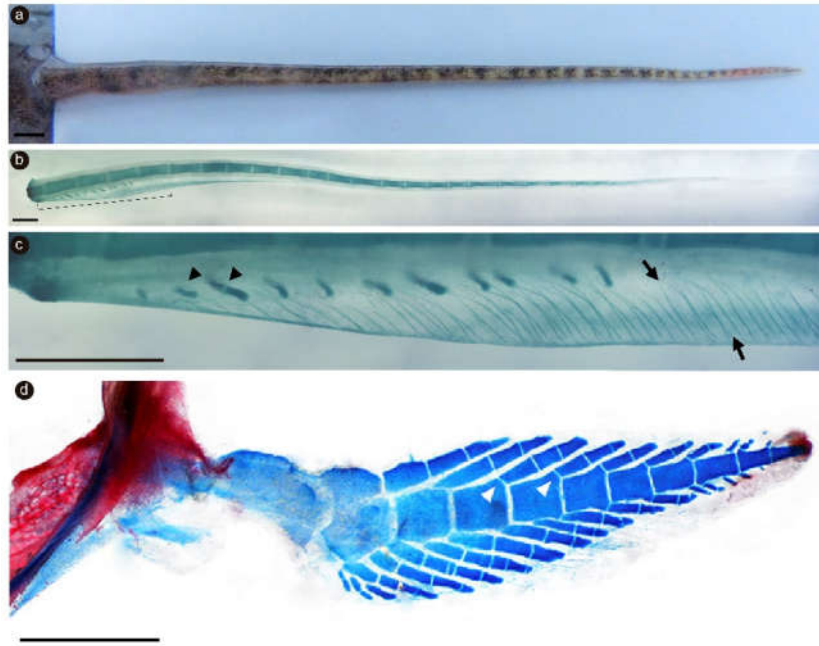


Figura 6. Nadadeira de peixes pulmonados juvenis. A nadadeira de *Protopterus annectens* é simples, assimétrica e filiforme (a). Análise por diafanização revela os elementos do eixo central (mesômeros) alinhados proximo-distalmente (b) bem como radiais distais pós-axiais (cabeças de seta) e raios dermais (setas) restritos à região posterior (c), todos corados em azul. A nadadeira de da espécie australiana, *Neoceratodus forsteri*, entretanto, apresenta radiais distais pré- (anteriores) e pós-axiais (posteriores) ao eixo central, caractere ancestral dentro do grupo Dipnoi (Jude et al., 2014) (d). Vista dorsal, anterior acima, escala 0,2 cm.

Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Estabelecer o papel da via de sinalização SHH na formação dos radiais distais nas nadadeiras peitorais em *Protopterus annectens*, peixe-pulmonado africano;

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar e analisar *in silico* a sequência ZRS em três espécies de peixes pulmonados viventes;
- Analisar o perfil de expressão gênica de *Shh*, *Ptch1* e *Gli1* durante a regeneração de nadadeiras peitorais em *P. annectens*;
- Avaliar o impacto da inibição da via de sinalização SHH na nadadeira em regeneração;
- Determinar o efeito da ativação ectópica da via de sinalização SHH nos elementos esqueléticos da nadadeira em regeneração;

Material e Métodos

3.1. Obtenção e manutenção de espécimes

Os peixes pulmonados africanos (*Protopterus annectens*) foram adquiridos em revendedor autorizado. Um total de 32 espécimes foram utilizados, com comprimento entre 13-23 cm (focinho à ponta da cauda). Os animais foram mantidos em tanques individuais, alimentados diariamente e com trocas de água e limpeza dos tanques regulares, parâmetros da água pH= ~7 e temperatura 25-30° C. Os espécimes de peixe pulmonado sul americano, *Lepidosiren paradoxa*, foram coletados em Breves (PA) com licença emitida pelo IBAMA/SISBIO, número 47206-1, também são mantidos em tanques individuais, recebendo os mesmos cuidados descritos anteriormente. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal, CEUA-UFPA número de protocolo 037-2015.

3.2. Extração de DNA e clonagem do ZRS

Para extração de DNA foram coletadas amostras de tecido dos peixes pulmonados *Lepidosiren paradoxa* e *Protopterus annectens*, já a amostra de tecido muscular da espécie australiana de peixe pulmonado, *Neoceratodus forsteri*, foi obtida em parceria com o Museu de História Natural de Berlim (MfN-Berlin). Os tecidos foram coletados em etanol 100% e mantidos à -20° C até o dia da extração de DNA, realizada com o kit de extração de DNA Purelink Genomic DNA Extraction Kit (Life Technologies) seguindo instruções do fabricante, seguido de purificação do DNA extraído com Fenol:Clorofórmio:Isoamil (25:24:1), precipitação em Acetato de Sódio (3M, pH ~5) e eluição em água ultrapura. As sequências parciais do acentuador ZRS foram obtidas por meio de *Nested* PCR (duas ou mais reações em cadeia da polimerase seguidas, a primeira utilizando iniciadores mais externos à sequência alvo do que as seguintes) com os iniciadores descritos na Tabela 1. A ordem dos iniciadores utilizados em cada reação está resumida na Tabela 2, utilizando o seguinte programa de PCR: desnaturação: 95° por 30 seg; 32 ciclos de três etapas, 95°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 68°C por 90 seg, por fim um ciclo de 10 min à 68°C.

Após a obtenção de ~400 pares de bases (pb) da ZRS de cada espécie, foram projetados novos iniciadores no *software* Primer3 (Untergasser et al., 2012) para a

amplificação de regiões flanqueadoras desconhecidas por GenomeWalker® (Figura 7a), seguindo as instruções do fabricante. As reações finais de PCR do Kit Genome Walker® foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% a 100 volts por 40 minutos (Figura 7b). O volume restante das PCRs cujas bandas foram escolhidas para sequenciamento, foram analisadas por eletroforese em gel de agarose e cada banda foi excisada do gel, o DNA extraído e purificado com o Kit Quiagen QIAquick® seguindo as instruções do fabricante e recuperado em 30 µl de volume. A qualidade e concentração do DNA de cada banda foi aferida utilizando o BioDrop® e confirmada por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a amplificação da ZRS em peixes pulmonados.

Nome	Sequência (5'→3')
Iniciadores para Nested PCR	
ZRS-nested-R2	TAACACTAAGCAGCACTTCC
ZRS-nested-F1	AGCAACATCCTGACCAATTATC
ZRS-nested-F2	AGCAACATGACAGCACAAATAGA
ZRS-nested-F3	CTATCCTGTGTCACAGTTTG
ZRS-nested-F4	GAGTTTGAGATTGTCCTGGTT
Lep_ZRS_sp_F	ATGTCCCTTGTGGCAAACCTT
Lep_ZRS_sp_R	GTGGGGGAAAAATGAGCATA
Neo_ZRS_sp_F	GGCCCCATATTAAGAGATGC
Neo_ZRS_sp_R	TGGATGATCAGTGGGAAAAA
Pro_ZRS_int_1	AAGAGACGCAGAAGCCTGTTT
Pro_ZRS_int_2	AAACAGGCTTCTGCGTCTCTT
Iniciadores para GenomeWalker®	
Lep_ZRS_5'-sp1	GCACCAACCCAGCTTCTTCACTTCCAC
Lep_ZRS_5'-sp2	CAACTCCTAAATCCTACAGACTACACTTGT
Lep_ZRS_3'-sp1	TGTCCTGGTTTATGTCCCTTGTGGCAA
Lep_ZRS_3'-sp2	GCCAACTTCTGCTTGTACTTTCATTGCA
Pro_ZRS_5'-sp1	TTGTTCCCTCCATTGTGCTGTCAATGT
Pro_ZRS_5'-sp2	AGTACCAATCCAGCTTCTTCACTTCCA
Pro_ZRS_3'-sp1	ACATGACAGCACAAATGGAGGAGGAACAA
Pro_ZRS_3'-sp2	GTGACCGTGTACTGTATTTTATGTCCAGA
Neo_ZRS_5'-sp1	GCTGTCACGTTGTTTCGCTTATAGACA
Neo_ZRS_5'-sp2	AGACTGCACTTGTACGGAATATTTGC
Neo_ZRS_3'-sp1	CCCCATATTAAGAGATGCAGAAATCCGT
Neo_ZRS_3'-sp2	CAAGGCTGTTTGTGTCCATTACTTTCA

Os iniciadores utilizados nas reações de *Nested PCR* ancoram em regiões conservadas entre peixes e mamíferos e já foram utilizadas em estudos anteriores (Dahn et al., 2007), juntamente com sequências de iniciadores degenerados.

Tabela 2. Ordem de uso dos pares de iniciadores para as reações de PCR.

Ordem de uso dos pares de iniciadores em <i>Nested</i> PCRs	
<i>Lepidosiren paradoxa</i>	<i>Protopterus annectens</i>
Lep_PCR1: Lep_ZRS_sp_F e ZRS-nested-R2	PCRs primárias (usando DNA genômico):
Lep_PCR2: Lep_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F1	Pro_PCR1: ZRS-nested-R2 e ZRS-nested-F1
Lep_PCR3: Lep_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F2	Pro_PCR2: ZRS-nested-R2 e ZRS-nested-F2
Lep_PCR4: Lep_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F3	Pro_PCR3: ZRS-nested-R2 e ZRS-nested-F3
<i>Neoceratodus forsteri</i>	<i>Nested</i> PCRs (usando as PCRs primárias):
Neo_PCR1: Neo_ZRS_sp_F e ZRS-nested-R2	Pro_PCR1: Pro_ZRS_int_1 e ZRS-nested-R2
Neo_PCR2: Neo_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F1	Pro_PCR2: Pro_ZRS_int_2 e ZRS-nested-F1
Neo_PCR3: Neo_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F2	Pro_PCR3: Pro_ZRS_int_2 e ZRS-nested-F2
Neo_PCR4: Neo_ZRS_sp_R e ZRS-nested-F3	Pro_PCR4: Pro_ZRS_int_2 e ZRS-nested-F3

Os iniciadores para *Nested PCR* da ZRS de peixes pulmonados estão em ordem de uso. Para as reações de PCR por GenomeWalker® serão utilizados os iniciadores que terminam em sp1 em PCRs primárias, seguidos dos que terminam em sp2 para *Nested PCR*.

