

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

## CARACTERIZAÇÃO DO PROGRAMA GENÉTICO UTILIZADO NA REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS PAREADAS EM POLYPTERUS SENEGALUS.

# CAMILA TAVARES UCHÔA GUIMARÃES

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

Belém/PA Agosto de 2021

### CAMILA TAVARES UCHÔA GUIMARÃES

# CARACTERIZAÇÃO DO PROGRAMA GENÉTICO UTILIZADO NA REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS PAREADAS EM *POLYPTERUS*. *SENEGALUS*.

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

Belém/PA Agosto de 2021

### CAMILA TAVARES UCHÔA GUIMARÃES

## CARACTERIZAÇÃO DO PROGRAMA GENÉTICO UTILIZADO NA REGENERAÇÃO DE NADADEIRAS PAREADAS EM *POLYPTERUS*. *SENEGALUS*.

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

Orientador: Prof. Dr. Igor Schneider

Data de aprovação \_\_\_\_/\_\_\_/

**Banca Examinadora:** 

Prof. Dr. Igor Schneider Orientador

Prof. Dr. Maria Iracilda da Cunha Sampaio Membro

> Profa. Dra. Patrícia Schneider Membro Externo

Profa. Dra. Louise Neiva Perez Membro Externo

Profa. Dra. Maria Paula Cruz Schneider Membro suplente

# INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Laboratório de Evolução e Desenvolvimento da Universidade Federal do Pará – UFPA Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

### **RESUMO**

A capacidade de regenerar partes corpóreas danificadas ou perdidas é uma característica distribuída variavelmente entre os filos do reino animal, principalmente nos vertebrados. Entre os vertebrados, os peixes da espécie Polypterus senegalus representam um modelo promissor para estudos dos mecanismos de regeneração de apêndices dos vertebrados por regenerarem eficientemente suas nadadeiras pareadas. Contudo, poucos estudos têm explorado compreender os eventos moleculares compartilhados e distintos da regeneração das nadadeiras em *Polypterus*. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que a via de sinalização de *ROS* pode atuar como candidato na ativação dos eventos iniciais da regeneração a partir da modulação vias de sinalização downstream em modelos de regeneração de cauda. Portanto, este estudo tem por objetivo identificar o programa genético utilizado na regeneração de nadadeiras pareadas em Polypterus. O sequenciamento das bibliotecas resultou em aproximadamente 48 milhões de reads por biblioteca com 76% de aproveitamento dos dados brutos. A montagem gerou 157.198 contigs com tamanho médio 922,12 pb e 20.208 contigs N50 com tamanho de 1.907 pb. Foram identificados 652 genes upregulated e 1119 genes downregulated na regeneração dos raios em Polypterus. Apesar de 90.9% dos transcritos semelhantes encontrados na regeneração dos raios e endoesqueleto, o perfil de expressão gênica tem variado consideravelmente entre os programas de regeneração. Os dados sugerem que a regeneração dos raios e endoesqueleto apresentam aspectos únicos com programas genéticos distintos que permitem o sucesso da regeneração entre os compartimentos da nadadeira.

Palavras-chave: regeneração; Polypterus, nadadeiras, transcriptoma.

### ABSTRACT

The ability to regenerate damaged or lost body parts is a characteristic that varies widely among phyla in the animal kingdom, especially in the vertebrates. Among vertebrates, the fish of the species *Polypterus senegalus* represents a promising model for studies of the regeneration mechanisms of vertebrate appendages, due to their high capacity to regenerate paired fins. However, few studies have attempted to uncover the shared and distinct molecular events of fin regeneration in Polypterus. Furthermore, recent studies have demonstrated that the ROS signaling pathway can act as a candidate for the activation of the initial regeneration events via modulation of downstream signaling pathways in tail regeneration models. Thus, this study aims to identify the genetic program used in the regeneration of paired fins in *Polypterus*. Library sequencing resulted in approximately 48 million reads with 76% valid reads from the raw data. The assembly generated 157,198 contigs with an average size of 413 bp and 20,208 N50 contigs with 1,907 bp. 652 upregulated genes and 1119 downregulated genes were identified during fin ray regeneration in the *Polypterus*. Despite 90.9% of similarity among transcripts in the regeneration of fin rays and fin endoskeleton, the profile of gene expression varied considerably between the two regenerative programs. The data obtained suggest that the regeneration of fin rays and fin endoskeleton each present unique aspects, with distinct genetic programs that allow successful regeneration in these fin compartments.

Keywords: regeneration, Polypterus, fins, transcriptome

Sumário				
RESUMO	4			
ABSTRACT	5			
1 INTRODUÇÃO	7			
1.1 Processos de regeneração em vertebrados	7			
1.2 Estruturas das nadadeiras raiadas de Actinopterygii	11			
1.3 O potencial regenerativo dos raios dérmicos nos apêndices pareados	15			
1.4 A produção de espécies reativas de oxigênio	19			
1.5 Os mecanismos da sinalização da via de ROS na regeneração	23			
1.6 Análise de RNA-seq para estudos da regeneração de apêndices	29			
2 HIPÓTESES	31			
3 OBJETIVO GERAL	32			
3.1 Objetivos específicos:	32			
4 MATERIAL E MÉTODOS	33			
4.1 Obtenção e manutenção dos animais	33			
4.2 Inibição farmacológica da via de ROS	33			
4.3 Quantificação da regeneração da nadadeira	33			
4.4 Obtenção RNA total das triplicatas biológicas	34			
4.5 Sequenciamento de mRNA	34			
4.6 Processamento das leituras do sequenciamento	35			
4.7 Montagem do transcriptoma <i>de novo</i>	35			
4 RESULTADOS	36			
4.1 Qualidade dos reads e da montagem do transcriptoma de novo	36			
4.2 Análise do programa genético da regeneração dos raios e endoesqueleto	38			
4.3 Caracterização da via de ROS na regeneração dos raios em Polypterus e Zebrafish40				
5 DISCUSSÃO	46			
6 REFERÊNCIAS	49			

### 1 INTRODUÇÃO

#### 1.1 Processos de regeneração em vertebrados

A regeneração pode ser definida como a restauração coordenada de uma parte perdida ou lesionada do corpo que pode ser encontrada em diferentes processos biológicos (Figura 1). Com base nisso, a regeneração pode ser classificada em níveis de organização biológica com a (i) regeneração do corpo inteiro (por exemplo, Hidra ou Planária), (ii) regeneração estrutural de apêndices (por exemplo, membros de salamandra e nadadeira do zebrafish, também conhecido como paulistinha), (iii) regeneração de órgãos internos (por exemplo,: coração do peixe zebrafish) , (iv) regeneração de tecidos (por exemplo, revestimento intestinal na mosca da fruta do gênero *Drosophila*) e (v) regeneração celular (por exemplo, regeneração de axônios no nematódeo C. *elegans*) (BELY; NYBERG, 2009, MEHTA; SINGH, 2019).

Figura 1 – O processo de regeneração em diferentes níveis biológicos nos organismos vertebrados e invertebrados



Fonte: Adaptado de BELY; NYBERG, 2009.

Os mecanismos básicos da regeneração podem ativar processos de (i) remodelação de tecidos pré-existentes, (ii) proliferação de células-tronco mesenquimais e (iii)

desdiferenciação e/ou trans - diferenciação celular em organismos multicelulares (ALVARADO; TSONIS, 2006).

A regeneração pode restabelecer estruturas idênticas ou semelhantes ao original por meio do desenvolvimento da morfolaxia e epimorfose. A regeneração por morfolaxia promovem a formação de estruturas a partir do remodelamento de tecidos existentes com grau de proliferação limitado ou ausente. A regeneração do tipo epimórfica envolve a proliferação celular e a formação de um blastema composto de células-tronco, células desdiferenciadas e/ou trans-diferenciadas, assim como ocorre na regeneração estrutural dos apêndices em vertebrados (BELY; NYBERG, 2009; AGATA; SAITO; NAKAJIMA, 2007; MEHTA; SINGH,2019; LISMAA et al.,2018).

A regeneração estrutural de apêndices permite o crescimento de um novo apêndice externo e funcional, restaurando completamente estruturas multicelulares que foram perdidas. No processo de regeneração de alguns vertebrados é crucial que após a lesão de um membro, ocorra o processo de cicatrização da ferida e a formação posterior de células desdiferenciadas de tecidos maduros existentes (AKIMENKO *et al*, 2003; CARLSON, 2005; SOUSA *et al.*, 2011).

Conforme Alvaro e Tsonis (2006, p.873), a capacidade de regenerar é uma característica distribuída variavelmente entre os filos do reino animal, principalmente nos grupos de vertebrados. Entre os vertebrados, os anfíbios anuros (girinos de *Xenopus laevis*) e os lagartos podem regenerar quase toda a cauda como estratégia de sobrevivência à predação (CLAUSE; CAPALDI, 2006; JACYNIAK; MCDONALD; VICKARYOUS, 2017; BORODINSKY, 2017; BECK; BELMONTE; CHRISTEN, 2009).

Entretanto, a capacidade de regenerar apêndices pareados (membros ou nadadeiras) completos e anatomicamente funcionais após lesão ou amputação está presente em apenas alguns vertebrados, principalmente nos anfíbios da ordem dos caudados como salamandra e tritões, os peixes ósseos da classe *Actinopterigii* como o *Polypterus senegalus* e zebrafish, e os peixes da classe *Sarcopterigii* dos grupos pulmonados das espécies *Lepidosiren paradoxa* e *Protopterus annectens* (LÉVESQUE *et al.*, 2007; YIN; POSS, 2008; MADEN, 2008; DARNET *et al.*, 2019, PÁPAI *et al.*, 2019; NOGUEIRA *et al.*, 2016).

Entre os anfíbios, o potencial regenerativo da salamandra (*Ambystoma mexicanum*) se destaca pela capacidade de regenerar completamente tanto os apêndices, como tecidos e órgãos internos durante toda a vida (JOVEN; ELEWA; SIMON, 2019). Ao passo que a

regeneração dos apêndices de *Xenopus laevis* só é possível até a metamorfose e, portanto, apresenta um potencial regenerativo limitado (BECK; BELMONTE; CHRISTEN, 2009). Além disso, existem variações da capacidade de regeneração entre anfíbios e mamíferos, uma vez que os mamíferos regeneram parcialmente a falange mais distal dos dígitos e o fígado (CARLSON, 2005; HAN; YANG; TAYLOR, 2005; MEHTA; SINGH, 2019).

A principal razão da limitação da capacidade de regeneração nos seres humanos é oriunda da formação de um tecido cicatricial em vez da recapitulação morfológica e fisiológica, como acontece na regeneração epimórfica dos apêndices de salamandra, onde ocorre a cicatrização da ferida e uma fase de formação de blastema que resulta na restauração completa da estrutura perdida (CARLSON, 2005; HAN; YANG; TAYLOR, 2005).

Uma outra distinção no processo da regeneração na salamandra em comparação com os mamíferos é o papel essencial que o sistema nervoso tem no início do processo da regeneração e na formação do blastema, sendo que os mamíferos não dependem da inervação para a regeneração tecidual inicial (CARLSON, 2005). Além disso, o fígado dos mamíferos se regenera a partir da proliferação dos tecidos existentes e não ocorre a formação do blastema (MEHTA; SINGH, 2019).

Estudos sobre a regeneração de membros em organismo modelo demonstraram que processo regenerativo do membro de salamandra requer vários eventos que são básicos para regeneração epimórfica em vertebrados (Figura 2) (BRYANT, 2002). A primeira fase estabelece uma resposta inicial a lesão com a cicatrização da ferida e a formação de uma camada de células epidérmicas (epitélio da ferida), seguida da inervação do epitélio da ferida para formação posterior da capa epitelial apical. Na segunda fase, surge uma população de células desdiferenciadas, denominada de células mesenquimais do blastema, que proliferam e migram para a ponta apical do blastema. Na terceira fase de reconstrução, inicia-se o crescimento do regenerado com a diferenciação de células do blastema em vários tipos de tecidos (nervoso, ósseo, vascular, muscular, cartilaginoso e outros) na região basal do blastema. No final da regeneração, o membro recém-regenerado substitui completamente o membro original em relação a arquitetura, padrão dos três eixos e a função do apêndice (MCCUSKER; BRYANT; GARDINER, 2015; HAAS; WHITED, 2017).



