

**INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DOS COMPLEXOS NOX E  
V-ATPase EM PEIXE ZEBRA E HUMANOS - MODELOS DE  
DISTINTOS SISTEMAS BIOELETROQUÍMICOS DE REPARO E  
REGENERAÇÃO**

**LÍVIA MARIA PIMENTEL MARQUES**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2022**

**INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DOS COMPLEXOS NOX E  
V-ATPase EM PEIXE ZEBRA E HUMANOS - MODELOS DE  
DISTINTOS SISTEMAS BIOELETROQUÍMICOS DE REPARO E  
REGENERAÇÃO**

**LÍVIA MARIA PIMENTEL MARQUES**

“Dissertação apresentada ao Centro de  
Biotecnologia e Biociências da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biociências e  
Biotecnologia”

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO - 2022**

INTERAÇÕES ESPECÍFICAS DOS COMPLEXOS NOX E V-ATPase EM PEIXE  
ZEBRA E HUMANOS - MODELOS DE DISTINTOS SISTEMAS  
BIOELETROQUÍMICOS DE REPARO E REGENERAÇÃO

LÍVIA MARIA PIMENTEL MARQUES

"Dissertação apresentada ao Centro de  
Biodiversidade e Biotecnologia da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Mestre em Biodiversidade e  
Biotecnologia"

Aprovada em 24 de fevereiro de 2022

Comissão examinadora:

*Cintia Barros*

---

Cintia Monteiro de Barros, D.Sc. (UENF)

*Sheila Espírito Santo Araújo*

---

Sheila Espírito Santo Araújo, D.Sc. (UENF)

*Antônio Jesus D. Cogo*

---

Antônio Jesus D. Cogo, D.Sc. (UENF)

*Arnoldo Rocha Façanha*

---

Arnoldo Rocha Façanha, D.Sc. (UENF) - orientador

*Dedico essa dissertação aos meus queridos pais, ao meu esposo e meus filhos*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela razão, pela ciência, por nos permitir descobrir, contemplar e nos apaixonar pela Verdade. Por me sustentar a cada instante com sua Infinita Misericórdia, sem ela eu seria um grande nada, portanto: “Minha alma engrandece o Senhor e meu espírito exulta de alegria em Deus, meu Salvador”;

Agradeço imensamente aos meus queridos pais, o Sr. Renato e a Sra. Maria Aparecida, por todo amor;

Ao meu esposo Romário pela parceria em ser uma só carne e um só coração comigo;

Aos meus filhos, força motriz que me impulsiona a ser melhor a cada dia;

Aos meus irmãos, avó, tios, primos e demais familiares e amigos, também meus avôs João Pimentel, João Marques e Alzira (<3), *in memoriam*, por fazerem parte da minha vida e do meu coração;

Ao professor Arnoldo, pela oportunidade, por todos os ensinamentos e orientação;

À professora Anna e a todos do grupo pelos ensinamentos, auxílio, apoio, colaboração e ótimo convívio; Ao professor Jorge pelos ensinamentos;

Aos membros da banca

A todos os funcionários da UENF por todo suporte;

À UENF, FAPERJ, CAPES e CNPQ pelo financiamento desse trabalho, tornando possível a sua realização.

*“Há mais coisas entre o céu e a terra do que pode imaginar nossa vã filosofia”*  
(William Shakespeare)

*“Toda verdade é a Verdade de Deus”* (Santo Agostinho)

*“Todo aquele que busca a verdade, mesmo sem saber que está buscando Deus,  
está buscando Deus”* (Edith Stein)

## RESUMO

Quando animais sofrem lesões, amputações, qualquer dano ou perda de órgãos, tecidos ou estruturas complexas, são imediatamente desencadeadas respostas iniciais, que podem ser de reparo, onde os tecidos perdidos e suas funções não são completamente restaurados, ou ativar processos que levam à regeneração completa de estrutura e função dos mesmos. Evidências experimentais têm revelado a participação dos complexos NOX e V-ATPase no local da lesão, logo após a amputação e a interdependência dos mesmos nos eventos moleculares que culminam na reativação de vias de sinalização responsáveis pela reconstrução completa e correta dos tecidos perdidos ou danificados. O objetivo desse trabalho foi estudar integrações entre a V-ATPase e os elementos do complexo NOX, visando elucidar os seus papéis nos processos regenerativos. Previamente, usando Aelosomas como modelo, verificamos as capacidades regenerativas destes anelídeos após amputações, onde ocorre um aumento significativo das atividades de hidrólise de ATP da V-ATPase e utilizando uma sonda vibrátil seletiva a íons H<sup>+</sup>, fluxos protônicos foram observados no local da lesão. Estes resultados nos levaram a desenvolver um estudo mais aprofundado por meio de análises *in silico* de dados transcricionais de genes que codificam as subunidades de ambos os complexos em espécies cujos dados estivessem disponíveis em plataformas informatizadas de busca por interações gênicas. Dados minerados na plataforma Genemania.org mostraram que o elo entre a V-ATPase e a NADPH oxidase no *Danio rerio*, animal com capacidades regenerativas, envolve interações com o sistema imunológico inato (fagócitos), com maior participação das subunidades da NADPH oxidase (NOX2). Enquanto que no *Homo sapiens*, cujas capacidades regenerativas diminuíram muito, as relações entre ambos os complexos mostraram maior envolvimento da NADPH oxidase com os membros da V-ATPase e a participação de outras isoformas (NOX5 e DUOX1/2), que são altamente expressas em tecidos linfóides, testículos e de tireóide. Sugerindo que nos animais que promovem um simples reparo, há a participação do sistema imunológico adaptativo, fruto de uma maior complexidade tecidual.

## ABSTRACT

When animals suffer injuries, amputations, any damage or loss of organs, tissues or complex structures, initial responses are triggered immediately, that can be repaired, where lost tissues and their functions are not fully restored, or activate processes that lead to the complete regeneration of their structure and function. Experimental evidence has revealed the participation of NOX and V-ATPase complexes at the lesion site, right after amputation and their interdependence in molecular events that culminate in the reactivation of signaling pathways responsible for the complete and correct reconstruction of lost or damaged tissues. The objective of this work was to study integrations between the V-ATPase and the elements of the NOX complex, to elucidate their roles in regenerative processes. Previously, using Aelosomes as a model, we verified the regenerative capacities of these annelids after amputations; there is a significant increase in the ATP hydrolysis activities of the V-ATPase and using a vibrating probe selective to H<sup>+</sup> ions, proton fluxes were observed at the lesion site. These results led us to develop a more in-depth study through *in silico* analysis of transcriptional data from genes that encode the subunits of complexes in species whose data were available on computerized platforms to search for gene interactions. Data mined on the Genemania.org platform showed that the link between V-ATPase and NADPH oxidase in *Danio rerio*, animal with regenerative abilities, involves interactions with the innate immune system (phagocytes), with greater participation of NADPH oxidase subunits (NOX2). While in *Homo sapiens*, whose regenerative capacities have greatly diminished, the relationships between the complexes showed greater involvement of NADPH oxidase with V-ATPase members and the participation of other isoforms (NOX5 and DUOX1/2), that are highly expressed in lymphoid, testes and thyroid tissues. Suggesting that in animals that promote a simple repair, there is the participation of the adaptive immune system, because of greater tissue complexity.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Escultura Prometeu .....	16
<b>Figura 2</b> - Mapeamento das capacidades regenerativas dos metazoários.....	19
<b>Figura 3</b> - Representação esquematizada das partes externas de uma planária de água doce, <i>Schmidtea mediterrânea</i> .....	21
<b>Figura 4</b> - <i>Aelosoma sp.</i> (animal adulto).....	22
<b>Figura 5</b> - Segmentos do corpo de <i>Aelosoma viride</i> .....	23
<b>Figura 6</b> - Processo de regeneração do seguimento da cabeça de <i>Aelosoma Viride</i> .....	24
<b>Figura 7</b> - Exemplos representativos das espécies de ascídias e suas características morfológicas.....	26
<b>Figura 8</b> - Peixe-zebra adulto medindo de 3 a 4 cm de comprimento.....	28
<b>Figura 9</b> - Esquema representativo das fases do processo de regeneração da barbatana caudal do <i>Danio rerio</i> .....	29
<b>Figura 10</b> - Esquematização da capacidade regenerativa de anuros.....	31
<b>Figura 11</b> - Montagem e ativação do complexo NADPH oxidase (NOX2) no fagócito.....	36
<b>Figura 12</b> - Mecanismos de ativação das diferentes isoformas de NOX2.....	37
<b>Figura 13</b> - Variedade de expressão do complexo NOX em seus principais tecidos.....	37

<b>Figura 14</b> - Potencial elétrico de células individuais e epitélios.....	40
<b>Figura 15</b> - Sinal bioelétrico indicando o local da amputação no membro oposto intacto.....	42
<b>Figura 16</b> - Esquema representativo do estabelecimento da polaridade axial, pelo gradiente de potencial de membrana, na regeneração de planária.....	43
<b>Figura 17</b> - Esquema retratando a estrutura tridimensional do complexo V-ATPase.....	44
<b>Figura 18</b> - Modelo integrativo das inter-relações entre as principais respostas iniciais desencadeadas pela lesão em animais com capacidades regenerativas.....	45
<b>Figura 19</b> - Genes utilizados.....	47
<b>Figura 20</b> - Exemplo de uma das 621 redes de interações individuais geradas.....	48
<b>Figura 21</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1B2 e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	49
<b>Figura 22</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1C1, ATP6V1C2, ATP6V1D, ATP6V1E1 e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	50
<b>Figura 23</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1E2, ATP6V1F, ATP6V1G1, ATP6V1G2 e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	51
<b>Figura 24</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1G3, ATP6V1H, ATP6V0A1, ATP6V0A2 e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	52

<b>Figura 25</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes TCIRG1, ATP6V0A4, ATP6V0B, ATP6V0C e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	53
<b>Figura 26</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V0D1, ATP6V0D2, ATP6V0E1, ATP6V0E2 e os genes do complexo NOX no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	54
<b>Figura 27</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX (média) no <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania. ....	55
<b>Figura 28</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NCF1, NCF2 e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania. ....	56
<b>Figura 29</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NCF4, CYBB, CYBA e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	57
<b>Figura 30</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes RAC1, RAC2, NOX1 e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	58
<b>Figura 31</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NOX3, NOX4, NOX5 e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	59
<b>Figura 32</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes DUOX1, DUOX2, NOXO1 e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	60

<b>Figura 33</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NOXA1 e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania. .....	61
<b>Figura 34</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo NOX (média) e os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> geradas no Genemania.....	61
<b>Figura 35</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	62
<b>Figura 36</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	63
<b>Figura 37</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania. ....	64
<b>Figura 38</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	65
<b>Figura 39</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase (média) e os genes do complexo NOX de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	66
<b>Figura 40</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo NOX e os genes da V-ATPase de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	67

<b>Figura 41</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo NOX e os genes da V-ATPase de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	68
<b>Figura 42</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo NOX e os genes da V-ATPase de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	69
<b>Figura 43</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo NOX e os genes da V-ATPase de <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	70
<b>Figura 44</b> - Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX (média) em <i>Danio rerio</i> geradas no Genemania.....	71
<b>Figura 45</b> - Síntese da análise quantitativa dos genes dos complexos V-ATPase e NOX.....	72
<b>Figura 46</b> - Esquema indicando características qualitativas de todas as interações diretas encontradas nas redes de interação individuais geradas no Genemania entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX em <i>Homo sapiens</i> e <i>Danio rerio</i> .....	74
<b>Figura 47</b> - Genes que fazem ponte de intercessão de interações indiretas envolvendo ambos os complexos (V-ATPase e NADPH oxidase) .....	76

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BMP</b>	Proteína morfogenética óssea
<b>FGF</b>	Fator de crescimento fibroblástico
<b>NaV1.2</b>	Canal iônico de sódio voltagem-dependente
<b>NOX/DUOX</b>	NADPH oxidase
<b>RAC</b>	Proteína G envolvida na regulação de NADPH oxidase
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species (espécies reativas de oxigênio)
<b>Shh</b>	Ligante envolvido na via de sinalização hedgehog
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento transformador Beta
<b>V-ATPase</b>	ATPase transportadora de prótons do tipo V
<b>V<sub>mem</sub></b>	Potencial de membrana
<b>V<sub>TEP</sub></b>	Potencial transepitelial
<b>Wnt</b>	Via de sinalização importante no desenvolvimento

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1	Regeneração e seus tipos.....	19
2.2	Principais modelos de estudo de regeneração .....	21
2.2.1	Planária .....	21
2.2.2	Aelosomatídeos.....	22
2.2.3	Ascídia.....	26
2.2.4	Peixe-zebra .....	28
2.2.5	Anfíbios.....	30
2.3	Regeneração em <i>Homo sapiens sapiens</i> .....	33
2.4	Reconstrução do novo tecido.....	33
2.5	Respostas iniciais dos tecidos que não regeneram .....	34
2.6	Espécies reativas de oxigênio.....	35
2.7	Sinalização bioelétrica e o papel das V-ATPases .....	39
3	OBJETIVO .....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
5.1	Combinações individuais com os genes da V-ATPase em <i>Homo sapiens</i> ..	50
5.2	Combinações individuais com os genes do complexo NOX em <i>Homo sapiens</i> 57	
5.3	Combinações individuais com os genes da V-ATPase em <i>Danio rerio</i> .....	63
5.4	Combinações individuais com genes do complexo NOX em <i>Danio rerio</i> .....	68
5.5	Comparação da quantificação das combinações individuais entre <i>Homo sapiens</i> e <i>Danio rerio</i> .....	73
5.6	Interações diretas encontradas .....	75
5.7	Interações indiretas encontradas .....	77
6	CONCLUSÕES .....	80
6.1	Conclusão geral .....	80
6.2	Conclusões específicas.....	80
7	REFERÊNCIAS.....	82

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade que alguns seres vivos possuem de reconstruir e restaurar células, tecidos, órgãos, estruturas complexas do corpo e suas funções, após serem lesionadas, danificadas ou perdidas, fascina os seres humanos desde a antiguidade. Os egípcios já possuíam artefatos e escritos referenciando tais fenômenos há mais de quatro mil anos, por exemplo, amuletos com o olho de Hórus, lagartos usados como adereços, lendas e escrituras que remontam a símbolos de renovação (Andrews CAR, 1994). Tais evidências são registros que atestam a precocidade histórica da observação desses fenômenos biológicos e suas peculiaridades (Elliott e Alvarado, 2018).

Na filosofia e ciência ocidentais, tais fenômenos têm sido abordados a partir dos estudos seminais de Aristóteles (Aristotle et al., 1965). Mas mesmo antes, referências implícitas da mitologia grega já demonstravam o conhecimento e fascínio exercidos pelos fenômenos regenerativos, muito bem exemplificados nos mitos da luta de Hércules contra o monstro Hidra, o qual ao ter uma de suas cabeças cortada, regenerava duas (Apollodorus, 1921), ou no mito de Prometeu, onde a punição de Zeus ao titã foi atá-lo a um rochedo por toda a eternidade, sendo torturado por uma ave de rapina que devorava seu fígado, e este se regenerava no dia seguinte. Tais mitos encontram eloquente paralelismo na regeneração das hidras (minúsculos cnidários aquáticos) e do fígado de mamíferos (Hesiod e Evelyn-White, 1914). Também muitos outros povos antigos, como indus e astecas, por exemplo, que mesmo sem ter uma explicação ao alcance, projetavam tal prodígio em suas lendas e criaturas míticas (Narayan, 1972; Goswami et al., 2005; Lee e Gardiner, 2012; Elliott e Alvarado, 2018).

A regeneração inspirou diversas obras literárias, políticas e culturais ao longo da história até os dias hoje (Elliott e Alvarado, 2018). Por volta do ano 77 alguns tratamentos para doenças oftálmicas, baseadas em regeneração de tecido ocular de anfíbios, foram formulados por Plínio, o Velho (Pliny e Riley, 1853). Na Idade Média o fenômeno também foi mencionado por Santo Alberto Magno, em seus estudos sobre a pele de diversos animais e penas de pássaros (Albertus et al., 2011).



**Figura 1. Escultura Prometeu (Nicolas-Sébastien Adam, 1762, Louvre).** Belíssima alusão mitológica e artística-cultural ao processo de regeneração do fígado.

Na ciência moderna, esse tema começou de fato a ser estudado mecanisticamente por diversos cientistas, principalmente a partir do século XVIII (Elliott e Alvarado, 2018). Mas os primeiros estudos mais influentes para a expansão dos estudos experimentais posteriores, foram executados por Thomas Hunt Morgan no início do século XX. O conceito de regeneração passou a ser dividido em três áreas: i) a regeneração do ovo e do embrião, hoje conhecida como regeneração embrionária; ii) a fisiológica, entendida como homeostática, ou seja, substituição habitual de células e tecidos (epiderme e cabelo, por exemplo); e iii) a regeneração

que restaura as funções e reconstrói completamente os tecidos, órgãos, estruturas complexas, após lesão, amputação ou autotomia (Poss, 2010; Vervoort, 2011).