3.3. Sequenciamento e análise *in silico* da ZRS

Após verificação dos produtos das PCRs por eletroforese em gel de agarose, as reações foram enviadas para sequenciamento pelo método Sanger. As sequências obtidas foram alinhadas com sequências ZRS de outros cinco taxa: celacanto (Aug. 2011 (Broad/latCha1, JH127332:523339-524178)), lagarto (May 2010 (Broad AnoCar2.0/anoCar2, chr6:6319498-6320278)) e camundongo (Dec. 2011 (GRCm38/mm10, chr5:29314898-29315677)), ornitorrinco (Feb. 2007 (ASM227v2/ornAna2, chrUn_DS181150v1:11,866,430-11,867,223)) e galinha (Mar. 2018 (GRCg6a/galGal6, chr2:8466998-8467777)) obtidas no UCSC Genome Browser (Kent et al., 2018). Análise de conservação global das sequências ZRS foi realizada com o algoritmo LAGAN na plataforma mVISTA (com a sequência de camundongo, como referência e seguinte árvore filogenética [Camundongo Ornitorrinco] [Lagarto Galinha] [*Lepidosiren Protopterus*] *Neoceratodus*] Celacanto]). O alinhamento múltiplo foi realizado no software BioEdit® com o algoritmo ClustalW (parâmetros padrão) e anotação de sítios específicos para ligação de fatores de transcrição essenciais para a formação de dígitos foi realizada manualmente no software CLC Main Workbench® e Adobe Illustrator®.

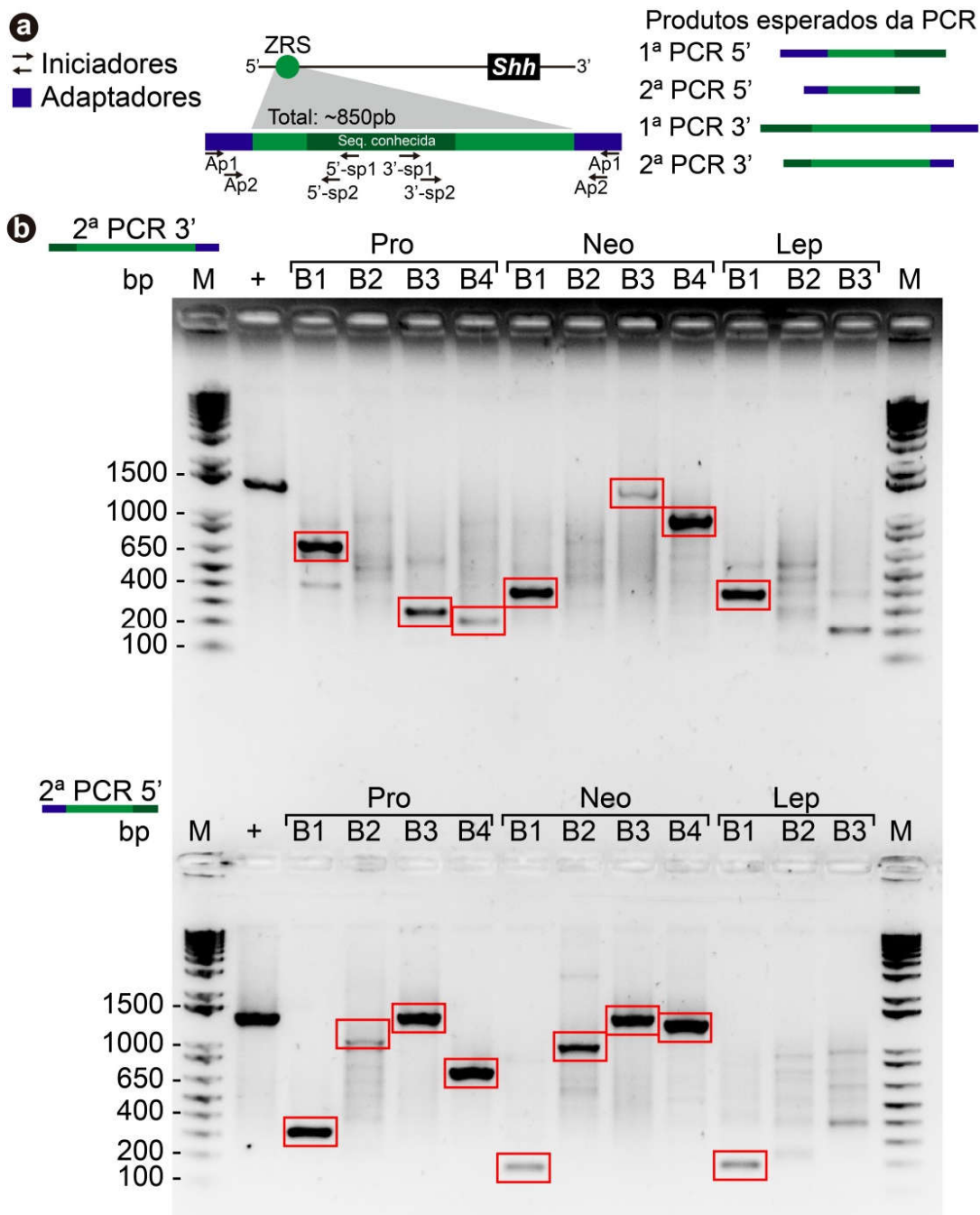


Figura 7. Experimento de Genome Walker®. Iniciadores que ancoravam na ZRS conhecida foram projetados para amplificar as regiões 5' e 3' desconhecidas em cada espécie, sendo utilizados juntamente com os iniciadores fornecidos no Kit, que ancoram em adaptadores. Na segunda reação de PCR (PCR nested), se espera a amplificação de pelo menos dois produtos específicos (A). 5 µl de cada PCR secundária das bibliotecas 1 à 4 (B1, B2, B3 e B4) em cada espécie (Pro = *P. annectens*, Neo = *N. forsteri*, Lep = *L. paradoxa*), os quadrados vermelhos demarcam as bandas que foram enviadas para sequenciamento, M = marcador, + = controle positivo fornecido pelo kit (B).

3.4. Anestesia e amputações

Os procedimentos descritos abaixo foram aprovados pelo Comitê de Ética de Pesquisa Animal da UFPA, sob número de protocolo: 037-2015. Animais quando submetidos à manipulação prolongada (fotografia) e amputações (excetuando-se as de troca de água) foram anestesiados com solução de triclaína à 0,2% pelo tempo necessário para atingir anestesia profunda (revisado por Carter et al., 2011). Após anestesia, os peixes tiveram suas nadadeiras amputadas à 0,1 - 0,5 cm distal da inserção no corpo e estas foram coletadas para protocolo de diafanização da nadadeira pré-amputação (madura).

3.5. Extração de RNA e construção de cDNA

Para a análise de expressão gênica por PCR semi-quantitativa foram coletadas nadadeiras em regeneração à 2 (6 nadadeiras), 3 (4 nadadeiras), 6 (1 nadadeira) e 8 (1 nadadeira) semanas pós-amputação (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.

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 400 ng do RNA total, seguindo as instruções do fabricante. Após a construção das bibliotecas de cDNA as amostras foram guardadas à -20°C.

3.6. Expressão gênica relativa por PCR semi-quantitativa

Para as PCRs semi-quantitativas foram utilizados iniciadores projetados no Primer3® (Tabela 3) com sequências de mRNA obtidas a partir do transcriptoma de cauda em regeneração de *P. annectens* (dados internos do grupo). Foram utilizadas sequências de Humano e Celacanto dos genes alvos como entrada em servidor Blast. As sequências obtidas para *Shh*, *Ptch1*, *Gli1* e *Polr1c* foram então submetidas ao Blastx no NCBI e alinhamento no software BioEdit® para confirmação da sequência proteica, com sequências de humano e celacanto como referência.

Tabela 3. Iniciadores utilizados para as PCRs semi-quantitativas.

Nome	Sequência (5'→3')
Pro_ <i>Polr1c</i> -F	ACAATGGCAGTGGAGAAGGTATT
Pro_ <i>Polr1c</i> -R	AATGTCATCATGGACTGGACGAA
Pro_ <i>Shh</i> -F	AGTAGAAGCTGGATTTGACTGGG
Pro_ <i>Shh</i> -R	TGTTGTCAGTGGTATTCTCCGTT
Pro_ <i>Ptch1</i> -F	CCTACTACACAACCTGCTGAACCT
Pro_ <i>Ptch1</i> -R	TATCTGTGAGGTCCAGTCCATCT
Pro_ <i>Gli1</i> -F	CTTGTCCTGCCTGTGTATATGGT
Pro_ <i>Gli1</i> -R	CCACTCAGTCAAGTTACATGGGA

Os iniciadores utilizados para PCRs semi-quantitativas amplificam regiões entre 350-400 pares de bases.

Por fim, cada reação de PCR de 50 µl utilizou 2 µl das bibliotecas de cDNA e seguiram o seguinte programa no termociclador: desnaturação: 94° por 3 min; 32 ciclos de três etapas, 94°C por 60 seg, 56-58°C por 30 seg (dependendo da temperatura de pareamento dos iniciadores). Os produtos de PCR foram analisados à 36 ciclos para os genes *Shh* e *Polr1c* e 32 ciclos para *Ptch1*, *Gli1* e *Polr1c*. Eles foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% a 80 volts por 50 min. Por fim, foram fotografados sob mesmas condições de transiluminação e configurações fotográficas em fotodocumentador. As imagens foram exportadas em formato TIFF e utilizadas ImageJ® seguindo o protocolo de análise de unidimensional de géis de eletroforese presente no software. O valor de expressão dos genes foi demonstrado em relação ao estágio maduro, cada gene foi normalizado com os valores de intensidade das bandas do gene *Polr1c* (de expressão constitutiva), em suas respectivas amostras e nos respectivos ciclos.

3.7. Tratamentos com fármacos e fotografia

Para modulação da via de sinalização de SHH foram utilizados o inibidor ciclopamina e ativador SAG, ambos atuam, respectivamente, como antagonista e agonista de SMO, primeira proteína transdutora na via de SHH (Frank-Kamenetsky et al., 2002) (Figura 3b). Logo após a amputação e recuperação da anestesia os animais foram colocados em tanques individuais contendo 400ml de água com o antagonista ou o equivalente em DMSO (controle). Uma vez que as substâncias utilizadas para os tratamentos são fotossensíveis, os tanques foram mantidos no escuro e as soluções foram trocadas diariamente após os animais serem alimentados (30-60 min, longe de luz direta).

Para tratamentos com ciclopamina foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 µg/ml, 1µg/ml ou 0,5 µg/ml. Na concentração de 1µg/ml, quatro grupos foram submetidos ao tratamento em estágios iniciais diferentes quanto a data de amputação das nadadeiras (os tratamentos foram iniciados em animais em estágio de semanas pós-amputação: 0 spa, 1 spa, 2 spa e 3 spa). Os tratamentos se estenderam até a quinta semana pós-amputação (5 spa), com fotografias semanais e uma semana após o fim do tratamento. Já para a ativação ectópica da via SHH o SAG foi utilizado à 200nmol, todos os tratamentos se estenderam por cinco semanas, começando na 2ª spa e 3ª spa. Ao final do tratamento as nadadeiras foram deixadas regenerar por mais uma semana, e só então coletadas para análise morfológica.