Figura 2 - Ilustração do processo de regeneração do membro intacto versus regenerado em salamandra

Fonte: MCCUSKER; BRYANT; GARDINER, 2015

Outros estudos evidenciaram uma variação da capacidade de regeneração epimórfica das nadadeiras pareadas ou apêndices pareados em diferentes espécies de peixes da subclasse *Actinopterygii*. Recentemente, demonstrou-se entre os grupos de peixes *Actinopterygii*, um potencial regenerativo no nível do endoesqueleto em nadadeiras de *P. senegalus* (Cladistia), gar (Holostei) e peixe-espátula (Chondrostei). A capacidade de regeneração de nadadeiras foi reportada também em peixes teleósteos, sugerindo que a capacidade de regeneração de apêndices estavam presentes antes da divergência das linhagens de *Actinopterygii* e *Sarcopterygii*. (DARNET *et al.*, 2019; PÁPAI *et al.*, 2019).

Os *Polypteriformes* por serem uma linhagem filogeneticamente basal do *Actinopterygii* representam um modelo promissor para estudos dos mecanismos de regeneração de apêndices dos vertebrados (NIKIFOROVA; GOLICHENKOV, 2012). Semelhante ao observado na regeneração de membros em salamandra, *Polypterus* regenera eficientemente o endoesqueleto dos apêndices pareados como observados no estudo de LU *et al.*, (2019).

Uma das primeiras respostas a lesão na regeneração epimórfica é a inflamação aguda seguida da cicatrização da ferida (GAURON *et al.*, 2013). Sabe-se que o sucesso da formação do blastema depende do epitélio da ferida, capa ectodérmica apical e da inervação que permeia a lesão, o qual é essencial para a progressão da regeneração (SINGER, 1974; WANG *et al.*, 2019, SEIFERT E MUNEOKA, 2018). A cicatrização da ferida tem sido

correlacionada com a inflamação que, por sua vez, está associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), principalmente de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (VLIET; JANSSEN-HEININGER, 2014).

Darnet *et al.*, (2019, p.15110) demonstraram que a via de sinalização ROS pode ser identificada nos estágios iniciais da regeneração a partir ativação de genes correlacionados com resposta inflamatória e ao estresse. Entretanto, são necessários mais estudos que investiguem o papel da via de ROS em modelos de regeneração como *Polypterus* a fim de determinar se esta via consiste em uma resposta regenerativa evolutivamente conservada.

### 1.2 Estruturas das nadadeiras raiadas de Actinopterygii

Os peixes ósseos (*Osteichthyes*) são subdivididos em peixes com nadadeiras raiadas (*Actinopterygii*) ou nadadeira lobadas (*Sarcopterygii*). Os peixes de nadadeira raiadas incluem modelos de biologia regenerativa como o "bichir" de Cuvier (*P. senegalus*) e o zebrafish (*Danio rerio*), enquanto os peixes com nadadeiras lobadas compreendem os grupos pulmonados (*Lepidosireniformes* e *Neoceratodus*) e os celacantos (*Latimeria*) (Figura 5) (YAMAMOTO; BLOCH; VERNIER., 2017).



Figura 5 - Elementos esqueléticos dos apêndices (nadadeiras/membros) de vertebrados

Fonte: Adaptado de AMARAL; SCHNEIDER, 2017.

A colonização do ambiente terrestre pelos primeiros tetrápodes resultou em mudanças significativas na locomoção. Neste processo de transição, as nadadeiras de peixes deram origem ao que hoje conhecemos como membros, resultando na perda dos raios dérmicos e a origem de dígitos (SCHNEIDER; SHUBIN, 2013). Os tetrápodes são filogeneticamente mais próximos aos peixes *Sarcopterygii* e podem ser considerados "peixes" de nadadeira lobada adaptados para vida terrestre (YAMAMOTO; BLOCH; VERNIER *et al.*, 2017).

Os membros dos tetrápodes podem ser divididos em três domínios morfologicamente distintos: estilopódio (ossos longos – úmero ou fêmur), zeugopódio (rádio e ulna ou fíbula e tíbia) e autopódio (ossos do carpo ou tarso, ossos de metacarpo ou metatarsos e falanges) que são ossos do endoesqueleto com ossificação endocondral. Por outro lado, o esqueleto das nadadeiras raiadas de *Actinopterygii* podem ser divididos em dois domínios: domínio radial do endoesqueleto e os raios das nadadeiras do exoesqueleto (Figura 6) (TANAKA, 2016; AMARAL; SCHNEIDER, 2018).



Figura 6 – Domínios morfológicos do membro de tetrápode e nadadeira raiada de Polypterus.

Fonte: Adaptado de AMARAL; SCHNEIDER, 2018; TANAKA, 2016.

O exoesqueleto dos apêndices peitorais não muscularizado é estabilizado por elementos esqueléticos de origem dérmica denominados de raios que estão conectados por meio de ligamentos a uma base endocondral cartilaginosa que geralmente ossifica em Actinopterygii (AKIMENKO et al., 2003; CUERVO et al., 2012; GRANDEL; HULTE-MERKER, 1998).

Ao contrário do membro de tetrápodes, no qual todo o esqueleto é sustentado por ossos endocondrais, o domínio radial do endoesqueleto dos peixes da ordem Polypteriformes é restrito apenas à base da nadadeira (WOOD; NAKAMURA, 2018; GRANDEL e SHULTE-MERKER, 1998). Portanto, os peixes Polypteriformes possuem um esqueleto tribasal composto por três estruturas esqueléticas confinadas na base na nadadeira: (i) protopterígio (anterior), (ii) mesopterígio (meio) e (iii) metapterígio (posterior) que estão articuladas aos pequenos elementos esqueléticos (\*) (CUERVO *et al.*, 2012).

A análise morfológica da estrutura tribasal pode ser observada pela técnica de diafanização que cora a cartilagem em azul com o corante *Alcian blue* e os ossos em vermelho com o corante *Alizarina Red* (Figura 7).



Figura 7 - Morfologia tribasal da nadadeira peitoral de Polypteriformes.

Fonte: adaptado de CUERVO et al., 2012.

Os radiais distais do endoesqueleto da nadadeira articulam-se ao longo do eixo com os raios ósseos ou lepidotríquias (CUERVO *et al.*, 2012). Embora as lepidotríquias e os radiais sejam estruturas ósseas, apresentam mecanismos de desenvolvimento distintos, haja vista que os radiais sofrem ossificação endocondral e os raios das nadadeiras sofrem ossificação membranosa (YANO; TAMURA, 2013).

De acordo com HALL (2005, p.4), os ossos dérmicos se desenvolvem diretamente do mesênquima por ossificação intramembranosa, enquanto os ossos endocondrais se desenvolvem a partir de um modelo de cartilagem pré-formada que será substituído por ossos. COHN *et al.* (2002, p.464) ressaltou que os radiais são formados a partir de

perfurações na placa celular pré-cartilagem com orientação posterior-anterior durante o desenvolvimento da nadadeira peitoral do *Polypterus* (Figura 8). Figura 8 – Formação dos radiais durante o desenvolvimento da nadadeira peitoral.



Fonte: (COHN et al., 2002).

A maior porção do esqueleto da nadadeira raiada corresponde ao exoesqueleto. No exoesqueleto, as lepidotríquias originam-se da base da nadadeira e se estendem distalmente apresentando bifurcações ao longo do eixo proximal-distal (Figura 9), conectando-se aos tecidos circundantes através de ligamentos de colágeno que possibilitam movimentos de flexibilidade e resistência na estrutura da nadadeira (BECERRA *et al.*, 1983).



Figura 9 - Estrutura do exoesqueleto da nadadeira caudal do peixe zebrafish

Fonte: Adaptado de AKIMENKO et al., 2003, KONIG et al., 2019.

As lepidotríquias são predominantemente compostas de matriz óssea calcificada, com exceções das estruturas de actinotríquias que permanecem não mineralizadas na margem distal da nadadeira (PFEFFERLI; JAŹWIŃSKA, 2015; KÖNIG *et al.*, 2019).

Em cada segmento da lepidotríquia, existe um par de hemi-segmentos opostos que são revestidas por uma monocamada de escleroblastos no espaço subjacente à superfície epidermal, semelhantes aos osteoblastos em mamíferos que são responsáveis por depositar matriz óssea durante a regeneração dos raios (AKIMENKO *et al.*, 2003; HALL, 2005).

Em secções longitudinais da nadadeira, observa-se nos raios diferentes tipos tecidos tais como, epidérmico, nervoso, conjuntivo (mesenquimal), ósseos e a presença de vasos sanguíneos. Por outro lado, as regiões de inter-raios são desprovidas de matriz óssea (PFEFFERLI; JAŹWIŃSKA, 2015; AKIMENKO *et al.*, 2003).

### 1.3 O potencial regenerativo dos raios dérmicos nos apêndices pareados

Entre os peixes actinopterígeos, o zebrafish tem sido considerado um organismo modelo do desenvolvimento de apêndices por ser capaz de reconstruir o tamanho e a forma original da nadadeira caudal em aproximadamente três semanas, sendo de fácil manejo para amputações na cauda e alta taxa de regeneração (FIGURA 10) (PFEFFERLI; JAŹWIŃSKA, 2015, KONIG *et al.*, 2018). Além disso, a ampla utilização em estudos de regeneração é proveniente da enorme capacidade de regenerar nadadeiras, tecidos da retina, coração e a medula espinhal (IOVINE, 2007).





Fonte: PFEFFERLI E JAŹWIŃSKA, 2015.

Recentemente, evidenciou-se que a regeneração dos apêndices pareados no zebrafish é regulada diferentemente no exoesqueleto e endoesqueleto. Enquanto o exoesqueleto possui um grande potencial de regeneração, a regeneração do endoesqueleto não é muito eficiente nessa espécie (PÁPAI *et al.*, 2019; GOSS, 1969). Por outro lado, os peixes Polypteriformes possuem a capacidade de regenerar tanto endoesqueleto como o exoesqueleto de suas nadadeiras peitorais (CUERVO *et al.*, 2012).

O exoesqueleto da nadadeira caudal é anatomicamente mais simples por não possuir músculos e cartilagem em comparação aos membros e cauda de anfíbios urodelos (PFEFFERLI E JAŹWIŃSKA, 2015). Entretanto, o processo de regeneração no peixe zebrafish têm eventos semelhantes na maioria dos vertebrados com uma sucessão de etapas: (i) cicatrização da ferida em 1dpa, (ii) formação de um blastema em 3dpa (iii) crescimento regenerativo com a restauração de vasos sanguíneos, tecido nervoso, tecido conjuntivo, epiderme e os elementos esqueléticos da nadadeira (Figura 11) (SOUSA *et al.*, 2011).



Figura 11 - Regeneração do exoesqueleto da nadadeira caudal do peixe zebrafish

Fonte: KÖNIG; JAŹWIŃSKA, 2019; YOSHINARI; KAWAKAMI; RODRIGUEZ ESTEBAN, 2006.

A regeneração do exoesqueleto envolve a cicatrização da ferida a partir da migração de células epidérmicas para o local da lesão (aproximadamente de 6 a 12hpa – horas pós amputação). Entre o primeiro e o segundo dia após amputação (1-2dpa), forma-se uma capa epidérmica apical (CEA) espessa e um tecido mesenquimal (blastema) inicial subjacente a epiderme da ferida (Figura 12). No terceiro dia pós amputação (3dpa), o blastema formado é composto por um *pool* de células desdiferenciadas (fibroblastos e escleroblastos) que proliferaram e migaram ao longo do eixo proximal-distal. A partir do quarto dia pós amputação (4dpa), as células mesenquimais na zona proximal respondem aos sinais de re-diferenciação tecidual para restabelecer estruturas ausentes, enquanto as células mesenquimais na zona mais distal permanecem desdiferenciadas e não-proliferativas. É possível observar características de re-diferenciação tecidual com estabelecimento da pigmentação de estruturas ósseas na nadadeira caudal em 6dpa (Figura 10-B). Nos estágios avançados, o crescimento se prolonga rapidamente em direção distal até atingir o tamanho original da nadadeira (PFEFFERLI; JAŹWIŃSKA, 2015; NECHIPORUK; KEATING, 2002; AZEVEDO; SOUSA; JACINTO, 2012; BECERRA, 1996).

Figura 12 – Eventos sequenciais da regeneração dos raios dérmicos da nadadeira caudal.





Fonte: Adaptado de BECERRA et al., 1996.

Os escleroblastos são células secretoras de matriz óssea dérmica que se alinham próximo a membrana basal da lepidotríquia em dois domínios laterais, e contribuem para o crescimento do hemisegmento. Sabe-se que os sinais de padronização permitem que as células precursoras de escleroblastos se diferenciem e proliferem durante a regeneração dos raios dérmicos (BECERRA *et al.*, 1996; NECHIPORUK; KEATING, 2002; SMITH *et al.*, 2006).