Nas últimas décadas têm surgido estudos em diversas áreas que exploram os processos regenerativos, porém ainda não se tem um conjunto de dados robustos que elucidem a rede de eventos moleculares e bioquímicos que coordenam tais fenômenos. Evidências experimentais têm revelado a participação dos complexos NOX e V-ATPase no local da lesão logo após a amputação e a interdependência dos mesmos nos eventos moleculares que culminam na reativação de vias de sinalização responsáveis pela reconstrução completa e correta dos tecidos perdidos ou danificados (Kakebeen e Willis, 2019). Entretanto, o porquê de alguns animais possuírem capacidades regenerativas e outros não a possuírem e como isso acontece, também são perguntas que ainda permanecem sem respostas (Gordon e Shenkar, 2018).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Regeneração e seus tipos

Alguns fenômenos fisiológicos de restauração são básicos para a manutenção do corpo e de sua homeostase, como os que têm por objetivo substituir periodicamente células de vida curta, como as da pele e de linhagem sanguínea dos vertebrados. Além dos fenômenos de reconstrução periódica, como a muda de penas de pássaros, do exoesqueleto de crustáceos, da pele de cobras, chifres de veados e até mesmo da renovação do endométrio no ciclo menstrual de mamíferos. A regeneração inclui os mecanismos para reconstruir o tecido ao reparar perdas por amputações, danos causados por ferimentos, doenças e outros fatores que prejudiquem a interidade do organismo (Stoick-Cooper et al., 2007).

A morfolaxia é a regeneração exemplificada pela hidra, onde ocorre um remodelamento do tecido já existente, sem indução de reprodução celular. Na regeneração chamada compensatória há um crescimento celular a partir do tecido existente para completar a parte perdida, um exemplo é o que acontece no fígado. Há também as que se restringem a um órgão, incluindo apenas um tipo de célula para reparar danos locais. Já a regeneração classificada como epimórfica é a que reconstrói partes perdidas ou danificadas, tais como membros, nadadeiras, caudas, e outras estruturas complexas. Envolve desdiferenciação celular com a formação do blastema, um botão de células germinativas com capacidade para se rediferenciar e proliferar de maneira ordenada, ativando células progenitoras e a morfogênese de novos tecidos para a substituição necessária (Carlson, 2007; Stoick-Cooper et al., 2007; Bideau, 2021, Brockes e Kumar, 2008).

Recentemente foi feito um mapeamento de dados atualizados a respeito da capacidade regenerativa dos metazoários (Bideau, 2021), e na figura 2 podemos observar um esquema simplificado de classificação filogenética.

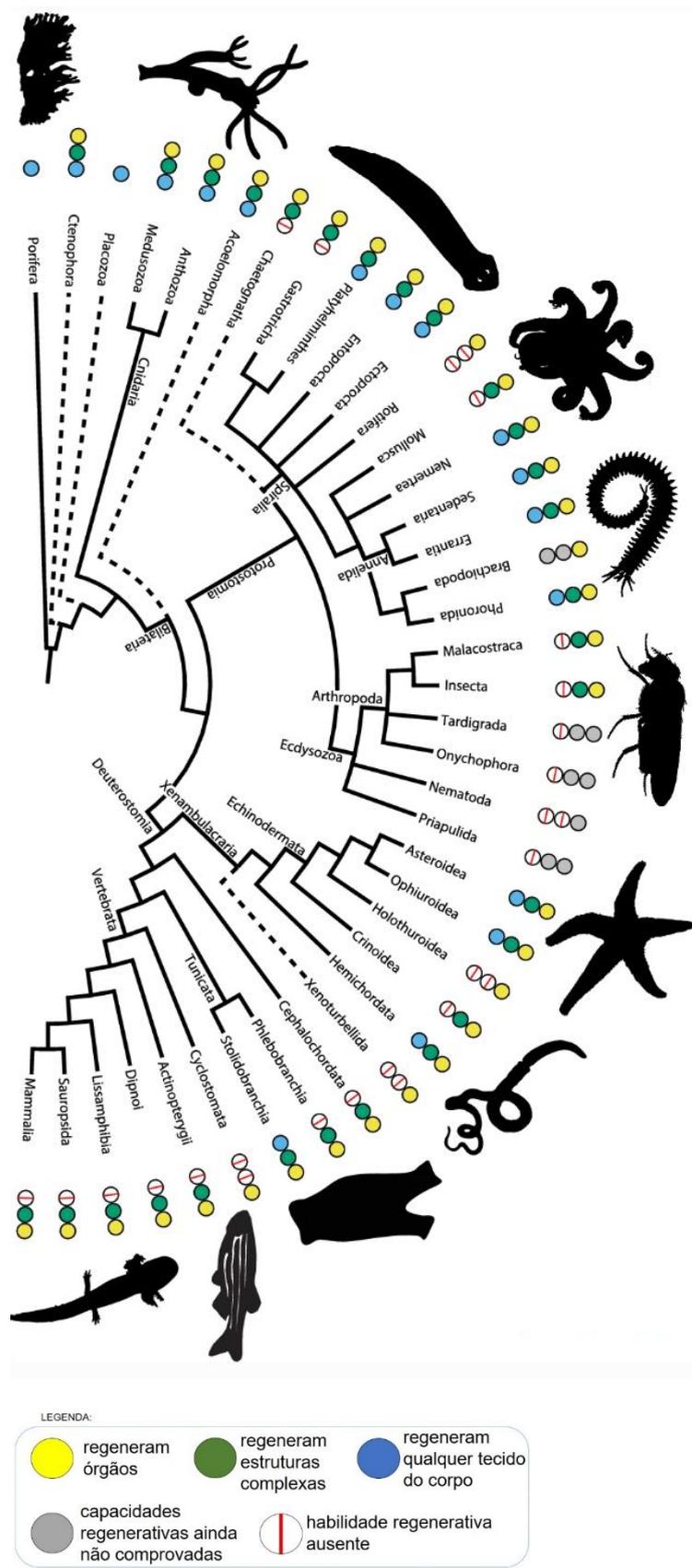


Figura 2. Mapeamento das capacidades regenerativas dos metazoários. (adaptado de Bideau, 2021).

As capacidades regenerativas estão distribuídas ao longo de todo reino animal, inclusive entre espécies evolutivamente distantes (Bely e Nyberg, 2010). Entretanto, ao examinar a figura 2 constatamos que grande parte dos animais invertebrados consegue regenerar o corpo todo, enquanto que os vertebrados já perderam essa capacidade, embora consigam regenerar alguns órgãos e estruturas complexas. Destaca-se os indivíduos pertencentes ao subfilo Tunicata, da classe Ascidiacea e da ordem Stolidobranquia, as ascídias, as quais são os únicos cordados que conservaram a habilidade de regenerar todos os tecidos do corpo (Bideau, 2021).

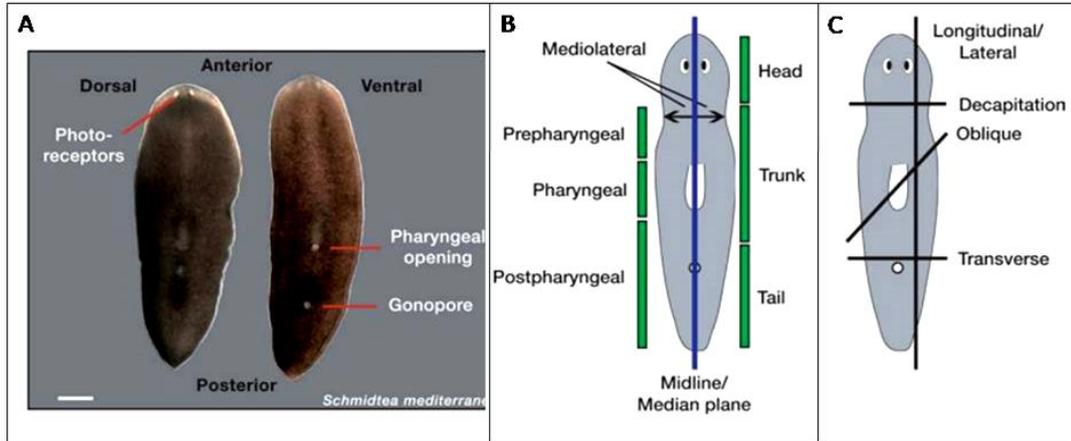
## **2.2 Principais modelos de estudo de regeneração**

### **2.2.1 Planária**

Embora os primeiros estudos de regeneração tenham sido feitos em hidras (Lenhoff e Lenhoff, 1986), as planárias constituem outro modelo clássico para estudos de regeneração, dadas as facilidades técnicas e econômicas para sua reprodução e manutenção em laboratório. Tais características levaram a elucidação de vários dos seus processos celulares, moleculares e as vias de sinalização que estabelecem o plano bilateral do corpo, um padrão de desenvolvimento conservado nos vertebrados, o que reforça a sua utilidade como organismo modelo (Reddien e Alvarado, 2004). As observações iniciais registradas remontam ao século XVIII (Pallas, 1774), mas foi só em 1898, que Morgan constatou que mesmo pequenos fragmentos retirados de planárias tinham capacidade para regenerar um organismo inteiro. Esses metazoários vivem em habitats marinhos e de água doce, e pertencem ao filo Platyhelminthes, se alimentando de pequenos invertebrados, insetos e larvas (Reddien e Alvarado, 2004).

Planárias são ótimos organismos modelo para estudos do estabelecimento da polaridade ântero-posterior durante a morfogênese nos processos regenerativos, e seu amplo uso levou a uma maior compreensão da natureza celular da regeneração e das propriedades das células-tronco (Elliott e Alvarado, 2018). Em indivíduos saudáveis a proliferação e migração celular acontecem normalmente, como parte de uma renovação fisiológica para manter a homeostase dos seus tecidos (Reddien e Alvarado, 2004). O corpo adulto desses animais possui células embrionárias denominadas neoblastos, que são células indiferenciadas, capazes de formar vários

tipos de tecido, e que possuem características próprias, como pouco citoplasma e núcleos grandes (Dubois, 1949; Wolff, 1962).



**Figura 3. Representação esquematizada das partes externas de uma planária de água doce, *Schmidtea mediterranea*.** Fotografia com barra de escala de 1 mm (A). Em destaque o plano corporal apresentando as regiões anterior, posterior, dorsal e ventral, além dos tipos de amputações mais utilizadas para estudar a regeneração nesse modelo (fonte: Reddien e Alvarado, 2004)

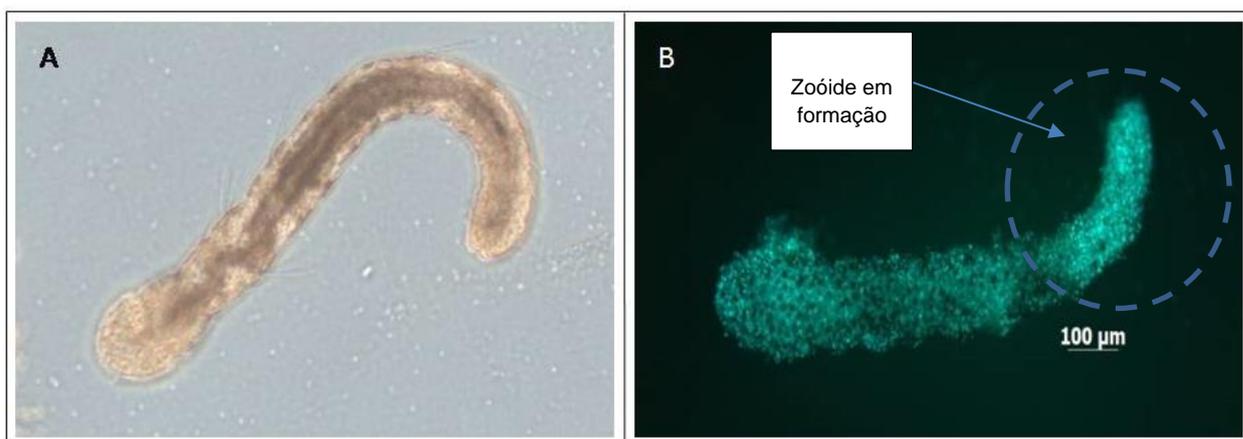
Ao sofrer amputação planárias imediatamente respondem com uma contração muscular intensa para diminuir a superfície da ferida (Chandebois 1980, Newmark e Alvarado, 2002). Nesse local é liberada uma substância que lhe confere proteção imunológica (Reisinger e Kelbetz, 1964) e, após cerca de 30 minutos uma fina camada epitelial apresenta-se cobrindo a ferida (Baguñà et al., 1994; Alvarado e Newmark, 1998). Os neoblastos são sinalizados e migram para o local da lesão, onde irão formar o blastema, botão de crescimento em que ocorre a intensa proliferação celular ordenada que conduz a morfogênese de um novo tecido (Brondsted, 1969; Dubois e Wolff, 1947; Dubois, 1949).

### 2.2.2 Aelosomatídeos

Como mostrado na figura 2, os invertebrados são os animais mais dotados de capacidades regenerativas. Os Aelosomatídeos pertencem ao grupo dos anelídeos, não são muito utilizados como modelos para estudos de regeneração, apesar de possuírem de alta capacidade regenerativa. Nesses animais tais aptidões variam muito entre as espécies, inclusive entre os pertencentes à mesma família (Bely, 2006;

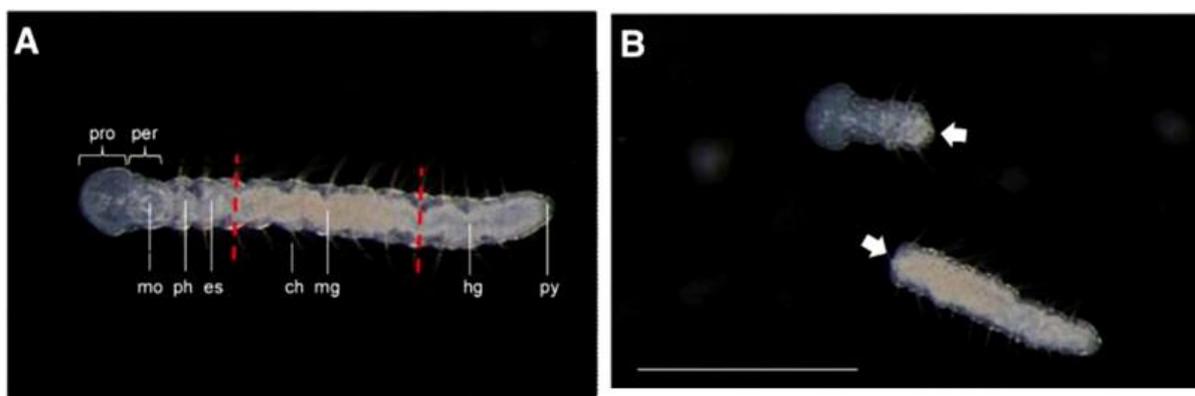
Bely e Sikes, 2010; Pfannenstiel, 1974). Algumas espécies possuem altas capacidades regenerativas porém, apenas regeneram amputações em um determinado plano corporal, ou do segmento posterior, ou do segmento anterior (Bely, 2006). Já outras espécies conseguem regenerar a partir de amputações em ambos os segmentos (Foulkes, 1953; Gibson e Paterson, 2003).

Estes diminutos poliquetas são cosmopolitas, encontrados em todas as partes do mundo em habitats de água doce, integrantes da família Aeolosomatidae (Annelida, Aphanoneura), na qual cerca de 30.000 espécies já foram identificadas (Glasby e Timm, 2008; Glasby et al., 2009). Dessas, uma mínima parte se reproduz sexuadamente e as demais se utilizam de reprodução assexuada, a paratomia (Falconi et al., 2015; Marotta, et al., 2003). Nesse tipo de reprodução forma-se um zoóide no seguimento posterior do animal, que ao sofrer fissão se separa do adulto, (Radashevsky, 1996; Smith, 1985; Zattara e Bely, 2016). Dados prévios de nosso grupo (Marques, 2016), usando microscopia confocal com marcação de núcleos celulares de Aeolosomas adultos, revelaram claramente a região anterior que se destaca, onde está ocorrendo a formação do zoóide, e a maior marcação nuclear demonstrou a intensa proliferação celular na região (figura 4 B).



**Figura 4. *Aelosoma* sp. (animal adulto)** - Em (A) microscopia de campo claro e em (B) microscopia confocal a laser com marcação de núcleos celulares (Marques, 2016).

Podendo atingir de 5 a 10 mm de comprimento, a alimentação desses animais é baseada em partículas de matéria orgânica, algas e bactérias (Blaszak, 2009). Com o corpo tipicamente transparente, são bons modelos para se acompanhar o processo de crescimento, em que se pode observar cada novo segmento sendo acrescentado na zona posterior do corpo, e que, geralmente é determinado pela disponibilidade e qualidade nutricionais (Chen et. al., 2020). Em *Aelosoma viride*, no primeiro segmento há um prostômio e um peristômio com uma boca (orifício circular simples) no centro do seu canal alimentar está localizado um intestino médio alargado, e no último segmento está o pigídio (Chen et. al., 2020).