3.8. Análise morfológica: Diafanização

Para análise morfológica as nadadeiras peitorais maduras e ao final do período de tratamento com fármacos foram coletadas e fixadas em Etanol 100% ou Formalina tamponada (10%, pH ~7). Em seguida, foram submetidas à coloração diferencial simultânea de cartilagem (azul de Alcian) e osso (vermelho de Alizarina) como descrito em Taylor and Van Dyke (1985), com uma modificação: após pelo menos 24 horas em etanol 70% as amostras foram colocadas diretamente em Alcian Blue (1,2 mg/ml, pH ~2). Amostras que foram armazenadas em Etanol por um ou mais meses foram deixadas em água destilada por 24hrs antes de serem submetidas a coloração com Alcian Blue. Ao fim do processo as amostras foram armazenadas em glicerina 100% e fotografadas.

Resultados

4.1. As ZRSs de lepidosirenídeos apresentam deleções em sítios de ligação para fatores ativadores

O alinhamento múltiplo da ZRS (~900bp) revelou conservação global da ZRS de pulmonados em relação a outros taxa. Entretanto, a região 3' do acentuador apresenta baixa conservação apenas nos lepidosirenídeos (Figura 8a). Para a região que controla a atividade do acentuador à longa distância, encontramos uma deleção de 17 pares de bases que elimina o segundo sítio de ligação para os fatores de transcrição (SLFT) da família ETS apenas nas sequências dos lepidosirenídeos. Na ZRS de *P. annectens*, foram encontradas substituições no segundo nucleotídeo do quinto sítio ETS, enquanto *L. paradoxa* apresenta uma substituição no último nucleotídeo dos sítios ETS um e quatro e no primeiro do quinto sítio ETS.

Em relação ao bloco que medeia os níveis de expressão de *Shh*, entre os lepidosirenídeos, apenas *L. paradoxa* apresenta substituições em quatro dos seis nucleotídeos do quarto sítio HOXD. Em contrapartida, a sequência ZRS de *N. forsteri* apresenta conservação de todos os cinco SLFTs da família ETS e quatro de HOXD (Figura 8b-c).

Para os SLFTs nos quais proteínas repressoras se ligam, a sequência ZRS de *N. forsteri* apresenta uma substituição no terceiro e último nucleotídeos do sítio A e B ETV, respectivamente. Já a sequência ZRS dos lepidosirenídeos apresentam o sítio A ETV conservado. Apenas, o sítio B ETV apresenta três e cinco dos sete nucleotídeos substituídos em sequências de *P. annectens* e *L. paradoxa*, respectivamente (Figura 8d).

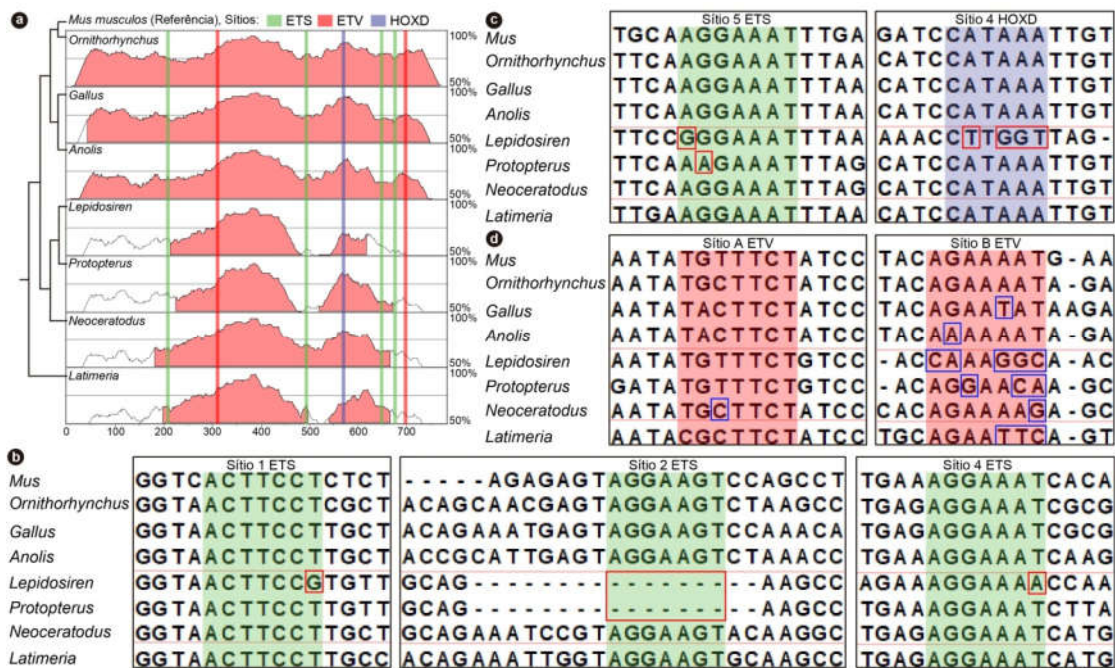


Figura 8. Estado global e local de conservação de sequência ZRS em espécies de peixes pulmonados. Gráfico de conservação das sequências ZRS de ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*), galinha (*Gallus gallus*), lagarto (*Anolis carolinensis*), peixes pulmonados africano (*Protopterus annectens*), australiano (*Neoceratodus forsteri*), sul-americano (*Lepidosiren paradoxa*) e celacanto (*Latimeria chalumnae*), utilizando como referência a sequência de camundongo (*Mus musculus*) (a). Em destaque encontram-se apenas os sítios de ligação para fatores de transcrição descritos por Lettice et al., (2017) que apresentam mutações em espécies de peixes pulmonados. Eles são sítios para a ligação de fatores ativadores (b-c) e repressores (d).

4.2. *Shh*, *Gli1* e *Ptch1* são regulados positivamente durante a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*

A nadadeira madura dos espécimes tipicamente apresenta uma bainha na sua região posterior, onde os radiais distais são observados (Figura 6a-c). Na segunda semana pós-amputação é possível observar o crescimento distal formado por tecido não-pigmentado e muito vascularizado, que constitui o blastema bem estabelecido. Na terceira semana é possível observar o aparecimento da bainha na região posterior (Figura 9a). Na sexta semana após a amputação a nadadeira está mais pigmentada e alcança mais da metade de seu tamanho original. Na oitava semana, a nadadeira apresenta o seu padrão de pigmentação na sua maior parte idêntico à original, alcançando em média 3,54 centímetros em comprimento (Figura 9b).

A análise de expressão relativa por PCR semi-quantitativa de *Shh* mostrou regulação positiva do gene durante toda a janela de oito semanas após amputação. *Shh* apresenta um pico de expressão na terceira semana pós-amputação caindo progressivamente até a oitava semana pós-amputação. De modo similar, *Gli1* e *Ptch1* também são regulados positivamente na maioria dos estágios analisados. Entretanto, enquanto *Gli1* teve pico de expressão na segunda semana pós-amputação, *Ptch1* alcançou seu valor mais alto de expressão relativa na terceira (Figura 9c). Desse modo, os genes envolvidos na via de sinalização SHH estão sendo expressos durante a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*.