As interações entre inúmeras vias de sinalizações envolvidas na regeneração podem regular os eventos iniciais da organização do epitélio da ferida e a formação do blastema durante a regeneração de apêndices (PFEFFERLI E JAŹWIŃSKA, 2015; WEHNER; WEIDINGER, 2015). Evidências sugerem que as vias de sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina, FGF e BMP são necessárias para promover a regeneração adequada dos apêndices, entretanto, pouco se sabe sobre os sinais moleculares iniciais que atuam na cascata de sinalização da regeneração (SMITH *et al.*, 2006; POSS; SHEN; NECHIPORUK, 2000; KAWAKAMI; RODRIGUEZ ESTEBAN, 2006).

Os fatores transcricionais expressos no início da regeneração podem ser localizados em domínios proximais e distais na camada basal da epiderme da ferida por meio da modulação da via de sinalização FGF e Wnt. O fator transcricional lef1 (via Wnt canônica) assemelha-se ao padrão de expressão do *sonic hedghog* (SHH) nos subtipos celulares epidérmicos proximais que orientam eventos mesenquimais do blastema subjacente, enquanto os subtipos celulares distais que expressam wnt5b e pea3 atuam limitando a regeneração. Tem sido postulado que a sinalização de FGF regula positivamente e negativamente a sinalização da via Hedgehog (Hh) mantendo a expressão de SHH na epiderme proximal e restringindo a sua expressão na epiderme distal por meio da via FGF/Ras com a indução da expressão de pea3 e wnt5b (STOICK-COOPER *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2009; POSS *et al.*, 2000; POSS; KEATING; NECHIPORUK., 2003).

Apesar das vias de sinalização Wnt/β-catenina, FGF, Hh, ácido retinóico (RA) e BMP desempenharem importantes papéis durante a regeneração (ROMERO *et al.*, 2018), tem sido destacado que a via de ROS pode atuar como candidato na ativação dos eventos iniciais da regeneração, modulando outras vias de sinalização *downstream*, tais como Wnt/βcatenina e FGF em modelos de estudo de regeneração da cauda (CHEN; LOVE; AMAYA, 2014; LOVE *et al.*, 2013; ROMERO *et al.*, 2018). Além disso, os níveis de ROS podem desencadear estímulos para apoptose e ativar a via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) envolvidos tanto no crescimento e morte celular durante a regeneração (GAURON *et al.*, 2013, SON *et al.*, 2013).

### 1.4 A produção de espécies reativas de oxigênio

As principais espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês) intracelulares descritas são: o ânion superóxido ( $^{\circ}O_2^{-}$ ), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila ( $^{\circ}OH$ -). As ROS são produzidas pela reação reduzida do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) resultando na formação do radical  $^{\circ}O_2^{-}$  reativo (DRÖGE, 2002). O radical  $^{\circ}O_2^{-}$  é rapidamente convertido a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante o processo de dismutação catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD, sigla em inglês) e, desta maneira exibe uma meia vida mais curta em comparação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ARNHOLD e FLEMMING,2010). Posteriormente, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser convertido para o  $^{\circ}OH^{-}$  pela reação de Fenton (LIN; WUPUTRA; YOKOYAMA, 2018).

As fontes produtoras de ROS estão localizadas em organelas, que incluem (i) mitocôndria, (ii) peroxissomos, (iii) retículo endoplasmático e (iv) fagossomos. Por outro lado, as ROS podem também ser produzidas a partir de ciclos de reações das oxidases e oxigenases (HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014; LIN; WUPUTRA; YOKOYAMA, 2018).

As enzimas oxirredutases podem produzir ROS como subproduto de uma reação oxidativa específica ou de uma variante disfuncional da enzima, como xantina oxidase e ciclooxigenase (SEDEEK *et al.*, 2013). Identificaram-se várias outras enzimas produtoras de ROS intracelular em células de mamíferos, tais como lipoxigenase (KUKREJA *et al.*, 1986), enzima do citocromo P450 (PUNTARULO; CEDERBAUM, 1998), óxido nítrico sintases (POU *et al.*, 1992), xantina oxidase (BERRY; HARE, 2004) e principalmente a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (ZAFARI; USHIO-FUKAI; AKERS,1998).

A NADPH oxidase é a principal produtora de ROS a partir da subunidade de NOX localizada na membrana celular que desencadeia ativação localizada da rede sinalização redox (DICKINSON; CHANG, 2012; EWALD, 2018). A subunidade NOX (gp91phox) é um complexo proteico transmembrana ligante da NADPH oxidase que geralmente produz superóxido ( $O_2^{-}$ ) (KUČERA *et al.*, 2015), mas acredita-se que NOX também pode ser ativado pela molécula de ROS (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011).

Atualmente, existem sete isoformas de NADPH oxidase (NOX 1-5, Duox1-2) que diferem em relação a subunidade de proteínas de ligação ao complexo, distribuição tecidual, localização intracelular e a formação de ROS (Figura 13) (SEDEEK *et al.*, 2013, KONIOR *et al.*, 2014).

Ao contrário das isoformas NOX 1-4, NOX5 e DUOX1-2 independem da subunidade p22phox para atividade da enzima NAPDH oxidases (AMEZIANE-EL-HASSANI; MORAND; BOUCHER,2005; TOUYZ; BRIONES; SEDEEK, 2011). As isoformas NOX5 e DUOX apresentam um domínio *EF-He* de ligação ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ) intracelular para sua ativação. Entretanto, somente a DUOX1-2 contém um domínio de peroxidase adicional (KAWAHARA; QUINN; LAMBETH, 2007; DE FARIA e FORTUNATO, 2020).

A subunidade reguladora de NOX denominada de p47phox (NOXO1) requer associação com outros componentes reguladores que incluem o p67phox (NOXA1), p40phox e Rac2 para ativação do complexo NOX2/p22phox (CHENG *et al.*, 2001; BÁNFI *et al.*, 2003). A proteína p47phox (NOXO1) ativada liga-se a subunidade p22phox atuando como adaptadora para permitir associação da p67phox (NOXA1) ao complexo transmembrana NOX1-2 (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).



Figura 13 - Estrutura das isoformas de NADPH oxidase na membrana celular

**Fonte:** Adaptado de BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014; ALTENHÖFER *et al.*, 2015.; DE FARIA; FORTUNATO, 2020.

Somente o complexo NOX3 pode ser ativado pela p47phox na ausência de subunidades reguladoras (CHENG; RITSICK; LAMBETH, 2004). A atividade da NOX4, por sua vez, depende fortemente da subunidade p22phox tornando-se ativa constitutivamente na ausência de cofatores regulatórios (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).

Em contrapartida a produção de ROS por NADPH oxidases (NOXs), acredita-se que os complexos I (coenzima NADH) e III (citocromo c peroxidase) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial contribuem para produção de ROS na mitocôndria (mtROS), seja como subproduto do metabolismo oxidativo ou como componentes envolvidos em vias de resposta imune, inflamação e apoptose (DAN DUNN *et al.*, 2015; HOLMSTROM; FINKEL, 2014).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (ETC, sigla em inglês) contém quatro complexos multiproteicos (complexos I-IV) e uma série de transportadores de elétrons específicos que incluem principalmente as flavoproteínas (NADH) e citocromos envolvidos no estado redox (LIU; FISKUM; SCHUBERT, 2002). O complexo I (NADH) produz 'O<sub>2</sub><sup>-</sup> exclusivamente na matriz mitocondrial, enquanto o complexo III na matriz ou no espaço intermembranar (SENA; CHANDEL, 2012).

Diferentes inibidores da via de ROS têm sido utilizados em vários experimentos *in vitro* e *in vivo* para avaliar o seu papel em diversos processos biológicos ou patológicos. O Difenileno iodônico (DPI, sigla em inglês *diphenyleneiodonium*) tem sido frequentemente utilizado para inibir a formação de ROS mediada pela enzima NOX da membrana plasmática e da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (LI; TRUSH *et al.*,1998). Além disso, o DPI é considerado um fármaco inibidor de flavoproteínas inespecífico por bloquear a produção de ROS de várias outras enzimas que contêm flavina, como citocromo P450 redutase,pea óxido nítrico sintase (NOS), xantina oxidase (WIND *et al.*, 2010; KIRCHNER *et al.*, 2012, LI; TRUSH *et al.*,1998).

De acordo com Li e Trush *et al.*, (1998), evidências sugerem que o DPI é um potente inibidor da respiração mitocondrial em células intactas por reduzir a produção de superóxido através do bloqueio da atividade do complexo mitocondrial I (NADH - ubiquinona oxidoredutase). Um estudo de Kirchner *et al.*, (2012, p.5) demonstrou que o DPI reduz fortemente a produção intracelular de ROS em neutrófilos isolados e incubados em comparação a outros inibidores.

O DPI inibiu fortemente todas as isoformas de NOX em ensaios celulares (JAQUET *et al.*, 2011, AUGSBURGUER *et al.*,2019). Um outro fármaco inibidor de ROS, VAS2870, inibiu todas as isoformas de NOX, exceto NOX-3, sugerindo que todas as isoformas apresentam características comum, mas não compartilhadas por NOX-3 (AUGSBURGUER *et al.*,2019).

Entretanto, as desvantagens do DPI são em relação a falta de especificidade e toxicidade *in vivo*, levando a efeitos inespecíficos durante a exposição de longo prazo. Portanto, sugere-se que o uso do DPI pode ser mais adequado para experimento *in vitro* com um prazo curto de incubação (JAQUET *et al.*, 2011; JAQUET *et al.*, 2009)

O mecanismo de ação do DPI atua na aceitação de um elétron do FAD que forma um radical que se liga de forma covalente e irreversível com o FAD (AUGSBURGUER *et al.*,2019). Em contraste, o VAS2870 modifica o agrupamento tiol de resíduos de cisteínas por alquilação que estão identificados no receptor de rianodina (RYR1) e, além disso,

modifica diretamente o tiol da subunidade p47phox do complexo NOX (Figura 14) (BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014).

Atualmente, o fármaco VAS3947 é o novo derivado do VAS2870 com mais solubilidade, bloqueando a atividade da NADPH oxidase em baixas concentrações e não interferindo nas atividades de outras flavoenzimas, como a xatina oxidase e óxido nítrico-sintase endotelial (WIND *et al.*, 2010)

Figura 14 – Sítios de ação de fármacos inibidores da via ROS.



Fonte: Adaptado de BRANDES; WEISSMANN; SCHRÖDER, 2014.

### 1.5 Os mecanismos da sinalização da via de ROS na regeneração

Acreditava-se que ROS era apenas um subproduto prejudicial do metabolismo no desenvolvimento de diversas condições e complicações patológicas. Porém, tem-se relatado um papel de ROS na homeostase celular para a ativação de vias de sinalização e fatores transcricionais *downstream* envolvidos em diferentes processos biológicos (DRÖGE, 2002; KÜLTZ, 2005).

A produção de ROS mediada pela NADPH oxidase atua na modulação de diversas vias de sinalização intracelular sensíveis ao redox. Os mecanismos de sinalização redox dependem da intensidade e duração do sinal, podendo ativar o processo de reparação tecidual, proliferação celular, diferenciação e migração ou promover a apoptose (JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). Além disso, ROS pode afetar diretamente a sinalização de quinases modificando resíduos específicos de cisteínas (Cys) dependentes de redox (GIANNONI *et al.*, 2005; HOLMSTRÖM; FINKEL, 2014).

Os níveis intracelulares de ROS têm sido correlacionados ao potencial regenerativo das células-tronco durante a homeostase celular. Acredita-se que níveis basais de ROS permitem o equilíbrio entre a saída da quinescência e a diferenciação celular. Contudo, o acúmulo dos níveis moderados de ROS podem induzir a senescência pela via MAPK p38 e comprometer a regeneração. Já o acúmulo de níveis altos de ROS resulta em apoptose (TA; SUDA, 2018). Dessa forma, os níveis regulados de ROS podem sensibilizar a diferenciação e o destino das células progenitoras hematopoiéticas através da via JNK (OWOSU-ANSAH; BANERJEE, 2009).

Um estudo em *Drosophila* mostrou que a injúria tecidual na asa induz níveis de ROS necessários para a promoção da regeneração. No tecido lesionado, as células proximais que recebem altos níveis de ROS sofrem apoptose, enquanto células distais ao local da lesão que apresentam níveis mais baixos de ROS respondem a atividade regenerativa. Os autores demonstram que altos níveis de ROS ativam a via quinase Ask1 (pró-apoptótica) em células próximas a lesão, enquanto células distais recebem níveis inferiores de ROS e respondem com uma atenuação da via Ask1 (pro-regenerativa) necessária para estimular p38 e ativar parcialmente a via JNK (SANTABÁRBARA-RUIZ *et al.*, 2019).

Diversos outros estudos têm investigado o papel da via de sinalização de ROS durante o processo da regeneração epimórfica em diferentes organismos modelo, como salamandra (AL HAJ BADDAR; CHITHRALA; VOSS, 2018), zebrafish (YOO *et al.*, 2012; ROMERO *et al.*, 2018; GAURON *et al.*, 2013; MEDA *et al.*, 2016) e *Xenopus* (Tabela 1) (FERREIRA *et al.*, 2018; LOVE *et al.*, 2013).