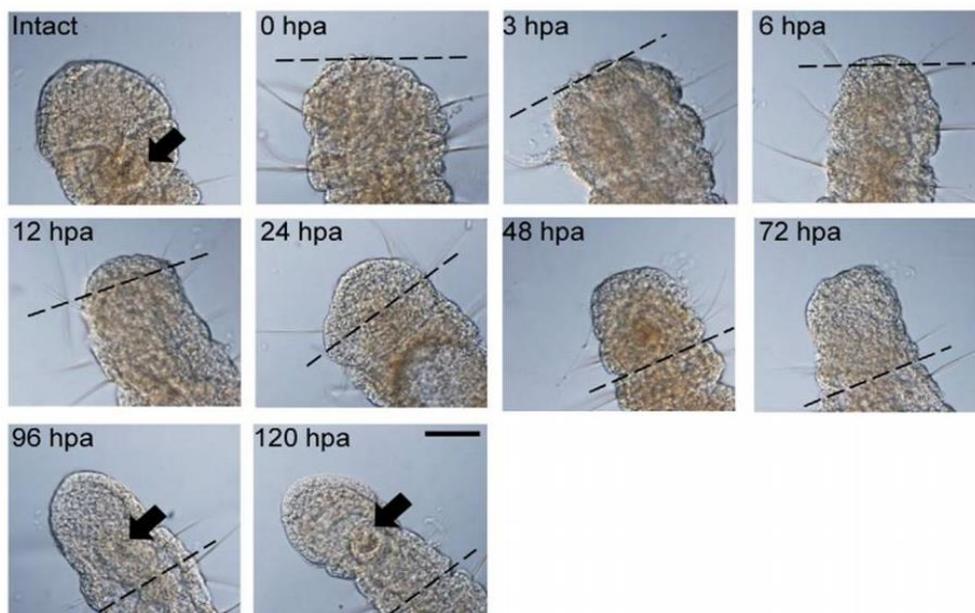


**Figura 5. Segmentos do corpo de *Aelosoma viride*.** Barras de escala: 1 mm. Em (A), ch: queta; es: esôfago; hg: intestino grosso; mg: intestino médio; mo: boca; per: peristômio; ph: faringe; pro: prostômio; py: pigídio. Em (B), animal dividido após sofrer amputação na posição anterior do corpo, as setas indicam o local do corte (adaptado de Chen et. al., 2020).

Na figura 5 é possível identificar as regiões anatômicas do *Aelosoma viride*; e outro exemplar com o corpo seccionado na porção medial anterior (Chen et. al., 2020). Os processos regenerativos desses animais são muito similares aos de formação do zoóide em sua reprodução assexuada (Berrill, 1952; Galloway, 1899). De interesse bioenergético e cronobiológico, estudos posteriores revelaram que as taxas de sobrevivência após amputação e o crescimento celular vão diminuindo à medida que o animal vai envelhecendo (Skol e Obst, 2011).

A proliferação celular com formação de blastema caracteriza a regeneração epimórfica em muitos modelos de anelídeos (Fernando et al., 2011; McCusker et al., 2015). Um estudo recente utilizando *Aelosoma viride* mostrou que, nesses eventos,

as células somáticas passam por um processo de dediferenciação, para que uma vez regenerado o estágio de células-tronco, as células do blastema possam reconstruir o tecido lesionado (Chen et. al., 2020). Na figura 6, vemos a regeneração do segmento anterior (cabeça) de *A. viride* com a formação de um blastema, que se torna visível de 12 à 24h após a amputação (Chen et al., 2020).



**Figura 6. Processo de regeneração do seguimento da cabeça de *Aelosoma Viride*.** Barra de escala: 50  $\mu$ m As setas e linhas pontilhadas indicam o local da amputação. A sigla hpa refere-se a “horas após amputação”. (Adaptado de Chen et. al., 2020).

Este modelo animal é atraente por ter o ciclo de vida curto e ser cultivado de forma rápida, fácil e com baixo custo, além de possuir o corpo translúcido, ideal para visualizações *in vivo* da dinâmica do crescimento celular. Porém, em investigações anteriores, com ensaios bioquímicos, envolvendo isolamento de membranas celulares viáveis para determinação de atividades enzimáticas, vimos que as preparações de Aelosomas para fracionamento celular possuem rendimento baixo, em termos de quantidade de proteínas, comprometendo a taxa de experimentos bem sucedidos (Marques, 2016). Para que os resultados sejam mais acertivos seria necessário utilizar apenas a região de amputação, isso dificulta ainda mais a disponibilidade de material para tais ensaios, uma vez que possuem corpo delgado com finas camadas de tecido e muita secreção mucilaginosa. Outra dificuldade que também enfrentamos, diz respeito a dificuldades com a analgesia do animal para observações *in vivo* que

necessitam que o mesmo esteja inerte. Foi o caso de nossas medições de fluxos de prótons com sonda vibrátil, que é delicada e sensível, correndo o risco de medidas imprecisas ou mesmo da sonda ser quebrada devido a movimentação do animal (Marques, 2016).

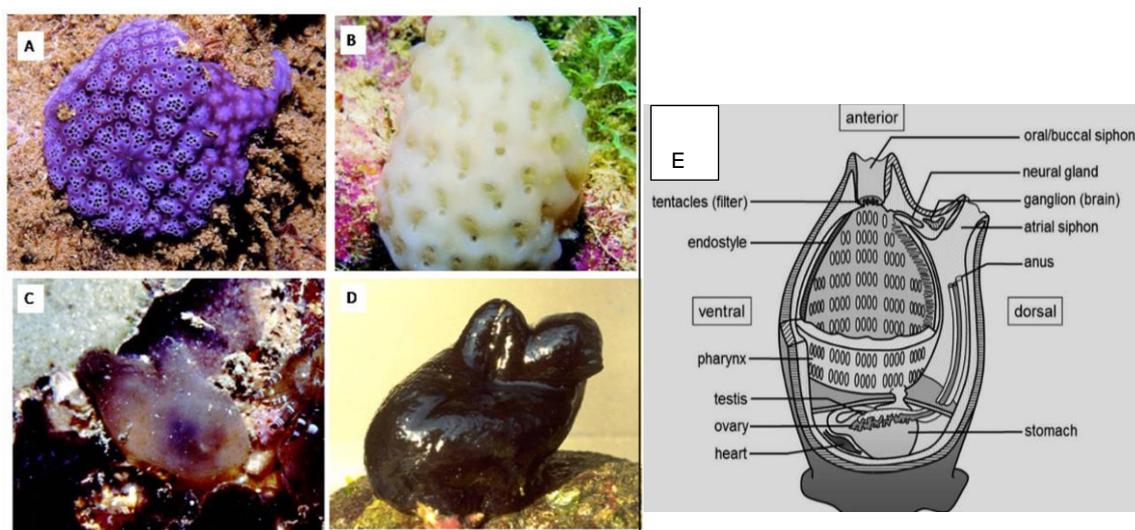
### **2.2.3 Ascídia**

Outro modelo interessante para estudar os fenômenos regenerativos é a ascídia. Da classe Ascidiacea (Shenkar e Swalla, 2011), com cerca de 3000 espécies marinhas de águas rasas e profundas (Monniot et al., 1991; Kott, 2005), constituem o maior grupo de animais pertencentes ao subfilo Tunicata (também conhecido como Urochordata), que desde Aristóteles são reconhecidos como um grupo diferenciado (Monniot et al., 1991).

Análises filogenéticas modernas revelaram características da fase larval que determinaram sua classificação como um dos representantes mais primitivos do filo Chordata (Monniot et al., 1991; Cameron et al., 2000). No estágio larval possuem notocorda, cauda pós-anal, um cordão nervoso tubular dorsal e fendas branquiais faríngeas rudimentares - as quatro características fundamentais dos cordados (Gordon e Shenkar, 2018). Nesse estágio também possuem um órgão tubular alongado no lado ventral do saco branquial, o endóstilo, que é semelhante à glândula tireóide nos vertebrados (Fujita e Nanba, 1971), que juntamente com os fragmentos da fenda branquial na faringe irão formar o saco branquial (Millar, 1971). Essas duas características larvais são conservadas após passarem pela metamorfose, enquanto que, as demais são modificadas ou substituídas na fase adulta (Jeffery, 2012). Por apresentar algo semelhante a uma túnica constituída polissacarídeo-celulose, um tipo de exoesqueleto, foram também denominados tunicados, originalmente, por Lamarck, em 1816 (Lambert, 2005).

Quando adultos, são sésseis em sua grande maioria e possuem um plano corporal comum, que consiste em um saco oco com uma abertura de dois sifões ao ambiente externo (Gordon e Shenkar, 2018). Entre esses fica localizado o complexo neural (cérebro), formado por um único gânglio e uma glândula neural associada (Mackie e Burighel 2005; Dahlberg et al. 2009). Suas características morfológicas

podem ser conferidas na ilustração da figura 7, entre elas observamos o estômago, intestino, coração e um saco branquial que utilizam tanto para a respiração quanto para capturar os alimentos (Pestarino et al., 1988; Fisher, 1976). Em algumas espécies os indivíduos são solitários já em outras vivem em colônias podendo reproduzir-se sexualmente e assexuadamente (Monniot et al., 1991; Shenkar e Swalla, 2011; Gordon e Shenkar, 2018)



**Figura 7. Exemplos representativos das espécies de ascídias e suas características morfológicas.** (A), *Eudistoma sp.*, e (B), *Stomozoa gigantea*, ambas espécies coloniais. Em (C), *Ascidia interrupta* e em (D), *Phallusia nigra*, espécies solitárias (adaptada de Lotufo, 2002). Em E, suas características morfológicas de ascídias solitárias esquematizadas, fonte: MORAES, Paula Louredo. "Subfilo Urochordata"; *Brasil Escola*. Acesso em 05 de agosto de 2021; <https://s1.static.brasilecola.uol.com.br/be/conteudo/images/organizacao-interna-da-ascidia.jpg>

Possuem alta capacidade de regeneração, inclusive do sistema nervoso central que se regenera por inteiro após completa ressecção (Mackie e Wyeth, 2000). Além da regeneração do complexo neural, as espécies solitárias também regeneram órgãos internos e estruturas periféricas (Dahlberg et al., 2009; Shenkar e Gordon, 2015), contudo essa aptidão diminui de acordo com a idade do animal (Jeffery, 2012; Dahlberg et al., 2009). Nos processos regenerativos do tecido neural em espécies solitárias há a presença de um blastema que fornece novas células na extremidade de cada nervo que se reconstrói (Dahlberg et al., 2009). Já as espécies coloniais conseguem regenerar um zoóide inteiro a partir de pequenos fragmentos ou de células

sanguíneas (Cohen e Berrill, 1936; Freeman, 1964; Voskoboynik et al., 2007; Kawamura et al., 2008; Brown et al., 2009).

As ascídias coloniais são as mais estudadas (Tiozzo et al., 2008; Voskoboynik et al., 2008), enquanto que as de vida solitária possuem menos espécies utilizadas (Medina et al., 2015). Algumas das espécies mais estudadas já possuem sequenciamento genômico, métodos aprimorados de criação para estudos em laboratório, linhagens transgênicas expressando marcadores fluorescentes etc. (Dahlberg et al., 2009; Awazu et al., 2007; Joly et al., 2007), por serem os únicos cordados que conservaram a capacidade de regenerar todos os tecidos do corpo, esses animais podem nos oferecer pistas evolutivas dos eventos moleculares, bioquímicos e celulares que envolvem manutenção e perda dessas capacidades (Delsuc et al., 2006; Goss, 1992; Bely, 2010; Bely e Nyberg, 2010; Giangrande e Licciano, 2014).

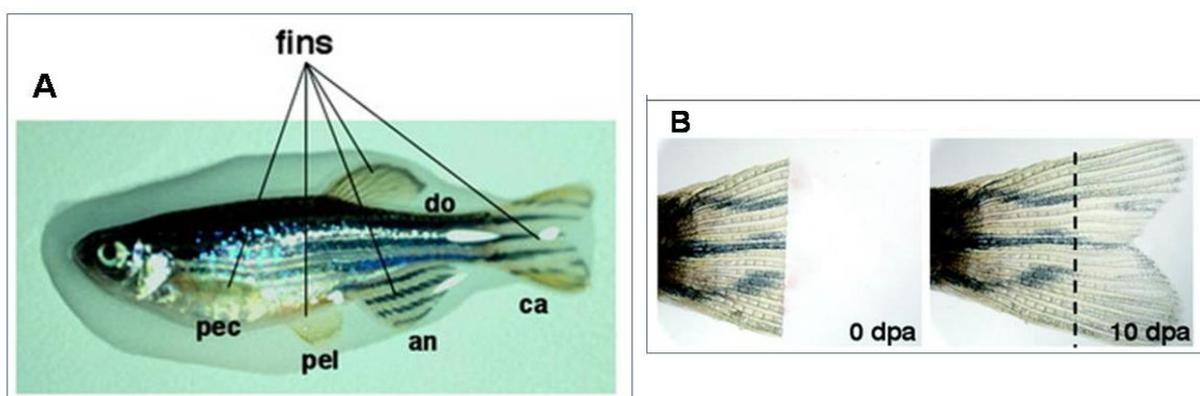
#### **2.2.4 Peixe-zebra**

Conhecido popularmente como peixe-zebra ou paulistinha, a espécie *Danio rerio* é um dos animais modelo mais utilizados em estudos em diversas áreas das ciências biológicas, com abundante representação nos bancos de dados de plataformas para análises *in silico*, fornecendo uma vasta base de informações, além de possuir ampla disponibilidade de reagentes e tecnologias aprimorados para a pesquisa desta espécie. Foi usado pela primeira vez como modelo de estudo na década de 1970, por George Streisinger, e já nos anos de 1990 ganhou amplo destaque em estudos com mutantes genéticos (Rahman Khan e Sulaiman Alhewairini, 2019).

Por ser de cultivo fácil e de baixo custo, desenvolvimento rápido, ter uma boa taxa de fecundidade e embriões com o corpo transparente (Carpio e Estrada, 2006; Brand et al., 2002; Rahman Khan e Sulaiman Alhewairini, 2019), o *Danio rerio* foi e continua a ser um modelo muito útil, principalmente para identificação de novos genes e suas funções em vertebrados (Carpio e Estrada, 2006; Pelegri, 2002). Mas seu uso também se estende a estudos de patologias diversas (Chitramuthu, 2013), como na carcinogênese (Hawkins *et al.*, 1985; Spitsbergen *et al.*, 2000), descoberta e avaliação

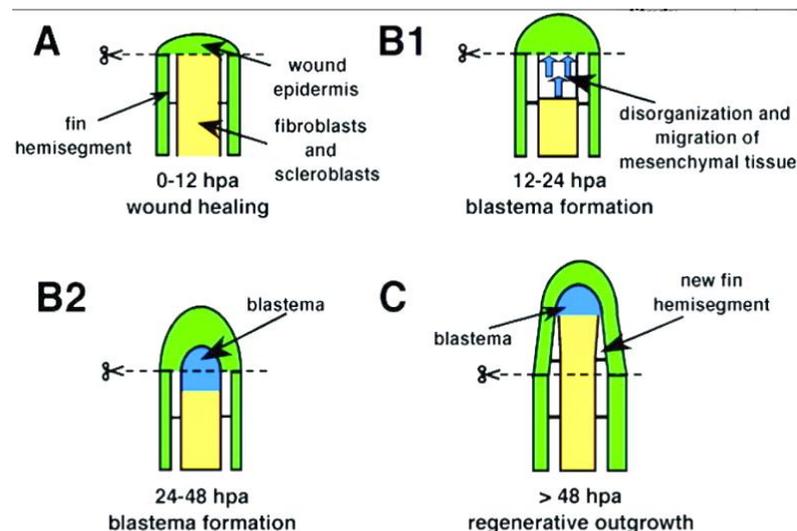
da bioatividade de novos fármacos (Handen, 2002; Kari *et al.*, 2007), na angiogênese (Chávez *et al.*, 2016), na agricultura, auxiliando o manejo e criação de outros peixes (Dahm e Geisler, 2006), entre muitas outras áreas estratégicas (Rahman Khan e Sulaiman Alhewairini, 2019). Além de constituir um organismo modelo que compartilha com humanos muitas semelhanças genômicas e em vias críticas do desenvolvimento de vertebrados, e semelhanças genéticas e fisiológicas marcantes no desenvolvimento de cérebro, músculos, sistema imunológico inato e trato digestivo (Gore *et al.*, 2012; Kanungo *et al.*, 2014), também possui em torno de 70% de homólogos funcionais aos genes relacionados a doenças em humanos (Santoriello *et al.*, 2012)

Teleósteo (peixe ósseo) tropical de água doce, pertencente à classe Actinopterygii, dos peixes com raios nas barbatanas e à família Cyprinidae (Rahman Khan e Sulaiman Alhewairini, 2019) que, apesar de não regenerar todos os tecidos do corpo, conserva tal capacidade em diversos tecidos, órgãos e estruturas complexas (Rahman Khan e Sulaiman Alhewairini, 2019), como nervo óptico, coração, escamas, medula espinhal e nadadeiras (anais, caudais, dorsais, pélvicas e peitorais) mesmo depois de adultos (Broussonet, 1786; Becker *et al.*, 1997; Bernhardt *et al.*, 1996). A figura 8 (A) mostra a fotografia de um peixe-zebra e suas nadadeiras esquematizadas, em (B) uma nadadeira amputada e a mesma totalmente regenerada após 10 dias de amputação.



**Figura 8. Peixe-zebra adulto medindo de 3 a 4 cm de comprimento.** Em (A), esquema mostrando suas nadadeiras: pec: peitoral, pel: pélvica; an: anal; do: dorsal e ca: caudal. Em (B), nadadeira caudal amputada e totalmente recosntruída após 10 dias de amputação (dpa). (Adaptado de Poss *et al.*, 2003).

A barbatana caudal é o órgão mais escolhido para a realização de estudos de regeneração, pois possui uma estrutura simples e simétrica, fina, relativamente transparente e de fácil acesso para procedimentos cirúrgicos, permitindo também melhor visualização das estruturas vasculares (Poss et al., 2003). Quando a barbatana é amputada ocorre migração de células formando uma fina camada epitelial para cobrir a ferida, após algumas horas há uma desorganização do tecido mesenquimal adjacente, um acúmulo de várias dessas camadas, num processo que ocorre sem sangramento e sem inflamação (Poss et al., 2003). Forma-se então o blastema, o botão de células proliferativas que irá promover o crescimento regenerativo da barbatana (Poss et al., 2003). Na figura 9 vemos esquematizado esse processo.