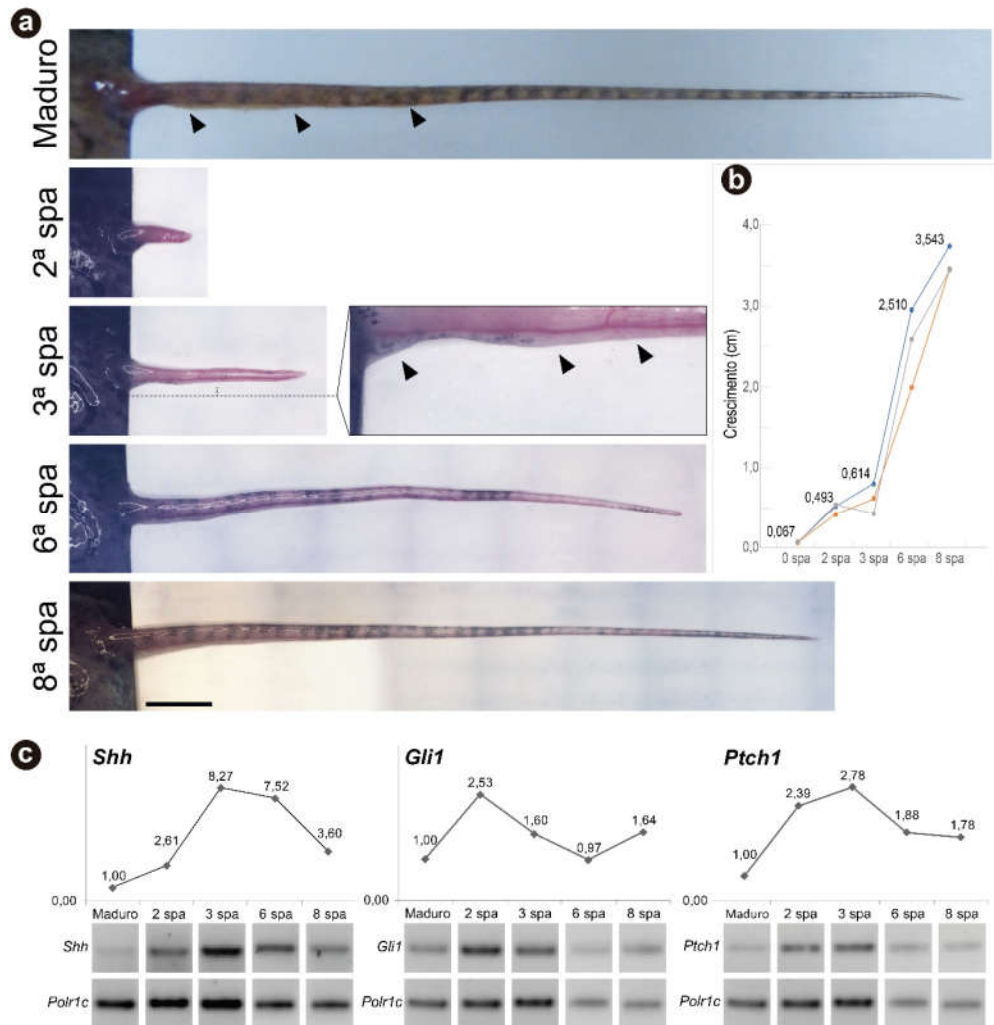


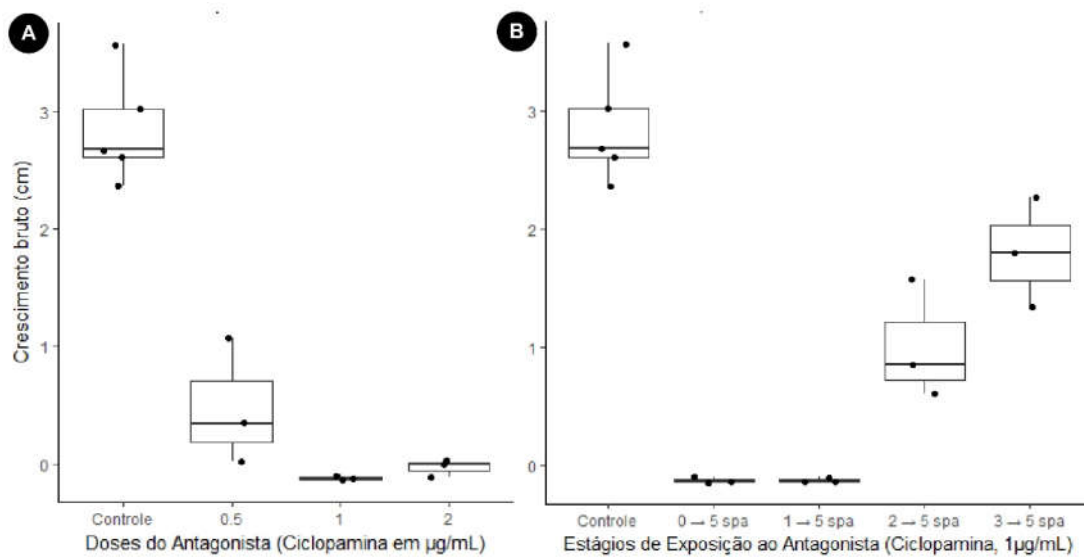
Figura 9. Expressão relativa de *Shh* e genes alvo da via SHH (*Gli1* e *Ptch1*) durante a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*. Durante a regeneração de *P. annectens* a bainha onde os radiais distais se formam está presente na 3ª semana pós-amputação (spa). Pontas de seta indicam a bainha, escala de 0.3 cm (a). Crescimento acumulado de nadadeiras em regeneração em centímetros (eixo y) de 0 à 8 spa (eixo x), os valores médios são mostrados acima dos respectivos estágios (n=3).

O eixo vertical mostra a expressão dos genes em relação ao tecido maduro, no eixo horizontal. Abaixo de cada amostra no eixo horizontal estão as bandas das quais a análise foi feita, cujo os valores foram normalizados pela expressão de *Polr1c* (c).

4.3. Inibição da via de SHH bloqueia o crescimento da nadadeira em regeneração de *P. annectens*

A curva de doses de ciclopamina revela que na concentração de 1 µg/ml, o composto é capaz de bloquear com sucesso a regeneração de nadadeiras peitorais em *P. annectens*. Doses mais altas (2 µg/ml) levam os animais à óbito na terceira semana de tratamento e doses inferiores (0.5 µg/ml) são menos efetivas, de modo que decidimos usar 1 µg/ml em experimentos subsequentes (Figura 10A e Figura 11).

A fim de determinar os estágios nos quais a via SHH é necessária para a regeneração, as nadadeiras em regeneração de *Protopterus annectens* foram expostas à ciclopamina (1 µg/ml) em períodos diferentes ao longo da regeneração da nadadeira (Figura 10B e Figura 11). Exposição imediatamente após a amputação ou a partir de 1 spa resultam em inibição completa da regeneração (Fig 10). Em contrapartida, tratamentos que começam



a partir de 2 spa são permissivos à progressão da regeneração.

Figura 10. Gráficos de crescimento bruto de nadadeiras de peixes pulmonados tratadas com ciclopamina. Curva de doses de ciclopamina utilizadas (eixo x) e comprimento da nadadeira ao final do tratamento (eixo y), na 5ª semana pós-amputação (spa) (A). Janelas de exposição de nadadeiras em regeneração à ciclopamina (B). Para cada tratamento, quando comparado ao grupo controle se obtiveram $p < 0.05$, teste t de Welch.

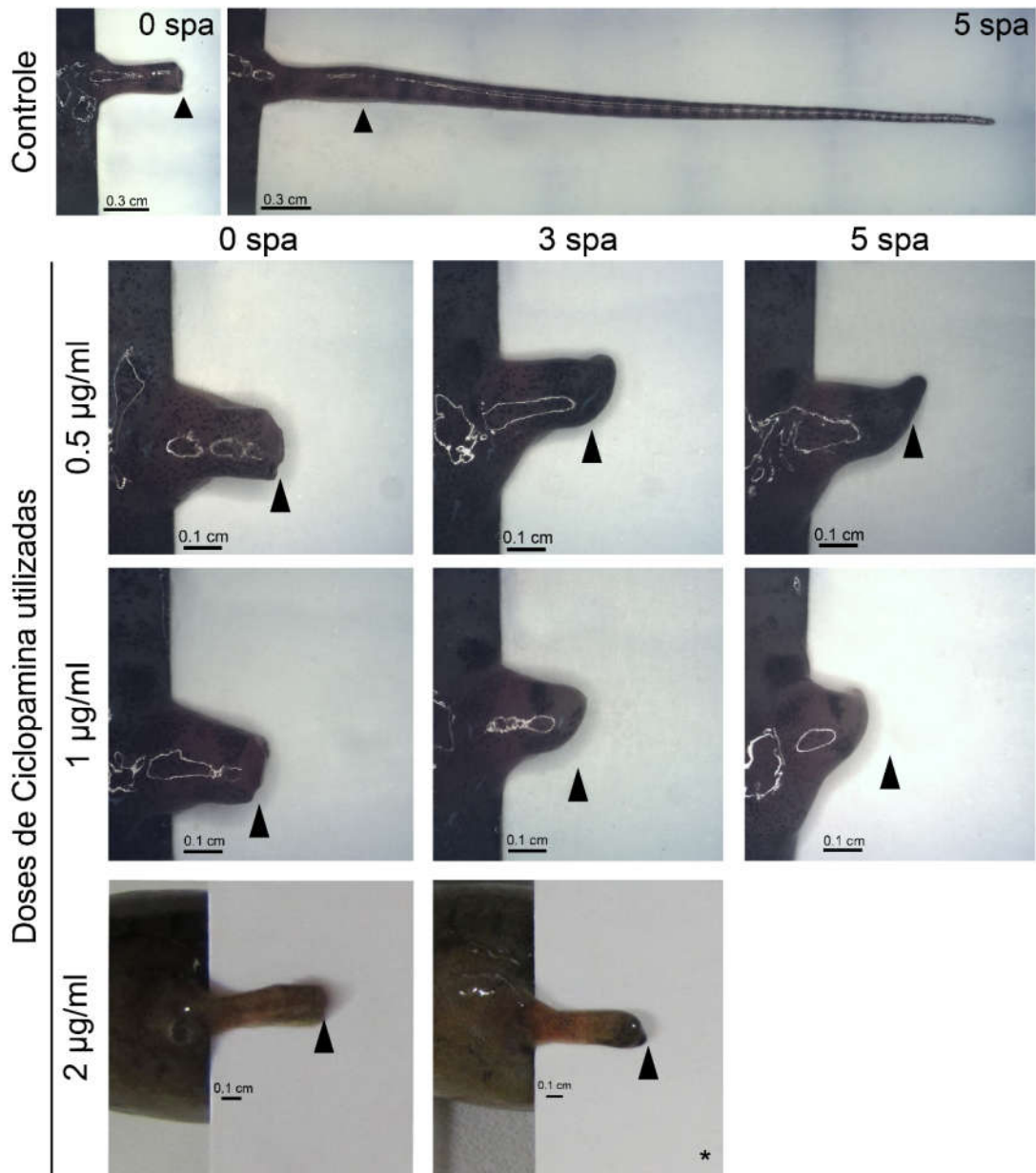


Figura 11. Inibição da via de SHH com uso de ciclopamina em diferentes dosagens. Observe a regressão da nadadeira em regeneração nos grupos tratados com 2 (n=3) e 1µg/ml (n=3), grupo controle com n=5. * os animais tratados com esta dose vieram à óbito na terceira semana após início do tratamento. Vista dorsal, posterior abaixo para o grupo controle e 2 µg/ml e acima para os restantes, distal à direita, spa = semanas pós-amputação, cabeças de seta marcam o ponto de amputação.

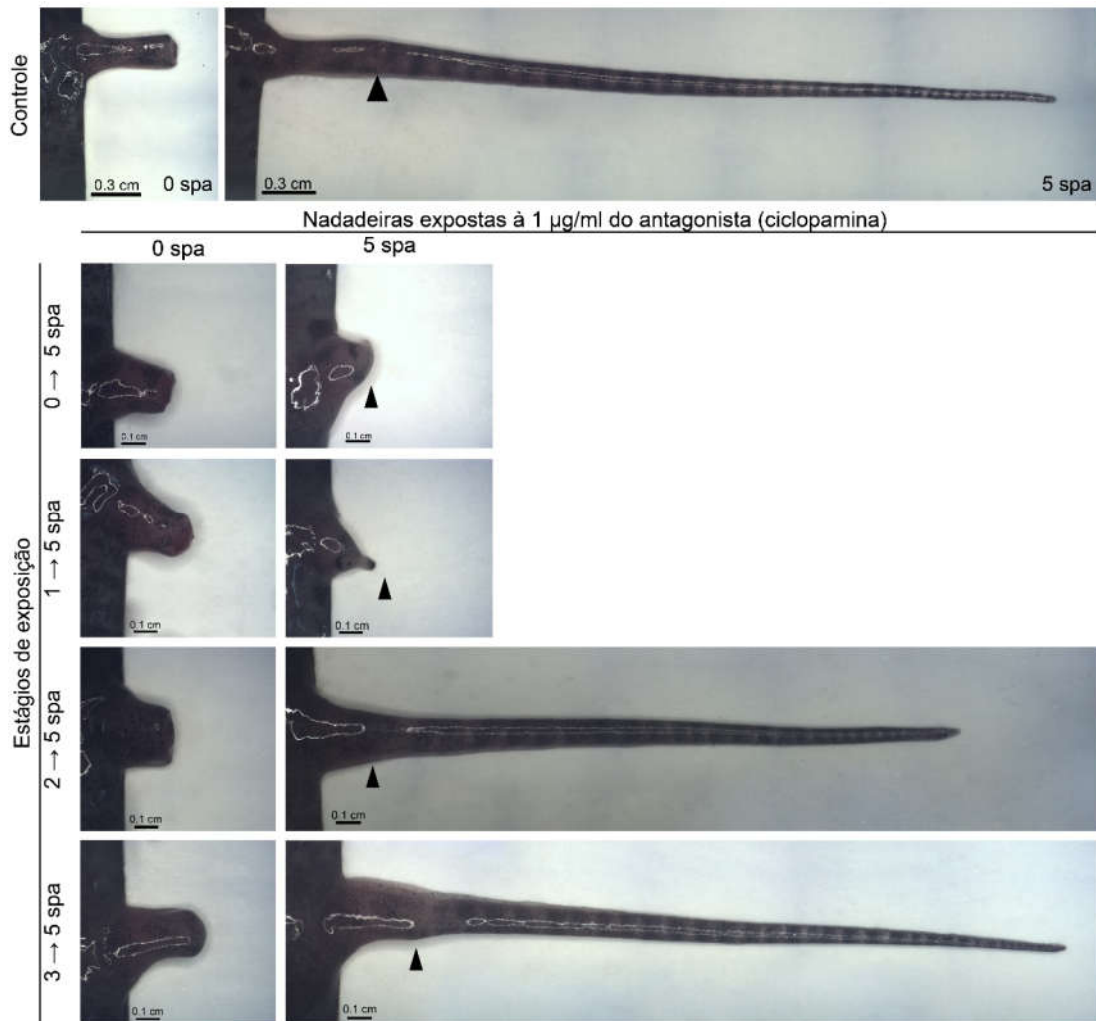


Figura 12. Inibição da via de SHH com uso de ciclopamina em diferentes estágios. Vista dorsal, posterior abaixo para o grupo controle, estágios 1 a 5 spa e 2 a 5 spa, e acima para os restantes, distal à direita, spa = semanas pós-amputação, cabeças de seta marcam o ponto de amputação (n=3 para cada grupo e n=5 para grupo controle).