No modelo larval de zebrafish, a injúria tecidual promove liberação de ATP, causando uma elevação do cálcio intracelular (Ca<sup>+</sup>) que ativa o complexo DUOX para a produção de  $H_2O_2$ . A produção  $H_2O_2$  atraem leucócitos para ferida e ativa uma família quinase Src (SFK) Lyn que funciona como um sensor redox nos leucócitos (ROEHL, 2018). A inibição transitória de ROS 1 (uma) hora após a lesão (hpl) diminuiu a atividade de SFKs no epitélio e prejudicou a regeneração tardia em 72hpl (YOO *et al.*, 2012).

A produção de ROS pode ser sustentada durante o processo de regeneração da nadadeira caudal do peixe zebrafish adulto (GAURON *et al.*, 2013). Neste estudo, o ROS pode estabelecer duas vias independentes (apoptose e JNK) para a proliferação compensatória das células epidérmicas no tecido regenerativo, funcionando como vias *downstream* de ROS. A inibição de ROS impactou na expressão de fatores de pluripotência

de células-tronco, como o fator klf4 e deiodinase 3 (dio3). Além disso, teve impacto na redução de fgf20 e sdf1 e aumento de gf2b e wnt10a semelhante à inibição por apoptose. Enquanto o estudo de ROMERO *et al.* (2018, p.4) demonstrou que a inibição de ROS reduziu a expressão de *ptch1*, *raldh2*, *tcf7* e *pea3* após a amputação da cauda na fase larval do zebrafish.

Durante a regeneração da caudal do girino *Xenopus*, a produção de  $H_2O_2$  induzida pela amputação sustentou a ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina por 24 horas. A inibição de ROS impactou na redução da expressão do Fgf20 que resultou na diminuição da regeneração da cauda. Portanto, as vias de sinaliza Wnt/ $\beta$ -catenina e FGF podem funcionar como vias de ativação *dowstream* a produção de ROS (CHEN; LOVE; AMAYA., 2014). Foi observado que a sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina pode ser modulada por ROS a partir de uma proteína Nrx (Nucleoredoxina) (FUNATO *et al.*, 2006).

A sinalização redox via ROS e fator indutível por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) tem um papel essencial na regulação da proliferação celular durante o desenvolvimento inicial da regeneração (COFFMAN; SU, 2019). Sabe-se que o HIF1 $\alpha$  é responsivo em condições de hipóxia e essa condição impede sua hidroxilação pela HIF prolil hidroxilase (HPH) evitando sua degradação (PAPANDREOU *et al.*, 2006). Foi reportado que ROS intracelular pode regular negativamente a degradação de HIF1 $\alpha$  por inibir a atividade da HPH, e assim, permitir seu acúmulo no núcleo para ativação de seus genes alvos (KIM *et al.*, 2006; SEMENZA *et al.*, 1996; GREER *et al.*, 2012).

A produção sustentada de ROS por 24 hpa são necessárias para regeneração da medula espinhal e cauda de embriões axolote. O tratamento com 4  $\mu$ M de DPI diminuiu significativamente os níveis de ROS em 24hpa em comparação ao controle. Já o tratamento com DPI por 3dpa impactou na redução da regeneração. Além disso, observaram que a atividade de NOX afeta a mitose celular na medula espinhal e da epiderme da cauda de axolote, sugerindo que ROS possa ter genes alvos envolvidos na proliferação celular (AL HAJ BADDAR; CHITHRALA; VOSS, 2018).

Portanto, ROS parece funcionar como uma via que coordenar uma rede de sinalização redox que ativa genes de proliferação e diferenciação celular para uma regeneração inicial eficiente. Contudo, os mecanismos responsáveis por essa coordenação durante o processo inicial da regeneração de nadadeiras em modelos adultos ainda não foram esclarecidos.

Espécies	Apêndices	Inibidor de ROS	Resultados	Conclusões	Referência
Embriões de axolote (Estágio 42)	Cauda	VAS2870 (5μM) DPI (4μM)	Os níveis de ROS foram mantidos por 24hpa, mas diminuíram a níveis basais entre 2dpa a 7dpa. Somente embriões tratamento com DPI (4µM) por até 3dpa apresentaram diminuição significativa da regeneração da cauda e medula em 7dpa.	A sinalização de ROS é necessária para a regeneração da cauda de axolote com importante papel na proliferação celular durante a fase inicial da regeneração.	AL HAJ BADDAR; CHITHRALA; VOSS, 2018
Larvas de Zebrafish	Cauda	DPI (100µM)	O pré-tratamento com DPI iniciando 1 hora antes e terminando 1 hora após a lesão, prejudicou a regeneração tardia em 3dpa. Larvas tratadas com DPI por 2 hpl prejudicou a atividade de SFK no epitélio da ferida, demonstrando que a inibição da sinalização de ROS e SFK prejudica a proliferação do blastema durante a regeneração.	A sinalização de ROS, SFK e cálcio induzida pela lesão é necessária para regeneração epimórfica na nadadeira caudal do zebrafish. Além disso, SFK (Lyn) atua como um receptor para sinalização de ROS.	YOO et al., 2012
Larvas de Zebrafish	Cauda	DPI (100-150µM)	O tratamento com 150 $\mu$ M de DPI iniciando 1 h antes da excisão até 1 hpe é suficiente para reduzir a regeneração em 50%. A expressão de <i>ptch1</i> , <i>ihhb</i> , <i>raldh2</i> , <i>tcf7</i> e <i>pea3</i> induzida pela ferida é reduzida após o tratamento com DPI. A inibição de SFK diminui a expressão dos transcritos <i>ptch1e ihhb</i> .	As interações regulatórias mediadas por ROS têm funções específicas durante a regeneração da cauda. A sinalização de ROS/SFK pode atuar <i>upstream</i> às vias Hedgehog, FGF, Wnt/β-catenina e RA.	ROMERO et al., 2018

Tabela 1 – Os principais estudos da via de sinalização de ROS na regeneração de apêndices

Zebrafish adulto	Cauda	DPI (1µM) VAS2870 (1µM)	O tratamento com VAS2870 reduziu significativamente a produção de ROS com impacto no tamanho do regenerado em 72hpa. Houve redução da expressão do fator <i>klf4, dio3, Fgf20 e sdf1</i> e aumento de igf2b e wnt10a em 18hpa. A inibição de ROS também reduziu a proteína P-JUN (via JNK) e do número de células apoptóticas.	A sinalização de ROS atua <i>upstream</i> as duas vias paralelas distintas envolvidas na indução de apoptose e ativação da via JNK. Ambos os eventos atuam impactam nas vias Wnt, SDF1 e IGF, enquanto a apoptose afeta apenas a expressão do marcador progenitor.	GAURON et al., 2013
Zebrafish adulto	Cauda	VAS2870 (1µM)	A denervação reduziu os níveis de ROS no plano da amputação a 17hpa, inibindo a capacidade regenerativa da nadadeira caudal em 3dpa. O tratamento HH-i (ciclopamina) reduziu os níveis de ROS as 16hpa, enquanto o tratamento com VAS2870 reduziu o número de células Shh positivas em 48hpa e o crescimento dos axônios durante a regeneração.	Os nervos periféricos controlam os níveis de ROS que por sua vez, regulam o crescimento dos nervos durante a regeneração. Além disso, ROS influenciam na via de sinalização hedgehog cooperando para o crescimento e coordenação da inervação na regeneração.	MEDA et al., 2016
Larvas de zebrafish	Cauda	DPI (100µM) VAS2870 (20µM)	O tratamento com DPI e VAS2870 reduziu significativamente a produção de ROS ( $H_2O_2$ ) na ferida após lesão. A inibição de ROS atenuou o recrutamento de leucócitos durante a resposta inicial a lesão. O <i>knockdown</i> DUOX reduziu significativamente a produção de $H_2O_2$ e o número de leucócitos recrutados para nadadeira caudal após a lesão.	A produção de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mediada pela DUOX é necessária para o recrutamento rápido de leucócitos na ferida.	NIETHAMMER <i>et al.</i> , 2009
Girinos de Xenopus	Cauda	DPI (2µM) APO (200µM)	O Tratamento com DPI e APO por 3dpa reduziu significativamente os níveis de ROS em 12hpa, resultando no	A produção de ROS induzida por amputação é necessária para sinalização de da via Wnt/β-catenina, contribuindo	LOVE et al., 2013

		MCI (200µM)	comprometimento da regeneração da cauda em 7dpa. Houve diminuição da expressão de fgf20 (alvo da via Wnt/β- catenina) nos girinos tratados com inibidores.	para o início do programa de regeneração da cauda dos girinos de <i>Xenopus</i> .	
Girinos de <i>Xenopus</i>	Cauda	DPI (1µM) Trolox (350 µM)	O tratamento com DPI em girinos (st. 40-41) diminuiu significativamente o influxo de $O_2$ em 6hpa e 24hpa, resultando no aumento (0-31%) de fenótipos com inibição da regeneração em 7dpa. O tratamento com inibidor da ligação de HIF-1 $\alpha$ ao DNA por 15minpa demonstrou aumentos dos fenótipos com inibição da regeneração em 7dpa. Entretanto, os girinos refratários (st.45-46) tratados com DMOG (20 $\mu$ M) resultou na diminuição da frequência de fenótipos com inibição da regeneração (33-7%). O tratamento com DPI reduziu significativamente a hipóxia e os níveis de HIF-1 $\alpha$ em comparação ao controle.	HIF-1α é necessária e suficiente para induzir a regeneração, sugerindo como candidato <i>downstream</i> da via de ROS.	FERREIRA et al., 2018

DPI: Inibidor difenileno iodônico; dpa: dia pós amputação; SFK: família de tirosina quinase Src; FGF: fator de crescimento fibroblástico; RA: ácido retinóico; JNK: c-Jun N-terminal cinase; SDF1: fator derivado do estroma da medula óssea; IGF: Fator de Crescimento Insulínico; HIF-1a: fator induzível por hipóxia-1a; DMOG: Inibidor dimethyloxallyl glicina.

### 1.6 Análise de RNA-seq para estudos da regeneração de apêndices

O sequenciamento de RNA (RNA-seq) tem proporcionado uma variedade de aplicações tecnológicas com diferentes estratégias de análise de dados que dependem do delineamento da pesquisa. Pode-se utilizar os dados de RNA-seq para análise de expressão gênica e identificar novos transcritos expressos a partir do perfil de transcriptoma anotado ao genoma de referência, como o genoma humano (CONESA *et al.*, 2016, HRDLICKOVA; TOLOUE; TIAN, 2017).

O transcriptoma refere-se ao conjunto de transcritos que incluem os RNA mensageiro (mRNA), RNAs não codificantes (ncRNA) e pequenos RNA (sRNA) que podem ser quantificados em níveis de expressão em determinados organismos, tecidos e células sob diferentes condições que proporcionam compreender os eventos regulatórios que ativam determinados programas biológicos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

A abordagem transcriptômica por RNA-seq tem sido utilizada para identificação de padrões de ativação de genes e vias de sinalização envolvidas em diferentes fases ou condições da regeneração em muitos organismos (COLAK *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2016; DARNET *et al.*, 2019). Em salamandra, os dados do transcriptoma puderam oferecer informações de sequência gênica completa de 88% dos genes do genoma de axolote (BRYANT *et al.*, 2017). De acordo com o estudo de SHI *et al.*, 2020, análise de sequenciamento de mRNA permitiu a identificação de 71 genes reguladores precoces da regeneração de nadadeiras do peixe zebrafish.

Usando essa abordagem, foi possível sugerir genes candidatos a efetores da memória posicional da nadadeira caudal em zebrafish adulto. A memória posicional é recapitulação de propriedades espaciais do tecido não lesado requerendo que as células regulem a proliferação de acordo com esse padrão durante a regeneração. Neste estudo, os dados de RNA-seq possibilitaram a identificação de sete fatores de transcrição tais como *dlx5a*, *dlx6a*, *meisla*, *msxla*, *hoxbl13a*, raraa e *lmxlbb* envolvidos na padronização de apêndices em desenvolvimento (RABINOWITZ et al., 2017).

