



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Análise morfológica e molecular dos filamentos das nadadeiras pélvicas  
do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa***

**SÉRGIO QUEIRÓS LIMA**

**BELÉM – PA  
DEZEMBRO DE 2015**

**SÉRGIO QUEIRÓS LIMA**

**Análise morfológica e molecular dos filamentos das nadadeiras  
pélvicas do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

**BELÉM – PA  
DEZEMBRO DE 2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação  
(CIP) Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Lima, Sérgio Queirós, 1990-  
Análise morfológica e molecular dos filamentos  
das nadadeiras pélvicas do peixe pulmonado  
lepidosiren paradoxa / Sérgio Queirós Lima. - 2015.

Orientador: Igor Schneider.  
Dissertação (Mestrado) -  
Universidade

Federal do Pará, Instituto de Ciências  
Biológicas, Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Peixe - respiração. 2. Biotecnologia.  
I. Título.

CDD 23. ed. 597

---

**SÉRGIO QUEIRÓS LIMA**

**Análise morfológica e molecular dos filamentos das nadadeiras  
pélvicas do peixe pulmonado *Lepidosiren paradoxa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como pré-  
requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

Universidade Federal do Pará/UFPA

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Igor Schneider, Universidade Federal do Pará/UFPA

Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Regina Lobato de Oliveira Bahia, Universidade Federal do  
Pará/UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Neiva Coelho Schneider, Universidade Federal do  
Pará/UFPA

---

Prof. Dr. Sylvain Henri Darnet, Universidade Federal do Pará/UFPA

**BELÉM – PA**  
**DEZEMBRO DE 2015**

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	vi
ABSTRACT .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. O PEIXE PULMONADO <i>Lepidosiren paradoxa</i> .....	1
1.2. FILAMENTOS PÉLVICOS DE <i>L. paradoxa</i> .....	4
1.3. SISTEMA RESPIRATÓRIO DE BRÂNQUIAS .....	5
1.4. O PERFIL MOLECULAR DOS FILAMENTOS BRÂNQUIAIS.....	8
3. OBJETIVOS.....	11
3.1. OBJETIVO GERAL.....	11
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
4. METODOLOGIA.....	12
4.1. COLETA DE <i>LEPIDOSIREN PARADOXA</i> E AMPUTAÇÃO DAS NADADEIRAS. 12	
4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	13
4.3. PREPARO PARA HISTOLOGIA.....	13
4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	14
4.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	14
5. RESULTADOS .....	16
5.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	16
5.2. ANÁLISE MOLECULAR .....	20
6. DISCUSSÃO.....	22
6.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	22
6.2. ANÁLISE MOLECULAR .....	23
7. CONCLUSÃO .....	26
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
ANEXO.....	36

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Igor Schneider pela paciência e suporte intelectual.

A Profa. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Schneider também pelo suporte intelectual.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Aos colegas do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento de Vertebrados-UFPA pelo auxílio em diversos momentos.

A Dr<sup>a</sup> Carinne Costa - UFPA e a Msc. Gabriela Lima pelas vastas correções e revisões da dissertação.

Ao laboratório de polimorfismo do DNA-UFPA (LPDNA), Núcleo de Pesquisa Oncológica (NPO) – Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON); ao Laboratório de microanálises – MEV e microsonda; e ao Laboratório de microscopia eletrônica de varredura do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) pelo uso de equipamentos.

Ao Prof. Dr. Luis Marcelo Pinheiro pela ajuda e suporte nas coletas no município de Breves.

Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia e a Universidade Federal do Pará - UFPA.

## Lista de Figuras

- Figura 1: Arvore filogenética de vertebrados, com peixes pulmonados como grupo irmão dos Tetrápodos. Em azul os peixes cartilaginosos, em verde, os peixes de nadadeira raiada, em roxo, os peixes de nadadeira lobada e em rosa, os Tetrápodes (AMEMIYA *et al.*, 2013)..... 1
- Figura 2: Mapa de distribuição de *Lepidosiren paradoxa*. As elipses representam as bacias hidrográficas e as estrelas, os espécimes reportados pela literatura (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2010)..... 3
- Figura 3: Morfologia geral dos filamentos brânquiais de peixes. (A) Filamento branquial de *Carassius auratus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). Adaptado de URIST (1973). (B) Filamento Branquial de *Goodea atripinnis* corado com HE e Masson's trichrome. Adaptado de RUIZ-PICOS; LOPEZ-LOPEZ (2012). Lamelas: L; Filamentos: F. .... 6
- Figura 4: Microscopia eletrônica de varredura do epitélio das brânquias de um elasmobrânquio de água doce. São mostradas células pavimentosas (*Pavement Cells*-PVC) e células ricas em mitocôndrias (*Mitochondrion-Rich Cells* - MRC) com microvilosidades (setas longas) e/ou micropapilas (setas menores) (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005). .... 7
- Figura 5: Morfologia externa da nadadeira pélvica e dos filamentos na estação de seca (A, B e C) e na estação chuvosa (D, E e F). (D) Localização dos filamentos na região dorsal da nadadeira pélvica indicada pela seta. (E) Imagem aproximada dos filamentos, com asteríscos indicando pontos de ramificação. (F) As cabeças de setas indicam os vasos sanguíneos nos filamentos. Escala em A e D é 1cm, B, C, E e F é 500um. .... 17
- Figura 6: Escaneamento por MEV de *L. paradoxa* comparando as estações de estiagem (A, B e C) e da estação chuosa (D, E e F). Na figura A e D está mostrando os pontos de ramificação em estrela. Na figura B e E é possível ver a superfície dos filamentos, mostrando o formato poliédrico das células com pequenas células pontuais entre as maiores mostradas com setas. Na figura D e F é possível ver estruturas de micropapilas ou microciliadas em algumas células pontuais apontadas com cabeça de seta. .... 18
- Figura 7: Criosecções de lâminas histológicas da nadadeira pélvica com filamentos de macho coradas com HE. A, B e C mostram filamentos da estação de estiagem e D, E e F mostra filamentos da estação chuvosa. Os filamentos são formados por um epitélio

mais fino que o restante das nadadeiras, constituídos de tecido conjuntivo (cj) e possui uma quantidade grande de mucinas (seta preta). As cabeças de seta mostram os vasos sanguíneos o sangue na figura F, representante da estação chuvosa. Cartilagem: asterisco, seta branca: linha basal. Escala: A e D tem 1 mm; B, C, E e F tem 500  $\mu\text{m}$ . ..... 19

Figura 8: Expressão relativa dos genes em  $\text{Log}_2$  de  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  organizados em categorias de hipóxia, osmoregulação, metabolismo energético e proteínas estruturais em filamentos da nadadeira pélvica de *L. paradoraxa* para as estações de estiagem (barra cinza) e chuvosa (barra branca), representadas pela média e  $\pm$  erro padrão das replicatas. A expressão relativa foi calculada a uma proporção ( $\text{Fl. Rel.}_{\text{exp.}} / \text{Fl. Rel.}_{\text{cont.}}$ ), usando o gene de referência *PolR1C*. ..... 21

## RESUMO

A espécie *Lepidosiren paradoxa* pertence à ordem Dipnoi, juntamente com mais dois gêneros, sendo considerados os peixes pulmonados verdadeiros. Os machos adultos de *L. paradoxa* diferenciam-se das fêmeas através da presença de filamentos nas nadadeiras pélvicas. Estes filamentos assemelham-se àqueles encontrados em brânquias de peixes e de salamandras neotênicas. Estes filamentos desenvolvem-se e tornam-se vascularizados durante o período de reprodução. Neste trabalho, propomos testar a hipótese de que os filamentos pélvicos de *L. paradoxa* compartilham características morfológicas e moleculares com filamentos brânquiais. Para tanto, realizamos análise morfológica e molecular dos filamentos das nadadeiras pélvicas entre as estações de estiagem e chuvosa. A análise morfológica ocorreu através de coloração de hematoxilina e eosina (HE) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por fim, foi feita a quantificação de expressão gênica de marcadores enriquecidos em brânquias de peixes, através de PCR em Tempo Real (RT-PCR), utilizando a nadadeira peitoral como referência. O comprimento dos filamentos da estação chuvosa e de estiagem apresentaram os valores de média e desvio padrão de,  $4,31 \text{ mm} \pm 0,186$  e  $1,63 \text{ mm} \pm 0,104$ , respectivamente. Nas imagens de MEV foram observadas algumas células com microvilosidades e/ou microciliadas e algumas células menores. Nas análises de HE os filamentos apresentaram uniformidade no seu epitélio formada com 4 camadas de células, sendo preenchido por tecido conjuntivo e por fim tornam-se mais vascularizados na estação chuvosa. Na análise molecular de RT-PCR os marcadores selecionados não apresentaram variação quando comparados com a nadadeira peitoral e entre as estações. Em conclusão, apesar de existirem semelhanças morfológicas entre filamentos pélvicos de *L. paradoxa* e filamentos brânquiais de peixes e anfíbios, os dados moleculares aqui obtidos não suportam a hipótese de que estes filamentos realizem trocas gasosas.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Lepidosiren paradoxa*, respiração, filamentos das nadadeiras pélvicas.

## ABSTRACT

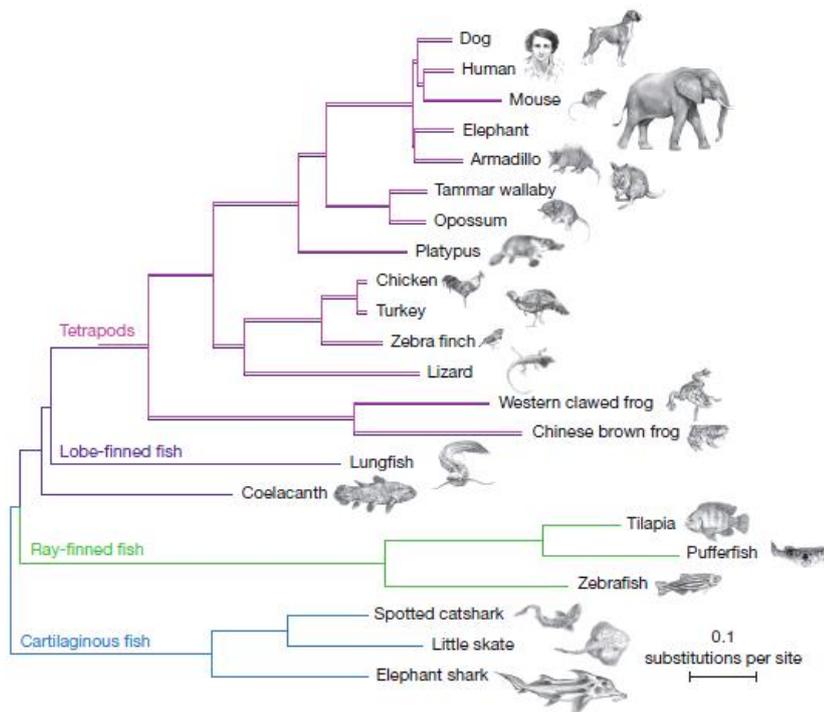
The *Lepidosiren paradoxa* species belongs to Dipnoi order, along with two genre and are considered true lungfishes. Adult males of *L. paradoxa* differ from females by the presence of filaments in the pelvic fin. These filaments resemble those found in gills of fish and neotenic salamanders. These filaments are grow and become vascularized during the reproduction period. In this work we tested the hypothesis that the pelvic filament of *L. paradoxa* share morphological and molecular characteristics with gill filaments. Thus, we performed morphological and molecular analyses of the filaments of the pelvic fins between the dry and rainy seasons. Morphological analysis was performed through hematoxylin and eosin (HE) and scanning electron microscopy (SEM). Finally, we quantified gene expression of gill markers by RT-PCR using pectoral fin as reference. The mean length and standard deviation of the filaments during rainy and dry season were 4,31mm of  $\pm 0.186$  and 1,63mm  $\pm 0.104$ , respectively. In the SEM images, we observed with a few cell microvilli and/or microplicae and some smaller cells. In the HE analyzes we found that the filaments have uniform epithelium formed with four layers of cells being filled by connective tissue and finally become more vascularized the rainy season. Molecular analysis through RT-PCR did not show any change when compared to the pectoral fin and between the stations. In conclusion, despite morphological and molecular similarities between gill filaments and pelvic fin filaments, our findings do not support a role for *L. paradoxa* pelvic filaments in gas exchange.