4.4. Ativação ectópica da via SHH modifica o endoesqueleto da nadadeira em *P. annectens*

Após verificar o estágio no qual o tratamento com ciclopamina é permissivo ao crescimento da nadadeira, realizamos a ativação ectópica da via de SHH com o uso do agonista SAG. Até dez semanas pós-amputação os radiais distais ainda não são formados no tipo selvagem (Figura 13a). Tratamentos com a molécula da 2^a à 7^a semana pós-amputação (spa) levam ao surgimento de duas estruturas esqueléticas principais: (i) estruturas longas e segmentadas na região posterior e (ii) inúmeras cartilagens pequenas disformes em diversas regiões das nadadeiras dos animais (Figura 13). Tratamentos iniciados na 3^a semana e

estendidos até a 8ª levam ao surgimento de estruturas menos segmentadas apenas na bainha onde os radiais distais se localizam em nadadeiras maduras (Figura 14).

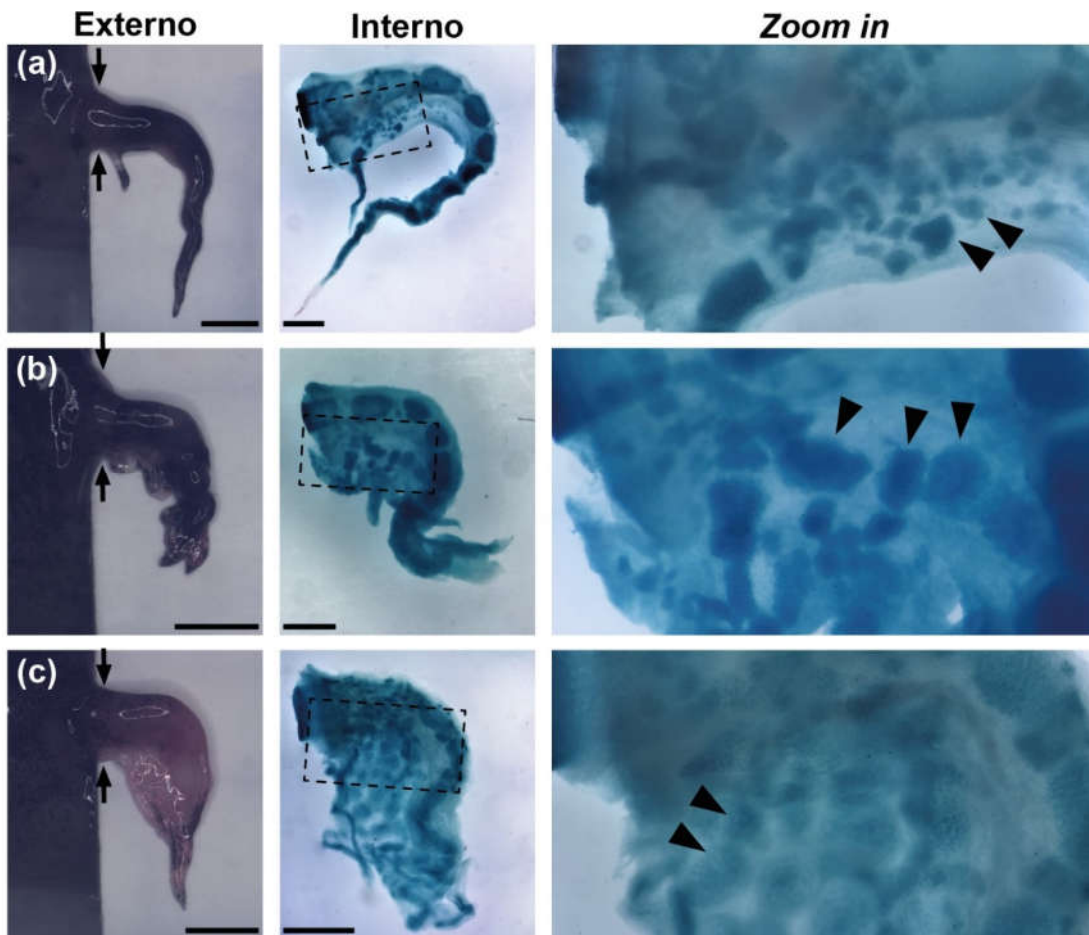


Figura 13. Ativação da via de SHH com uso de SAG da 2ª a 7ª semana pós-amputação. Coloração de Azul de Alcian na 8ª spa dos animais tratados com SAG. Observe o aumento no número de elementos esqueléticos. Vista dorsal, posterior abaixo (escala 0.3 cm na primeira coluna e 0.1 cm na segunda). Setas indicam o local da amputação.

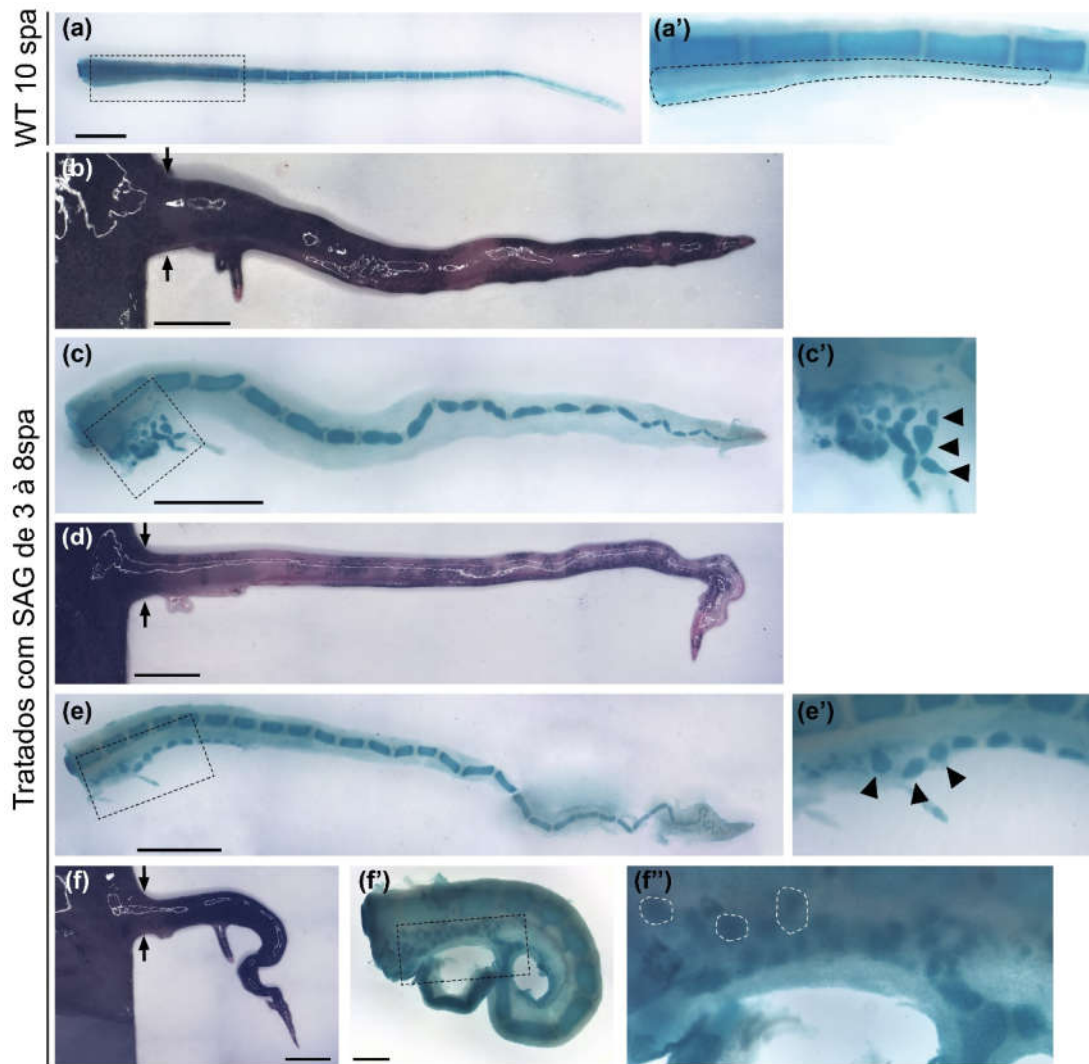


Figura 14. Ativação da via de SHH com uso de SAG de 3 à 8 semanas pós-amputação. Os radiais distais não se formam antes de dez spa (a') região delimitada pela linha tracejada. Observe o surgimento precoce de radiais distais (pontas de seta em c', e' e círculos tracejados em f'). Escala 0.3 cm a-f e 0.1 cm em f'. spa = semanas pós-amputação, WT = tipo selvagem. Vista dorsal, posterior abaixo. Setas indicam o local da amputação.

Discussão

5.1. Mudanças na ZRS estão associadas a diferentes números de radiais distais em peixes pulmonados

Mudanças na regulação da expressão de proteínas que atuam na padronização/identidade de estruturas durante o desenvolvimento têm sido associadas a inovações evolutivas (Prud'homme et al., 2007). Os peixes esgana-gato (*Gasterosteus aculeatus*) representam um exemplo recém descrito deste fenômeno. Populações marinhas possuem espinhos pélvicos, que por sua vez foram perdidos em populações de água doce. Chan et al., (2010) encontraram deleções na região do acentuador do gene *Ptx1*, específicas das populações que perderam o espinho pélvico. Por transgenia da sequência do acentuador de populações de peixes marinhos, em zigotos de populações de *G. aculeatus* de água doce, a expressão de *Ptx1* foi recuperada e os espinhos pélvicos se desenvolveram.