DARNET *et al.* (2019), com base na análise comparativa do RNA-seq demonstraram que o blastema de 3dpa do *Polypterus versus* salamandra compartilham um programa genético semelhante durante os estágios iniciais da regeneração com uma lista de 194 genes específicos da regeneração encontrados entre ambos os blastemas. Além disso, o enriquecimento do conjunto de genes específicos compartilhados na regeneração está associado a várias vias de sinalização, principalmente a sinalização da via de ROS. Em outro estudo, também foram encontrados genes que codificam moléculas de sinalização das vias de FGF, SHH e BMP que estão envolvidas na regeneração e durante o desenvolvimento embrionário (KATOGI *et al.*, 2004)

Além disso, a abordagem molecular pode ajudar a elucidar os mecanismos intrínsecos ao desenvolvimento esquelético dos raios dérmicos para ossos endocondrais em tetrápodes. Haja vista que as alterações esqueléticas foram observadas na transição de nadadeiras de peixes para membros tetrápodes durante a evolução dos apêndices (WOOD; NAKAMURA, 2018).

Recentemente, tem-se buscado compreender com estudos da regeneração o perfil de expressão gênica durante os eventos iniciais da regeneração nos apêndices pareados de organismos modelo de desenvolvimento que integram a classe *Actinopterygii*. No entanto, poucos estudos têm explorado compreender os eventos moleculares compartilhados e distintos da regeneração endocondral *versus* raios dérmicos em *Polypterus senegalus*.

# 2 HIPÓTESES

- O programa genético dos raios e endoesqueleto empregam mecanismos moleculares distintos durante a regeneração de nadadeira pareadas em *Polypterus senegalus*
- A via de sinalização de ROS tem um papel na regeneração de nadadeira pareadas em *Polypterus senegalus*

### **3 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o programa genético utilizado na regeneração de nadadeiras pareadas em *Polypterus senegalus*.

### **3.1** Objetivos específicos:

- Identificar o programa genético do endoesqueleto e raios dérmicos na regeneração de apêndices pareados em *Polypterus* a partir da análise de transcriptoma;

- Analisar o papel da via de ROS na regeneração de apêndices pareados em Polypterus.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e manutenção dos animais

Os peixes *Polypterus senegalus* juvenis (5-8 cm) e os zebrafish foram obtidos em lojas de aquarismo autorizadas e armazenados em instalações adequadas do Laboratório de Evolução e Desenvolvimento (LED)/UFPA. Os animais foram mantidos em tanques individuais no equipamento com sistemas de filtragem da água e alimentados duas vezes por dia. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as determinações do comitê de ética em pesquisa com animais de experimentação da Universidade Federal do Pará (protocolo no. 037-2015).

#### 4.2 Inibição farmacológica da via de ROS

Os animais foram anestesiados em solução Tricaína 0,1 % para amputações a nível do exoesqueleto (raios) na nadadeira peitoral do *Polypterus* e nadadeira caudal do peixe zebrafish. Após o procedimento, os animais recuperados da anestesia foram transferidos para o recipiente com 150 ml da droga.

Utilizamos dois grupos de tratamento: o grupo controle e o grupo tratado. No grupo controle, utiliza-se o veículo dimetilsulfóxido (DMSO) a 0.10% que foi o diluente utilizado para preparar a solução estoque do inibidor diphenyleneiodonium (DPI). No grupo tratado, o DPI (#D2926, Sigma) foi diluído a uma concentração estoque de 20uM para preparação de alíquotas e armazenado em freezer -80°C. Durante o experimento, os animais foram mantidos no escuro e retornarão à luz por 2 hora para alimentação e renovação do fármaco.

Devido a toxicidade do fármaco DPI com 4 $\mu$ M por três dias, realizamos curvas de dose de 2 $\mu$ M de DPI por 3dpa (dias pós amputação) e 4 $\mu$ M por três horas antes da amputação até 2dpa para caracterizar a via de ROS na regeneração de nadadeira pareadas em *Polypterus*. Em zebrafish, foi utilizada curva de dose 1 $\mu$ M por 3dpa de acordo com estudo de Gauron *et al.* (2013).

### 4.3 Quantificação da regeneração da nadadeira

A regeneração do exoesqueleto de nadadeiras peitorais e caudal foi monitorada por meio de fotografias na câmera Canon EOS SL2 em diferentes estágios da regeneração. Posteriormente, realizamos a medida a área da superfície do blastema em milímetros quadrado (mm<sup>2</sup>) subsequentemente dividida pelo comprimento do plano de amputação ao

quadrado de cada peixe de acordo com estudo de Gauron *et al.* (2013). As imagens da área regenerada foram medidas utilizando o software ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/).

#### 4.4 Obtenção RNA total das triplicatas biológicas

A extração de RNA total por *TRIzol Reagent (Life Tecnologies)* foi realizada a partir de triplicatas biológica de apêndices pareados dos raios e do endoesqueleto em *Polypterus*. Portanto, foram realizadas amputações bilaterais dos raios (3 amostras composta de 4 tecidos dos raios) com blastema em 3dpa e 0dpa (tecido maduro) e do endoesqueleto (3 amostras composta 8 tecidos do endoesqueleto) do blastema em 3dpa e 0dpa (tecido maduro). O painel mostra as amputações dos raios de nadadeira em *Polypterus* para obtenção de triplicatas biológica (Figura 15). Posteriormente, as amostras biológicas foram quantificadas (ng/µl) em espectrofotométrico Biodrop (Biochrom).



Figura 15 – Painel obtidos das amostras coletadas durante a regeneração dos raios da nadadeira em Polypterus

escala 4mm

Fonte: Laboratório de evolução e desenvolvimento - UFPA

### 4.5 Sequenciamento de mRNA

O sequenciamento de mRNA do endoesqueleto de nadadeira pareadas em *Polypterus* foi realizada de acordo com o estudo de Darnet et al., 2019. As bibliotecas para o sequenciamento de RNA dos raios foram construídas a partir de triplicatas biológicas com 1µg de RNA total de acordo com protocolo da Illumina *TruSeq*® *Stranded mRNA* sample e adaptadores *Illumina TruSeq*® *single indexes set A*. As bibliotecas foram quantificadas utilizando kit de ensaio Qubit<sup>TM</sup> e os fragmentos foram analisados pelos ensaios

d1000 screentape (Agilent Technologies). As amostras foram sequenciadas em 4 canaletas ("lanes") pela plataforma Illumina Nextseq 500/550 com 150 ciclos de modo *paired-end* e com *reads* de tamanho 2x75 pares de base (pb) de comprimento. O *output* do sequenciamento foi desmultiplexado utilizando o software bcl2fastq para identificação das corridas que geraram 48 arquivos no formato FastQ.

### 4.6 Processamento das leituras do sequenciamento

Os relatórios das análises de qualidade das leituras foram realizados pela ferramenta FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) antes e após o processamento das *reads* pelo software *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014). Os dados brutos obtidos do sequenciamento foram processados pelo software *Trimmomatic* para remoção das bases de baixa qualidade e das sequencias de adaptadores da *Illumina TruSeq* utilizados durante o sequenciamento de acordo com os parâmetros informados: Utilizou-se HEADCROP:11 para remover 11 bases de baixa qualidade no início da sequência, MINLEN 50 para eliminar *reads* com comprimento abaixo de 50 pares de base (pb), ILLUMINACLIP: Truseq3-PE.fa:2:30:10 para remoção dos adaptadores da Illumina e SLIDINGWINDOW:4:20 para retiradas de bases com escore inferior a Q < 20 *phred* com leitura em intervalos intercalados de quatro base.

#### 4.7 Montagem do transcriptoma de novo

A montagem *de novo* das sequências foi realizada pelo software *Trinity* com tamanho mínimo de *contigs* de 200pb e cobertura k-mer3(GRABHERR *et al.*, 2011). A qualidade da montagem foi avaliada pelas ferramentas *assembly-stats* e BUSCO (SIMÃO *et al.* 2015) com banco de dados de metazoários. A anotação das sequências montadas por similaridade foi realizada utilizando a ferramenta BLASTX ((cut-off de 1e-3) no banco de dados proteoma humano (Homo Sapiens GRCh38). O mapeamento das *reads* contra o transcriptoma montado foi realizado pela plataforma CLC Bio Genomics Workbench (Qiagen) para análise de expressão gênica diferencial, no qual utilizou-se as estatísticas de transcritos por milhão (TPM, do inglês *transcripts per million*) e a variação na expressão (FC, do inglês *fold change*). Os genes *upregulated* tiveram valores de *p-value* ajustado FDR < 0.05 e FC  $\geq$  2, enquanto os genes *downregulated* tiveram valores de *p-value* ajustado FDR < 0.05 e FC  $\leq$  -2.

### **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Qualidade dos reads e da montagem do transcriptoma de novo

A plataforma da Illumina Nextseq 500/550 gerou um total 292.620.100 *paired-end reads* brutas com 75pb de comprimento que representa aproximadamente 48 milhões de *reads* por biblioteca. A análise de qualidade do sequenciamento pelo FastQC. foi realizada antes (pré-processamento) e depois (pós-processamento) da trimagem. No pós-processamento foi obtido total de 228.974.777 *reads* de alta qualidade com um aproveitamento de aproximadamente 76% dos dados brutos (Tabela 2).

Condição	Pré-processamento	Pós-processamento	Aproveitamento
Amostra	N° Sequências	Nº Sequências	Valor (%))
Ps_u1_cat_r1.fastq	42657981	34072447	80%
Ps_u2_cat_r1.fastq	55151714	43606890	79%8
Ps_u3_cat_r1.fastq	38903526	30279869	78%
Ps_3d1_cat_r1.fastq	44818930	34005301	76%
Ps_3d2_cat_r1.fastq	56379532	43845660	78%
Ps_3d3_cat_r1.fastq	54708417	43164610	79%

Tabela 2 – Análise de qualidade das sequências antes e depois da trimagem

A análise estatística da montagem foi realizada *assembly-stats* que avalia a quantidade de transcritos, o tamanho dos *contigs*, o conteúdo de GC das sequências e o *contigs* N50 (Tabela 3). A análise qualitativa da montagem gerou 157.198 *contigs* com tamanho médio 922,12 pb e 20.208 *contigs* N50 com 1.907 pb. O N50 corresponde estatística média ponderada dos todos os *contigs* de modo que 50% dos transcritos montados apresentam valores iguais ou maiores que o comprimento N50 do *contig* (FERNANDES, 2015).

Valor
201
24.499
922,12
1.278,25
413
1.907
157.198
38.451
20.208
144.955.433
97.790.820
41,9%

Tabela 3 - A análise estatística da montagem realizada pelo Assembly - Stats

O controle de qualidade da montagem foi realizado utilizando o BUSCO (do inglês, *Benchmarking Universal Single Copy Orthologs*) com banco de dados Metazoa (Tabela 4). A ferramenta BUSCO fornece medidas quantitativas da integridade da montagem do transcriptoma a partir da identificação de genes de grupos órtologos conservados de cópia única. O banco de dados BUSCO identificou 954 genes ortólogos, sendo 77,9 % de genes de cópia única e 98,5 % estavam completos na montagem. Entretanto, foram identificados 2 genes fragmentados e apenas 1,3 % dos genes ortólogos não foram encontrados ou estão incompletos.

BUSCO	Ν	%
Genes completos	940	98,5
Genes completos de cópia única	743	77,9
Genes completos de cópia duplicada	197	20,6
Genes fragmentados	2	0,2
Genes perdido	12	1,3

### 4.2 Análise do programa genético da regeneração dos raios e endoesqueleto

Um estudo em colaboração com os pesquisadores do Instituto de Hidrobiologia da Academia Nacional de Ciências da China (LU *et al.*, 2021) investigou os fundamentos morfológicos e moleculares dos programas de regeneração dos raios e do endoesqueleto em *Polypterus* adultos e juvenis. Os nossos dados em colaboração foram referentes aos dados de transcriptoma dos raios e do endoesqueleto do grupo de *Polypterus* juvenis e, portanto, serão os dados discutidos nessa dissertação.

No total, foram identificados 652 genes *upregulated* e 1119 genes *downregulated* nos raios das nadadeiras em *Polypterus* (Figura 17– A). Entre as vias super-representadas, a análise de enriquecimento de ontologia gênica do grupo de genes *downregulated* demonstrou associação com especificação do destino celular epidérmico e a regulação negativa da extensão de axônio, enquanto os grupos de genes *upregulated* foram associados ao processo de biossíntese de L-serina e ao complexo passageiro dos cromossomos.





Fonte: LU et al., 2021.

De todos os transcritos analisados no diagrama de Venn, 90.9% dos transcritos são compartilhados entre o programa de regeneração dos raios e endoesqueleto. Além disso, a análise da via de KEGG (do inglês, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)* demonstrou que grande parte dos transcritos e vias de sinalização dos raios também estão envolvidas na regeneração do endoesqueleto das nadadeiras, tais como sinalização de WNT, TGF $\beta$  e spliceossomos. Enquanto 9.1% dos transcritos foram encontrados somente no blastema dos raios e estavam correlacionados com as vias de sinalização do metabolismo do ácido araquidônico e a biossíntese da aminoacil-tRNA (Figura 17 – B).