**KEYWORD:** *Lepidosiren paradoxa*, gas exchange, limb gills.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O PEIXE PULMONADO *Lepidosiren paradoxa*

Os peixes pulmonados são um grupo de grande relevância para pesquisadores no ramo da Biologia Evolutiva do Desenvolvimento, ou Evo-Devo, podendo auxiliar estudos sobre as adaptações necessárias para transição da água para terra. Os peixes pulmonados são considerados fósseis vivos por se assemelharem morfológicamente com seus ancestrais no registro fóssil (JOSS, 2006). Recentemente foi comprovado através do sequenciamento de 251 genes de diferentes vertebrados, que os peixes pulmonados, e não o celacanto, são o grupo-irmão imediato de Tetrapoda (AMEMIYA *et al.*, 2013) (Figura 1).



**Figura 1:** Arvore filogenética de vertebrados, com peixes pulmonados como grupo irmão dos Tetrápodos. Em azul os peixes cartilagosos, em verde, os peixes de nadadeira raiada, em roxo, os peixes de nadadeira lobada e em rosa, os tetrápodos (AMEMIYA *et al.*, 2013).

Devido à relação próxima dos peixes pulmonados com os tetrápodes, trabalhos que tratam do desenvolvimento de membros citam este grupo como um

dos modelos para entender o surgimento de apêndices (FRIEDMAN; COATES; ANDERSON, 2007; HODGKINSON *et al.*, 2009). O desenvolvimento embrionário dos peixes pulmonados também tem sido alvo de estudos comparativos entre outros vertebrados, em especial com anfíbios. Múltiplas similaridades são observadas no desenvolvimento destes dois grupos (pulmonados e anfíbios), incluindo a presença de células ciliadas ao longo dos primeiros estágios do desenvolvimento do embrião (KEMP, 1996; CASTILLO-BRICENO; KODJABACHIAN, 2014).

Os peixes pulmonados são representados por três gêneros, *Neoceratodus*, encontrado na Austrália, o *Protopterus*, que habita o continente africano, e o *Lepidosiren* que é encontrado na América do Sul. Entretanto, os gêneros *Protopterus* e *Lepidosiren* são considerados filogeneticamente mais próximos entre si (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2010). O gênero *Lepidosiren* teve inicialmente sua taxonomia descrita em quatro espécies (*L. paradoxa*, *L. articulata*, *L. dissimilis* e *L. giglioliana*), entretanto elas posteriormente foram sinonimizadas e atualmente o gênero é composto apenas por *L. paradoxa*, popularmente conhecida como Pirambóia (BEMIS, 2003; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003).

A pirambóia apresenta-se distribuída nas bacias dos rios Paraguai e Amazonas (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2010) (Figura 2). A espécie possui um hábito solitário, construindo os seus ninhos em pântanos ou em ambientes lamacentos, sua fecundação é externa e o desenvolvimento indireto (KERR, 1900, 1950). HARDER *et al.* (1999) realizaram diversas mensurações fisiológicas durante 31 dias e os dados obtidos sugeriram que *L. paradoxa* é capaz de estivar, entretanto mais estudos são necessários para determinar a capacidade de estivação de *L. paradoxa* (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2010).



**Figura 2:** Mapa de distribuição de *L. paradoxa*. As elipses representam as bacias hidrográficas e as estrelas, os espécimes reportados pela literatura (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2010).

A pirambóia possui um evidente dimorfismo sexual nas nadadeiras pélvicas, não observadas em outras espécies de pulmonados. Os machos possuem filamentos na parte dorsal das nadadeiras pélvicas. Uma das hipóteses sobre a funcionalidade destes filamentos é a de que estes representam exclusivamente um dimorfismo sexual (LANKESTER, 1894; FOXON, 1933, BEMIS, 2003). Outros autores sugerem que os filamentos podem realizar trocas gasosas, auxiliando os machos no cuidado parental por meio da aeração dos ovos. Em suporte desta hipótese, pesquisadores relatam que os filamentos pélvicos crescem durante o período reprodutivo, assumindo uma coloração avermelhada devido à expansão na vascularização (KERR, 1900; CUNNINGHAM; REID, 1932; FOXON, 1933; URIST, 1973).

## 1.2. FILAMENTOS PÉLVICOS DE *L. paradoxa*

Os filamentos presentes nas nadadeiras pélvicas de pirambóias representam uma inovação evolutiva peculiar. Cunningham e Reid (1932) realizaram experimentos para testar a emissão de oxigênio dos filamentos de *L. paradoxa*, adaptando a metodologia empregada anteriormente ao peixe *Synbrachus marmoratus*, conhecido popularmente como muçum. Os espécimes foram colocados dentro de tubo de vidro e a quantidade de oxigênio dissolvido na água medido através do método químico de Winkler (WINKLER, 1888). Fêmeas e machos foram coletados em estações distintas a fim de obter animais dentro e fora do período reprodutivo. Na maioria dos experimentos, houve uma diminuição do oxigênio dissolvido na água, que segundo os autores deve-se à capacidade do muco secretado pelo peixe em se ligar à molécula de oxigênio, tanto em fêmeas quanto em machos. Porém, quando realizaram experimentos com machos que possuíam filamentos compridos, houve um aumento na quantidade de oxigênio dissolvido na água. Em resumo, os autores propõem que os filamentos pélvicos em machos no período reprodutivo são capazes de liberar oxigênio na água. Os autores propõem ainda que a liberação de oxigênio pelos filamentos pélvicos podem suprir a demanda respiratória dos embriões, pois durante o período reprodutivo, são os machos que apresentam o cuidado parental, provendo suporte aos ovos nos filamentos das nadadeiras pélvicas.

Em contraste à hipótese de que os filamentos pélvicos serviriam para oxigenar os ovos, Urist (1973) sugere que esta característica auxilia o próprio animal na respiração. A fim de comparar os filamentos das nadadeiras pélvicas da pirambóia com filamentos brânquiais de peixes teleósteos, o autor induziu o crescimento dos filamentos das nadadeiras pélvicas através de injeções de testosterona e as analisou a partir de cortes histológicos. Observou-se um aumento dos filamentos na sexta semana após a aplicação do hormônio, além de uma notável mudança na coloração, devido ao aumento da quantidade de capilares, iniciando com um tom mais escuro e ao fim do experimento com uma leve coloração rosa ou avermelhada.

Nos cortes histológicos, Urist (1973) descreveu a morfologia da nadadeira e dos filamentos, ressaltando a formação de novas redes de capilares dentro das

estruturas, caracterizando as células do epitélio como cuboides e basofílicas. O autor também descreveu o comportamento do animal após o tratamento com testosterona, relatando o aumento do intervalo entre as viagens até a superfície para fins de respiração. Ao fim do artigo, o autor concluiu que o epitélio dos filamentos da nadadeira pélvica da pirambóia, assim como as estruturas cartilaginosas da nadadeira, é similar à composição anatômica dos filamentos brânquiais do peixe dourado *Carassius auratus*.

Ao estudar a espécie de sapo *Astylosternus robustus*, DEAN (1913) reportou uma estrutura filamentosa semelhante àquela observada em pirambóias, presente apenas nos flancos e na região dorsal das patas traseiras de machos adultos. O autor sugere que tanto os filamentos pélvicos de pirambóia, quanto os filamentos do *A. robustus*, atuam no período reprodutivo para servir de suporte físico aos ovos até a hora da eclosão.

Posteriormente, NOBLE (1925) analisou a histologia dos filamentos de *A. robustus* e observou que eles são bastante irrigados por vasos sanguíneos que separam em grupos de células no epitélio, potencialmente facilitando a captura e difusão do oxigênio no tecido. Entretanto, DEAN (1913) e NOBLE (1925) não realizaram experimentos funcionais para testar diretamente a realização ou não de trocas gasosa nos filamentos de *A. robustus*.

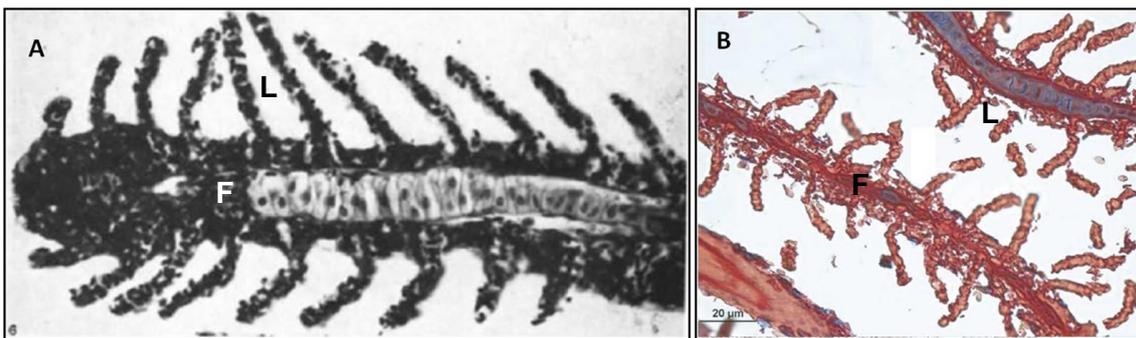
Até o presente momento, apesar da semelhança morfológica com filamentos brânquiais, a finalidade funcional dos filamentos pélvicos da pirambóia permanece obscura.