Outras alterações mais sutis em regiões específicas do acentuador também podem resultar em mudanças fenotípicas (Wittkopp and Kalay, 2011). Mutações de nucleotídeo único na ZRS levam à expressão ectópica de *Shh*, por converterem sítios para a ligação de proteínas repressoras (ETV) em ativadoras (ETS), gerando polidactilia pré-axial em humanos (Lettice et al., 2012). Alternativamente, deleções e mudanças na conservação de sítios para a ligação de fatores de transcrição (SLFTs) da família ETS e HOXD no acentuador ZRS de píton são responsáveis pela expressão transiente de *Shh*, estando associados a perda de membros em serpentes (Kvon et al., 2016; Leal et al., 2016), ainda que a sequência ZRS apresente conservação geral alta.

Do mesmo modo, mudanças no estado de conservação de sítios de ligação para proteínas ativadoras e repressoras na ZRS podem estar por trás do estabelecimento do número de radiais distais em peixes pulmonados. As sequências da ZRS de peixes pulmonados apresentam conservação global alta quando comparadas à sequência de camundongo, exceto na região 3' de lepidosirenídeos, cujos radiais distais são reduzidos (*P. annectens*) ou ausentes (*L. paradoxa*). Nesta região as ZRSs apresentam uma deleção de 17 pb no segundo SLFT da família ETS e uma substituição de nucleotídeo único no quinto sítio ETS, responsáveis por ativar a expressão de *Shh* em membros em desenvolvimento (Lettice et al., 2012). *L. paradoxa*, que perdeu completamente os radiais distais apresenta

substituições adicionais em SLFT um e quatro ETS e sítio quatro HOXD na ZRS. Estas mutações/deleções podem afetar a expressão de *Shh* nesses peixes e serem responsáveis pela redução/perda dos radiais distais em lepidosirenídeos.

Além da perda de conservação dos SLFTs ativadores, lepidosirenídeos apresentam, substituições em um dos dois sítios ETV. Apesar de estas mudanças poderem impactar a ligação de ETV, elas podem ter pouca influência na atividade total do acentuador, visto que em camundongos, a presença de um único sítio ETV é suficiente para delimitar a expressão de *Shh* à ZPA (Lettice et al., 2012). Em contrapartida, a ZRS de *N. forsteri* (espécie que tem radiais distais pré- e pós-axiais) apresenta substituições em ambos SLFTs ETV (repressores da expressão de *Shh*) em conjunto com todos os sítios HOXD e ETS intactos. Em camundongos, a deleção de ambos sítios ETV leva a expressão ectópica de *Shh* e polidactilia pré-axial (Lettice et al., 2012). Portanto, é plausível que a perda da conservação destes dois sítios na ZRS de *N. forsteri* seja um dos motivos pelo qual a espécie apresenta radiais pré-axiais.

Assim como deleções de SLFTs ativadores e repressores na ZRS causam modificação na expressão de *Shh* e perda ou ganho de dígitos, encontramos um provável mecanismo comum associado à redução e aumento radiais distais em peixes pulmonados. Portanto, é possível que os mecanismos reguladores utilizados na padronização de dígitos tenham os mesmos efeitos na formação e diversificação dos radiais distais de peixes.

5.2. A via de SHH é ativada durante a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*

A via de sinalização SHH é ativada em múltiplos tecidos durante o desenvolvimento embrionário. Durante o desenvolvimento de membros em galinha a ativação da via de SHH eleva a expressão dos genes *Ptch1* e *Gli1* (Pearse et al., 2001) e mesmo em serpentes, onde a via é ativada apenas de modo transiente e comparativamente mais restrita, ambos genes leitores da via são detectados (Leal and Cohn, 2016). Estes mesmos genes também respondem a ativação da via de SHH em peixes paulistinha (Prykhozhiy et al., 2008), peixe-espátula (Tulenko et al., 2017) e tubarões (Onimaru et al., 2015). Durante a regeneração de membros em salamandras *Shh* atinge seu pico de expressão 10 dias pós-amputação, acompanhando a ativação da via de SHH, *Gli1* e *Ptch1* atingem seus níveis mais altos no 12º dia (Nacu et al., 2016).

Do mesmo modo, observamos aumento de expressão de *Shh* já na 2ª spa (semana pós-amputação). *Ptch1* e *Gli1* também são regulados positivamente, em comparação ao maduro, indicando a ativação da via de SHH já na 2ª spa (Figura 9a). Na 3ª spa, *Shh* alcança seu pico de expressão, estando associado com o aparecimento da bainha (Figura 9b) onde os radiais distais se formam em *P. annectens*. Desse modo, apesar do ZRS de *P. annectens* apresentar diversas mutações e deleção do sítio 2 ETS, estes não são suficientes para impedir a expressão de *Shh* e consequente ativação da via.

De modo similar, serpentes também apresentam expressão de *Shh* em seus brotos de membros posteriores mesmo com mutações e deleções na ZRS (Leal and Cohn, 2016). Enquanto nossos dados não podem mostrar a presença da ZPA em peixes pulmonados, eles sugerem que a via está ativa. Portanto, decidimos investigar o papel da via de SHH nos diferentes estágios de regeneração a fim de entender em qual momento ela poderia estar regulando a padronização do esqueleto da nadadeira.

5.3. A via de SHH é necessária para a regeneração de nadadeiras em *P. annectens*

Durante o desenvolvimento e regeneração de membros o fator de crescimento de fibroblasto 8 (*Fgf8*) é expresso na região distal do blastema ou broto do membro estimulando a proliferação celular (Moon and Capecchi, 2000 and Nacu et al., 2016). A expressão contínua de *Fgf8* depende da expressão de *Shh*, que está envolvido na manutenção do crescimento distal do autopódio no membro por via de retroalimentação positiva que envolve *Gremlin1-Fgf8* (Verheyden and Sun, 2008). Apesar de contribuir para o crescimento distal durante o desenvolvimento do membro, *Shh* não é necessário para a formação dos compartimentos proximais em tetrápodes, visto que camundongos nocautes para o gene formam ossos do braço e antebraço (Chiang et al., 2001). Já durante a regeneração, a ativação da via de sinalização SHH é necessária para manutenção da expressão de *Fgf8* e consequente crescimento do membro, incluindo braço e antebraço (Nacu et al., 2016 e Singh et al., 2012).

Em concordância, a inibição contínua da via de SHH durante a regeneração de nadadeiras em *Protopterus* bloqueia o processo (Figura 9). Assim como em membros de salamandras (Singh et al., 2012), a ativação da via é necessária para a regeneração apenas nas duas primeiras semanas (Figura 10 e Figura 8B), visto que tratamentos com o inibidor após 2ª semana pós-amputação são permissivos a regeneração.

Singh et al., (2012) mostraram que períodos mais precoces e curtos de inibição da via de SHH levam a redução no número de dígitos em salamandras (Figura 5b). Como nossos estágios de tratamento mais tardios não bloqueiam a regeneração, o papel da via de SHH a partir da segunda semana após amputação pode estar relacionado com a padronização do esqueleto distal em peixes pulmonados. Para testar esta hipótese realizamos experimentos com a molécula ativadora da via de SHH a partir da 2ª e 3ª semana pós-amputação e analisamos a padronização do esqueleto.

5.4. A via de SHH modula a padronização dos radiais distais em *P. annectens*

Durante o desenvolvimento de membros em tetrápodes a via de sinalização SHH participa no estabelecimento da identidade, número e comprimento dos dígitos. Deleção de *Gli3*, antagonista da via SHH, leva à aumento no domínio de ativação da via de SHH no broto do membro, gerando polidactilia (Litingtung et al., 2002). Em salamandras, aumento da ativação da via de SHH dirigida por infecção de vetor de expressão, leva ao aumento de dígitos durante a regeneração de membros (Oliveira et al., 2018).

Do mesmo modo, a ativação ectópica da via de SHH a partir da 3ª spa levou ao aparecimento precoce e em maior número de elementos esqueléticos, especialmente na região posterior da nadadeira em regeneração (Figura 12 c', e', f'). Concomitante ao aparecimento da bainha na 3ª spa, região onde os radiais distais se formam, e o pico de expressão de *Shh* ocorre. A ativação ectópica mais precoce da via, na 2ª spa, além de gerar múltiplos elementos esqueléticos menores também gera múltiplos eixos de mesômeros na nadadeira dos espécimes tratados (Figura 11). Estes dados estão em concordância com o papel da via SHH na formação do eixo principal de crescimento durante a regeneração de membros em salamandras (Nacu et al., 2016).

Em morcegos, uma segunda onda de ativação da via de SHH leva ao aumento no comprimento das falanges dos dígitos (Hockman et al., 2008). De modo similar, o aumento no comprimento dos radiais distais nos espécimes cuja via foi ativada ectopicamente logo após o surgimento da bainha, pode indicar que a via SHH também atua no alongamento dessas estruturas. Portanto, uma via comum na padronização de dígitos em tetrápodes, também parece estar atuando, com efeitos similares, na padronização dos radiais distais em peixes pulmonados, suportando a homologia entre radiais distais e dígitos.

Portanto, nossos dados começam a preencher uma lacuna de conhecimento por tempos negligenciada. A dificuldade em se obter embriões de peixes pulmonados contribuiu significativamente para a escassez de experimentos nessas espécies (Amaral and Schneider, 2017). Os peixes pulmonados apresentam o maior genoma dentre os vertebrados vivos, com estimativas superiores à 30 vezes maior do que o genoma humano (Biscotti et al., 2016). Desse modo, a obtenção de um genoma completo ainda é um grande desafio. Portanto, nossos dados do acentuador ZRS são os primeiros a analisarem sequências reguladoras de longa distância nesses peixes com importância na evolução de característica de tetrápodes.

Adicionalmente, nossos resultados de análise de expressão gênica e modulação da via de SHH são compatíveis com o esperado dado o papel da via na padronização do endoesqueleto. Logo, o estudo de processos de desenvolvimento durante a regeneração de estruturas complexas, pode fornecer dados importantes sobre a sua evolução na origem de tetrápodes. Em especial, uma vantagem, notável se refere a modulações de vias de sinalização celular, que durante o desenvolvimento são ativadas em diversas partes do embrião. Ao se estudar a regeneração de estruturas em organismos já formados, modulação global dessas vias por uso de moléculas dissolvidas no meio, gera efeitos localizados.