Ao comparar os níveis de expressão de um conjunto de 745 genes que foram comumente expressos no blastema dos raios *versus* endoesqueleto obteve-se uma correlação moderada (Figura 18-A). Por outro lado, ao avaliar um conjunto de aproximadamente ~50 genes envolvidos na regeneração do endoesqueleto, observou-se uma diferença significativa no perfil de expressão gênica dos raios *versus* endoesqueleto embora exista semelhanças morfológicas entre os programas de regeneração (Figura 18-B). Esses dados sugerem que apesar de encontrarmos um número considerável de transcritos compartilhado entre os dois programas de regeneração, o perfil de expressão gênica tem variado entre a regeneração dos raios e do endoesqueleto em *Polypterus*.



Figura 18 – Correlações do perfil de expressão gênica entre os programas de regeneração em animais juvenis



Fonte: LU et al., 2021.

Outra a comparação subsequente foi realizada com um conjunto de aproximadamente ~ 50 genes envolvidos na regeneração do endoesqueleto, no qual foram encontrados uma baixa correlação na comparação entre a regeneração dos raios *versus* nadadeira de peixe pulmonado e membros de salamandra (18 – C, D), sugerindo que há diferenças no perfil de expressão gênica que proporciona o processo de regeneração em cada espécie.

No estudo de transcriptoma de Darnet *et al.* (2019, p.15110) foi demonstrado um conjunto compartilhado de genes no blastema de 3dpa em *Polypterus* e salamandra que permitiu a identificação de várias vias de sinalização envolvidas na regeneração, principalmente a via de ROS, que foi enriquecida nos estágios iniciais da regeneração do endoesqueleto de nadadeiras de *Polypterus* e, portanto, foi selecionada pelo nosso grupo para investigar o papel de ROS na regeneração dos raios em *Polypterus*.

### 4.3 Caracterização da via de ROS na regeneração dos raios em Polypterus e Zebrafish

O estudo de Gauron *et al.* (2013) foi o único até o presente momento que avaliou o papel das ROS induzida por lesões no exoesqueleto da nadadeira caudal em peixes zebrafish adulto. O grupo submeteu os animais ao tratamento com inibidores farmacológicos da via de ROS, tais como VAS2870 e DPI, e demonstrou efeito na redução do tamanho do regenerado em 3dpa. Deste modo, iniciamos os estudos reproduzindo os experimentos com

DPI em zebrafish adulto conforme o estudo de Gauron *et al.* (2013) para validar os resultados experimentais com o fármaco.

No nosso estudo, os peixes zebrafish (n=12) foram amputados no exoesqueleto da nadadeira caudal para o tratamento com DMSO (grupo controle) e DPI (grupo tratado). No grupo controle utilizou-se 0.1% de DMSO e no grupo tratado utilizou-se 1 $\mu$ M de DPI por 3dpa (Figura 18-A).

Figura 18 - Inibição da via de ROS na regeneração da nadadeira caudal em zebrafish adulto.



Fig. 18 – (A) Esquematização do desenho experimental com a janela de tratamento do DPI. (B) Imagens da regeneração no exoesqueleto da nadadeira caudal do zebrafish adulto no grupo controle e tratado com 1 $\mu$ M de DPI nos estágios 3dpa e 6dpa. A linha pontilha azul representa o plano de amputação. Escala = 2mm Foi possível observar alterações da morfologia do tecido regenerado ao final do tratamento com DPI (n=6/12) em relação ao controle (n=5/12) em 3dpa (Figura 18-B), com *p-value* = 0.05696 (Figura 19-A). Vale ressaltar que um integrante do grupo DMSO morreu durante a execução do experimente. Entretanto, uma vez não sendo mais exposto ao tratamento com DPI, houve crescimento progressivo da regeneração em 6dpa (Figura 18-B).





Apesar dos estudos com DPI demonstrarem um efeito na redução da regeneração de apêndices em organismos modelos, o efeito do DPI no estudo foi observado em apenas alguns animais do grupo tratado em 3dpa (Figura 18-B). Portanto, são necessários mais experimentos com aumento da concentração do DPI para confirmar o efeito da inibição de ROS sobre a regeneração dos raios. Vale ressaltar que no estudo de Gauron *et al.* (2013), optou-se por utilizar o inibidor VAS2870 para dar continuidade aos experimentos, visto que o fármaco parece ser mais específico para inibição da NADPH oxidase.

No estudo em *Polypterus*, foram realizados experimentos com curvas de dose de  $2\mu$ M e  $4\mu$ M de DPI em diferentes janelas de tratamentos, ajustando de acordo com a toxicidade do fármaco. Alguns animais tratados com  $4\mu$ M de DPI por mais de dois dias não suportaram o tratamento, enquanto os tratados por até dois dias sobreviveram ao experimento. Além disso, foi observado que durante os experimentos os animais que já foram tratados anteriormente com DPI não sobreviveram aos novos testes com o fármaco.

Os *Polypterus* tratados com 2µM de DPI (n=6/12) foram incubados por 3dpa para analisar se a sinalização de ROS é necessária para o sucesso da regeneração dos raios (Figura 20-A). Entretanto, não foi observado diferenças entre os tratados com DPI e Controle

(n=6/12), possivelmente porque a regeneração não progrediu o suficiente em 3dpa (Figura 20-B).



Figura 20 - Inibição da via de ROS na regeneração dos raios em Polypterus

Devido à alta toxicidade com 4 $\mu$ M de DPI, os animais foram tratados por um período mais curto de até 2dpa para evitar a letalidade durante o experimento com o fármaco. Yoo *et al.*, (2012) demonstrou que o pré-tratamento com DPI iniciando 1 horas antes e terminando 1 hora após a lesão inibiu a regeneração da cauda em larvas de zebrafish em 3dpa. Portanto, definiu-se um experimento de tratamento com 4 $\mu$ M de DPI por 3 horas antes da amputação (-3hrs) até 2dpa para avaliar o efeito da inibição de ROS no início da regeneração dos raios entre os estágios 9dpa e 15dpa (Figura 21).

Figura 21 - Inibição de ROS na regeneração dos raios em Polypterus com DPI de 4µM



A)

Fig.21-(A) Esquematização do desenho experimental com a janela de tratamento do DPI. (B) Imagens da regeneração dos raios do *P. senegalus* no grupo controle e tratados com 4 $\mu$ M de DPI nos estágios de 9dpa e 15dpa. A linha pontilha cinza representa o plano de amputação. Escala = 4mm.



No experimento, os animais (n=6) foram amputados no exoesqueleto da nadadeira peitoral e submetidos ao tratamento com DMSO (n=3/6) e com 4 $\mu$ M de DPI (n=3/6), contudo um integrante do grupo DPI que já havia sido tratado com o fármaco em outro momento não resistiu ao tratamento. Portanto, foram analisados os resultados da área regenerada no grupo controle (n=3/6) e grupo DPI 9 (n=2/6).

A inibição com DPI revelou uma variação na área regenerada dos raios em 9dpa, em razão das diferenças no plano de amputação dos animais. No entanto, um animal do grupo tratado teve diminuição da regeneração em relação ao grupo controle, com recuperação progressiva da regeneração em 15dpa (Fig.21-B).

Em vista disso, o número amostral não foi o suficiente para avaliar se existem diferenças significativas (*p-value* 0.9044) entre os grupos tratados com DPI e controle (Figura 22). Em contrapartida, um estudo de regeneração da cauda em embriões de axolote mostrou que o tratamento de 4µM de DPI por até 2dpa não teve efeito inibitório sobre a regeneração da cauda, entretanto ao estender a janela de tratamento por mais de 3 dias os animais morreram (AL HAJ BADDAR; CHITHRALA; VOSS, 2018). Deste modo, observa-se que a concentração de 4uM do DPI é altamente tóxica para o animal, sendo necessário realizar diversos testes com ajustes de dose para evitar toxicidade do fármaco durante os experimentos. Além disso, são necessários o aumento do número amostral para avaliar melhor o impacto da inibição de ROS na regeneração dos raios.



Figura 22 - Análise quantitativa da área regenerada da nadadeira peitoral em Polypterus

## 5 DISCUSSÃO

O fenômeno da regeneração em espécies animais é caracterizado pela restauração de uma parte danificado do corpo que pode restabelecer estruturas idênticas ou semelhante ao original. Apesar da regeneração ter sido evidenciada em diferentes espécies de animais do grupo de vertebrados, existem diferentes habilidade de regeneração entre as espécies com uma diversidade de respostas regenerativas entre órgãos, estágios do desenvolvimento e filogenia (SEIFERT; VOSS., 2013; YOSHIDA *et al.*, 2020). Devido à alta diversidade da capacidade regenerativa, os peixes têm sido utilizados como modelo promissor para estudos sobre a evolução da regeneração de nadadeiras (SAFIAN; WIEGERTJES; POLLUX, 2021).

Os peixes teleósteos como o peixe zebrafish (*Danio rerio*) apresenta uma notável capacidade de regenerar o exoesqueleto da nadadeira caudal e por isso tem sido considerado um organismo modelo para estudos de regeneração pela facilidade de manipulação e alta taxa de regeneração (HOU et al.,2020, MARQUES; LUPI; MERCADER., 2019). Apesar da alta capacidade regenerativa do peixe zebrafish, um estudo recente sobre regeneração de apêndices pareados tem mostrado que a regeneração do endoesqueleto em peixes teleósteos não é tão eficiente quanto na regeneração do exoesqueleto, sugerindo que a regeneração é regulada diferencialmente entre o endoesqueleto e exoesqueleto de apêndices pareados (PÁPAI et al.,2019). Já em um estudo de Yoshida et al. (2020) foi observado pouca resposta regenerativa de partes endoesqueléticas em modelos de zebrafish adultos (YOSHIDA et al.,2020).

Apesar do endoesqueleto e raios dérmicos (exoesqueleto) das nadadeiras serem estruturas ósseas, o processo de desenvolvimento é distinto, haja vista que os radiais do endoesqueleto sofrem ossificação endocondral de forma semelhante aos tetrápodes e, portanto, apresentam homologia com membro de tetrápode. Enquanto os raios sofrem ossificação membranosa e não compartilham homologia com estruturas endoesqueléticas do membro de tetrápode (YANO; TAMURA, 2013). Isso sugere que o programa genético dos raios e endoesqueleto podem empregar mecanismos moleculares distintos durante a regeneração de apêndice pareado em *Polypterus senegalus*.

A abordagem de análise de comparativa do transcriptoma do blastema do endoesqueleto de nadadeiras em *Polypterus versus* salamandra (tetrápode) forneceu várias informações sobre ativação de genes e vias de sinalização envolvidas nos estágios iniciais

da regeneração de apêndices pareados. Além disso, foi demonstrado que a regeneração do endoesqueleto de apêndices pareados em *Polypterus* versus salamandra compartilham o programa genéticos semelhante durante os estágios iniciais da regeneração (DARNET et al., 2019).

No estudo de Darnet *et al.*, (2019) foram identificados 3.554 genes *upregulated* e 705 genes *downregulated* no blastema do endoesqueleto em *Polypterus*, enquanto o nosso estudo de transcriptoma dos raios foram identificados 652 genes *upregulated* e 1119 genes *downregulated*. Foi observado no nosso estudo uma diferença significativa no perfil de expressão gênica dos raios *versus* endoesqueleto embora exista um número considerado de transcritos compartilhados entre os programas de regeneração dos raios e endoesqueleto. Isso sugere que a regeneração dos raios e endoesqueleto apresentam aspectos únicos que permitem o sucesso da regeneração.

A análise de enriquecimento de ontologia gênica (GO, do inglês gene ontology) do processo de regeneração do endoesqueleto revelou que os grupo de genes *upregulated* estão associados a matriz extracelular, enquanto os genes *downregulated* estão relacionadas á função muscular (LU et al.,2019). Por outro lado, a análise de enriquecimento de GO de grupos de genes *upregulated* dos raios estão associados biossíntese de L-serina e ao complexo passageiro dos cromossomos, enquanto os genes *downregulated* revelou estarem associados com especificação do destino celular epidérmico e a regulação negativa da extensão de axônio. Vale ressaltar que a análise de GO do transcriptoma identificou grande parte das vias de sinalizações dos raios também estão envolvidas na regeneração do endoesqueleto.

Um estudo recente de análise de expressão gênica diferencial revelou semelhanças significativas na regeneração do endoesqueleto de apêndices pareados de *Polypterus*, peixes pulmonados e salamandras (LU et al.,2019; NOGUEIRA et al.,2016). Em contrapartida, ao realizarmos a análise comparativa de correlação de aproximadamente 50 genes importante para a regeneração do endoesqueleto entre a regeneração dos raios *versus* nadadeira de peixe pulmonado ou membro de salamandra, identificamos diferenças significativa no perfil de expressão gênica, sugerindo que existe diferenças fundamentais entre a regeneração dos raios *versus* peixe pulmonado e membros de salamandra que viabilizam a regeneração em cada espécie.