### **1.3. SISTEMA RESPIRATÓRIO DE BRÂNQUIAS**

Caso a hipótese de que os filamentos da nadadeira pélvica sejam órgãos funcionalmente análogos a filamentos brânquiais, estes representariam uma inovação evolutiva complementar ao sistema respiratório de vertebrados. Existem três tipos de respiração em vertebrados, classificadas de acordo com os órgãos utilizados: a respiração branquial, a cutânea e a respiração através de sacos de gás (KARDONG, 2014). Cada modo de respiração está intimamente associado ao ambiente onde é utilizado (HSIA *et al.*, 2013).

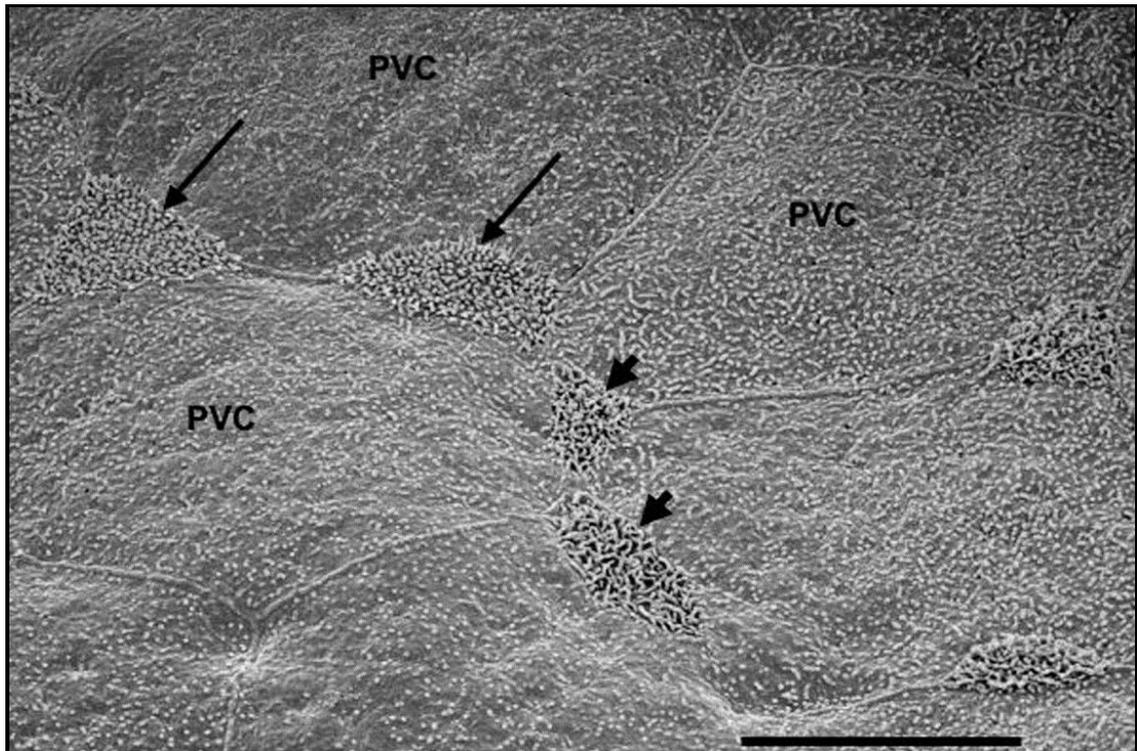
As brânquias são órgãos especializados para o ambiente aquático presentes em peixes e anfíbios (KARDONG, 2014). Este órgão é formado por arcos brânquiais que possuem filamentos responsáveis pela captura de oxigênio (Figura 3). Nestes filamentos estão presentes um par de fileiras de lamelas, uma em cada lado, com células que realizam trocas iônicas e células quimiorreceptoras de oxigênio (ROMBOUGH, 2002; COOLIDGE, 2008).

Estudos demonstram que variações na quantidade de oxigênio dissolvido e salinidade da água causam ativação de quimiorreceptores em resposta a estresse, resultando em expansão da superfície dos filamentos brânquiais, aumentando consideravelmente a ventilação e conseqüentemente a absorção de oxigênio ou de trocas iônicas (COOLIDGE, 2008; UCHIYAMA, KUMANO, 2011; RAMOS *et al.*, 2013).



**Figura 3:** Morfologia geral dos filamentos brânquiais de peixes. (A) Filamento branquial de *Carassius auratus* corado com Hematoxilina e Eosina (HE). Adaptado de URIST (1973). (B) Filamento Branquial de *Goodea atripinnis* corado com HE e Masson's trichrome. Adaptado de RUIZ-PICOS; LOPEZ-LOPEZ (2012). Lamelas: L; Filamentos: F.

Além da presença de células quimiorreceptoras, a composição celular dos filamentos brânquias é comparável em peixes e anfíbios. O epitélio dos filamentos é composto geralmente por 3 a 4 camadas de células e o das lamelas, apenas com uma única camada e a maioria da superfície é coberta com células pavimentosas e cuboides; além disso, também estão presentes células ricas em mitocôndrias e células mucosas (Figura 4). Há células não diferenciadas, localizadas na base e na camada intermediária do epitélio dos filamentos brânquiais, que estão ausentes nas lamelas. Nas estruturas lamelares existem células endoteliais modificadas, chamadas células pilares, que suportam e definem os espaços sanguíneos (LAURENT, PIERRE; DUNEL, 1980; WILSON; LAURENT, 2002).



**Figura 4:** Microscopia eletrônica de varredura do epitélio das brânquias de um elasmobrânquio de água doce. São mostradas células pavimentosas (*Pavement Cells-PVC*) e células ricas em mitocôndrias (*Mitochondrion-Rich Cells - MRC*) com microvilosidades (setas longas) e/ou micropapilas (setas menores) (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005).

Existem dois tipos de brânquias que são divididas morfologicamente em internas e externas (KARDONG, 2014). A primeira está presente em peixes ósseos (*Osteichthyes*) e cartilagosos (*Condriichthyes*) (KARDONG, 2014). Os peixes ósseos possuem as brânquias protegidas pelo aparato opercular, diferente dos *Condriichthyes*, que possuem septos interbrânquiais e um estreito canal de passagem da água. Esta última característica anatômica dificulta a extração do oxigênio em *Condriichthyes*, que compensam este déficit através de uma natação rápida, capaz de aumentar a ventilação e a troca gasosa necessária para o animal (HSIA *et al.*, 2013).

Brânquias externas são encontradas em larvas de alguns anfíbios e de alguns peixes (KARDONG, 2014). Apesar da importância das brânquias para os animais aquáticos, existem espécies que não utilizam unicamente as brânquias como órgãos respiratórios, mas também outras estruturas ou órgãos para a mesma finalidade (HSIA *et al.*, 2013; KARDONG, 2014). Os peixes pulmonados possuem brânquias

que auxiliam na excreção de CO<sub>2</sub> e compensação ácido-base (GILMOUR; EUVERMAN, 2007). Alguns Salmoniformes também realizam parte de suas trocas gasosas através da pele em ambientes aéreos (URBINA; MEREDITH, 2014).

Os sarcopterígio compreendem todos os tetrápodes e peixes que possuem nadadeira lobada (AMEMIYA *et al.*, 2013). Incluídos neste grupo estão os peixes pulmonados, que tem o pulmão como principal órgão para a captura de oxigênio. A pirambóia também possui filamentos em suas nadadeiras pélvicas, que se assemelham fisiologicamente e morfológicamente a filamentos brânquiais, conforme citado anteriormente (URIST, 1973).

#### **1.4. O PERFIL MOLECULAR DOS FILAMENTOS BRÂNQUIAIS**

Os filamentos brânquiais, quando expostos a estresses fisiológicos sofrem modificações estruturais como por exemplo a redução do tecido entre as lamelas e aumento da superfície celular (NIKINMAA; REES, 2005; DHILLON *et al.*, 2013). Estudos de expressão gênica realizados através de hibridização *in situ* de RNA e imunofluorescência indicam que os genes que codificam as proteínas HIF-1alfa, Anidrase carbônica, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, ATPase vacuolar e lactato desidrogenase, estão associados à fisiologia (SEIDELIN *et al.*, 2001; SCOTT; RICHARDS, 2004; HUANG; LIN; LIN, 2015; HUANG *et al.*, 2015) e à morfologia (MEER *et al.*, 2005; PERRY *et al.*, 2010; WRIGHT, 2012; DHILLON *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2013) dos filamentos brânquiais.

A maioria dos genes expressos nesta estrutura adapta a sua expressão quando o animal sofre um estresse ambiental, levando a uma alta ou baixa expressão. A hipóxia é a condição mais conhecida por alterar a fisiologia, morfologia e o padrão de expressão dos genes relacionados aos filamentos brânquiais (AUGUSTO *et al.*, 2010; ZHU; WANG; YAN, 2013; BLANK; BURGGREN, 2014).

Em situações onde há baixa concentração de oxigênio na água o gene “*Hypoxia-Induced factor*” (*HIF*) é ativado. HIF é um fator de transcrição que ativa a transcrição de diversos genes que modificam a fisiologia e a morfologia das brânquias de peixes e anfíbios, a fim de fazer com que o animal se adapte a condição de hipóxia (NIKINMAA; REES, 2005). Em concentrações basais de oxigênio, HIF é degradado constitutivamente. Em ocasiões onde há diminuição dos

níveis de oxigênio, a degradação natural que HIF sofre no citoplasma é inibida. Portanto, genes responsáveis por controlar, por exemplo, a eritropoiese, a síntese de hemoglobina, angiogênese, mudanças na superfície celular, glicólise, transporte de glicose e supressão de proliferação celular, são ativados em condição de hipóxia (NIKINMAA; REES, 2005).

Assim como a condição de hipóxia, a mudança de salinidade também resulta em adaptações fisiológicas nas brânquias. Portanto os genes utilizados em cada ambiente são cruciais para a resistência do organismo a mudanças ambientais (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; ZHU; WANG; YAN, 2013; JONZ *et al.*, 2015). Os genes que codificam as proteínas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, vacuolar ATPase e ATPase-Classe IV-tipo são alguns dos genes ativados por alterações na salinidade (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; SERRANO; HENRY, 2008; SANDBICHLER; EGG, 2011; RAMOS *et al.*, 2013; HUANG; LIN; LIN, 2015a,b; HUANG *et al.*, 2015).

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e o tipo H<sup>+</sup>-vacuolar -ATPase (Vacuolar-type H<sup>+</sup> -ATPase - VHA) são encontrados nos filamentos brânquiais em células ricas em mitocôndrias de peixes e anfíbios (HWANG *et al.*, 1998; UCHIYAMA; KUMANO, 2011). Estes genes são responsáveis pela osmoregulação em peixes e em larvas de anfíbios, através de bombas de sódio e potássio e pela liberação de prótons H<sup>+</sup>, respectivamente. Ensaio de imunolocalização da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e de hibridização *in situ* de RNA mostraram que há expressão entre as lamelas e as porções interlamelares dos filamentos brânquiais (TAKABE; TERANISHI; TAKAKI, 2012). Em condições de alta salinidade ocorre o aumento da expressão de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nas brânquias de peixes, com o objetivo de facilitar a secreção de íons do corpo para o meio externo (D,COTTA *et al.*, 2000; MARSHALL, 2002; RICHARDS, *et al.*, 2003).