**Figura 9. Esquema representativo das fases do processo de regeneração da barbatana caudal do *Danio rerio*.** Em (A) temos a formação do epitélio de ferida, em (B1) as células mesenquimais que se desorganizam e migram para o local do corte, em (B2) o blastema formado pela estratificação do epitélio e em (C) o início do crescimento regenerativo. As linhas pontilhadas em cada esquema indicam o local da amputação (Poss et al., 2003).

### 2.2.5 Anfíbios

No grupo dos anfíbios, muitas espécies têm se mostrado atraentes como modelo para estudos de regeneração tecidual. A subclasse Lissamphibia é dividida em três ordens: a Caudada/Urodela constituída pelas salamandras, axalotes e tritões, com 9 famílias e cerca de 360 espécies (Freytag, 1974; Frost, 1985), a Gymnophiona/Apoda dos cecilianos, mais conhecidos como cobras-cegas, com 5

famílias e 164 espécies (Duellman e Trueb, 1986) e a Anura/Salientia composta pelos sapos e rãs com 23 famílias e cerca de 3400 espécies (Heusser, 1974 Duellman e Trueb, 1986; Parsons e Williams, 1963).

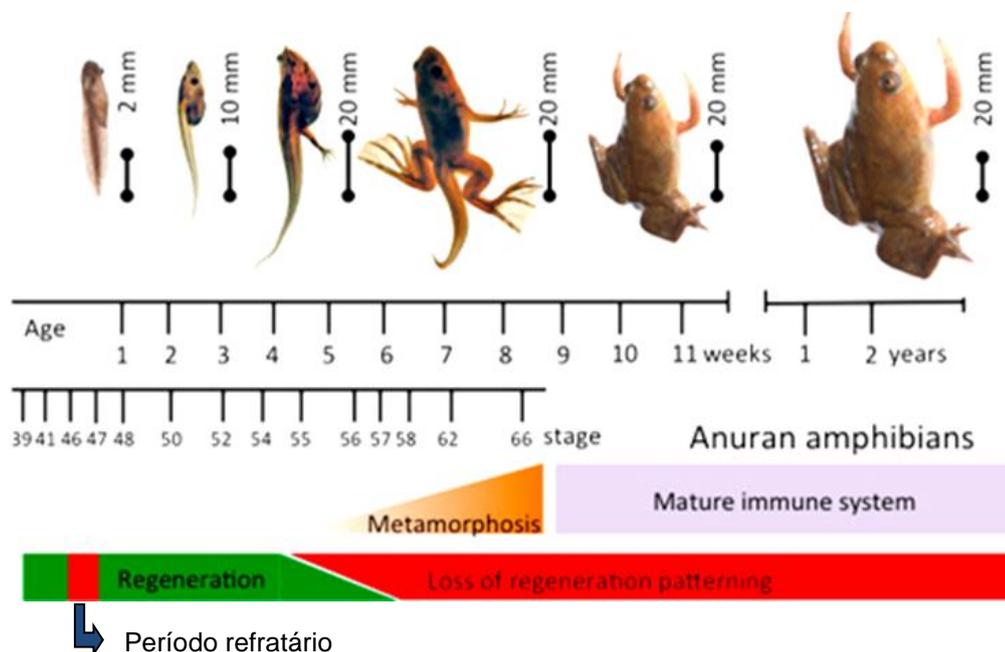
No grupo dos anfíbios, os urodeles são os que apresentam melhores capacidades regenerativas (Stocum, 1995), considerados campeões da regeneração, pois neles o processo de envelhecimento parece não interferir nas suas aptidões regenerativas (Zeleny, 1909). Muitas espécies regeneram caudas, membros, mandíbulas, pele, coração, lentes oculares e inclusive estruturas do sistema nervoso central como medula espinhal, cérebro e neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, sem deixar nenhuma cicatriz glial, mesmo depois da metamorfose (Roy e Gatien, 2008; Goss, 1969; Okamoto et al., 2007; Parish et al., 2007). Intrigantemente, salamandras e tritões também se destacam por uma forte resistência à indução ao câncer (Tsonis, 1983; Okamoto, 1997; Brockes, 1998).

Os estudos com salamandras iniciaram ainda no século XVIII, com destaque aos estudos de Spallanzani (Spallanzani, 1768), e atualmente as estruturas regenerativas mais estudadas nesse modelo são os membros anteriores e posteriores (Roy e Gatien, 2008). Sua regeneração epimórfica se dá de modo muito semelhante à que ocorre no *Danio rerio*. Após a amputação há a formação do epitélio de ferida, seguida de uma reorganização da matriz extracelular, as células então se desdiferenciam, migram e proliferam, formando o blastema (Roy e Gatien, 2008). A partir de então, de forma muito semelhante ao que acontece no desenvolvimento embrionário, o tecido que fora perdido é reconstruído completamente (Gardiner et al., 1999; Gardiner et al., 2002; Roy e Lévesque, 2006).

Anuros possuem capacidades regenerativas mais limitadas (Beck et al., 2009), e algumas espécies como *Xenopus laevis* e *X. tropicalis*, conhecidos popularmente como rãs com garras, quando girinos regeneram a cauda, estrutura que possui medula espinhal, notocórdio e somitos, cujos tecidos são os mesmos presentes no tronco que não regenera (Beck et al., 2009). Essa habilidade também se verifica no cristalino ocular e nos botões dos membros em formação, porém durante a metamorfose vai diminuindo de acordo com o aumento da idade do animal, de modo

que os sapos adultos regeneram apenas a cartilagem hipomórfica (Endo et al., 2000; Barfurth, 1894; Dent, 1962, Beck et al., 2009).

Os *Xenopus* são organismos amplamente utilizados em pesquisas, e como modelos em estudos de Evo-devo (biologia evolutiva do desenvolvimento) de vertebrados, existindo um vasto banco de dados disponível, assim como sondas, técnicas microcirúrgicas e transgênicas padronizadas e bem estabelecidas (Beck et al., 2009). Produzem numerosa progênie e podem se reproduzir durante todo o ano, além de ser de fácil manipulação em todos os seus estágios do desenvolvimento (Beck et al., 2009). Dentre esses há um período que é classificado como período refratário, que consiste nos estágios 45 a 47, entre o 4º e o 6º dia de desenvolvimento, em que esses girinos perdem temporariamente a capacidade de regenerar, a qual é recuperada no 48º estágio; o que os torna modelos preferenciais em estudos que exploram a comparação de eventos moleculares antes, durante e depois da perda transitória do poder de regeneração (Beck et al., 2009).



**Figura 10: Esquematização da capacidade regenerativa de anuros.** Relações entre os seus estágios do desenvolvimento, tamanho do corpo, idade e presença e ausência da habilidade de regeneração, representada pelas cores verde e vermelha respectivamente (Modificada de Godwin e Rosenthal, 2014).

### **2.3 Regeneração em *Homo sapiens sapiens***

Conforme os metazoários foram adquirindo complexidade estrutural e funcional, a habilidade regenerativa foi sendo perdida, de modo que os mamíferos, especialmente a espécie humana, apresentam grande limitação de tal capacidade (Roy e Gatién, 2008).

Todavia, durante o primeiro trimestre de gestação, os fetos de mamíferos possuem aptidões similares à dos urodeles (Adzick e Lorenz, 1994), mas quando adultos só regeneram alguns tecidos, como os de fígado, músculos e ossos, e mesmo nestes a reposição da quantidade correta de tecido é restrita (Michalopoulos e De Frances, 1997). Com o avançar da idade a capacidade de regeneração muscular vai diminuindo até cessar (Marsh et al., 1997; Grounds, 1998; Carlson et al., 2008). Os ossos estão em constante remodelamento e sua regeneração é bem sucedida em reparar fraturas, porém ocorrem imperfeições no processo, dependendo do local da ruptura, se for entre à extremidade óssea o reparo não é completo (Schmitz e Hollinger, 1986; Hietaniemi et al., 1995). O único órgão que regenera completamente é a pele em nível da epiderme, contudo se a lesão atingir a derme ocorre fibrose e esta não volta a sua estrutura original, formando cicatrizes (Martin, 1997; Harty et al., 2003). A única observação de regeneração epimórfica plena em humanos é a reconstrução da ponta dos dedos (Illingsworth, 1974), mesmo assim a eficiência do processo diminui sensivelmente com a idade.

### **2.4 Reconstrução do novo tecido**

A regeneração epimórfica é o tipo de regeneração mais eficiente, nela a parte lesionada ou perdida é reconstruída de modo fiel à original, no tamanho, polaridade e estrutura tridimensional (Roy e Gatién, 2008). Esse processo se dá em duas etapas: uma preparativa e outra de reiniciação de processos do desenvolvimento (Gardiner et al., 1999; Gardiner et al., 2002; Roy e Lévesque, 2006). Na primeira fase basicamente forma-se o epitélio de ferida e ocorre a desdiferenciação e migração de células adjacentes para o local da lesão formando o blastema, botão de células indiferenciadas que irão se proliferar no sítio da lesão (Roy e Gatién, 2008). Na segunda etapa as células se rediferenciam para promover a reconstrução do tecido, num processo que consiste na reativação e recapitulação do desenvolvimento

embrionário (Roy e Gatién 2008). Ou seja, como na embriogênese, ocorre uma intensa e rápida proliferação celular altamente ordenada, onde as células são direcionadas de acordo com as identidades posicionais, gerando estruturas padronizadas (Kakebeen e Willis, 2019)

Algumas vias de sinalização do desenvolvimento embrionário, como BMP, Wnt, FGF, Shh, TGF- $\beta$ , são reativadas e estão envolvidas com a padronização correta no processo de reconstrução da cauda do girino de *Xenopus* (Beck et al., 2003; Lin e Slack, 2008; Ho e Whitman, 2008; Taniguchi et al., 2014). Outras semelhanças com a embriogênese são: a dependência dos fatores de transcrição Hox nas fases posteriores ao estabelecimento das identidades posicionais (Christen *et al.*, 2003) e a expressão 'de novo' de muitos genes que também ocorrem na formação da cauda, durante o desenvolvimento (Love et al., 2011; Chang et al., 2017). Mas a reconstrução de um novo tecido ocorre de forma independente do desenvolvimento, pois precisa ser reativada em qualquer momento em que for requisitada e não se dá por inteiro, formando exatamente a parte do tecido que foi perdida, particularidade que torna a regeneração um evento singular, independente da embriogênese (Kakebeen e Willis, 2019).

## **2.5 Respostas iniciais dos tecidos que não regeneram**

A partir do estímulo que perturba a integridade do tecido e sua homeostase, ocorre no local do ferimento uma série de respostas iniciais que irão guiar o processo de reparo (Kakebeen e Willis, 2019). Quando as lesões ocorrem nos tecidos de animais que não regeneram, como a medula espinhal de mamíferos e em amputação de seus membros, por exemplo, as respostas iniciais são de cunho inflamatório e os conduzem a uma série de eventos que culminam, por exemplo, na cicatrização fibrótica, caracterizada por depositar tecido conjuntivo no local da lesão formando uma fibrose, com o objetivo de estancar rapidamente o sangramento e fechar o ferimento para impedir a entrada de patógenos para que a homeostase seja recuperada o mais rápido possível (Kakebeen e Willis, 2019). Nesse caso, o foco na rapidez e segurança do reestabelecimento da homeostase no local lesionado cobra um preço do animal, que fica com uma incapacidade permanente, pois o tecido perdido (ou lesionado) e suas funções não são recuperados.

## 2.6 Espécies reativas de oxigênio

Entretanto, nos organismos capacitados a promover uma restauração completa de estrutura e função, ou seja, que irão regenerar, as respostas iniciais são singulares e dentre essas, uma sinalização diferencial de espécies reativas de oxigênio (ROS, *Reactive Oxygen Species*) constitui um dos primeiros fenômenos detectados no local da lesão (Belousov et al., 2006).

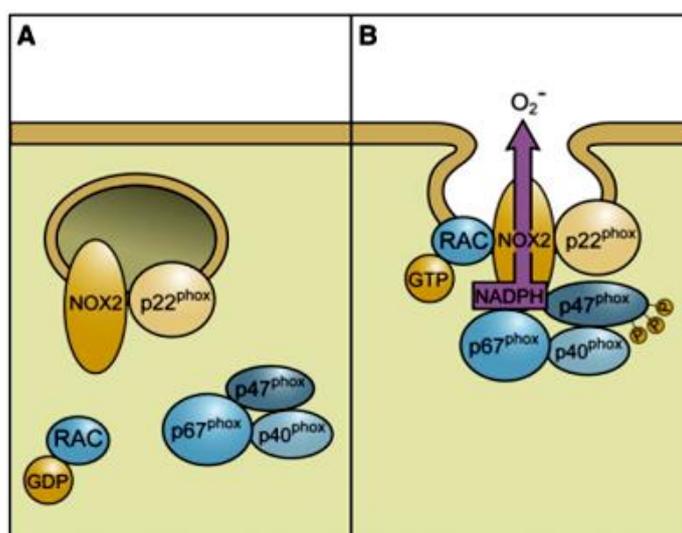
As ROS são geradas nas mitocôndrias continuamente, como resíduos tóxicos do metabolismo (Smith e Curnutte, 1991; Finkel e Holbrook, 2000). Originam-se também nos tecidos como subproduto de algumas reações biológicas e são sintetizadas em diversos tipos celulares, em resposta a citocinas, fatores de crescimento, sinais de cálcio, etc, sinalizando processos fisiológicos e do desenvolvimento (Batot et al., 1995; Segal et al., 1981; Babior, 2004). O controle fino da sua produção está diretamente associado à atividade de diversas enzimas, principalmente das NADPH oxidases (NOX), que foram descobertas inicialmente nos fagócitos profissionais, onde produzem ROS para combater patógenos (Lambeth 2004, Bedard e Krause, 2007; Balaban *et al.*, 2005, Segal *et al.*, 1981; Babior, 2004).

São também constantemente eliminadas pela ação de enzimas, tais como a superóxido dismutase, glutathiona peroxidase, catalase, e outras, uma vez que seu acúmulo leva ao estresse oxidativo, e sua toxicidade pode causar diversas doenças (Storz e Imlay, 1999; Aruoma, 1998).

Além de interferirem no metabolismo, proliferação, sinalização, as ROS são cruciais e determinantes para que os processos de reconstrução restaurativa dos tecidos ocorram (Finkel e Holbrook, 2000; Lambeth, 2004). Após a amputação da cauda de *Xenopus laevis* muitos genes envolvidos na sua produção são regulados positivamente (Love *et al.*, 2011) e quando essa produção é inibida a regeneração não acontece, comprovando sua essencialidade nesses processos (Love *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2016, 2018). Após 20 minutos da amputação um acúmulo de ROS já pode ser detectado, e cerca de 6 horas após a amputação (hpa) as suas concentrações atingem um pico, se mantendo elevadas até o fechamento do epitélio na região lesionada (Love *et al.*, 2013).

A produção de ROS inicial é dependente de uma infiltração de oxigênio molecular ambiental através da lesão, e da ativação do complexo NOX que, a partir de NADPH, transfere elétrons através das membranas para o oxigênio molecular produzindo íons superóxidos, que são então dismutados em  $H_2O_2$  e outras ROS mais estáveis e difusíveis (Ago *et al.*, 1999; Kakebeen e Willis, 2019; Bedard e Krause, 2007). A manutenção das suas altas concentrações até completar o fechamento da ferida, onde gradativamente diminui a partir de então, depende também de outros agentes como, por exemplo, as células do sistema imune inato que migram para o local da lesão (Love *et al.*, 2013). No período refratário, em que o girino perde temporariamente a capacidade de regeneração, essa infiltração de oxigênio é interrompida, bloqueando também a capacidade de regeneração (Ferreira *et al.*, 2018; Love *et al.*, 2013).

O complexo da NADPH oxidase é bem diversificado. NOX2, por exemplo, é constituído por dois domínios ligados à membrana: gp91phox e p22phox, três componentes no citosol: p67phox, p47phox e p40phox, além de uma proteína G de baixo peso molecular, rac1 ou rac2. A gp91phox é ativada com a fosforilação de um dos seus componentes citosólicos, produzindo grandes quantidades de ROS (Bedard e Krause, 2007). A figura 11 esquematiza sua montagem e ativação em um fagócito.



**Figura 11: Montagem e ativação do complexo NADPH oxidase (NOX2) no fagócito.** Nas membranas das vesículas intracelulares (A). Quando é ativado, as vesículas contendo NOX2 se fundem na membrana plasmática ou na membrana fagossomal (B) (Bedard e Krause, 2007).

NOX2 possui vários homólogos: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2, a depender da espécie de ser vivo e do tipo celular em que se encontram. Assim, as NADPH oxidases constituem uma verdadeira família NOX e são controladas por uma grande diversidade de mecanismos regulatórios (Bedard e Krause, 2007; Lambeth, 2004). Suas funções vão muito além das atividades que executam nos fagócitos para promover a morte de microorganismos invasores, estando presente em praticamente todos os tecidos (Bedard e Krause, 2007).