Considerações finais

Os peixes pulmonados vivos são os vertebrados aquáticos mais proximamente relacionados aos tetrápodes e estudar esses organismos pode nos fornecer respostas importantes quanto a invasão da terra pelos vertebrados. A emergência do membro tetrápode ilustra um ramo de pesquisa ainda em estudo e compreender como ele surgiu, a partir de nadadeiras de peixes, é uma questão ainda discutida.

Nossos resultados mostram que o acentuador de um gene chave no desenvolvimento de dígitos, *Shh*, apresenta deleções associadas a perda de radiais distais pré-axiais em peixes pulmonados, sugerindo que vias comuns controlam a perda de esqueleto distal de nadadeiras e membros. Do mesmo modo, encontramos similaridades na regeneração de apêndices entre peixes pulmonados e salamandras, pois a regeneração de nadadeira em *P. annectens* necessita da ativação da via de sinalização SHH. Adicionalmente, assim como ocorre nos dígitos de tetrápodes, a ativação ectópica da via de SHH leva ao aumento dos radiais distais em peixes pulmonados. Portanto, três mecanismos moleculares da via de SHH representam a herança que tetrápodes receberam de seus ancestrais aquáticos, entre tantas outras já exploradas recentemente (Amaral and Schneider, 2018, ver Anexo I).

Em resumo, nossos dados revelam modificações nos radiais distais de peixes dependentes de vias utilizadas na padronização dos dígitos em tetrápodes. Dado a proximidade filogenética dos peixes pulmonados com os tetrápodes vivos, os resultados obtidos são compatíveis com a hipótese de homologia entre radiais distais e dígitos. Em especial, nossos dados indicam que (i) radiais distais em peixes pulmonados apresentam variação fenotípica sem precedentes em nadadeiras de outros peixes vivos; (ii) essas mudanças estão associadas com alterações em elementos *cis*-reguladores responsáveis pelo número de dígitos em tetrápodes; (iii) mudanças nas vias que estes elementos controlam demonstram certo grau de individualização dos radiais distais em relação aos elementos proximais.

Portanto, os dados parecem satisfazer as definições de inovação evolutiva propostas por Wagner and Larsson (2006) e Wagner and Lynch (2010), sugerindo que os únicos elementos novos durante a evolução de membros em tetrápodes são os do punho (Johanson et al., 2007). Mais ainda, se torna tentador especular que, assim como em peixes pulmonados

viventes, a via de SHH possa ter contribuído para a diversidade no número e forma de radiais distais em nadadeiras de peixes fósseis mais proximamente relacionados aos tetrápodes (*Sauripterus*, *Eusthenopteron*, *Rhizodus*, *Panderichthys* e *Tiktaalik*) (Figura 1).

Referências Bibliográficas

- Ahn D and 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.
- Amaral DB, Schneider I (2018) Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish. *Genesis*. 56(1)
- 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, Scharl M, Jaffe DB, Postlethwait JH, Venkatesh B, Di Palma F, Lander ES, Meyer A and Lindblad-Toh K (2013). The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. *Nature* 496(7445):311-6.
- Bartsch P, Gemballa S and Piotrowski T (1997) The Embryonic and Larval Development of *Polypterus senegalus* Cuvier, 1829: its Staging with Reference to External and Skeletal Features, Behaviour and Locomotory Habits. *Acta Zoologica*, 78(4), 309–328.
- Biscotti MA, Gerdol M, Canapa A, Forconi M, Olmo E, Pallavicini A, Barucca M and Scharl M (2016) The Lungfish Transcriptome: A Glimpse into Molecular Evolution Events at the Transition from Water to Land. *Sci Rep* 6(1).

- Boisvert CA, Mark-kurik E and Ahlberg PE (2008) The pectoral fin of *Panderichthys* and the origin of digits. *Nature* 456(7222):636-8.
- Braasch I, Gehrke AR, Smith JJ, Kawasaki K, Manousaki T, Pasquier J, Amores A, Desvignes T, Batzel P, Catchen J, Berlin AM, Campbell MS, Barrell D, Martin KJ, Mulley JF, Ravi V, Lee AP, Nakamura T, Chalopin D, Fan S, Weisel D, Cañestro C, Sydes J, Beaudry FE, Sun Y, Hertel J, Beam MJ, Fasold M, Ishiyama M, Johnson J, Kehr S, Lara M, Letaw JH, Litman GW, Litman RT, Mikami M, Ota T, Saha NR, Williams L, Stadler PF, Wang H, Taylor JS, Fontenot Q, Ferrara A, Searle SM, Aken B, Yandell M, Schneider I, Yoder JA, Volff JN, Meyer A, Amemiya CT, Venkatesh B, Holland PW, Guiguen Y, Bobe J, Shubin NH, Di Palma F, Alföldi J, Lindblad-Toh K and Postlethwait JH (2016) The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat Gen* 48(4), 427–437.
- Carter KM, Woodley CM and Richard SB (2011) A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fisheries* 21:51–59.
- Chan YF, Marks ME, Jones FC, Villarreal GJ, Shapiro MD, Brady SD, Southwick AM, Absher DM, Grimwood J, Schmutz J, Myers RM, Petrov D, Jónsson B, Schluter D, Bell MA and Kingsley DM (2010) Adaptive evolution of pelvic reduction in sticklebacks by recurrent deletion of a *Pitx1* enhancer. *Science*. 327(5963):302-5.
- Chiang C, Litingtung Y, Harris MP, Simandl BK, Li Y, Beachy PA and Fallon JF (2001) Manifestation of the limb prepattern: limb development in the absence of sonic hedgehog function. *Dev Biol*. 236(2):421-35.
- Clement, AM (2019) Sarcopterygian Fishes, the "Lobre-Fins" In Ziermann, JM; Diaz Jr, RE; Diogo, R (Eds.), *Heads, Jaws, and Muscles* (pp. 119-142). Basel, Basel-Stadt, Suíça: Springer International Publishing.
- Coates MI and Clack JA (1990) Polydactyly in the earliest known tetrapod limbs. *Nature* 347():66-69.

- Coates MI and Ruta M (2007) Skeletal Changes in the Transition from Fins to Limbs. In: Hall BK (ed) Fins into limbs: evolution, development, and transformation. The University of Chicago Press, Chicago, pp 15-38.
- Cuervo R, Hernández-martínez R, Chimal-monroy J, Merchant-larios H and Covarrubias L (2012) Full regeneration of the tribasal *Polypterus* fin. Proc Natl Acad Sci USA 109(10):3838-3843.
- Dahn RD, Davis MC, Pappano WN and Shubin NH (2007) Sonic hedgehog function in chondrichthyan fins and the evolution of appendage patterning. Nature. 445(7125):311-4.
- Davis MC, Shubin NH and Force A (2004) Pectoral fin and girdle development in the basal actinopterygians *Polyodon spathula* and *Acipenser transmontanus*. J Morphol. 262(2), 608–628.
- Frank-Kamenetsky M, Zhang XM, Bottega S, Guicherit O, Wichterle H, Dudek H, Bumcrot D, Wang FY, Jones S, Shulok J, Rubin LL and Porter JA (2002) Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists. J Biol. 1(2):1-10.
- Freeman S and Herron JC (2013) Evolutionary Analysis (5th ed) Chapter 2 (pg. 69-76). Prentice Hall. Pearson Education.
- Freitas R, Zhang G and 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 and 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 and 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 and Shubin NH (2016) *Cis*-regulatory programs in the development and evolution of vertebrate paired appendages. *Semin Cell Dev Biol.* 57, 31–39.
- 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 and Shubin NH (2015) Deep conservation of wrist and digit enhancers in fish. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(3):803-8.
- Gerber T, Murawala P, Knapp D, Masselink W, Schuez M, Hermann S, Gac-Santel M, Nowoshilow S, Kageyama J, Khattak S, Currie JD, Camp JG, Tanaka EM and Treutlein B (2018) Single-cell analysis uncovers convergence of cell identities during axolotl limb regeneration. *Science.* 362(6413), eaaq0681.
- Goodrich ES (1931) Studies on the Structure and Development of Vertebrates. *J Nerv Ment Dis,* 74(5), 678.
- Grandel H and Schulte-Merker S (1998) The development of the paired fins in the Zebrafish (*Danio rerio*). *Mech Develop.* 79(1–2), 99–120.
- Hall BK (2005) Consideration of the neural crest and its skeletal derivatives in the context of novelty/innovation. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 304B(6), 548–557.
- Harfe BD, Scherz PJ, Nissim S, Tian H, McMahon AP and Tabin CJ (2004) Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell.* 118(4):517-528.
- Imokawa Y and 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 and Ahlberg, PE (2007) Fish fingers: digit homologues in Sarcopterygian fish fins. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 308B:757–768.

- Jude E, Johanson Z, Kearsley A and Friedman M (2014) Early evolution of the lungfish pectoral-fin endoskeleton: evidence from the Middle Devonian (Givetian) *Pentlandia macroptera*. *Front Earth Sci* (2)1-18.
- Hockman D, Cretekos CJ, Mason MK, Behringer RR, Jacobs DS and Illing N (2008) A second wave of *Sonic hedgehog* expression during the development of the bat limb. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105(44):16982-16987.
- Kardong, KV (2015) *Vertebrates: comparative anatomy, function, evolution*. New York: McGraw-Hill Education. p. 82-127.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM and Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res*. Jun;12(6):996-1006.
- 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 and Pennacchio LA (2016) Progressive Loss of Function in a Limb Enhancer during Snake Evolution. *Cell*. 167(3):633-642.e11.
- Langellotto F, Fiorentino M, De Felice E, Caputi L, Nittoli V, Joss JMP and Sordino P (2018) Expression of *meis* and *hoxa11* in dipnoan and teleost fins provides new insights into the evolution of vertebrate appendages. *EvoDevo*. 9(1).
- Leal F and 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.
- Letelier J, De la calle-mustienes E, Pieretti J, Maeso I, Nakamura T, Pascual-Anaya J, Shubin NH, Schneider I, Martinez-Morales JR and Gómez-Skarmeta JL (2018) A conserved *Shh cis*-regulatory module highlights a common developmental origin of unpaired and paired fins. *Nat Genet*.
- Lettice LA, Heaney SJH, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE and 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 and 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.
- Lettice LA, Devenney P, De angelis C and Hill RE (2017) The Conserved Sonic Hedgehog Limb Enhancer Consists of Discrete Functional Elements that Regulate Precise Spatial Expression. *Cell Rep*. 20(6):1396-1408.
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF and Chiang C (2002) *Shh* and *Gli3* are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature*. 418(6901):979-83.
- Montavon T, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, Laat W, Spitz F and Duboule, D (2011) A Regulatory Archipelago Controls Hox Genes Transcription in Digits. *Cell*, 147(5), 1132–1145.
- Moon, AM and Capecchi, MR (2000) *Fgf8* is required for outgrowth and patterning of the limbs. *Nature Genet*. 26, 455–459.
- Muneoka K and Bryant SV (1982) Evidence that patterning mechanisms in developing and regenerating limbs are the same. *Nature*. 298 (5872):369-371.
- 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 and 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: 1203-1223.
- Nacu E, Gromberg E, Oliveira CR, Drechsel D and Tanaka EM (2016) FGF8 and SHH substitute for anterior-posterior tissue interactions to induce limb regeneration. *Nature*. 533(7603):407-10.
- Nakamura T, Gehrke AR, Lemberg J, Szymaszek J and Shubin NH (2016) Digits and fin rays share common developmental histories. *Nature*. 537(7619):225-228.