Evidências sobre a regeneração do endoesqueleto de nadadeiras tem demonstrado que os peixes com nadadeira lobadas da classe *Sarcopetygii* e peixes da classe *Actinopterygii* compartilham um programa genético conservado (NOGUEIRA et al.,2016, DARNET et al., 2019), mas os nossos dados de transcritoma dos raios observou diferenças significativas entre os programas de regeneração dos raios entre as espécies do grupo de peixes *Sarcopetygii* e *Actinopterygii*.

A montagem *de novo* do transcriptoma na ausência de um genoma de referência disponível como no caso da salamandra, ofereceu uma estratégia alternativa para identificar transcritos específicos e grupos de genes associados com uma regeneração bem-sucedida (BRYANT et al.,2017). Vários desses genes e proteínas estão associados a epiderme da ferida, matriz extracelular, membrana basal, blastema e células precursoras condrogênicas em diferenciação (GÓMEZ *et al.*,2018).

O estudo de Wang *et al.* (2020) a partir de dados do RNA-seq dos estágios iniciais da regeneração do exoesqueleto de duas espécies de teleósteos (Killifish africano e peixe Zebrafish) conseguiram identificar um programa de resposta de regeneração evolutivamente conservado (RRP, do inglês *regeneration response program*) com 310 genes regulados por RREs (sigla do inglês, regeneration responsive enhancers) compartilhados entre peixes submetidos a pressões seletivas diferentes.

Por fim, a tecnologia de RNA-seq tem isso amplamente utilizada para estudos de transcriptoma de peixes (QIAN *et al.*, 2014), ajudando a esclarecer se o programa de regeneração em algumas espécies apresenta semelhanças moleculares ou especificidade. Atualmente, tornou-se bastante possível identificar genes diferencialmente expressos e vias de sinalização que apresentam importante papéis durante o processe de regeneração (BIDEAU *et al.*,2021).

### 6 REFERÊNCIAS

BELY, A. E.; NYBERG, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 25, n. 3, p. 161–170, 2010.

MEHTA, A. S.; SINGH, A. Insights into regeneration tool box: An animal model approach. **Developmental Biology**, v. 453, n. 2, p. 111–129, 2019.

ALVARADO, A. S.; TSONIS, P. A. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 11, p. 873–884, 2006.

AGATA, K.; SAITO, Y.; NAKAJIMA, E. Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis. **Development Growth and Differentiation**, v. 49, n. 2, p. 73–78, 2007.

IISMAA, S. E.; KAIDONIS, X.; NICKS, A. M.; et al. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. **npj Regenerative Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–20, 2018. Springer US.

AKIMENKO, M. A.; MARÍ-BEFFA, M.; BECERRA, J.; GÉRAUDIE, J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. **Developmental Dynamics**, v. 226, n. 2, p. 190–201, 2003.

CARLSON, B. M. Some principles of regeneration in mammalian systems. Anatomical Record - Part B New Anatomist, v. 287, n. 1, p. 4–13, 2005.

CLAUSE, A. R.; CAPALDI, E. A. Caudal autotomy and regeneration in lizards. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**, v. 305A, n. 12, p. 965–973, 2006.

JACYNIAK, K.; MCDONALD, R. P.; VICKARYOUS, M. K. Tail regeneration and other phenomena of wound healing and tissue restoration in lizards. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 16, p. 2858–2869, 2017.

BORODINSKY, L. N. Xenopus laevis as a model organism for the study of spinal cord formation, development, function and regeneration. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 11, n. November, p. 1–9, 2017.

BECK, C. W.; BELMONTE, J. C. I.; CHRISTEN, B. Beyond early development: Xenopus as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1226–1248, 2009.

LÉVESQUE, M.; GATIEN, S.; FINNSON, K.; *et al.* Transforming growth factor:  $\beta$  signaling is essential for limb regeneration in axolotls. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, 2007.

YIN, V. P.; POSS, K. D. New regulators of vertebrate appendage regeneration. Current **Opinion in Genetics and Development**, v. 18, n. 4, p. 381–386, 2008.

MADEN, M. Axolotl/Newt. Methods in Molecular Biology, v. 461, p. 467-480, 2008.

DARNET, S.; DRAGALZEW, A. C.; AMARAL, D. B.; *et al.* Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 30, p. 15106–15115, 2019.

PÁPAI, N.; KAGAN, F.; CSIKÓS, G.; *et al.* No correlation between endo-and exoskeletal regenerative capacities in teleost species. **Fishes**, v. 4, n. 4, p. 1–12, 2019.

NOGUEIRA, A. F.; COSTA, C. M.; LORENA, J.; *et al.* Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–9, 2016. Nature Publishing Group.

JOVEN, A.; ELEWA, A.; SIMON, A. Model systems for regeneration: Salamanders. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 14, p. 0–2, 2019.

HAN, M.; YANG, X.; TAYLOR, G.; *et al.* Limb regeneration in higher vertebrates: Developing a roadmap. **Anatomical Record - Part B New Anatomist**, v. 287, n. 1, p. 14–24, 2005.

BRYANT, S. V.; ENDO, T.; GARDINER, D. M. Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells. **International Journal of Developmental Biology**, v. 46, n. 7, p. 887–896, 2002.

MCCUSKER, C.; BRYANT, S. V.; GARDINER, D. M. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. **Regeneration**, v. 2, n. 2, p. 54–71, 2015.

HAAS, B. J.; WHITED, J. L. Advances in Decoding Axolotl Limb Regeneration. **Trends** in Genetics, v. 33, n. 8, p. 553–565, 2017.

NIKIFOROVA, A. I.; GOLICHENKOV, V. A. Characteristics of the reparative regeneration of fins in the polypterid fish (Polypteridae, Actinopterygii). **Russian Journal of Developmental Biology**, v. 43, n. 2, p. 115–120, 2012.

LU, S.; YANG, L.; JIANG, H.; *et al.* Bichirs employ similar genetic pathways for limb regeneration as are used in lungfish and salamanders. **Gene**, v. 690, n. December 2018, p. 68–74, 2019. Elsevier.

GAURON, C.; RAMPON, C.; BOUZAFFOUR, M.; *et al.* Sustained production of ROS triggers compensatory proliferation and is required for regeneration to proceed. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–9, 2013.

SINGER, M. Neurotrophic Control of Limb Regeneration in the Newt. Annals of the New York Academy of Sciences, v. 228, n. 1, p. 308–321, 1974.

qi, M. H.; WU, C. H.; HUANG, T. Y.; *et al.* Nerve-mediated expression of histone deacetylases regulates limb regeneration in axolotls. **Developmental Biology**, v. 449, n. 2, p. 122–131, 2019. Elsevier Ltd.

SEIFERT, A. W.; MUNEOKA, K. The blastema and epimorphic regeneration in mammals. **Developmental Biology**, v. 433, n. 2, p. 190–199, 2018.

VAN DER VLIET, A.; JANSSEN-HEININGER, Y. M. W. Hydrogen Peroxide as a Damage Signal in Tissue Injury and Inflammation: Murderer, Mediator, or Messenger? **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 3, p. 427–435, 2014.

YAMAMOTO, K.; BLOCH, S.; VERNIER, P. New perspective on the regionalization of the anterior forebrain in Osteichthyes. **Development Growth and Differentiation**, v. 59, n. 4, p. 175–187, 2017.

AMARAL, D. B.; SCHNEIDER, I. Fins into limbs: Recent insights from sarcopterygian fish. **Genesis**, v. 56, n. 1, p. 1–8, 2018.

SCHNEIDER, I.; SHUBIN, N. H. The origin of the tetrapod limb: from expeditions to enhancers. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 7, p. 419–426, 2013.

TANAKA, M. Fins into limbs: Autopod acquisition and anterior elements reduction by modifying gene networks involving 5'Hox, Gli3, and Shh. **Developmental Biology**, v. 413, n. 1, p. 1–7, 2016.

CUERVO, R.; HERNANDEZ-MARTINEZ, R.; CHIMAL-MONROY, J.; MERCHANT-LARIOS, H.; COVARRUBIAS, L. Full regeneration of the tribasal Polypterus fin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 10, p. 3838–3843, 2012.

GRANDEL, H.; SCHULTE-MERKER, S. The development of the paired fins in the zebrafish (Danio rerio). **Mechanisms of Development**, v. 79, n. 1–2, p. 99–120, 1998.

WOOD, T. W. P.; NAKAMURA, T. Problems in fish-to-tetrapod transition: Genetic expeditions into old specimens. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. JUL, p. 1–17, 2018.

YANO, T.; TAMURA, K. The making of differences between fins and limbs. **Journal of Anatomy**, v. 222, n. 1, p. 100–113, 2013.

HALL, B. K. Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. Cambridge, MA: Academic Press, 2005.

COHN, M. J.; LOVEJOY, C. O.; WOLPERT, L.; COATES, M. I. Branching, segmentation and the metapterygial axis: Pattern versus process in the vertebrate limb. **BioEssays**, v. 24, n. 5, p. 460–465, 2002.

BECERRA, J.; MONTES, G. S.; BEXIGA, S. R. R.; JUNQUEIRA, L. C. U. Structure of the tail fin in teleosts. **Cell and Tissue Research**, v. 230, n. 1, p. 127–137, 1983.

KÖNIG, D.; DAGENAIS, P.; SENK, A.; *et al.* Distribution and Restoration of Serotonin-Immunoreactive Paraneuronal Cells During Caudal Fin Regeneration in Zebrafish. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. September, p. 1–28, 2019.

PFEFFERLI, C.; JAŹWIŃSKA, A. The art of fin regeneration in zebrafish. **Regeneration**, v. 2, n. 2, p. 72–83, 2015.

KÖNIG, D.; PAGE, L.; CHASSOT, B.; JAŹWIŃSKA, A. Dynamics of actinotrichia regeneration in the adult zebrafish fin. **Developmental Biology**, v. 433, n. 2, p. 416–432, 2018.

IOVINE, M. K. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 10, p. 613–618, 2007.

GOSS, R. J. Principles of Regeneration. Principles of Regeneration, 1969.

SOUSA, S.; AFONSO, N.; BENSIMON-BRITO, A.; *et al.* Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. **Development**, v. 138, n. 18, p. 3897–3905, 2011.

KÖNIG, D.; JAŹWIŃSKA, A. Zebrafish fin regeneration involves transient serotonin synthesis. **Wound Repair and Regeneration**, v. 27, n. 4, p. 375–385, 2019.

KAWAKAMI, Y.; RODRIGUEZ ESTEBAN, C.; RAYA, M.; *et al.* Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. **Genes & Development**, v. 20, n. 23, p. 3232–3237, 2006.

YOSHINARI, N.; KAWAKAMI, A. Mature and juvenile tissue models of regeneration in small fish species. **Biological Bulletin**, v. 221, n. 1, p. 62–78, 2011.

NECHIPORUK, A.; KEATING, M. T. A proliferation gradient between proximal and msxbexpressing distal blastema directs zebrafish fin regeneration. **Development**, v. 129, n. 11, p. 2607–2617, 2002.

AZEVEDO, A. S.; SOUSA, S.; JACINTO, A.; SAÚDE, L. An amputation resets positional information to a proximal identity in the regenerating zebrafish caudal fin. **BMC Developmental Biology**, v. 12, 2012.

BECERRA, J.; JUNQUEIRA, L. C. U.; BECHARA, I. J.; MONTES, G. S. Regeneration of fin rays in teleosts: A histochemical, radioautographic, and ultrastructural study. **Archives of Histology and Cytology**, v. 59, n. 1, p. 15–35, 1996.

SMITH, A.; AVARON, F.; GUAY, D.; PADHI, B. K.; AKIMENKO, M. A. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. **Developmental Biology**, v. 299, n. 2, p. 438–454, 2006.

WEHNER, D.; WEIDINGER, G. Signaling networks organizing regenerative growth of the zebrafish fin. **Trends in Genetics**, v. 31, n. 6, p. 336–343, 2015. Elsevier Ltd.

POSS, K. D.; SHEN, J.; NECHIPORUK, A.; *et al.* Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. **Developmental Biology**, v. 222, n. 2, p. 347–358, 2000.

STOICK-COOPER, C. L.; WEIDINGER, G.; RIEHLE, K. J.; *et al.* Distinct Wnt signaling pathways have opposing roles in appendage regeneration. **Development**, v. 134, n. 3, p. 479–489, 2007.

LEE, Y.; HAMI, D.; DE VAL, S.; *et al.* Maintenance of blastemal proliferation by functionally diverse epidermis in regenerating zebrafish fins. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 270–280, 2009.