As variedades de isoformas e mecanismos de ativação e os tecidos em que se encontram as NADPH oxidases estão demonstrados no esquema da figura 12 e 13, respectivamente. NOX1, NOX2, NOX3 e NOX4 formam complexos com p22<sup>phox</sup> na membrana. Enquanto que NOX2 é ativado através da ação de Rac e da montagem envolvendo p67, p47 e p40. NOX1 e NOX3 são ativados também com a participação por NOXO1 e NOXA1, além de Rac. NOX5 e DUOX1/2 possuem um domínio calmodulina amino-terminal com sítios de ligação de cálcio para sua regulação e DUOX1/2 possuem uma subunidade transmembranar extra (Lambeth, 2004; Bedard e Krause, 2007).

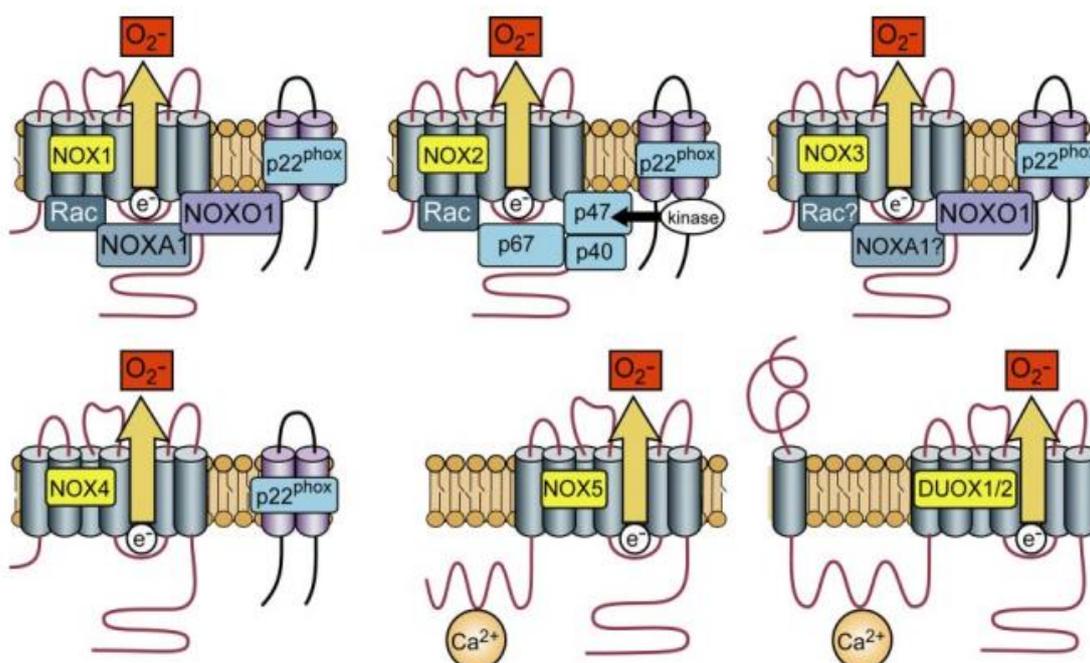


Figura 12. Mecanismos de ativação das diferentes isoformas de NOX2 (Bedard e Krause, 2007).

	Expressão de alto nível	Expressão de nível intermediário a baixo
<b>NOX1</b>	cólon	músculo liso, endotélio, útero, placenta, próstata, osteoclastos, pericitos retiniais
<b>NOX2</b>	fagócitos	linfócios B, neurônios, cardiomiócitos, músculo esquelético, hepatócitos, endotélio, células tronco hematopoéticas, músculo liso
<b>NOX3</b>	ouvido interno	rim fetal, baço fetal, ossos do crânio, cérebro
<b>NOX4</b>	rim, vasos sanguíneos	osteoclastos, endotélio, músculo liso, células tronco hematopoéticas, fibroblastos, queratinócitos, células de melanoma, neurônios
<b>NOX5</b>	tecido linfóide, testículo	endotélio, músculo liso, pâncreas, placenta, ovário, útero, estômago, vários tecidos fetais
<b>DUOX1</b>	tireóide	epitélio das vias aéreas, epitélio da língua, cerebelo, testículo
<b>DUOX2</b>	tireóide	glândulas salivares, epitélios gastrointestinais, epitélio das vias aéreas, útero, ilhotas pancreáticas, vesícula biliar

**Figura 13: Variedade de expressão do complexo NOX em seus principais tecidos** (Bedard e Krause, 2007).

As ROS estão diretamente envolvidas com a ativação de genes da via de sinalização FGF e Wnt nos processos regenerativos (Love et al., 2013). Essa última (Wnt) tem um papel crucial na regeneração de praticamente todos os metazoários com capacidades regenerativas (Galliot e Chera, 2010; Whyte et al., 2012). Essa via é antiga e conservada nos metazoários, podendo ser dependente de  $\beta$ -catenina, cuja ativação é também um dos primeiros sinais ativados pela lesão, ou pode ser independente de  $\beta$ -catenina, chamadas de via canônica e não canônica respectivamente (Komiya, e Habas, 2008; Galliot e Chera, 2010; Whyte et al., 2012). Possuem um papel crucial na embriogênese e diversos efeitos na estimulação mitogênica, especificação de destino celular e diferenciação (Logan e Nusse, 2004). Regulam eventos importantes no desenvolvimento como organogênese, organização do destino celular, polaridade, motilidade, renovação de células-tronco, etc (Habas e Dawid, 2005; Yamaguchi, 2001). Defeitos na regulação dessa via leva à má formação congênita como espinha bífida, fechamento inadequado do tubo neural humano e câncer, de mama, pele e cólon (Logan e Nusse, 2004).

## 2.7 Sinalização bioelétrica e o papel das V-ATPases

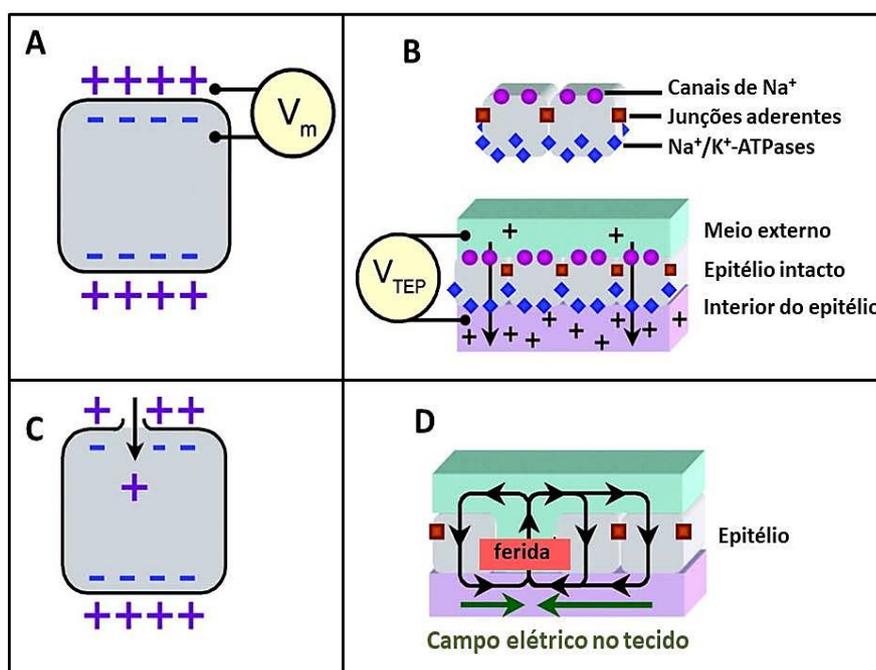
Nos tecidos que regeneram as ROS também estão envolvidas indiretamente com a presença de sinais bioelétricos, detectados logo após a amputação, e que são determinantes para que a regeneração correta e plena ocorra, além de não serem observados em animais sem tal capacidade (Ferreira et al., 2016). Girinos de *Xenopus* manifestam sinais bioelétricos específicos no botão de regeneração do membro recém-amputado, porém no período refratário tais sinais não são detectados (Tseng e Levin, 2012; Adams et al., 2007; Franklin et al., 2017). Interessantemente, sinais elétricos também podem induzir ou aumentar a capacidade regenerativa, inclusive quando aplicados artificialmente em espécies que não a possuem (Sisken, 1993; Smith, 1981; Sisken e Fowler, 1981; Becker, 1972).

Desde as observações do século XIX, em salamandras, sabe-se que a condutância nervosa tem um papel importante na regeneração (Todd, 1823). A presença dos nervos é determinante para que a proliferação celular ocorra nos processos regenerativos de muitas espécies (Singer e Craven, 1948; Simões et al., 2014). Entretanto, a bioeletricidade de todas as células vivas é característica que precede a existência dos nervos e a sinalização bioelétrica também é vista em tecidos não neurais de animais após a amputação (Keijzer et al., 2013; Liebeskind et al., 2015).

A bioeletricidade permite que todas as células vivas realizem funções básicas importantes, como transporte e sinalização (Nuccitelli, 2003). As células intactas individuais apresentam membrana com elevada resistência elétrica (McCaig et al., 2005). Esse potencial membranar ( $V_{mem}$ ) é dado pelas diferentes concentrações de íons positivos e negativos distribuídos assimetricamente nas faces interna e externa da membrana, com carga líquida negativa no interior em relação ao exterior. Cada tipo celular tem uma faixa específica de potencial de repouso, tipicamente em torno de  $-70mV$ , que está sob o controle de transportadores iônicos, bombas e canais que integram todas as membranas biológicas (Figura 14.A) (McCaig et al., 2005; Bates, 2015; Nuccitelli, 2003).

Nos epitélios, as células estão fortemente ligadas umas às outras pelas junções aderentes, proporcionando uma alta resistência elétrica aos mesmos, e os transportadores na porção apical e basal das células são diferentes, fazendo com que o transporte de íons através do epitélio seja seletivo e direcional, que resulta numa maior concentração de  $\text{Na}^+$  no seu interior em relação ao exterior, ocasionando uma expressiva diferença de potencial, definida como potencial transepitelial ( $V_{\text{TEP}}$ ), como mostrado na figura 14 B. Assim, um epitélio íntegro pode ser comparado a uma “bateria” biológica (McCaig et al., 2005; Nuccitelli, 2003).

Quando uma célula individual é lesionada, íons carregados positivamente penetram no citoplasma gerando uma corrente que desestabiliza o potencial de repouso da membrana celular (figura 14.C). E quando isso acontece, no nível do epitélio, a perda da sua integridade causa um colapso do  $V_{\text{TEP}}$  formando uma corrente de lesão que flui para o meio externo e um gradiente de voltagem lateral, constituindo um campo elétrico, definido como potencial de ferida, que é de longa duração e estável, diferente dos potenciais de ação rápidos e autorregenerativos (McCaig et al., 2005).



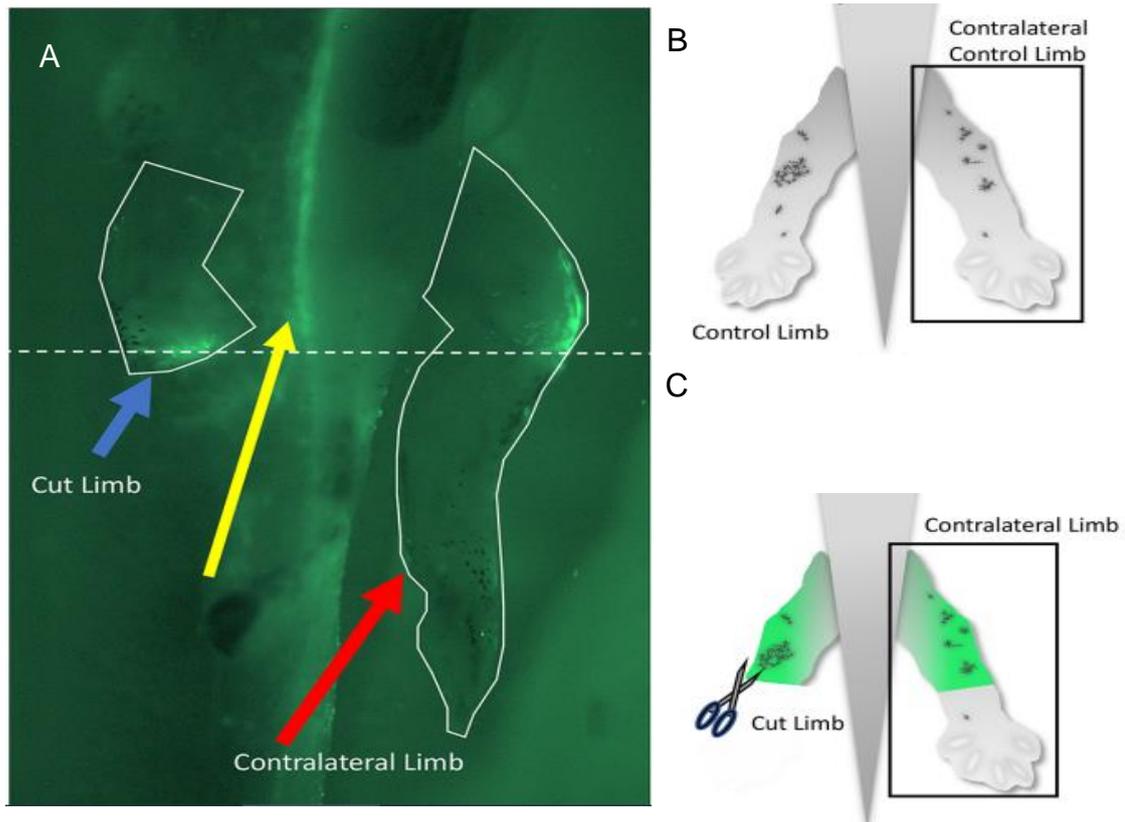
**Figura 14. Potencial elétrico de células individuais e epitélios.** Em (A) potencial de repouso de uma célula individual íntegra; em (B) TEP de um epitélio íntegro; em (C) Célula individual rompida e quebra do potencial de repouso; em (D) epitélio com integridade rompida, TEP perturbado e formação do potencial de ferida no local da lesão (Modificada e adaptada a partir de McCaig et al., 2005).

A bioeletricidade diferencial dos animais que regeneram é justamente o comportamento desse potencial de lesão. Logo após o ferimento o sinal tem uma polaridade positiva em animais que regeneram e que não regeneram. Todavia, nos que não possuem a capacidade regenerativa plena, a corrente vai diminuindo lentamente à medida que o tecido vai cicatrizando e fechando a ruptura causada pela lesão. Já nos que regeneram tecidos completos, a corrente positiva se inverte bruscamente para uma polaridade negativa que atinge seu pico no auge da proliferação celular, mantendo o processo de reconstrução tecidual (Borgens et al., 1984; Levin, 2007). O transporte iônico na superfície da célula também fornece sinais bioelétricos de longo alcance, podendo ocorrer através de correntes líquidas ou de fluxos iônicos e gradientes eletroquímicos de íons específicos, ambos de longa duração e estáveis (Levin, 2007).

Essa sinalização é essencial também no desenvolvimento embrionário (Altizer et al., 2001), tendo uma participação importante nos processos que regulam o ciclo celular, e a proliferação, diferenciação e migração celulares, sendo também cruciais para o controle do processo de morte celular programada, que por sua vez é essencial para moldar a regeneração e evitar um crescimento descontrolado como acontece na proliferação desordenada oncogênica (Nuccitelli, 2003; McCaig et al., 2005; Blackiston et al., 2009; McCaig et al., 2009; Sundelacruz et al., 2009; Levin, 2007).

Gradientes eletroquímicos gerados pelos sistemas de transporte primários de íons, também coordenam o desenvolvimento dos órgãos e o estabelecimento da polaridade e identidade anatômicas corretas na padronização do tecido durante a sua reconstrução (Kurtz e Schrank, 1995; Marsh e Beams, 1957; Levin et al., 2002; Adams et al., 2006; Beane et al., 2011). Sendo assim, orientam os rearranjos morfogênicos (Shi e Borgens, 1995) agindo juntamente com os sinais bioquímicos e as forças biomecânicas, além de arregimentar domínios para a expressão gênica (Burr e Hovland, 1937; Vandenberg et al., 2011) e controlar a posição, tipo e número de células no decurso da proliferação dos novos tecidos (Lund, 1947; Nuccitelli et al., 1986; Levin, 2007, 2009). Sinais bioelétricos também são vistos à longa distância do ferimento (figura 15). Como, por exemplo, no membro lateral oposto correspondente, e se propaga no membro sadio até o ponto exato em que foi feita a amputação do outro, mantendo conexão ativa com este, parecendo mostrar ao tecido a parte exata

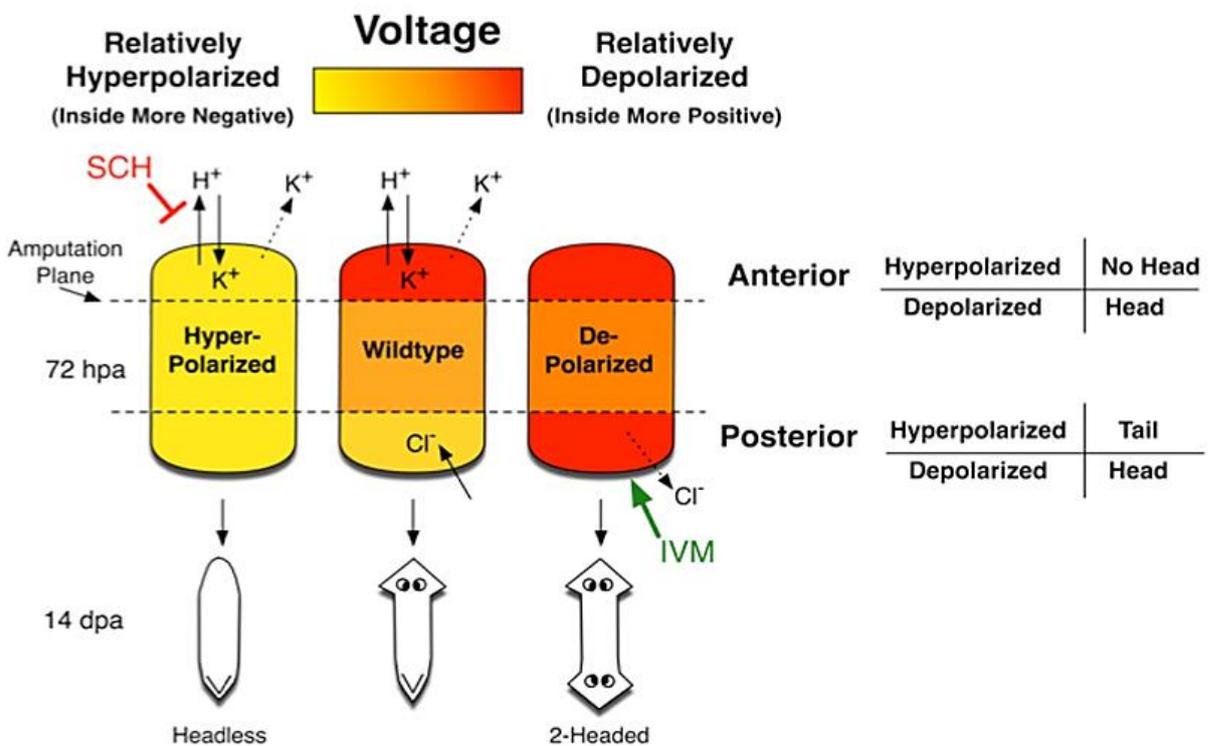
que precisa ser reconstruída, guiando a regeneração fidedigna, o reparo pleno e correto do local lesionado, no tamanho, polaridade, estrutura tridimensional, e demais características (Busse et al., 2018).