- Nikiforova AI and Golichenkov VA (2012) Characteristics of the reparative regeneration of fins in the Polypterid fish (Polypteridae, Actinopterygii). *Russ J Dev Biol.* 43(2):115-120.
- Nogueira AF, Costa CM, Lorena J, Moreira RN, Frota-Lima GN, Furtado C, Robinson M, Amemiya CT, Darnet S and Schneider I (2016) Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. *Nat Commun.* 7:13364.
- Oliveira CR, Lemaitre R, Murawala P, Tazaki A, Drechsel DN and Tanaka EM (2018) Pseudotyped baculovirus is an effective gene expression tool for studying molecular function during axolotl limb regeneration. *Dev Biol.* 433(2):262-275.
- Onimaru K, Kuraku S, Takagi W, Hyodo S, Sharpe J and 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 and Zeller R (2014) HAND2 targets define a network of transcriptional regulators that compartmentalize the early limb bud mesenchyme. *Dev Cell.* 31(3):345-357.
- Paço A and Freitas R (2017) *Hox D* genes and the fin-to-limb transition: Insights from fish studies. *Genesis.* 56(1), e23069.
- Pearse RV, Vogan KJ and Tabin CJ (2001) *Ptc1* and *Ptc2* transcripts provide distinct readouts of Hedgehog signaling activity during chick embryogenesis. *Dev Biol.* 239(1):15-29.
- Petit F, Sears KE and Ahituv N (2017) Limb development: a paradigm of gene regulation. *Nature Rev Genet.* 18(4), 245–258.
- Prud'homme B, Gompel N and Carroll SB (2007) Emerging principles of regulatory evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104 Suppl 1:8605-12.
- Prykhozhiy SV and Neumann CJ (2008) Distinct roles of Shh and Fgf signaling in regulating cell proliferation during zebrafish pectoral fin development. *BMC Dev Biol.* 8:91.

- Rodríguez-carballo E, Lopez-delisle L, Zhan Y, Fabre, Pierre J, Beccari L, El-Idrissi I, Huynh THN, Ozadam H, Dekker J and Duboule D (2017) The HoxD cluster is a dynamic and resilient TAD boundary controlling the segregation of antagonistic regulatory landscapes. *Genes Dev.* 31(22):2264-2281.
- Roy S and Gardiner DM (2002) Cyclopamine induces digit loss in regenerating axolotl limbs. *J Exp Zool.* 293(2):186-90.
- Sagai T, Hosoya M, Mizushina Y, Tamura M and 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.
- Sheth R, Barozzi I, Langlais D, Osterwalder M, Nemeč S, Carlson HL, Stadler HS, Visel A, Drouin J, Kmita M (2016) Distal Limb Patterning Requires Modulation of *cis*-Regulatory Activities by HOX13. *Cell Rep.* 17(11):2913-2926.
- Shubin NH, Daeschler EB and 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 and Carroll S (2009) Deep homology and the origins of evolutionary novelty. *Nature.* 457(7231):818-823.
- Singh BN, Doyle MJ, Weaver CV, Koyano-nakagawa N and Garry DJ (2012) Hedgehog and Wnt coordinate signaling in myogenic progenitors and regulate limb regeneration. *Dev Biol.* 371(1):23-34.
- Singh BN, Koyano-nakagawa N, Donaldson A, Weaver CV, Garry MG and Garry DJ (2015) Hedgehog Signaling during Appendage Development and Regeneration. *Genes (Basel).* 6(2):417-435.
- Stocum DL (2017) Mechanisms of urodele limb regeneration. *Regeneration (Oxf).* 4(4):159-200.
- Stopper GF and Wagner GP (2007) Inhibition of Sonic hedgehog signaling leads to posterior digit loss in *Ambystoma mexicanum*: parallels to natural digit reduction in urodeles. *Dev Dyn.* 236(1):321-31.

- Tarchini B, Duboule D and Kmita M (2006) Regulatory constraints in the evolution of the tetrapod limb anterior-posterior polarity. *Nature*. 443(7114):985-8.
- Taylor WR and Van Dyke G (1985) Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9, 107–119.
- Tulenko FJ, Augustus GJ, Massey JL, Sims SE, Mazan S and Davis MC (2016) *HoxD* expression in the fin-fold compartment of basal gnathostomes and implications for paired appendage evolution. *Sci Rep*. 6:22720
- Tulenko FJ, Massey JL, Holmquist E, Kigundu G, thomas S, Smith SME, Mazan S and Davis MC (2017) Fin-fold development in paddlefish and catshark and implications for the evolution of the autopod. *Proc Biol Sci*. 284(1855).
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M and Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 1;40(15):e115.
- Verheyden JM and Sun X (2008) An Fgf/Gremlin inhibitory feedback loop triggers termination of limb bud outgrowth. *Nature*. 454(7204):638-41.
- Wagner GP and Lynch VJ (2010) Evolutionary novelties. *Curr Biol*. 20(2):R48-52.
- Wagner GP, Larsson HCE (2006) Fins and limbs in the study of evolutionary novelties. In: Hall BK, editor. *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*. Chicago: University of Chicago Press. pg. 49-61.
- Wittkopp PJ and Kalay G (2011) *Cis*-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. *Nat Rev Genet*. 13(1):59-69.
- Woltering JM, Noordermeer D, Leleu M and Duboule D (2014) Conservation and divergence of regulatory strategies at Hox Loci and the origin of tetrapod digits. *PLoS Biol*. 12(1):e1001773.
- Woltering JM and Duboule D (2010) The origin of digits: expression patterns versus regulatory mechanisms. *Dev Cell*. 18(4):526-32.

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

Zhu M and Yu X (2009) Stem sarcopterygians have primitive polybasal fin articulation. *Biol Lett*. 5(3), 372–375.

Anexo I

Parte da revisão de literatura e discussão de hipóteses que permeiam este projeto foram reunidas em um artigo de revisão publicado em 24 de janeiro de 2018 na revista *Genesis*: Amaral DB, Schneider I (2018) Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish. *Genesis*. 56(1). doi.org/10.1002/dvg.23052

REVIEW

WILEY *genesis*
The Journal of Genetics and Development

Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish

Danielson B. Amaral | Igor Schneider 

Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Rua Augusto
Corrêa, 01, Belém 66075-900, Brazil

Correspondence

Igor Schneider, Instituto de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Pará,
Rua Augusto Corrêa, 01, Belém 66075-900,
Brazil.
Email: ischneider@ufpa.br

Funding information

CNPq Universal Program, Grant/Award
Number: 403248/2016-7; CAPES/
Alexander von Humboldt Foundation

Summary

Limbs with digits evolved as sarcopterygian fish transitioned to a terrestrial life, giving rise to modern tetrapods. Since the Devonian, most of the sarcopterygian fish diversity became extinct, with the only surviving representatives being two coelacanth and six lungfish species. As the sister group of tetrapods, sarcopterygian fish constitute the ideal models to address questions regarding the transition of vertebrates from water to land. However, distantly related yet experimentally amenable teleost fish species have instead become the organisms of choice for geneticists and developmental biologists. Comparative studies using teleosts, such as zebrafish, have greatly enriched our knowledge on the genetic and regulatory mechanisms underlying fin development. However, their highly derived fin anatomy provides limited insights on the origin of limbs and the teleost-specific whole-genome duplication represents a further complication to comparisons of gene function and regulation. In recent years, refined morphological and behavioral studies and access to lungfish embryos and availability of genetic resources have underscored the value of nontetrapod sarcopterygians as model organisms. Here we review recent studies using lungfishes and coelacanths that shed light on various aspects of the evolution of the tetrapod limb, including the origin of the tetrapod pelvis, limb musculature, digits, locomotion, and regenerative capacity.

KEYWORDS

appendage, evolution, genetics, limb, process, tissue, wing

1 | INTRODUCTION

One of the most emblematic innovations associated with the evolution of tetrapods is the origin of limbs with digits. The tetrapod limb is composed of a proximal skeletal segment, the stylopod (humerus and femur), followed by an intermediate segment, the zeugopod (radius/ulna, tibia/fibula), and finally a distal segment, the autopod (manus and pes). This basic structure evolved from fins of sarcopterygian fish, which already possessed skeletal elements homologous to those of the tetrapod stylopod and zeugopod. A distal segment containing wrist/ankle bones and digits evolved in tetrapods (Figure 1).

Coelacanths and lungfishes are the only living sarcopterygian fish. The two living species of coelacanths are the West Indian Ocean coelacanth (*Latimeria chalumnae*) and the Indonesian coelacanth (*Latimeria menadoensis*). Lungfishes are represented by six species: four African species of the genus *Protopterus* (*P. aethiopicus*, *P. amphibius*, *P. annectens* and *P. dolloi*), one Australian species (*Neoceratodus forsteri*) and one South American species (*Lepidosiren paradoxa*). Among lungfishes, the fins of the Australian lungfish better resemble the ancestral lungfish condition; the fins of South American and African lungfish species, which lack preaxial and postaxial radials, are considered to be derived

(Johansen et al., 2007). Compared to lungfish fins, the shorter fins with four axial elements seen in coelacanths better reflect the ancestral sarcopterygian condition (Coates, Jeffery, & Ruta, 2002).

From a phylogenetic perspective, living sarcopterygian fish represent the best model organisms to infer anatomical, developmental, and genetic underpinnings of the evolution of limbs. However, lungfish and coelacanth research has long been marked by difficulties in obtaining developing embryos and adult specimens, and by limited genetic resources. These constraints have been attenuated by spawning programs for the Australian lungfish and the sequencing of the coelacanth genome and lungfish transcriptomes (Amemiya et al., 2013; Biscotti et al., 2016; Joss, 2011; Nogueira et al., 2016). Here we review the latest research progress and propose future directions for studies using lungfishes and coelacanths to elucidate the evolutionary origin of limbs with digits.

2 | ORIGINS OF THE TETRAPOD PELVIS AND ASSOCIATED MUSCULATURE

In recent years, comparative analyses of the pelvic girdle and appendicular musculature in sarcopterygian fish have provided valuable insights