A Anidrase carbônica (CA) é outra enzima encontrada nos filamentos brânquiais. A sua principal função é manter o pH do sangue do animal e realizar trocas gasosas, catalisando a conversão de dióxido de carbono e água em ácido carbônico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (ESBAUGH; TUFTS, 2006; GEORGALIS; PERRY; GILMOUR, 2006). Em brânquias de *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), a expressão deste gene foi encontrada no epitélio das lamelas e nos espaços interlamelares. Em ambientes com um alto teor de dióxido de carbono, ocorre o aumento no número de células que expressam este gene (GEORGALIS; PERRY; GILMOUR, 2006).

Como descrito anteriormente, existe uma rede de interação gênica que resulta em adaptações morfológicas e fisiológicas em brânquias de peixes e anfíbios dentro de condições de hipóxia e mudanças de salinidade (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; ZHU; WANG; YAN, 2013; JONZ *et al.*, 2015). Os machos de *L. paradoxa* sofrem um grande estresse devido ao déficit de oxigênio quando estão resguardando os ovos dentro do ninho. Em paralelo a este estresse, filamentos pélvicos crescem e tornam-se mais irrigados por vasos sanguíneos. Neste trabalho, propomos analisar a morfologia e a expressão de marcadores tipicamente associados a função branquial a fim de determinar se os filamentos pélvicos de pirambóias exercem funções análogas a filamentos brânquiais.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Realizar a caracterização morfológica e molecular dos filamentos das nadadeiras pélvicas de *Lepidosiren paradoxa*.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar morfológicamente os filamentos pélvicos através de coloração com hematoxilina e eosina e microscopia eletrônica de varredura (MEV) durante as estações de estiagem e chuvosa;
- Caracterizar o padrão de expressão gênica de genes expressos em filamentos brânquiais, através de PCR em tempo real.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. COLETA DE *LEPIDOSIREN PARADOXA* E AMPUTAÇÃO DAS NADADEIRAS

As coletas foram realizadas com a autorização do SISBIO (Processo N°. 47206-1) e do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE, Processo N°. 037-2015) no município de Breves (1° 41' 33" S e 50° 28' 43" W), localizado na Ilha do Marajó no estado do Pará.

Os espécimes foram transportados para a Universidade Federal do Pará (UFPA) e foram mantidos em tanques de 1.37cm de comprimento, 62cm de largura e 46cm de profundidade. Os machos de *L. paradoxa* foram identificados pela presença de filamentos na nadadeira pélvica na face dorsal. O *n* amostral para os experimentos comparativos entre a estação de estiagem e chuvosa, incluindo análises morfológica e molecular, foi de 11 espécimes no total, sendo 5 na estação de estiagem e 7 na estação chuvosa.

Os espécimes foram anestesiados através da imersão em eugenol (EscamaForte) com 1ml/L em água. Posteriormente cada espécime foi pesado, medido, em seu comprimento total e comprimento das nadadeiras, e fotografado. Em seguida, a nadadeira foi amputada por meio de uma tesoura cirúrgica, podendo ser a nadadeira direita ou a esquerda, e dividida em 5 secções. As amostras para a histologia foram congeladas em cubas de plástico com otimizador de cortes de tecido em baixas temperaturas (*Tissue Tek*<sup>®</sup> Optimal Cutting Temperature Compound - Sakura), e armazenadas à -80°C até serem seccionadas em criostato.

Nadadeiras inteiras foram fixadas com PFA 3% e desidratadas em diluições seriadas de etanol a 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Foram escolhidas porções de 5 milímetros da região dorsal da nadadeira para a medição do comprimento dos filamentos. A medição foi feita a partir da base até a ponta do filamento no microscópio estereoscópico de luz *Nikon SMZ1500*, com auxílio do software *NIS elements* (*Nikon*<sup>®</sup>). Foram feitas 10 medições, sendo 5 de cada lado, posteriormente, foram tiradas médias e o desvio padrão de cada espécime nas diferentes estações.

## 4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Algumas secções foram separadas para a realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Zeiss LEO 1450VP). Após fixação com Karnovski (MEER, 2005) por 24h, as amostras foram incubada duas vezes com tampão fosfato por 30 minutos e desidratadas em diluições seriadas de Etanol a 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100%. Finalizando o procedimento, as amostras sofreram desidratação total através da retirada de liquido das células por meio de ponto crítico com CO<sub>2</sub> e, em seguida, cobertas com uma fina camada de ouro, para a condução dos elétrons no microscópio.

## 4.3. PREPARO PARA HISTOLOGIA

As nadadeiras congeladas com *Tissue Tek*<sup>®</sup> foram retiradas do -80°C e seccionadas no criostato a -20°C a uma espessura de 20µm. Os tecidos foram cortados em planos sagitais aderidos em lâminas *Colorfrost Plus*<sup>®</sup> (*Life Technologies* - Invitrogen) com dois cortes por lâmina. Em seguida as lâminas foram fixadas em PFA 3% por 5 minutos, foram feitas duas lavagens rápidas em PBS 0.01M, foram desidratadas gradualmente em diluições seriadas de Etanol a 70%, 95% e 100% por 2 minutos cada. Por final, as lâminas secaram à temperatura ambiente e armazenadas à -80°C.

Para a coloração com hematoxilina e eosina (HE), as lâminas foram retiradas do -80°C em uma sequência intercalada e deixadas em temperatura ambiente para a secagem. O processo de coloração com Hematoxilina tem a finalidade de corar estruturas ácidas na célula, enquanto que a Eosina cora estruturas básicas. Após a secagem, as lâminas foram coradas por 3 minutos com hematoxilina, foram lavadas por 5 minutos em água destilada e mergulhadas por 30 segundos em eosina. As lâminas foram desidratadas em diluições seriadas de Etanol a 50%, 70% e 95% por 30 segundos e a 100% por 1 minuto, e por fim, 1 minuto em Xilol. A montagem das lâminas foi feita com lamínulas (*Fisherfinest Premium*). As lâminas coradas foram visualizadas em um microscópio estereoscópico *Nikon SMZ1000* e no microscópio óptico de luz *Nikon Eclipse Ci-S/Ci-L*.

#### 4.4. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração do RNA total dos filamentos pélvicos foi realizada com TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies – Ambion) seguindo os passos do fabricante. A amostra que estava no RNALater<sup>®</sup> (Ambion) foi homogeneizada em 1ml de TRIzol<sup>®</sup>, em seguida foi incubada 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 0.2ml de clorofórmio para cada 1ml de TRIzol<sup>®</sup> utilizado e o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos. A amostra permaneceu por 3 minutos em temperatura ambiente e depois centrifugada 12,000 x g (12000 rcf) por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi removida e posta em um outro tubo de 1,5ml. Foram adicionados 0.5ml de isopropanol 100% para 1ml de TRIzol<sup>®</sup> usado na fase de homogeneização. Em seguida foi feita uma incubação de 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugado a 12,000 x g por 10 minutos 4°C. O sobrenadante foi removido e deixado apenas um precipitado de RNA, que foi lavado em etanol a 75% em água tratada com DEPC (Dietilpirocarbonato, SIGMA) para cada 1ml de TRIzol<sup>®</sup>. A amostra foi misturada levemente e centrifugada a 7,500 x g (7500 rcf) por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado secado à temperatura ambiente por 10 minutos. O precipitado de RNA foi ressuscitado em 30µL de água livre de RNase e armazenado a -80°C.

#### 4.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (RT-PCR)

Para análise de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) em tempo real foram extraídos o RNA total com TRIzol<sup>®</sup> (Life Technologies) como descrito anteriormente, do tecido dorsal da nadadeira pélvica do período chuvoso, de estiagem e da nadadeira peitoral em replicata para cada grupo.

Em seguida os RNAs totais foram purificados utilizando o kit RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN) com a DNase I para a remoção de DNA genômico, e a partir do RNA purificado, foi confeccionado o cDNA utilizando o kit SuperScript<sup>®</sup> III *First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen) com 250 ng de RNA. Foram desenhados iniciadores para 11 genes com o auxílio do programa *Primer Express Software* v.2.0 (Applied Biosystems), considerando-se a sequência de cDNA do gene de interesse (CDS + 3' não traduzida), localizando os iniciadores, preferencialmente, entre o códon de

parada e a sequência 3' não traduzida. As sequências de cada iniciador sense e anti-sense estão na tabela 1 (Anexo) e organizadas em categorias de funções metabólicas similares.

A RT-PCR foi realizada com o kit *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante. Para cada 10 µL de reação foram adicionados, 1µL de primeira fita e 1X de *SYBR Green PCR Master Mix* e 2mM dos oligonucleotídeos específicos para cada gene. O gene *Polymerase (RNA) I polypeptide C (PolR1C)* foi utilizado como gene constitutivo, servindo como normalizador da quantidade de primeira fita. As amplificações da RT-PCR seguiram os parâmetros de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C.

O resultado bruto do software do RT-PCR é uma curva logarítmica da intensidade de fluorescência na fase inicial, que se transforma, gradativamente, num platô de saturação. Para determinarmos a quantidade precisa do produto de PCR, é imprescindível que o ponto de medição seja bem determinado. É necessário desconsiderar o sinal inicial, que pode conter fluorescência basal, já que é muito evidente nos ciclos iniciais, antes de haver uma quantidade significativa do DNA amplificado. É baseado nestes ciclos que se determina a linha de fluorescência básica das amostras. O ponto de medição escolhido foi acima da linha de base, ainda na fase logarítmica da curva.

$$\text{Fl. Rel.} = 2^{(\text{CT cont} - \text{CT gene})}$$

Onde:

**Fl. Rel.** é a fluorescência relativa.

**CT cont** é a média de número de ciclos no ponto escolhido do controle.

**CT gene** é a média de número de ciclos no ponto escolhido do gene em questão.

Para a expressão relativa dos experimentos com os controles experimentais, então:

$$\text{Fl. Rel.}_{\text{exp.}} / \text{Fl. Rel.}_{\text{cont.}}$$

Todos os valores são apresentados com médias  $\pm$  erro padrão. Os dados foram analisados usando o teste-*t* pareado e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com  $p < 0,05$ . Todas as análises foram conduzidas no programa GRAPH pad prism (GraphPad software, CA, USA) para o Windows.