**Figura 15: Sinal bioelétrico indicando o local da amputação no membro oposto intacto.** Marcador fluorescente sensível a mudanças bioelétricas ( $\text{DiBAC}_4(3)$ ), revelando os locais de despolarização da membrana (A), a seta azul indica o local do corte, a seta vermelha indica o membro intacto e a seta amarela indica a despolarização regular referente à medula espinhal do animal, que não se altera durante o experimento. Em B e C, esquema representativo do local do corte, do membro intacto e do sinal bioelétrico (Modificada e adaptada de Busse et al., 2018).

Na figura 16 observamos um esquema exemplificando o controle do estabelecimento da polaridade axial na morfogênese do novo tecido, ou seja, as identidades posicionais na formação da cabeça e da cauda, na regeneração de planária, exercido pela sinalização bioelétrica, dada pelo gradiente de potencial de membrana (Beane et al., 2011). As observações de Beane et al. ajudam a elucidar

como se dá a organização desses arranjos e o exemplo mostra que para formar a cabeça é necessária uma maior despolarização e para formar a cauda uma hiperpolarização. Quando se induz artificialmente à hiperpolarização em ambos os cortes (anterior e posterior) há a formação de duas caudas e nesses quando se induz à despolarização há a formação de duas cabeças (Beane et al., 2011).



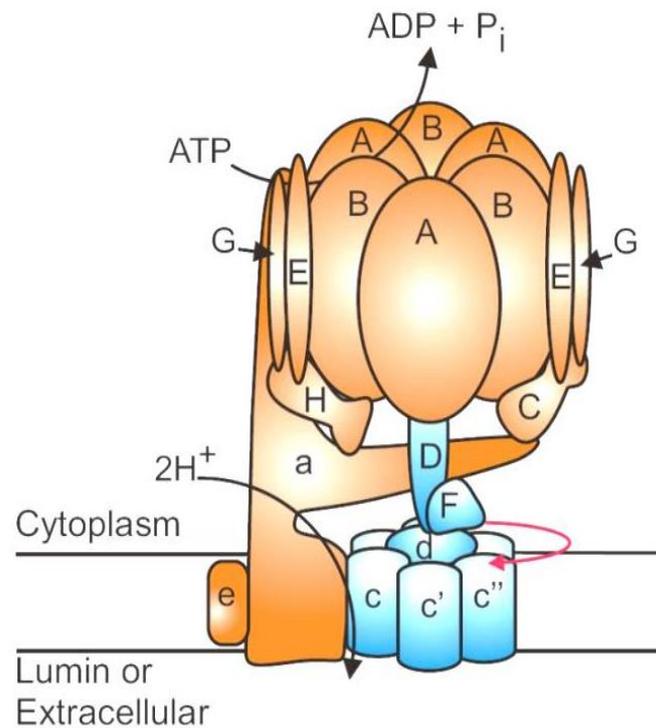
**Figura 16: Esquema representativo do estabelecimento da polaridade axial, pelo gradiente de potencial de membrana, na regeneração de planária.** Após a amputação da cabeça e da cauda, o primeiro exemplar foi submetido, somente no corte da região da cabeça, a um tratamento com SCH, inibidor de uma bomba transpostadora, a H, K-ATPase. O segundo foi mantido como controle e o terceiro foi submetido à tratamento com ivermectina (IVM) na região de amputação da cauda para causar uma despolarização artificial do local. (Adaptado de Beane et al., 2011).

Vários transportadores iônicos são participantes do controle da sinalização bioelétrica. Tais como os canais de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$ , que, após a amputação, são diferencialmente expressos ao longo do tempo nos tecidos lesionados de *Xenopus* (Chang, et al., 2017). Além de participações importantes e cruciais, como

as do canal NaV1.2 (Tseng et al., 2010) e de bombas, como as V-ATPases, cuja participação crucial se destaca nas respostas iniciais dos tecidos lesionados de *Xenopus* e *Danio rerio* (Adans et al., 2013; Monteiro et al., 2014).

As V-ATPases são complexos enzimáticos transmembranares, que hidrolisam ATP gerando gradientes de potencial eletroquímico de H<sup>+</sup> que energizam transportes secundários de nutrientes e outros metabólitos importantes (Hinton et al., 2009). Por ter sido pela primeira vez descoberta e estudada em vacúolos recebeu a designação de ATPase vacuolar (V-ATPase) (Forgac et al., 2007). Mas estão presentes em diversas endomembranas de diferentes organelas (Taiz e Zeiger, 2009), e também na membrana plasmática de certas células especializadas e células tumorais (Hinton et al., 2009; Swallow et al., 1990; Vaananen et al., 1990). Além de fazer o transporte ativo de prótons para o interior de alguns compartimentos intracelulares, as V-ATPases podem realizar outras funções na célula, tais como: endocitose mediada por receptor, modificação pós traducional, degradação de proteínas, e transporte secundário (Hurtado-Lorenzo et al., 2006; Stevens e Forgac 1997)

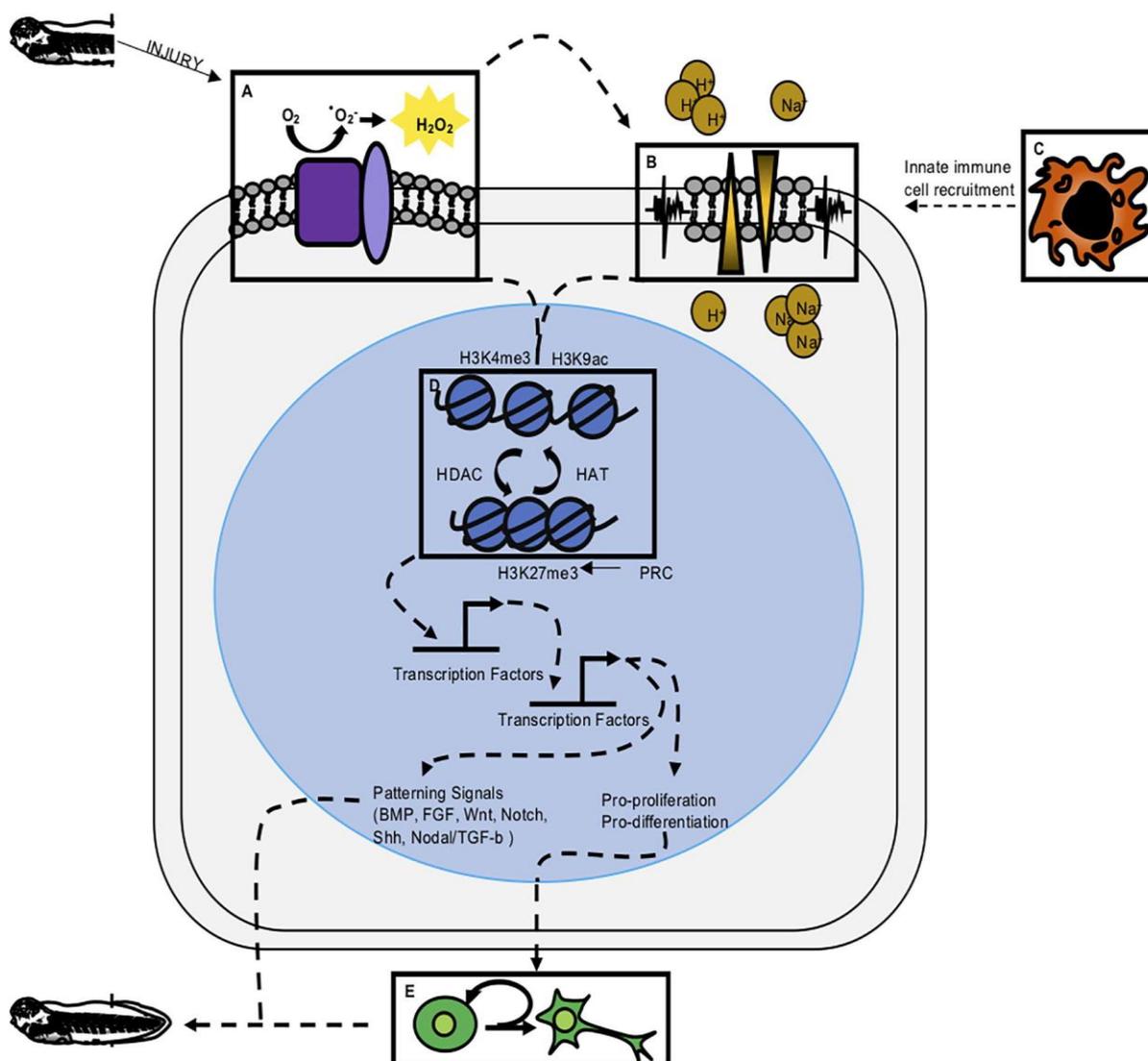
A estrutura dessa bomba de prótons (figura 17) constitui um complexo de subunidades dispostas em dois domínios, um transmembranar (V0), composto pelas subunidades a, d, e, c, c', e c'', e o outro citosólico (V1) que é formado por oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H). D e F formam um eixo central que liga o anel proteolipídico formado por c, c', e c'' ao complexo de três subunidades A e B alternadas, onde ocorre a hidrólise de ATP. Ao impulsionar a rotação do eixo D-F, o anel proteolipídico gira e a translocação dos prótons ocorre na interface entre o anel rotativo e a subunidade a (Cipriano et al., 2008; Forgac et al., 2007; Marshansky e Futai, 2008; Smith et al., 2003; Wagner et al., 2004; Breton e Brown, 2013).



**Figura 17: Esquema retratando a estrutura tridimensional do complexo V-ATPase.** Domínio transmembranar (V0), composto pelas subunidades a, d, e, c, c' e c''; domínio citosólico (V1) formado por oito subunidades (A, B, C, D, E, F, G e H). D e F formando um eixo central (Cipriano et al., 2008).

A sinalização bioelétrica e a sinalização de ROS integradas, constituem os eventos estimulados pelo dano tecidual que podem ser o início de uma cascata de processos que ativam e desencadeiam todo processo regenerativo nos animais privilegiados com essas habilidades (Ferreira et al., 2016; Kakebeen e Willis, 2019).

Outros eventos que ocorrem nos tecidos regenerativos são: a migração de células do sistema imune inato, particularmente macrófagos (Godwin e Rosenthal et al., 2013; Lai et al., 2017) e neutrófilos (Paredes et al., 2015; Rosales, 2018) para o local da lesão e modificações epigenéticas (Hayashi et al. 2015; Yakushiji et al., 2007). Essas respostas se mostram necessárias para promover a reconstrução tecidual correta e fiel. A figura 18 retrata o paradigma atual de todas as repostas iniciais dos tecidos recém lesionados (cauda de *Xenopus*) que irão regenerar e suas inter-relações (Kakebeen e Willis, 2019).



**Figura 18: Modelo integrativo das inter-relações entre as principais respostas iniciais desencadeadas pela lesão em animais com capacidades regenerativas.** As linhas tracejadas indicam conexões indiretas determinadas experimentalmente; A primeira a ser ativada é a sinalização de ROS, em (A), que age a montante das modificações bioelétricas e epigenéticas, da ativação de fatores de transcrição e proliferação; Em (B) temos as mudanças bioelétricas que agem a montante da proliferação e do recrutamento de células imunes inatas; Em (C), as células imunes inatas agindo a montante da proliferação; Em (D), modificações epigenéticas importantes para que a regeneração ocorra; E a jusante de todas essas respostas, a diferenciação e proliferação celular ordenada, em (E).

### 3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi estudar integrações entre as V-ATPases e os elementos do complexo NOX, em *Danio rerio* comparando com *Homo sapiens*, buscando encontrar mecanismos de suas ações diferenciais e seus papéis nos processos regenerativos que os diferenciam dos processos de reparo.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS

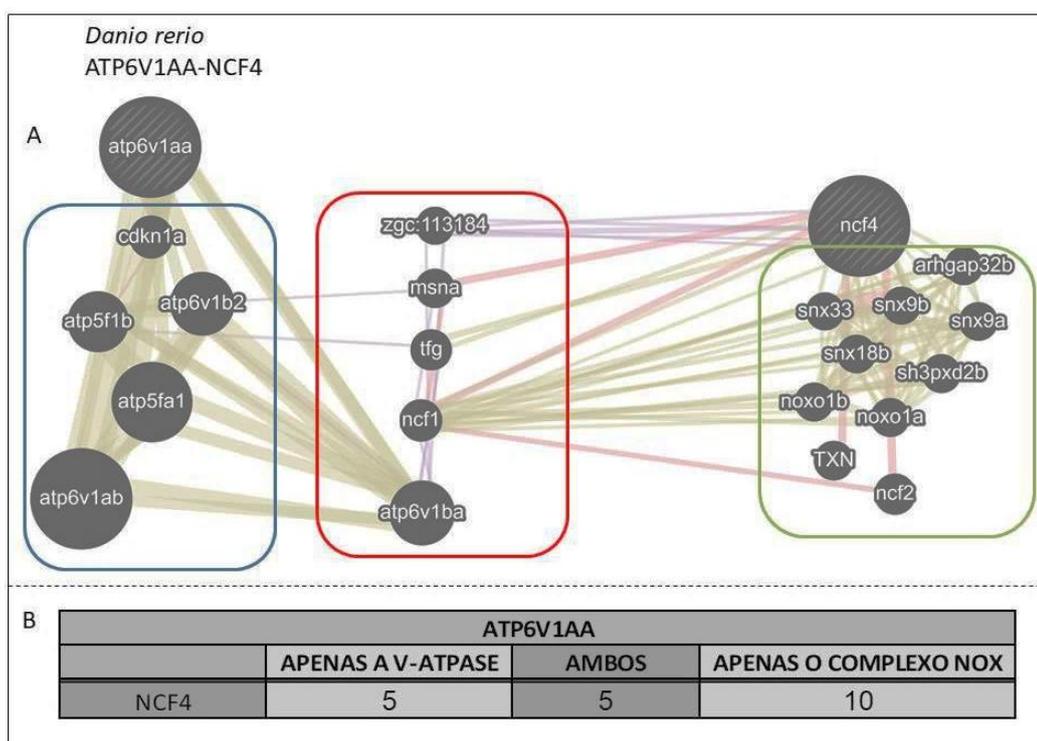
Para entender as relações gênicas entre os membros da V-ATPase e do complexo NOX e encontrar os principais genes que relacionam com ambos, quando esses estão interligados funcionalmente, foram realizadas múltiplas análises *in silico*, utilizando a plataforma Genemania (<https://genemania.org>), que está vinculada a diversos bancos de dados e possui uma ferramenta onde o algoritmo encontra os principais genes que se relacionam com um determinado gene de interesse, ou com um grupo de genes de interesse, gerando redes de interações entre eles, fornecendo um conjunto grande de dados de associação funcional como interações genéticas, participação numa mesma via de sinalização, co-expressão, colocalização e similaridade de domínio de proteína.

A ferramenta disponibiliza 9 espécies e para o presente trabalho foram escolhidas duas, uma que regenera alguns tecidos, o *Danio rerio*, e outra que possui taxa extremamente baixa de regenerar seus tecidos após lesão, o *Homo sapiens*. Para encontrar os genes do *Homo sapiens* e seus ortólogos correspondentes em *Danio rerio* foi utilizada a plataforma Genecards (<https://www.genecards.org>), nem todos os genes que codificam as subunidades dos complexos em *Homo sapiens* foram encontrados no *Danio rerio* e a figura 19 mostra os genes encontrados e utilizados. Em seguida, foram geradas combinações individuais entre cada um dos 23 genes que codificam para a V-ATPase em ambas as espécies, 15 genes que codificam para o complexo NOX em *Homo sapiens*, e 12 genes que codificam para o complexo NOX em *Danio rerio*. Totalizando 345 redes de interações individuais do *Homo sapiens* e 276 redes de interações individuais do *Danio rerio*.