POSS, K. D.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. Tales of regeneration in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 226, n. 2, p. 202–210, 2003.

ROMERO, M. M. G.; MCCATHIE, G.; JANKUN, P.; ROEHL, H. H. Damage-induced reactive oxygen species enable zebrafish tail regeneration by repositioning of Hedgehog expressing cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

CHEN, Y.; LOVE, N. R.; AMAYA, E. Tadpole tail regeneration in Xenopus. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, n. 3, p. 617–623, 2014.

LOVE, N. R.; CHEN, Y.; ISHIBASHI, S.; *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful Xenopus tadpole tail regeneration. **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 2, p. 222–228, 2013.

SON, Y.; KIM, S.; CHUNG, H. T.; PAE, H. O. Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases. 1° ed. Elsevier Inc., 2013.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

ARNHOLD, J.; FLEMMIG, J. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 500, n. 1, p. 92–106, 2010. Elsevier Inc.

LIN, C-S.; WUPUTRA, K.; YOKOYAMA, KK. Tissue Regeneration and Healing by ROS-Mediated NOX2 and Ca2+ Ion Uptake. **J Stem Cells Res**. v. 5, n. 1, p. 2–4, 2018.

HOLMSTRÖM, K. M.; FINKEL, T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 411–421, 2014. Nature Publishing Group.

SEDEEK, M.; NASRALLAH, R.; TOUYZ, R. M.; HÉBERT, R. L. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: Friend and foe. Journal of the American Society of Nephrology, v. 24, n. 10, p. 1512–1518, 2013.

KUKREJA, R. C.; KONTOS, H. A.; HESS, M. L.; ELLIS, E. F. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. Circulation **Research**, v. 59, n. 6, p. 612–619, 1986.

PUNTARULO, S.; CEDERBAUM, A. I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. Free Radical Biology and Medicine, v. 24, n. 7–8, p. 1324–1330, 1998.

POU, S.; POU, W. S.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H.; ROSEN, G. M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24173–24176, 1992.

BERRY, C. E.; HARE, J. M. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: Molecular mechanisms and pathophysiological implications. **Journal of Physiology**, v. 555, n. 3, p. 589–606, 2004.

ZAFARI, A. M.; USHIO-FUKAI, M.; AKERS, M.; *et al.* Angiotensin II – Induced Vascular Hypertrophy. **Hypertension**, v. 32, n. 3, p. 488–495, 1998.

DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 8, p. 504–511, 2011.

EWALD, C. Y. Redox signaling of nadph oxidases regulates oxidative stress responses, immunity and aging. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, 2018.

KUČERA, J.; BINÓ, L.; ŠTEFKOVÁ, K.; *et al.* Apocynin and diphenyleneiodonium induce oxidative stress and modulate PI3K/Akt and MAPK/Erk activity in mouse embryonic stem cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

JIANG, F.; ZHANG, Y.; DUSTING, G. J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: Roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 218–242, 2011.

KONIOR, A.; SCHRAMM, A.; CZESNIKIEWICZ-GUZIK, M.; GUZIK, T. J. NADPH oxidases in vascular pathology. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, n. 17, p. 2794–2814, 2014.

AMEZIANE-EL-HASSANI, R.; MORAND, S.; BOUCHER, J. L.; *et al.* Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca2+-dependent H 2O2-generating activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30046–30054, 2005.

TOUYZ, R. M.; BRIONES, A. M.; SEDEEK, M. NOX Isoforms. **Molecular intervention**, v. 11, n. 1, p. 27–35, 2011.

KAWAHARA, B. T.; QUINN, M. T.; LAMBETH, J. D. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1–21, 2007.

DE FARIA, C. C.; FORTUNATO, R. S. The role of dual oxidases in physiology and cancer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 1–9, 2020.

CHENG, G.; CAO, Z.; XU, X.; MEIR, E. G. V.; LAMBETH, J. D. Homologs of gp91phox: Cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. **Gene**, v. 269, n. 1–2, p. 131–140, 2001.

BÁNFI, B.; CLARK, R. A.; STEGER, K.; KRAUSE, K. H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3510–3513, 2003.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208–226, 2014. Elsevier.

ALTENHÖFER, S.; RADERMACHER, K. A.; KLEIKERS, P. W. M.; WINGLER, K.; SCHMIDT, H. H. W. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 5, p. 406–427, 2015.

CHENG, G.; RITSICK, D.; LAMBETH, J. D. Nox3 regulation by NOXO1, p47phox, and p67phox. Journal of Biological Chemistry, v. 279, n. 33, p. 34250–34255, 2004.

DAN DUNN, J.; ALVAREZ, L. A. J.; ZHANG, X.; SOLDATI, T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. **Redox Biology**, v. 6, p. 472–485, 2015.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, n. 5, p. 780–787, 2002.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular Cell**, v. 48, n. 2, p. 158–167, 2012. Elsevier Inc.

LI, Y.; TRUSH, M. A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H oxidase inhibitor, also potently inhibits mitochondrial reactive oxygen species production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 2, p. 295–299, 1998.

WIND, S.; BEUERLEIN, K.; EUCKER, T.; *et al.* Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 885–898, 2010.

KIRCHNER, T.; MLLER, S.; KLINGER, M.; *et al.* The impact of various reactive oxygen species on the formation of neutrophil extracellular traps. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 2012.

JAQUET, V.; MARCOUX, J.; FOREST, E.; *et al.* NADPH oxidase (NOX) isoforms are inhibited by celastrol with a dual mode of action. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 2 B, p. 507–520, 2011.

AUGSBURGER, F.; FILIPPOVA, A.; RASTI, D.; *et al.* Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. **Redox Biology**, v. 26, n. June, p. 101272, 2019. Elsevier B.V.

JAQUET, V.; SCAPOZZA, L.; CLARK, R. A.; KRAUSE, K.-H.; LAMBETH, J. D. Small-Molecule NOX Inhibitors: ROS-Generating NADPH Oxidases as Therapeutic Targets. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2535–2552, 2009.

KÜLTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, n. 1, p. 225–257, 2005.

GIANNONI, E.; BURICCHI, F.; RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Intracellular Reactive Oxygen Species Activate Src Tyrosine Kinase during Cell Adhesion and Anchorage-Dependent Cell Growth. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 15, p. 6391– 6403, 2005.

TAN, D. Q.; SUDA, T. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Homeostasis as Regulators of Stem Cell Fate and Function. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 29, n. 2, p. 149–168, 2018.

OWUSU-ANSAH, E.; BANERJEE, U. Reactive oxygen species prime Drosophila haematopoietic progenitors for differentiation. **Nature**, v. 461, n. 7263, p. 537–541, 2009. Nature Publishing Group.

SANTABÁRBARA-RUIZ, P.; ESTEBAN-COLLADO, J.; PÉREZ, L.; *et al.* Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in Drosophila. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–27, 2019.

AL HAJ BADDAR, N. W.; CHITHRALA, A.; VOSS, S. R. Amputation-induced reactive oxygen species signaling is required for axolotl tail regeneration. **Developmental Dynamics**, v. 248, n. 2, p. 189–196, 2019.

YOO, S. K.; FREISINGER, C. M.; LEBERT, D. C.; HUTTENLOCHER, A. Early redox, Src family kinase, and calcium signaling integrate wound responses and tissue regeneration in zebrafish. **Journal of Cell Biology**, v. 199, n. 2, p. 225–234, 2012.

MEDA, F.; GAURON, C.; RAMPON, C.; *et al.* Nerves control redox levels in mature tissues through Schwann cells and Hedgehog signaling. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 24, n. 6, p. 299–311, 2016.

FERREIRA, F.; RAGHUNATHAN, V. K.; LUXARDI, G.; ZHU, K.; ZHAO, M. Early redox activities modulate Xenopus tail regeneration. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Springer US.

ROEHL, H. H. Linking wound response and inflammation to regeneration in the zebrafish larval fin. **International Journal of Developmental Biology**, v. 62, n. 6–8, p. 473–477, 2018.

FUNATO, Y.; MICHIUE, T.; ASASHIMA, M.; MIKI, H. The thioredoxin-related redoxregulating protein nucleoredoxin inhibits wnt– $\beta$ -catenin signalling through dishevelled. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 5, p. 501–508, 2006.

COFFMAN, J. A.; SU, Y. H. Redox regulation of development and regeneration. Current **Opinion in Genetics and Development**, v. 57, p. 9–15, 2019. Elsevier Ltd.

PAPANDREOU, I.; CAIRNS, R. A.; FONTANA, L.; LIM, A. L.; DENKO, N. C. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 187–197, 2006.

KIM, J. W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–185, 2006.

SEMENZA, G. L.; JIANG, B. H.; LEUNG, S. W.; *et al.* Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase a gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 51, p. 32529–32537, 1996.

GREER, S. N.; METCALF, J. L.; WANG, Y.; OHH, M. The updated biology of hypoxiainducible factor. **EMBO Journal**, v. 31, n. 11, p. 2448–2460, 2012. Nature Publishing Group.

NIETHAMMER, P.; GRABHER, C.; LOOK, A. T.; MITCHISON, T. J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. **Nature**, v. 459, n. 7249, p. 996–999, 2009. Nature Publishing Group.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2016.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, 2009.

COLAK, D.; AL-HARAZI, O.; MUSTAFA, O. M.; *et al.* RNA-Seq transcriptome profiling in three liver regeneration models in rats: comparative analysis of partial hepatectomy, ALLPS, and PVL. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2020. Springer US.

KANG, J.; HU, J.; KARRA, R.; *et al.* Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. **Nature**, v. 532, n. 7598, p. 201–206, 2016.

BRYANT, D. M.; JOHNSON, K.; DITOMMASO, T.; *et al.* A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 762–776, 2017.

SHI, L.; CHEN, C.; YIN, Z.; *et al.* Systematic profiling of early regulators during tissue regeneration using zebrafish model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 29, n. 1, p. 189–195, 2021.

RABINOWITZ, J. S.; ROBITAILLE, A. M.; WANG, Y.; *et al.* Transcriptomic, proteomic, and metabolomic landscape of positional memory in the caudal fin of zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 5, p. E717–E726, 2017.

KATOGI, R.; NAKATANI, Y.; SHIN-I, T.; *et al.* Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, Oryzias latipes. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 7–8, p. 861–872, 2004.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

GRABHERR, M. G., BRIAN, J. HAAS, MORAN, Y.; *et al.* Trinity: reconstructing a fulllength transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2013.

SIMÃO, F. A.; WATERHOUSE, R. M.; IOANNIDIS, P.; KRIVENTSEVA, E. V.; ZDOBNOV, E. M. BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210–3212, 2015.

FERNANDES, L. A. Montagem e anotação funcional de sequências gênicas de Handroanthus impetiginosus (Mart. ex DC.) Mattos., p. 1–63, 2015.

SEIFERT, A. W.; VOSS, S. R. Revisiting the relationship between regenerative ability and aging. **BMC Biology**, v. 11, 2013.

YOSHIDA, K.; KAWAKAMI, K.; ABE, G.; TAMURA, K. Zebrafish can regenerate endoskeleton in larval pectoral fin but the regenerative ability declines. **Developmental Biology**, v. 463, n. 2, p. 110–123, 2020.

SAFIAN, D.; WIEGERTJES, G. F.; POLLUX, B. J. A. The Fish Family Poeciliidae as a Model to Study the Evolution and Diversification of Regenerative Capacity in Vertebrates. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, n. March, 2021.

HOU, Y.; LEE, H. J.; CHEN, Y.; et al. Cellular diversity of the regenerating caudal fin. **Science Advances**, v. 6, n. 33, p. 1–12, 2020.

MARQUES, I. J.; LUPI, E.; MERCADER, N. Model systems for regeneration: Zebrafish. **Development (Cambridge)**, v. 146, n. 18, 2019.

ARENAS GÓMEZ, C. M.; WOODCOCK, R. M.; SMITH, J. J.; VOSS, R. S.; DELGADO, J. P. Using transcriptomics to enable a plethodontid salamander (Bolitoglossa ramosi) for limb regeneration research 06 Biological Sciences 0604 Genetics. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–12, 2018.

WANG, W.; HU, C. K.; ZENG, A.; et al. Changes in regeneration-responsive enhancers shape regenerative capacities in vertebrates. **Science**, v. 369, n. 6508, 2020.

QIAN, X.; BA, Y.; ZHUANG, Q.; ZHONG, G. RNA-seq technology and its application in fish transcriptomics. **OMICS A Journal of Integrative Biology**, v. 18, n. 2, p. 98–110, 2014.

BIDEAU, L.; KERNER, P.; HUI, J.; VERVOORT, M.; GAZAVE, E. Animal regeneration in the era of transcriptomics. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 3941–3956, 2021. Springer International Publishing.