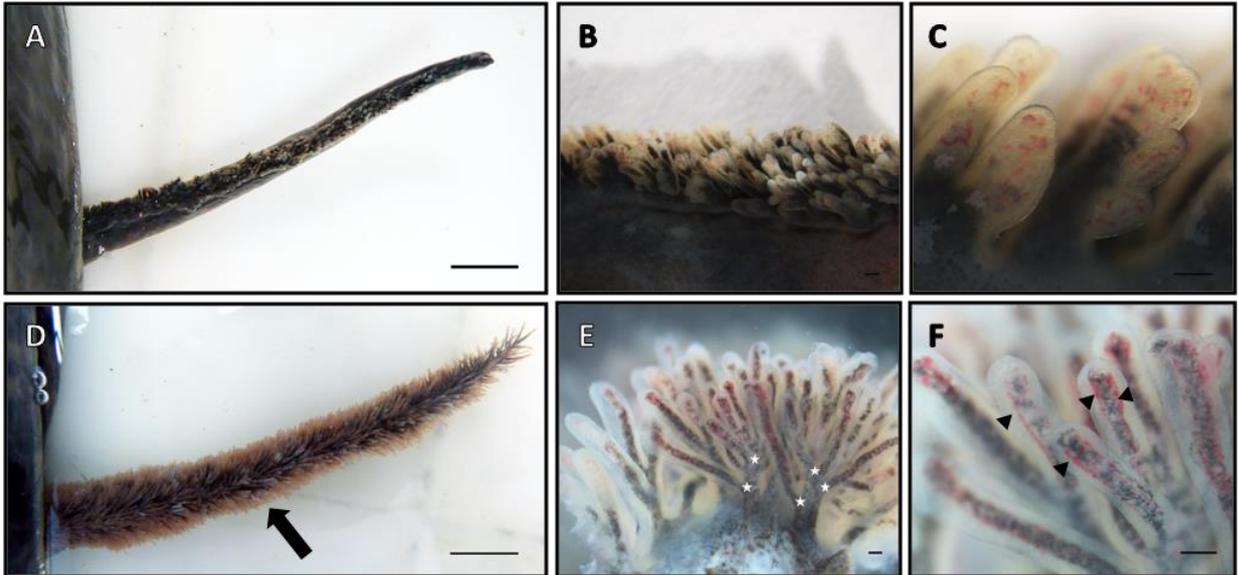
## 5. RESULTADOS

### 5.1. ANALISE MORFOLÓGICA

Os filamentos da nadadeira de *L. paradoxa* encontram-se somente na região dorsal, a maioria possui ramificações com uma superfície simples, ou seja, sem estruturas visíveis por microscopia de luz convencional. As médias de comprimento dos filamentos em cada estação são maiores na estação chuvosa ( $4,31\text{mm}\pm 0,186$ ) do que na estiagem ( $1,63\text{mm}\pm 0,104$ ), consistente com relatos do crescimento desta estrutura no período de chuvas, que coincide com o período reprodutivo da espécie (Tabela 2). Na figura 5 é possível observar a diferença de tamanho entre os filamentos nas estações de estiagem e chuvosa. Na figura 5F é possível visualizar a vascularização dos filamentos.

**Tabela 2:** Média e desvio padrão do comprimento dos filamentos na época de estiagem e chuvosa

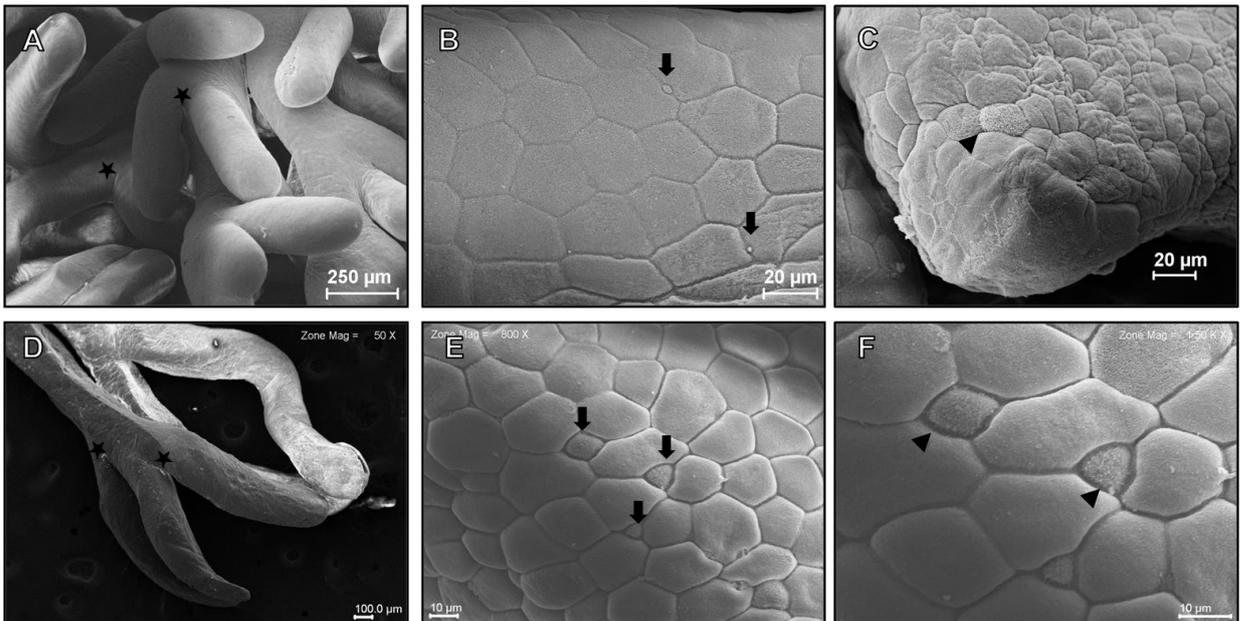
<b>Estação</b>	<b>n (espécimes)</b>	<b>n (filamentos)</b>	<b>Média (mm)</b>	<b>Desvio Padrão (mm)</b>
Estiagem	4	40	1,63	0,104
Chuvosa	3	30	4,31	0,186



**Figura 5:** Morfologia externa da nadadeira pélvica e dos filamentos na estação de seca (A, B e C) e na estação chuvosa (D, E e F). (D) Localização dos filamentos na região dorsal da nadadeira pélvica indicada pela seta. (E) Imagem aproximada dos filamentos, com asteriscos indicando pontos de ramificação. (F) As cabeças de setas indicam os vasos sanguíneos nos filamentos. Escala em A e D é 1cm, B, C, E e F é 500um.

Nas imagens de MEV, observou-se com mais detalhes a morfologia externa dos filamentos, podendo ser visualizado o formato cilíndrico dos filamentos e o poliédrico das células. Também foram observadas nas imagens células menores com um tamanho de 5  $\mu\text{m}$ , localizadas pontualmente entre as células maiores da superfície sendo que algumas possuem microcílios (Figura 6).

As células que possuem os ornamentos na superfície possuem um tamanho de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$  e são semelhantes às células ricas em mitocôndrias presentes nos filamentos brânquiais de peixes. No restante das células de superfície são observadas menos microvilosidades do que as células pontuais descritas anteriormente e possuem o quádruplo do tamanho com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ .



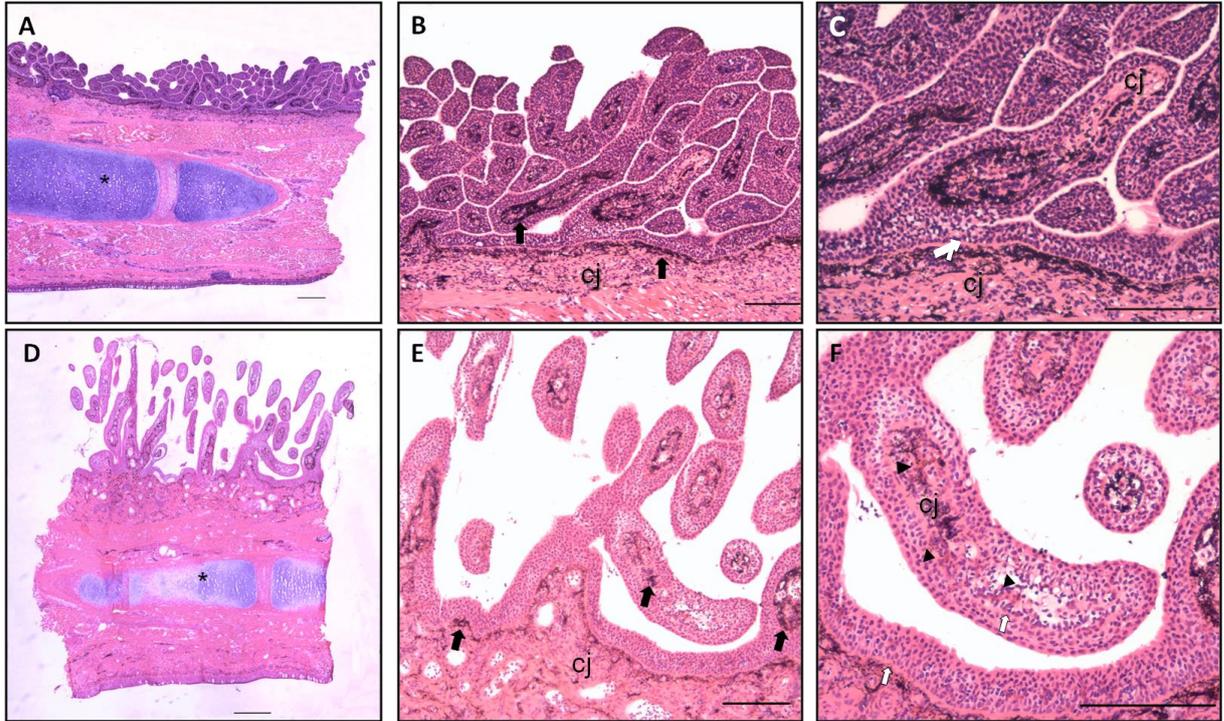
**Figura 6:** Escaneamento por MEV de *L. paradoxa* comparando as estações de estiagem (A, B e C) e da estação chuosa (D, E e F). Na figura A e D está mostrando os pontos de ramificação em estrela. Na figura B e E é possível ver a superfície dos filamentos, mostrando o formato poliédrico das células com pequenas células pontuais entre as maiores mostradas com setas. Na figura D e F é possível ver estruturas de micropapilas ou microciliadas em algumas células pontuais apontadas com cabeça de seta.

Através da análise histológica da nadadeira pélvica e dos filamentos de *L. paradoxa* foi possível observar o esqueleto da nadadeira pélvica formado por vários cilindros cartilagosos unidos por fibrocartilagem (figura 7A e 7D). Cada cilindro possui fibras musculares ligadas, que se estendem em diagonal até o epitélio, formando segmentos que são separados por tecido conjuntivo frouxo.

Também é possível observar uma alta concentração de mucinas na nadadeira e nos filamentos (figura 7B, 7C, 7E e 7F). O epitélio da nadadeira pélvica possui em torno de 10 camadas de células, é do tipo estratificado não queratinizado, sendo prismáticas as células mais próximas ao tecido conjuntivo e a medida que se afastam, tornam-se achatadas. Já nos filamentos da nadadeira pélvica, o epitélio é mais fino com 4 camadas de células, entretanto é preenchido por tecido conjuntivo frouxo, sendo irrigado por vasos capilares que são representados pelos espaços vazios e pelo sangue com coloração alaranjada, apontadas pelas cabeças de seta (figura 7F).