<i>Homo sapiens</i>		<i>Danio rerio</i>	
Genes que codificam para a V-ATPase	Genes que codificam para o complexo NOX	Genes que codificam para a V-ATPase	Genes que codificam para o complexo NOX
ATP6V1A	NCF1	ATP6V1AB	NCF1
ATP6V1B1	NCF2	ATP6V1AA	NCF2
ATP6V1B2	NCF4	ATP6V1BA	NCF4
ATP6V1C1	CYBB (NOX2)	ATP6V1B2	CYBB (NOX2)
ATP6V1C2	CYBA	ATP6V1C1A	CYBA
ATP6V1D	RAC1	ATP6V1C1B	RAC1
ATP6V1E1	RAC2	ATP6V1C2	RAC2
ATP6V1E2	NOX1	ATP6V1D	NOX1
ATP6V1F	NOX3	ATP6V1F	NOX5
ATP6V1G1	NOX4	ATP6V1G1	DUOX
ATP6V1G2	NOX5	ATP6V0A1B	NOXA1
ATP6V1G3	DUOX1	ATP6V0A2B	NOXO1
ATP6V1H	DUOX2	ATP6V1H	
ATP6V0A1	NOXA1	ATP6V0A1A	
ATP6V0A2	NOXO1	ATP6V0A2A	
TCIRG1		TCIRG1A	
ATP6V0A4		TCIRG1B	
ATP6V0B		ATP6V0CA	
ATP6V0C		ATP6V0CB	
ATP6V0D1		ATP6V0D1	
ATP6V0D2		ATP6V0E1	
ATP6V0E1		ATP6V0E2	
ATP6V0E2		ATP6V0E2	

**Figura 19: Genes utilizados**

Conforme mostra o exemplo da figura 20, em cada uma das combinações geradas, foram buscadas interações entre os genes da V-ATPase e os do complexo NOX. Os genes foram separados e contabilizados de acordo com as associações formadas. Os que se associavam apenas com os que codificam para a V-ATPase e não tinham associação com os genes do complexo NOX (circulados em azul na figura 21-A), os que se associavam apenas com os que codificam para o complexo NOX e não se associavam com os da V-ATPase (circulados em verde na figura 21-A) e os genes que se associavam com ambos (circulados em vermelho na figura 21-A). Nessa análise quantitativa não foi considerado o tamanho das esferas, mas a quantidade de genes diferentes que participam de interações com os de interesse. Também foram catalogados todos os genes que formam pontes de interações indiretas entre ambos os complexos possuindo relações com os genes da V-ATPase e também com os genes do complexo NOX, como por exemplo, o msna, da figura 21-A.

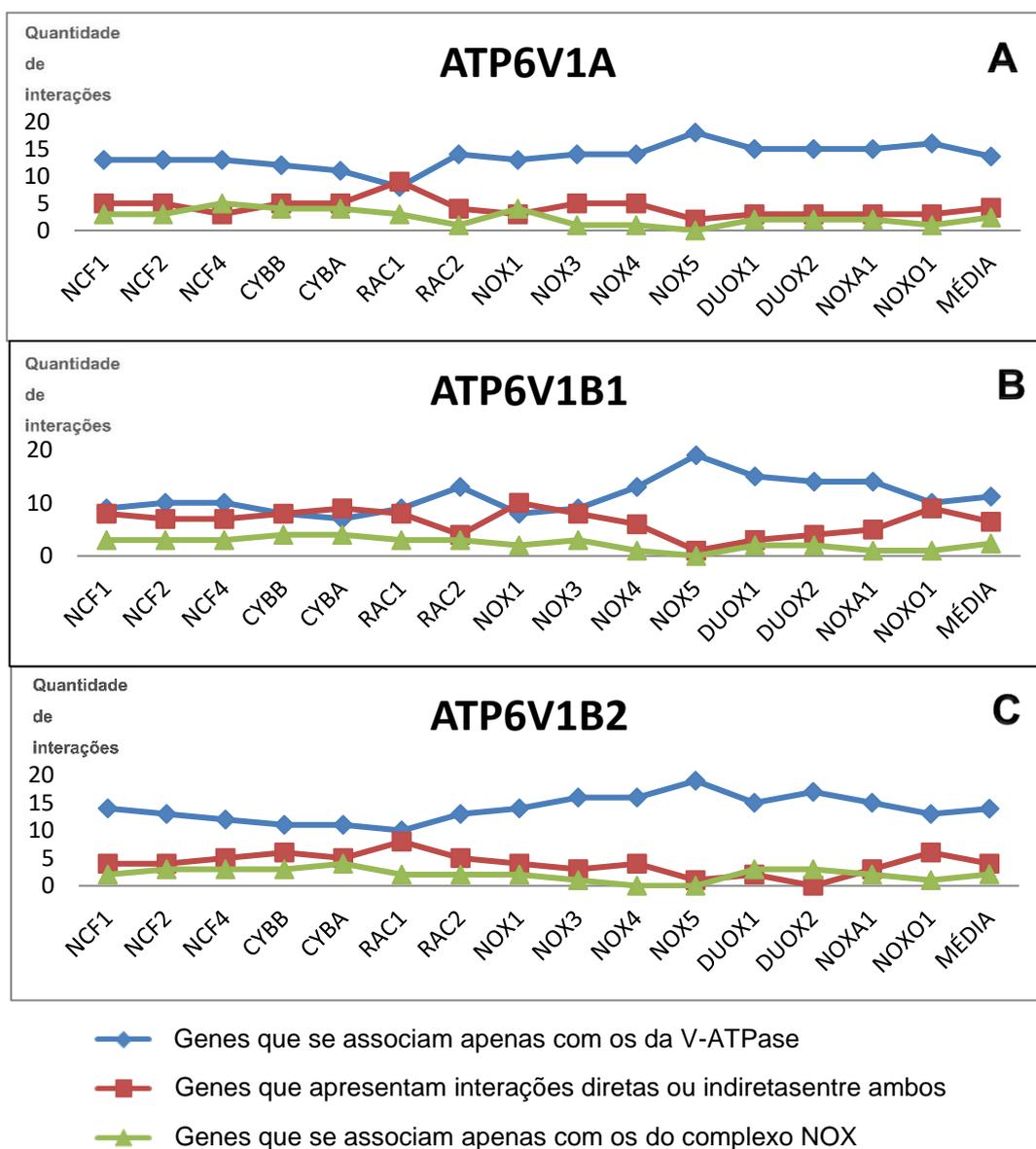


**Figura 20: Exemplo de uma das 621 redes de interações individuais geradas.** Em A, os genes que se associam apenas com os da V-ATPase estão circulados em azul, os que se associam apenas com os do complexo NOX estão circulados em verde e os que fazem pontes de interações indiretas entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX (ZGC:113184, MSNA e TFG) juntamente com os que apresentam interações diretas entre eles (NCF1 e ATP6V1BA) estão circulados em vermelho. Em B a contabilização das associações interativas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Combinações individuais com os genes da V-ATPase em *Homo sapiens*

As diferentes interações geradas na plataforma Genemania entre cada gene da V-ATPase e os genes do complexo NOX foram quantificadas para que fosse feita uma análise individual dessas interações. Os gráficos abaixo mostram essa quantificação para *Homo sapiens*.



**Figura 21: Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1A, ATP6V1B1, ATP6V1B2 e os genes do complexo NOX no *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**

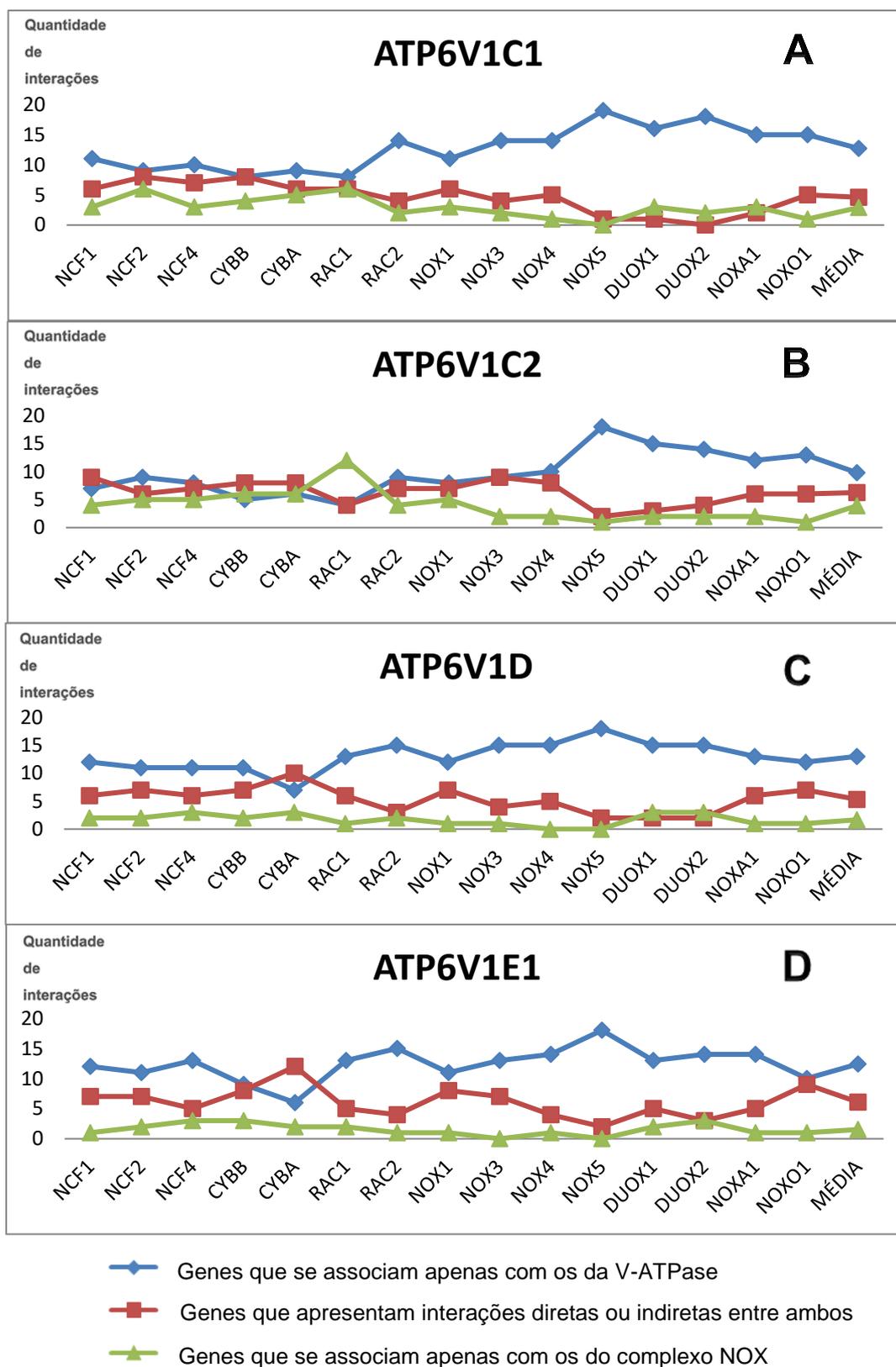
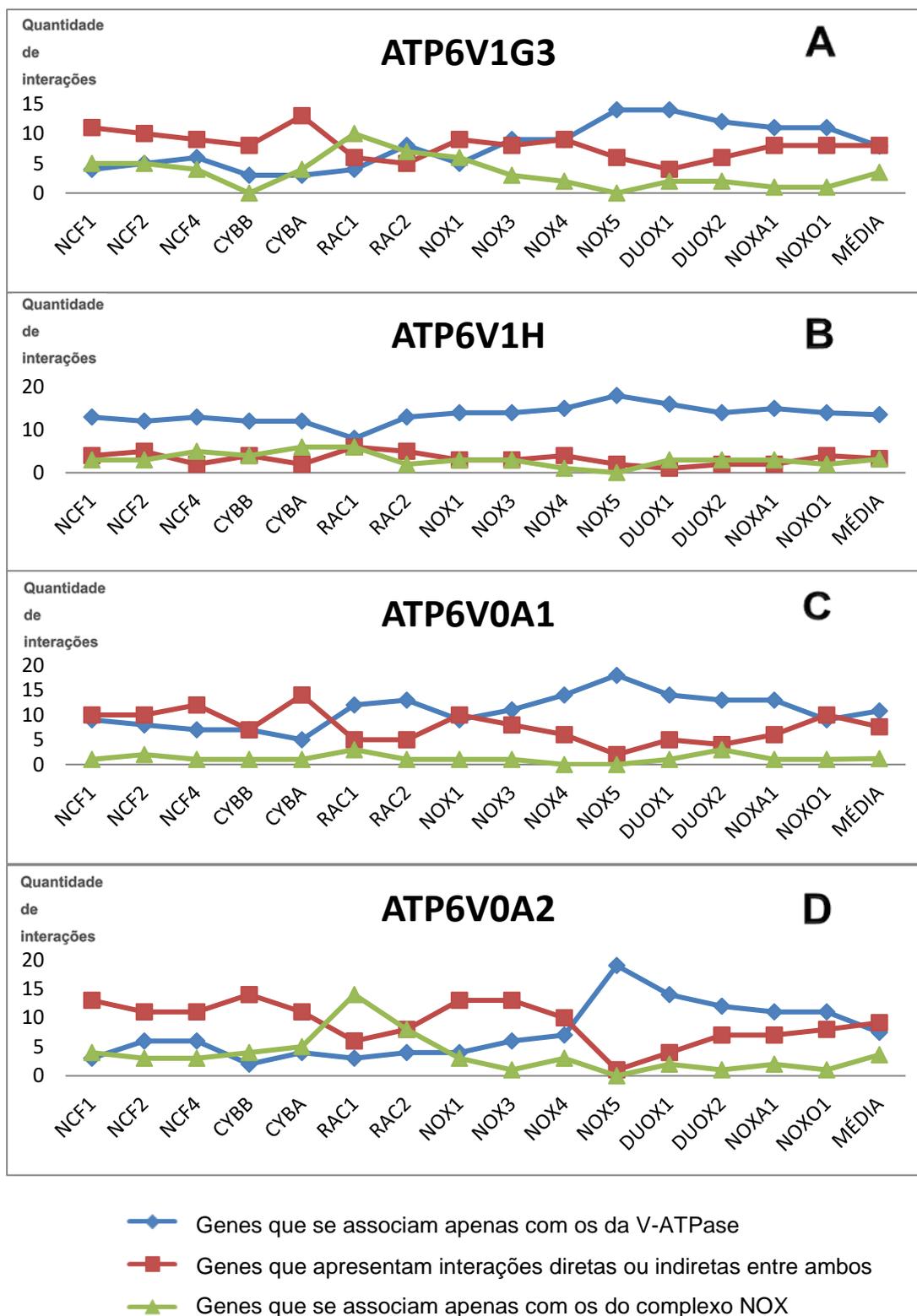
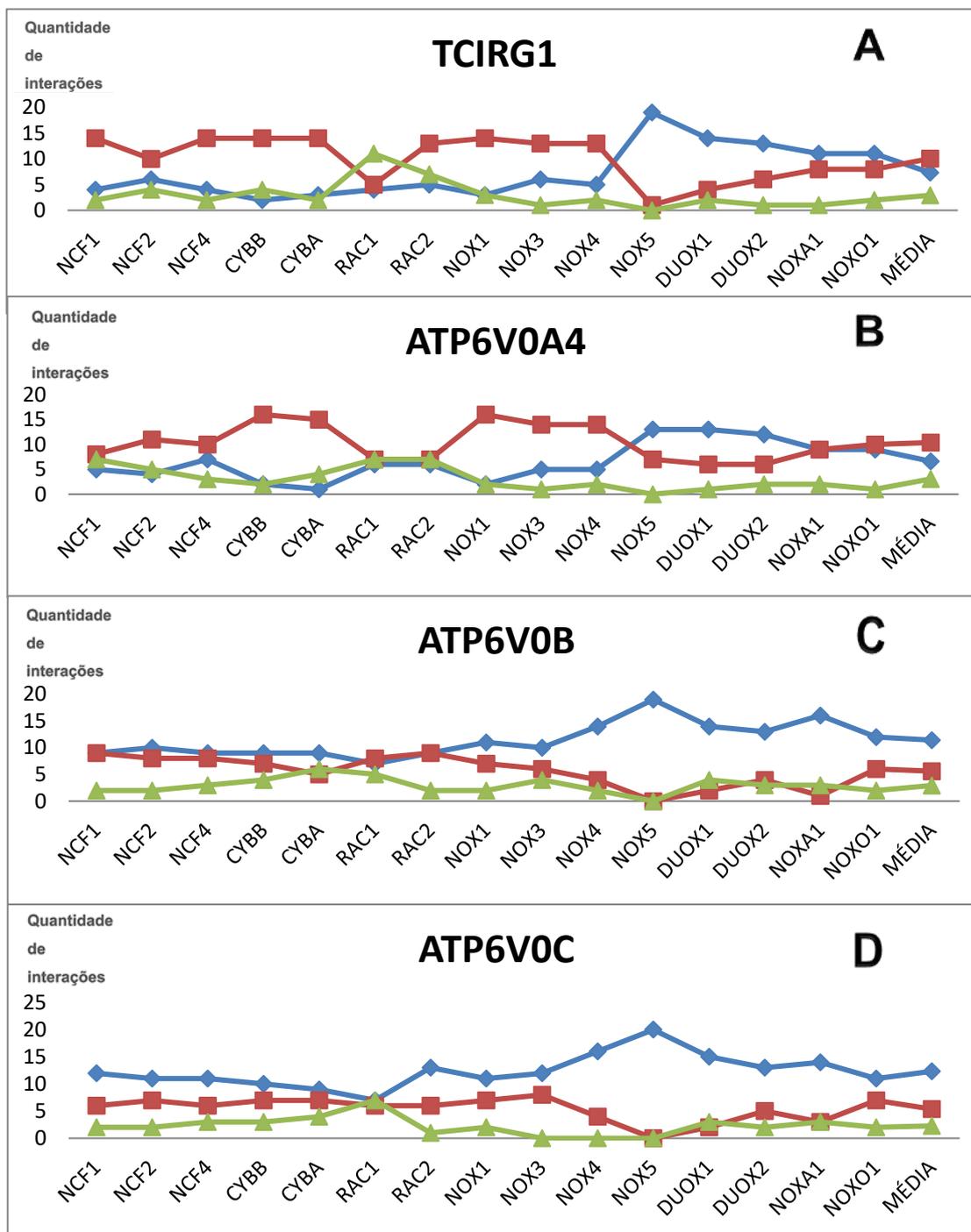


Figura 22: Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1C1, ATP6V1C2, ATP6V1D, ATP6V1E1 e os genes do complexo NOX no *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade das redes de interações se encontra no eixo Y.