A histologia dos filamentos das pirambóias coletadas na estação de estiagem (figura 7A, 7B e 7C) mostram filamentos menores, com poucos vasos

sanguíneos e sem extravasamento de sangue para o epitélio. Em contrapartida, os filamentos da estação chuvosa (figura 7D, 7E e 7F), que possuem um tamanho maior e uma quantidade maior de vasos sanguíneos, que inclusive entram em contato com a membrana basal (figura 7F), diminuindo o espaço entre a água e os vasos sanguíneos.



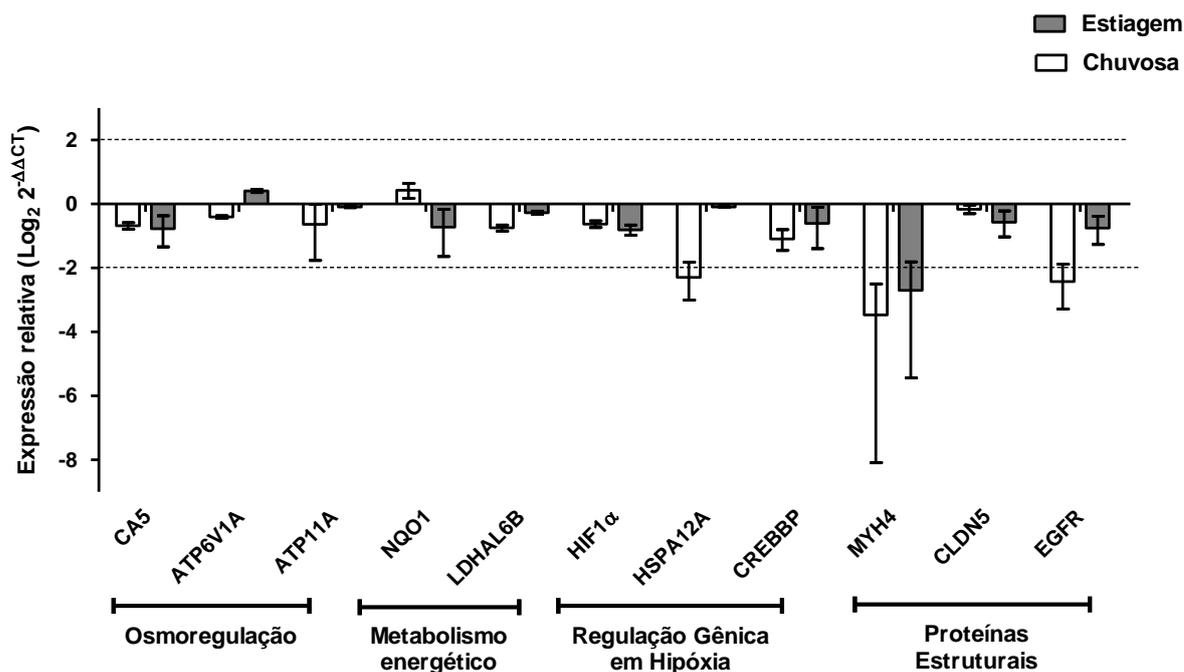
**Figura 7:** Criosecções de lâminas histológicas da nadadeira pélvica com filamentos de macho coradas com HE. A, B e C mostram filamentos da estação de estiação e D, E e F mostra filamentos da estação chuvosa. Os filamentos são formados por um epitélio mais fino que o restante das nadadeiras, constituídos de tecido conjuntivo (cj) e possui uma quantidade grande de mucinas (seta preta). As cabeças de seta mostram os vasos sanguíneos o sangue na figura F, representante da estação chuvosa. Cartilagem: asterisco, seta branca: membrana basal. Escala: A e D tem 1 mm; B, C, E e F tem 500 µm.

## 5.2. ANALISE MOLECULAR

Um total de 11 marcadores associados a fisiologia de brânquias foi selecionado para análise de RT-PCR em filamentos pélvicos. A expressão destes marcadores foi quantificada em biopsias de tecido epitelial contendo filamentos de machos na época de estiagem (quando os filamentos se apresentam com tamanho reduzido) e na época chuvosa (quando os filamentos atingem tamanho máximo). Os valores obtidos foram normalizados usando cDNA extraído de tecido epitelial da nadadeira peitoral, que não possui filamentos.

Os marcadores testados neste estudo foram selecionados com base em estudos envolvendo resposta de brânquias a estresse fisiológico, porém são comumente expressos em filamentos brânquiais de peixes. Portanto, se filamentos pélvicos de pirambóia exercem papel análogo aos filamentos brânquiais de peixes e anfíbios, espera-se que a expressão destes marcadores seja maior em epitélio contendo filamentos versus epitélio comum. Além disso, espera-se também maior expressão destes marcadores em filamentos pélvicos em período chuvoso do que em período de estiagem.

Entretanto, os resultados da RT-PCR demonstram que 8 dos 11 marcadores não apresentam variação significativa (*fold-change* inferior a 2). Além disso, dentre os genes que apresentam valor *fold-change* maior que 2 (HSPA12A, MYH4, EGFR) estes estão sub-expressos em tecido contendo filamentos, quando comparados ao epitélio da nadadeira peitoral (que não contem filamentos). Portanto a maioria dos genes estudados não apresentaram variação nas duas estações quando comparadas com as nadadeiras peitorais, com valores estatisticamente não significativos entre as estações (figura 8; teste-*t* pareado:  $p=0,31$ ).



**Figura 8:** Expressão relativa dos genes em  $\text{Log}_2$  de  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  organizados em categorias de hipóxia, osmoregulação, metabolismo energético e proteínas estruturais em filamentos da nadadeira pélvica de *L. paradoraxa* para as estações de estiagem (barra cinza) e chuvosa (barra branca), representadas pela média e  $\pm$  erro padrão das replicatas. A expressão relativa foi calculada a uma proporção ( $\text{Fl. Rel.}_{\text{exp.}} / \text{Fl. Rel.}_{\text{cont.}}$ ), usando o gene de referência *PolR1C*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. ANÁLISE MORFOLÓGICA

A morfologia e a fisiologia dos filamentos brânquiais da maioria dos peixes e anfíbios são similares e a capacidade de se adaptarem ao ambiente também, como em condição de hipóxia (WILSON; LAURENT, 2002; BRUNELLI *et al.*, 2009). A principal mudança morfológica envolvendo os peixes submetidos em hipóxia é o crescimento dos filamentos branquiais, principal sítio de trocas gasosas. O crescimento dos filamentos ou a redução do tecido entre as lamelas aumenta a área de superfície para a respiração (NILSSON, 2007; BLANK; BURGGREN, 2014). Já é descrito que os filamentos pélvicos de pirambóia, são estruturas que crescem na estação chuvosa, porém a sua real finalidade é obscura, podendo auxiliar os machos em trocas gasosas, ou como uma estrutura para guardar os ovos, assim como é discutido para o sapo *A. robustus* (DEAN, 1913; CUNNINGHAM; REID, 1932; URIST, 1973).

O epitélio de revestimento da estrutura dos filamentos brânquiais possui uma única camada de células, para que a troca de gases entre o ambiente e o tecido seja realizada. As principais células que compõem os filamentos brânquiais são as células pavimentosas (*Pavement Cells* - PVC) e as células ricas em mitocôndrias (*Mitochondrion-Rich Cells* - MRC), que consistem em 90% e 10% no tecido, respectivamente (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005).

Nas imagens de MEV dos filamentos pélvicos de pirambóia, a morfologia externa e espacial das células é distinta quando comparadas com os filamentos brânquiais de peixes e anfíbios. Em filamentos pélvicos, algumas células possuem microcílios, além de pequenas células pontuais, mas em um aspecto geral, pouca informação com relação a ornamentação nas células dos filamentos pélvicos pode ser obtida. Tampouco podem ser observadas as PVCs e as MRCs na histologia com hematoxilina e eosina.

A morfologia da nadadeira de pirambóia foi comparada com filamentos brânquiais do peixe dourado *Carassius auratus* por URIST (1973), que relacionou similaridades entre as lamelas, filamentos; e os elementos cartilagosos. Quando o

autor discutiu a função dos filamentos pélvicos, sugeriu que um experimento de trocas gasosas poderia esclarecer a possível função respiratória. A morfologia dos tecidos da nadadeira de pirambóia é semelhante ao descrito por KING e HALE (2014) para o peixe pulmonado africano *Protopterus annectens*. Os autores discutem que a função deste tipo de morfologia da nadadeira, facilita a flexibilidade e a sustentação do animal no substrato.

A alta vascularização dos filamentos e o contato dos vasos sanguíneos com a membrana basal são indicações da redução da distância entre água e vasos sanguíneos. Estas características são encontradas em peles de peixes da subfamília Oxudercinae, popularmente conhecidos como “*Mudskippers*” ou saltadores da lama, e em lamelas de filamentos brânquiais de jovens *Arapaima gigas* (AL-KADHOMIY; HUGHES, 1988; RAMOS *et al.*, 2013). Entretanto, a espessura do epitélio de filamentos e lamelas brânquiais costumam ser entre 1 a 2 camadas de células para facilitar a difusão de substâncias e trocas gasosas (AL-KADHOMIY; HUGHES, 1988), ao contrário dos filamentos pélvicos de pirambóia que possuem 4 camadas de células, o que pode constituir em uma barreira impeditiva a realização de trocas gasosas.

Portanto, apesar de semelhanças macroscópicas, a análise morfológica dos filamentos da nadadeira pélvica de pirambóia revela importantes diferenças com relação a filamentos brânquiais,

## **6.2. ANÁLISE MOLECULAR**

Para o presente trabalho, foram selecionados alguns genes candidatos descritos na literatura desempenhando papel em hipóxia e na regulação osmótica em filamentos brânquiais, por exemplo, demonstrando um importante papel durante a adaptação em resposta a estresse quanto a mudança de salinidade e de oxigênio (MEER, 2005; GEORGALIS; PERRY; GILMOUR, 2006; HUANG; LIN; LIN, 2015a, 2015b; HUANG *et al.*, 2015). A maioria dos genes analisados em filamentos da nadadeira pélvica apresentaram-se sem variação no padrão de expressão quando comparado ao tecido controle (nadadeira peitoral) em ambas estações.

Os genes selecionados para a análise molecular estão relacionados a estresse de salinidade e de teor de oxigênio em brânquias de peixes e anfíbios e

estão envolvidos em condições rápidas de aclimatação destes animais (GEORGALIS; PERRY; GILMOUR, 2006; GILMOUR; EUVERMAN, 2007; SERRANO; HENRY, 2008; JILLETTE *et al.*, 2011). Apesar dos genes selecionados estarem envolvidos com situações atípicas dando resistência aos animais às novas condições, não foi possível identificar na literatura marcadores estritamente associados ou enriquecidos em filamentos brânquiais, independente da situação de estresse que o animal estivesse.

Condições de estresse promovem picos de expressão em alguns genes, algo que não foi possível observar durante o presente trabalho. Já foi descrito que a expressão do gene *Anidrase carbônica* em brânquias de peixes e caranguejos apresentou uma indução no seu padrão de expressão, mas quando os animais transitavam para um ambiente mais salino houve uma diminuição na expressão (ESBAUGH *et al.*, 2005; CRAIG, 2007; JILLETTE *et al.*, 2011). Esta alteração na expressão gênica serviria como uma aclimatação em organismos que transitam entre condições ambientais adversas, tais como a mudança de pH e de osmolaridade (SERRANO; HENRY, 2008; JILLETTE *et al.*, 2011), condições não observadas neste trabalho.

Os genes *anidrase carbônica*, *V-tipo H<sup>+</sup> ATPase* e *HIF 1-alpha* foram detectados em animais que sofreram estresse fisiológico, mas não foi observado variações na sua expressão (GEORGALIS; PERRY; GILMOUR, 2006; HUANG; LIN; LIN, 2015a,b; HUANG *et al.*, 2015). Em outros genes, por exemplo, *vacuolar ATPase* e *NAD(P)H desidrogenase* houve a inibição das suas expressões, com a finalidade de minimizar a formação de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e o custo energético com enzimas envolvidas no metabolismo, respectivamente (LIN; RANDALL, 1993; LIN *et al.*, 1994; PIERMARINI, EVANS, 2001; SEIDELIN *et al.*, 2001; MEER, 2005; GILMOUR, 2012).

Em geral, a despeito de condições de estresse, os marcadores supracitados devem ser detectados dentro da sua expressão basal ou em picos de expressão em brânquias quando comparada a outros tecidos epiteliais. A não variação da expressão dos genes encontrados neste trabalho ao comparar os filamentos pélvicos entre as estações sugere que os filamentos pélvicos de pirambóia não cumprem um papel respiratório. É possível que estes filamentos tenham papel estritamente estrutural, crescendo durante o período chuvoso (reprodutivo) a fim de servir de substrato para os ovos (KERR, 1900; DEAN, 1913).

Futuros estudos com enfoque em análise fisiológica utilizando métodos modernos para medição de consumo ou liberação de oxigênio podem ajudar a estabelecer se os filamentos pélvicos de pirambóias realizam trocas gasosas. Por fim, uma comparação mais abrangente através de transcriptomas de brânquias de filamentos pélvicos poderá revelar se existem vias gênicas comuns entre estas estruturas. A procura de novas vias gênicas e metabólicas responsáveis pela função de respiração pode auxiliar em caminhos biotecnológicos, como aumentar a resistência de organismos ao um ambiente de hipóxia ou de salinidade através da transgenia.

## 7. CONCLUSÃO

- O comprimento dos filamentos nas estações de estiagem e chuvosa apresentaram diferenças na média e desvio padrão, sendo maiores na estação chuvosa.
- Nas imagens de MEV foram observadas algumas células com microvilosidades e/ou micropapilas e outras de menor tamanho, porém não foram observadas grandes mudanças entre as estações.
- Na histologia com hematoxilina e eosina, foi observada a vascularização e o preenchimento por tecido conjuntivo frouxo, porém uma espessa camada do epitélio dos filamentos dificultaria uma provável osmoregulação ou trocas gasosas.
- Os padrões de expressão relativos da maioria dos genes comuns em filamentos brônquiais não tiveram variação em filamentos da nadadeira pélvica quando comparadas com as nadadeiras peitorais, e não foram significantes entre as estações.
- Quando comparadas todas estas características morfológicas e moleculares com outros órgãos respiratórios, a hipótese de que os filamentos nas nadadeiras pélvicas possuem algum papel de trocas gasosas, sendo ela como consumo de oxigênio, ou a liberação de oxigênio, tornam-se menos evidentes. Valendo a pena ressaltar outras funções para esta estrutura filamentosa, por exemplo, de suporte para os ovos no período reprodutivo

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KADHOMIY, N. K.; HUGHES, G. M. Histological study of different regions of the skin and gills in the mudskipper , *boleophthalmus boddarti* with respect to their respiratory function. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, p. 413–422, 1988.

ALMEIDA-VAL, V. M. F. DE et al. Biology of the South American Lungfish, . In: **The Biology of Lungfishes**. 109. ed. New York: CRC PRESS: [s.n.]. p. 129–147, 2010.

AMEMIYA, C. T. JESSICA ALFOLDI, ALISON P. LEE, SHAOHUA FAN, HERVE PHILIPPE, IAIN MACCALLUM, INGO BRAASCH, TEREZA MANOUSAKI, IGOR SCHNEIDER, NICOLAS ROHNER,CHRIS ORGAN, DOMITILLE CHALOPIN, JERAMIAH J.SMITH, MARK ROBINSON, ROSEMARY A. DORRINGTON, MARCO GERDOL, BRONWEN AKEN, MARIA ASSUNTA BISCOTTI, MARCO BARUCCA, DENIS BAURAIN, AARON M. BERLIN, GREGORY L. BLATCH, FRANCESCO BUONOCORE, THORSTEN BURMESTER, MICHAEL S. CAMPBELL, ADRIANA CANAPA, JOHN P. CANNON, ALAN CHRISTOFFELS, GIANLUCA DE MORO, ADRIENNE L. EDKINS, LIN FAN, ANNA MARIA FAUSTO, NATHALIE FEINER, MARIKO FORCONI, JUNAID GAMIELDIEN, SANTE GNERRE, ANDREAS GNIRKE, JARED V. GOLDSTONE, WILFRIED HAERTY, MARK E. HAHN, ULJANA HESSE, STEVE HOFFMANN, JEREMY JOHNSON, SIBEL I. KARCHNER, SHIGEHIRO KURAKU, MARCIA LARA, JOSHUA Z. LEVIN, GARY W. LITMAN, EVAN MAUCELI, TSUTOMU MIYAKE, M. GAIL MUELLER, DAVID R. NELSON, ANNE NITSCHKE, ETTORE OLMO, TATSUYA OTA, ALBERTO PALLAVICINI, SUMIR PANJI, BARBARA PICONE, CHRIS P. PONTING, SONJA J. PROHASKA, DARIUSZ PRZYBYLSKI, NIL RATAN SAHA, VYDIANATHAN RAVI, FILIPE J. RIBEIRO, TATJANA SAUKA-SPENGLER, GIUSEPPE SCAPIGLIATI, STEPHEN M. J. SEARLE, TED SHARPE, OLEG SIMAKOV, PETER F. STADLER, JOHN J. STEGEMAN, KENTA SUMIYAMA, DIANA TABBAA, HAKIM TAFER, JASON TURNER-MAIER, PETER VAN HEUSDEN, SIMON WHITE, LOUISE WILLIAMS, MARK YANDELL, HENNER BRINKMANN, JEAN-NICOLAS VOLFF, CLIFFORD J. TABIN, NEIL SHUBIN, MANFRED SCHARTL, DAVID B. JAFFE, JOHN H.

POSTLETHWAIT, BYRAPPA VENKATESH, FEDERICA DI PALMA, ERIC S. LANDER, AXEL MEYER & KERSTIN LINDBLAD-TOH. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 311–6, 18 abr. 2013.

AUGUSTO, J. PETER GABERZ KIRSCHNIK, VALTER DA SILVA QUEIROZ, SILVANA MARIS CIRIO. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. p. 469–484, 2010.

BEMIS, W. E. Notes on the Systematics, Distribution and Natural History of the South American Lungfishes in the genus. **Neotropical Ichthyology**, v. 1837, p. 1–27, 2003.

BLANK, T.; BURGGREN, W. Hypoxia-induced developmental plasticity of the gills and air-breathing organ of *Trichopodus trichopterus*. **Journal of fish biology**, v. 84, n. 3, p. 808–26, mar. 2014.

BRUNELLI, E.; E. SPERONE , M. MAISANO & S. TRIPEPI. Morphology and ultrastructure of the gills in two Urodela species: *Salamandrina terdigitata* and *Triturus carnifex*. **Italian Journal of Zoology**, v. 76, n. 2, p. 158–164, jun. 2009.

CASTILLO-BRICENO, P.; KODJABACHIAN, L. *Xenopus* embryonic epidermis as a mucociliary cellular ecosystem to assess the effect of sex hormones in a non-reproductive context. **Frontiers in zoology**, v. 11, n. 1, p. 9, jan. 2014.

COOLIDGE, E. A comparative analysis of putative oxygen-sensing cells in the fish gill. **Journal of Experimental Biology**, p. 1231–1242, 2008.

CRAIG, P. Gill membrane remodeling with soft-water acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiological genomics**, p. 53–60, 2007.

CUNNINGHAM, J.; REID, D. Experimental researches on the emission of oxygen by the pelvic filaments of the male *Lepidosiren* with some experiments on *Symbranchus marmoratus*. **Proceedings of the royal society: biological sciences**, p. 234–248, 1932.

D, COTTA, H; CLAUDIANE VALOTAIRE, FLORENCE LE GAC, AND PATRICK PRUNET. Synthesis of gill Na/K-ATPase in Atlantic salmon smolts: differences in alpha -mRNA and alpha -protein levels. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, p. 101–110, 2000.

DEAN, B. On The Hair-Like Appendages In The Frog *Astylosternus Robustus* (Blgr.). **Bulletin of the Museum of Comparative Zoology**, p. 349–352, 1913.

DHILLON, R. S. et al. Interspecific Differences in Hypoxia-Induced Gill Remodeling in Carp. **Physiological and Biochemical Zoology** v. 86, n. 6, p. 727–739, 2013.

ESBAUGH, A J. et al. Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution. **The Journal of experimental biology**, v. 208, n. Pt 10, p. 1951–61, maio 2005.

ESBAUGH, A. J.; TUFTS, B. L. The structure and function of carbonic anhydrase isozymes in the respiratory system of vertebrates. v. 154, p. 185–198, 2006.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill : Dominant Site of Gas Exchange , Osmoregulation , Acid-Base Regulation , and Excretion of Nitrogenous Waste. p. 97–177, 2005.

FRIEDMAN, M.; COATES, M. I.; ANDERSON, P. First discovery of a primitive coelacanth fin fills a major gap in the evolution of lobed fins and limbs. **Evolution & development**, v. 9, n. 4, p. 329–37, 2007.

FOXON, G. E. H. Pelvic fins of the *Lepidosiren*. **Nature**, V.131, n. 3316, 1993.

GEORGALIS, T.; PERRY, S. F.; GILMOUR, K. M. The role of branchial carbonic anhydrase in acid – base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Experimental Biology**, p. 518–530, 2006.

GILMOUR, K.; EUVERMAN, R. Mechanisms of acid–base regulation in the African lungfish *Protopterus annectens*. **Journal of Experimental Biology**, p. 1944–1959, 2007.

GILMOUR, K. M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 223–30, 1 dez. 2012.

HAN, M.; AN, J.; KIM, W. Expression patterns of Fgf-8 during development and limb regeneration of the axolotl. **Developmental Dynamics**, v. 220, n. 1, p. 40–8, jan. 2001.

HODGKINSON, V. S.; ROLF ERICSSON, ZERINA JOHANSON AND JEAN M. P. JOSS. The apical ectodermal ridge in the pectoral fin of the Australian Lungfish (*Neoceratodus forsteri*): keeping the fin to limb transition in the fold. **Acta Zoologica**, v. 90, n. May, p. 253–263, maio 2009.

HSIA, C. C. W.; ANKE SCHMITZ, MARKUS LAMBERTZ, STEVEN F. PERRY, AND JOHN N. MAINA. Evolution of Air Breathing: Oxygen Homeostasis and the Transitions from Water to Land and Sky. v. 3, n. April, p. 849–915, 2013.

HUANG, C.; HSUEH-HSI LIN, CHENG-HUANG LIN, HUI-CHEN LIN. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A The absence of ion-regulatory suppression in the gills of the aquatic air-breathing fish *Trichogaster lalius* during oxygen stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 179, p. 7–16, 2015.

HUANG, C.; LIN, C.; LIN, H. Comparative Biochemistry and Physiology , Part A Development of gas exchange and ion regulation in two species of air-breathing fish , *Betta splendens* and *Macropodus opercularis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 185, p. 24–32, 2015a.

HUANG, C.; LIN, H.; LIN, C. Effects of hypoxia on ionic regulation , glycogen utilization and antioxidative ability in the gills and liver of the aquatic air-breathing fish

*Trichogaster microlepis*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 179, p. 25–34, 2015b.

HWANG, P. P.; M.J. FANG, J.C. TSAI, C.J. HUANG AND S.T. CHEN. Expression of mRNA and protein of Na<sup>+</sup> -K<sup>+</sup> -ATPase  $\alpha$  subunit in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 363–373, 1998.

J. G. RICHARDS, J. W. SEMPLE, J. S. B. AND P. M. S. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase - isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 24, p. 4475–4486, 15 dez. 2003.

JILLETTE, N.; LAUREN CAMMACK; MARGARET LOWENSTEIN; RAYMOND P. HENRY. Down-regulation of activity and expression of three transport-related proteins in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to high salinity acclimation. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v. 158, n. 2, p. 189–93, fev. 2011.

JONZ, M. G.; LESLIE T. BUCK; STEVE F. PERRY; THORSTEN SCHWERTE; AND GIACOMO ZACCONE. Sensing and surviving hypoxia in vertebrates. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 1–16, 8 maio 2015.

JOSS, J. M. P. Lungfish evolution and development. **General and comparative endocrinology**, v. 148, n. 3, p. 285–9, 15 set. 2006.

KEMP, A. Role of Epidermal Cilia in Development of the Australian Lung. **Journal of Morphology**, v. 228, p. 203–221, 1996.

KENNETH V. KARDONG. Vertebrados - Anatomia Comparada, Função e Evolução. **Editora Roca**, 2014.

KERR J. G. A Naturalist in the Gran Chaco. **Cambridge University Press, Cambridge**. 1950.

KING, H. M.; HALE, M. E. Musculoskeletal morphology of the pelvis and pelvic fins in the lungfish *Protopterus annectens*. **Journal of Morphology**, v. 275, n. 4, p. 431–441, 30 abr. 2014.

LAURENT, PIERRE; DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 238, n. 3, p. 147–159, 1980.

LIN, H. DAVID C. PFEIFFER; A. WAYNE VOGL; JIE PAN AND DAVID J. RANDALL. Immunolocalization of H<sup>+</sup>-atpase in the gill epithelia of rainbow trout. **Journal of Experimental Biology**. v. 183, p. 169–183, 1994.

LIN, H.; RANDALL, D. J. H<sup>+</sup>-atpase activity in crude homogenates of fish gill tissue. **Inhibitor Sensitivity And Environmental And Hormonal Regulation**. v. 174, p. 163–174, 1993.

MARSHALL, W. S. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> Transport by Fish Gills : Retrospective Review and Prospective Synthesis. **Journal of Experimental Biology** v. 283, n. April, p. 264–283, 2002.

MEER, D. VAN DER. Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 289, n. 5, p. 1512–1519, 2005.

NIKINMAA, M.; REES, B. B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. **The American Journal Of Phisiology - Regulatory, Integrative And Comparative Phisiology**, 2005.

NILSSON, G. E. Gill remodeling in fish--a new fashion or an ancient secret? **The Journal of experimental biology**, v. 210, n. Pt 14, p. 2403–9, jul. 2007.

NOBLE, G. K. The integumentary, pulmonary, and cardiac modifications correlated with increased cutaneous respiration in the amphibia: A solution of the “Hairy frog” problem. **Journal of Morphology**, v. 40, n. 2, p. 341–416, 1925.

PETER M. PIERMARINI AND DAVID H. EVANS. Immunochemical analysis of the vacuolar proton-ATPase B-subunit in the gills of a euryhaline stingray (*Dasyatis sabina*): effects of salinity and relation to Na/K-ATPase. **Journal of Experimental Biology**, v. 3259, p. 3251–3259, 2001.

PERRY, S. F.; TYLER SCHWAIGER; YUSUKE KUMAI; VELISLAVA TZANEVA AND MARVIN H. BRAUN. The consequences of reversible gill remodelling on ammonia excretion in goldfish (*Carassius auratus*). **The Journal of experimental biology**, p. 3656–3665, 2010.

ROBERTO E. REIS, SVEN O. KULLANDER, CARL J. FERRARIS, JR. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. **Porto Alegre : EDIPUCRS**, 2003

RAMOS, C. A.; MARISA NARCISO FERNANDES; OSCAR TADEU FERREIRA DA COSTA; AND WALLICE PAXIUBA DUNCAN. Implications for osmorepiratory compromise by anatomical remodeling in the gills of *Arapaima gigas*. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, v. 296, n. 10, p. 1664–75, out. 2013.

JEFF G. RICHARDS; JEFFREY W. SEMPLE; JASON S. BYSTRIANSKY AND PATRICIA M. SCHULTE. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. **The Journal of experimental biology**; 2003

ROMBOUGH, P. Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O<sub>2</sub> uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*. **The Journal of experimental biology**, v. 205, n. Pt 12, p. 1787–94, jun. 2002.

RUIZ-PICOS, R.; LOPEZ-LOPEZ, E. Gill and Liver Histopathology in *Goodea atripinnis* Jordan, Related to Oxidative Stress in Yuriria Lake, Mexico. **Int J Morphol**, v. 30, n. 3, p. 1139–1149, 2012.

SANDBICHLER, A.; EGG, M. Claudin 28b and F-actin are involved in rainbow trout gill pavement cell tight junction remodeling under osmotic stress. **The Journal of experimental biology**, p. 1473–1487, 2011.

SCOTT, G.; RICHARDS, J. Changes in gene expression in gills of the euryhaline killifish *Fundulus heteroclitus* after abrupt salinity transfer. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 4, p. 300–309, 2004.

SEIDELIN, M.; COLIN J. BRAUNER, FRANK B. JENSEN, AND STEFFEN S. MADSEN. Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Expression in Gills of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) during Isolated and Combined Exposure to Hyperoxia and Hypercapnia in Fresh Water Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase Expression in Gills. **Zoological Science**, v. 18, n. 9, p. 1199–1205, 2001.

SERRANO, L.; HENRY, R. P. Differential expression and induction of two carbonic anhydrase isoforms in the gills of the euryhaline green crab, *Carcinus maenas*, in response to low salinity. **Comparative biochemistry and physiology. Part D, Genomics & proteomics**, v. 3, n. 2, p. 186–93, jun. 2008.

TAKABE, S.; TERANISHI, K.; TAKAKI, S. Morphological and functional characterization of a novel Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>-ATPase-immunoreactive, follicle-like structure on the gill septum of Japanese banded houndshark, *Triakis scyllium*. **Cell And Tissue research**; v. 1, p. 141–153, 2012.

UCHIYAMA, M.; KUMANO, T. Immunohistological classification of ionocytes in the external gills of larval Japanese black salamander, *Hynobius nigrescens* Stejneger. **Journal of Morphology**, v. 1024, p. 1017–1024, 2011.

URBINA, M.; MEREDITH, A. The importance of cutaneous gas exchange during aerial and aquatic respiration in galaxiids. **Journal of fish biology**, p. 1–15, 2014.

URIST, M. Testosterone-induced development of limb gills of the lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 1933, 1973.

WILSON, J. M.; LAURENT, P. Fish Gill Morphology : Inside Out. **The Journal of experimental biology** v. 213, n. April, p. 192–213, 2002.

WRIGHT, P. A. Environmental physiology of the mangrove rivulus, *Kryptolebias marmoratus*, a cutaneously breathing fish that survives for weeks out of water. **Integrative and comparative biology**, v. 52, n. 6, p. 792–800, dez. 2012.

ZHU, C.; WANG, Z.; YAN, B. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, n. Table 1, 2013.

## ANEXO

**Tabela 1:** Genes usados na PCR de tempo real agrupados em categorias e com a sequência de iniciadores no sentido 5' - 3'.

Categoria dos genes	Gene amplificado	5' - Primer - 3'
Metabolismo energético	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	Sense: GCAGCAGTTTGTCTCTCATTTTC Anti-sense: AACATGCACAAGATGCAAATGAC
	Lactate dehydrogenase A	Sense: TGCCTCTCCCAGCAGTTTG Anti-sense: GGATTTGACAGATGAGCTTGCA
Osmoregulação	Anidrase carbonica	Sense: GAAGCAGACAGTCTCCGATCAA Anti-sense: AAGGCTTTAGCAGAGGGTCATAGA
	ATPase V	Sense: CATATCGCAGTCACTGTCCAAATT Anti-sense: CGCTCTCCGCAACCTACATAA
	ATPase, class VI, type 11A	Sense: TCGGAGATGGAGCGAATGAT Anti-sense: TTCTTTTCCCATAATGCCTATGC
Regulação gênica em hipóxia	HIF-1alpha	Sense: CCTTGCCTTCCCATTGTTCTAA Anti-sense: GCCTTCTCAACTGGCACATTC
	Heat shock 70kDa protein 12A	Sense: CCAGCGTGTGCCATCTTTG Anti-sense: CTGAATCGATTTATGGAAGAAAAGC
	CREB-binding protein	Sense: TCACGCCGTTTGAGTATCCA Anti-sense: TTGCGACACTGGCAAGCA
Proteínas estruturais	Myosin heavy chain	Sense: AGCTGAAGAACAAGCAAATGCA Anti-sense: CAGCCTCTTCAAGCTCATGTTG
	Collagen, type I, alpha 1	Sense: TGTACCGAACGCTGACTCCTT Anti-sense: CCTCCGTACGCCAGAGA
	Epidermal growth factor receptor (EGFR), transcript variant 1	Sense: TGGCACTGTAATGTTTCCTTCGT Anti-sense: CGGCACCGCCAACAAA