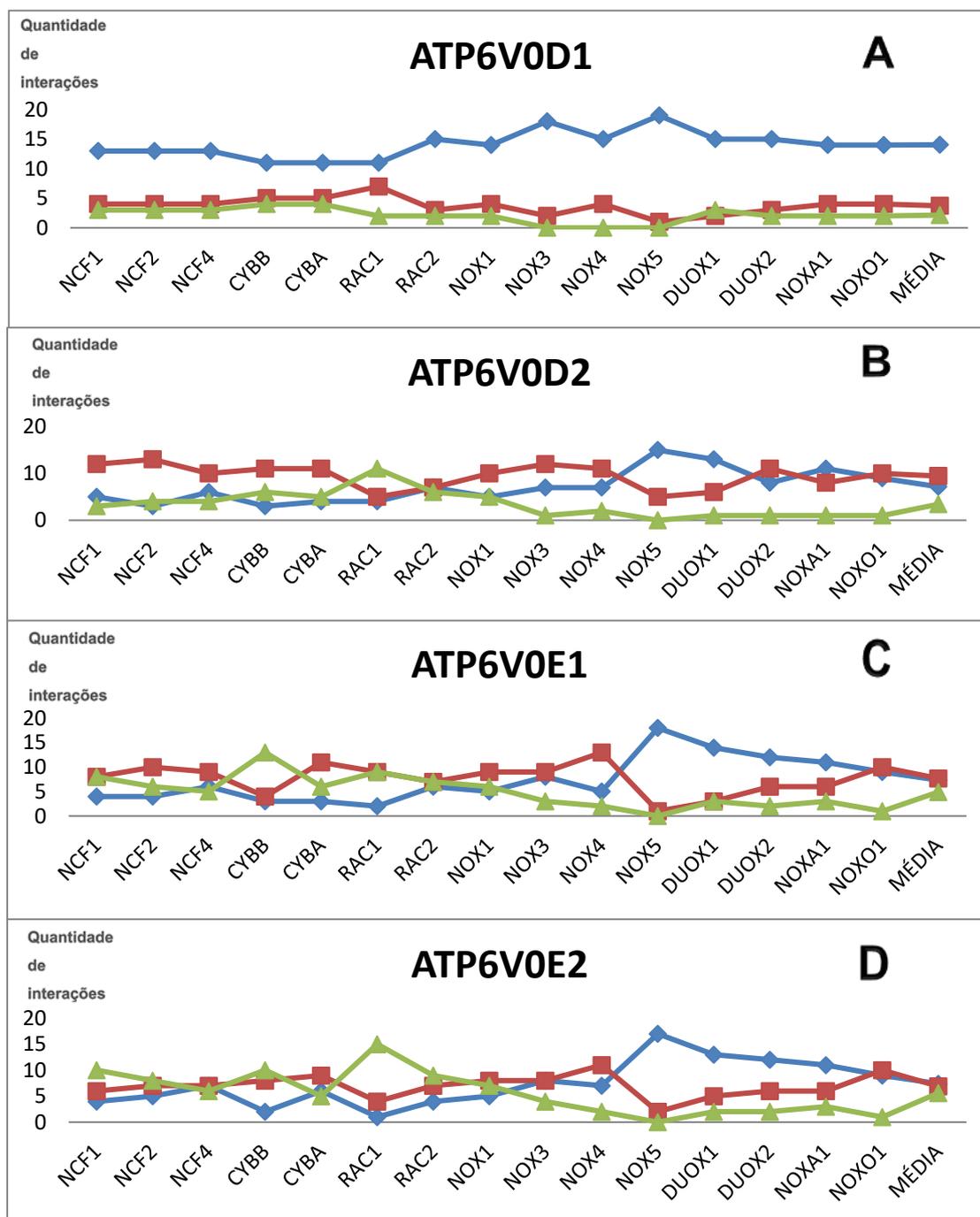




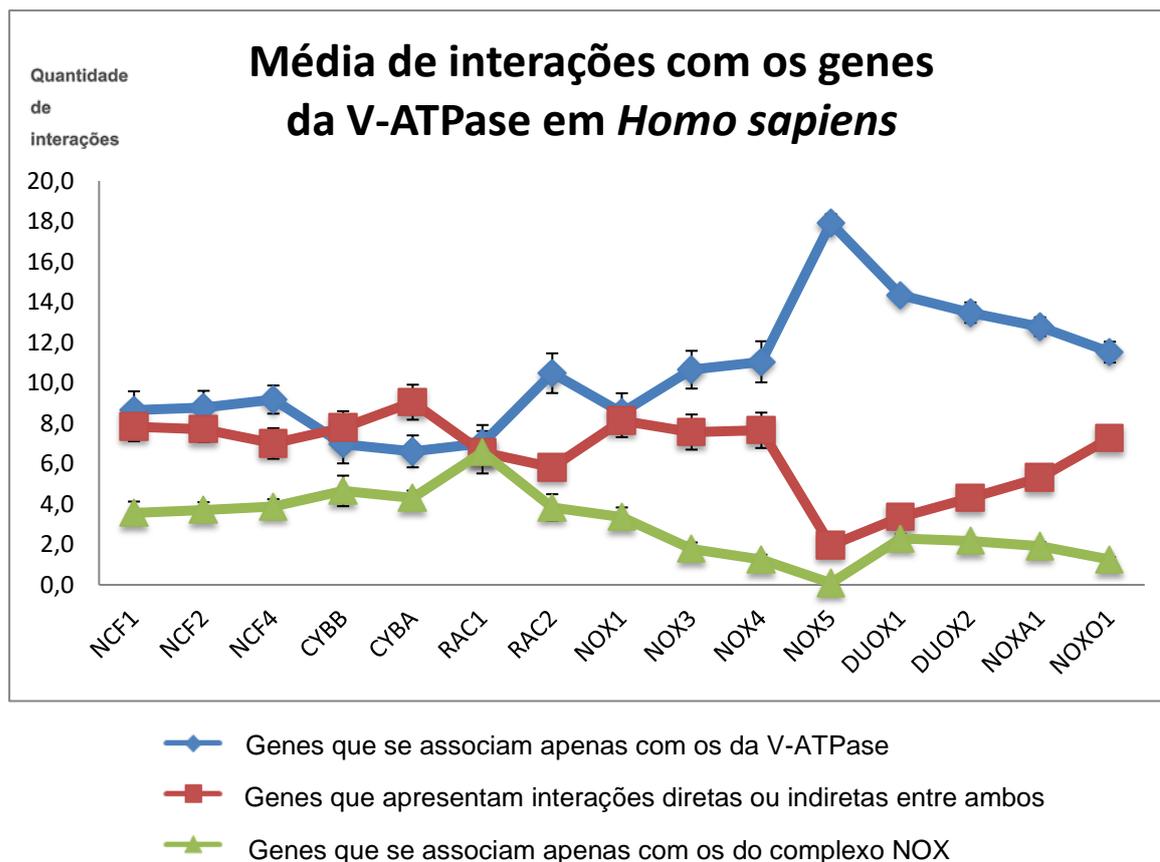
**Figura 24: Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1G3, ATP6V1H, ATP6V0A1, ATP6V0A2 e os genes do complexo NOX no *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade das redes de interações se encontra no eixo Y.**



**Figura 25: Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes TCIRG1, ATP6V0A4, ATP6V0B, ATP6V0C e os genes do complexo NOX no *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**



**Figura 26:** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V0D1, ATP6V0D2, ATP6V0E1, ATP6V0E2 e os genes do complexo NOX no *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

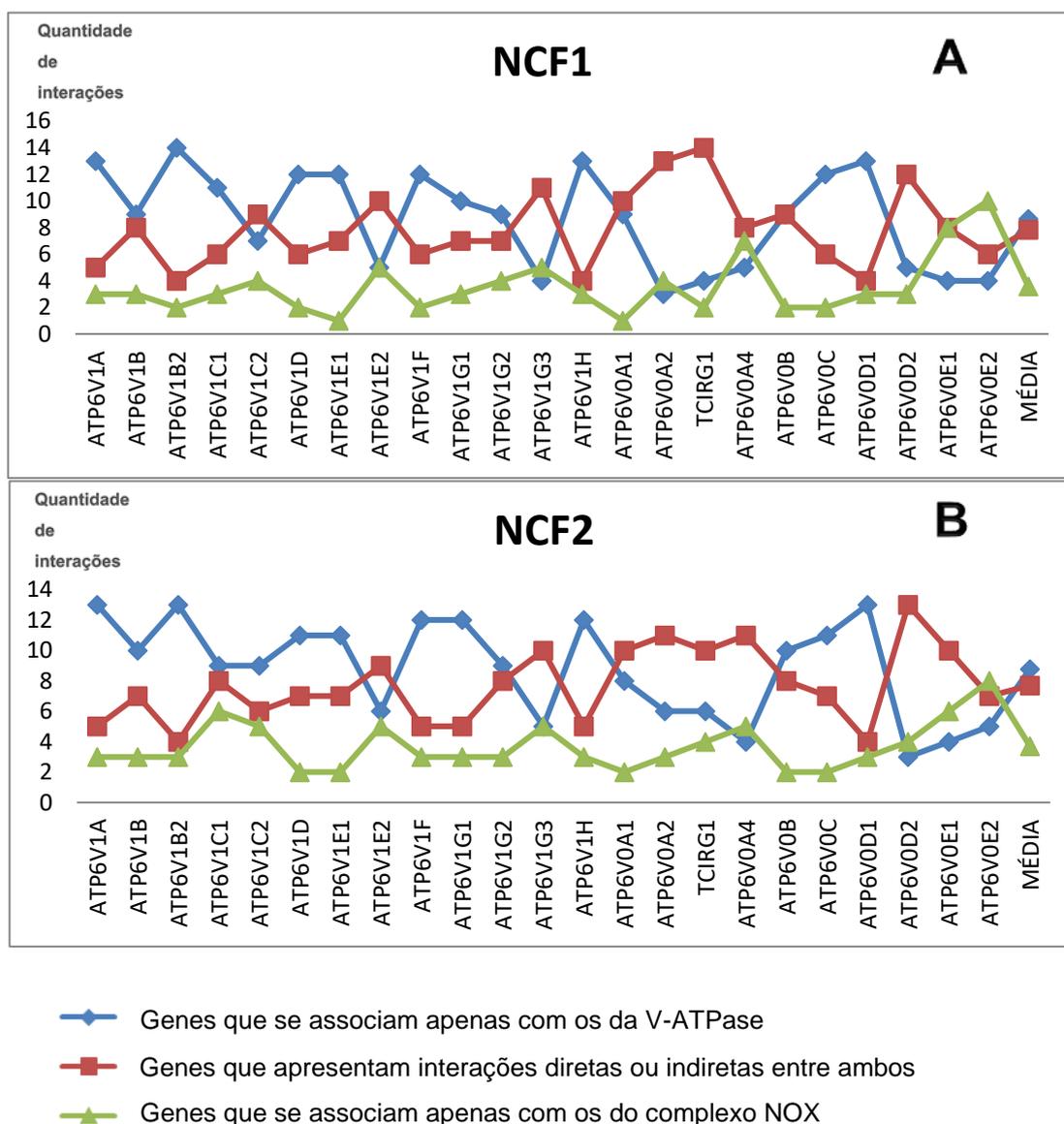


**Figura 27: Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX (média) em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**

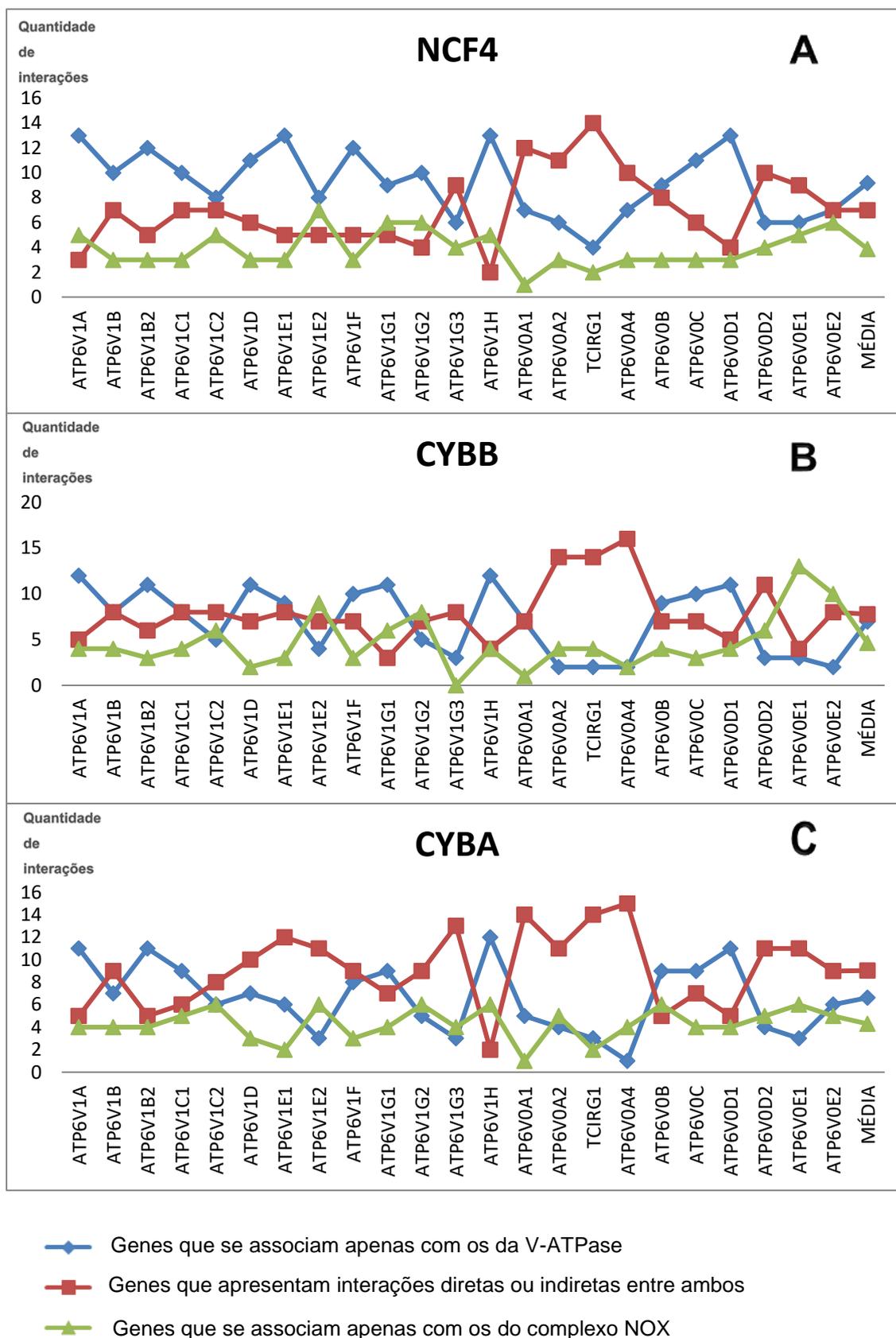
Observamos (figura 27) que no *Homo sapiens* a quantidade de interações e envolvimento é maior entre os genes da V-ATPase que se associam entre si e entre outros que se associam somente com os seus genes (em azul), oscilando de 7 a 18 interações aproximadamente. Particularmente, tal aumento pode ser mais bem notado nas interações com NOX5, DUOX1, DUOX2, NOX3, NOX4, NOXA1, NOXO1 e RAC2. Sendo NOX5 o que mais se destaca (apresentando cerca de 18 interações), seguido de DUOX1/2. O gene CYBA também se mostrou diferente, sendo o único cujas quantidades de interações envolvendo ambos (aproximadamente 9) sobressaíram as que envolvem somente os genes da V-ATPase (em azul) com aproximadamente 7 e somente os genes do complexo NOX, com aproximadamente 4, diferente dos outros. No geral, as associações envolvendo apenas membros do complexo NOX foram menores, apresentando quantidades inferiores a 6,6 (em verde).

## 5.2 Combinações individuais com os genes do complexo NOX em *Homo sapiens*

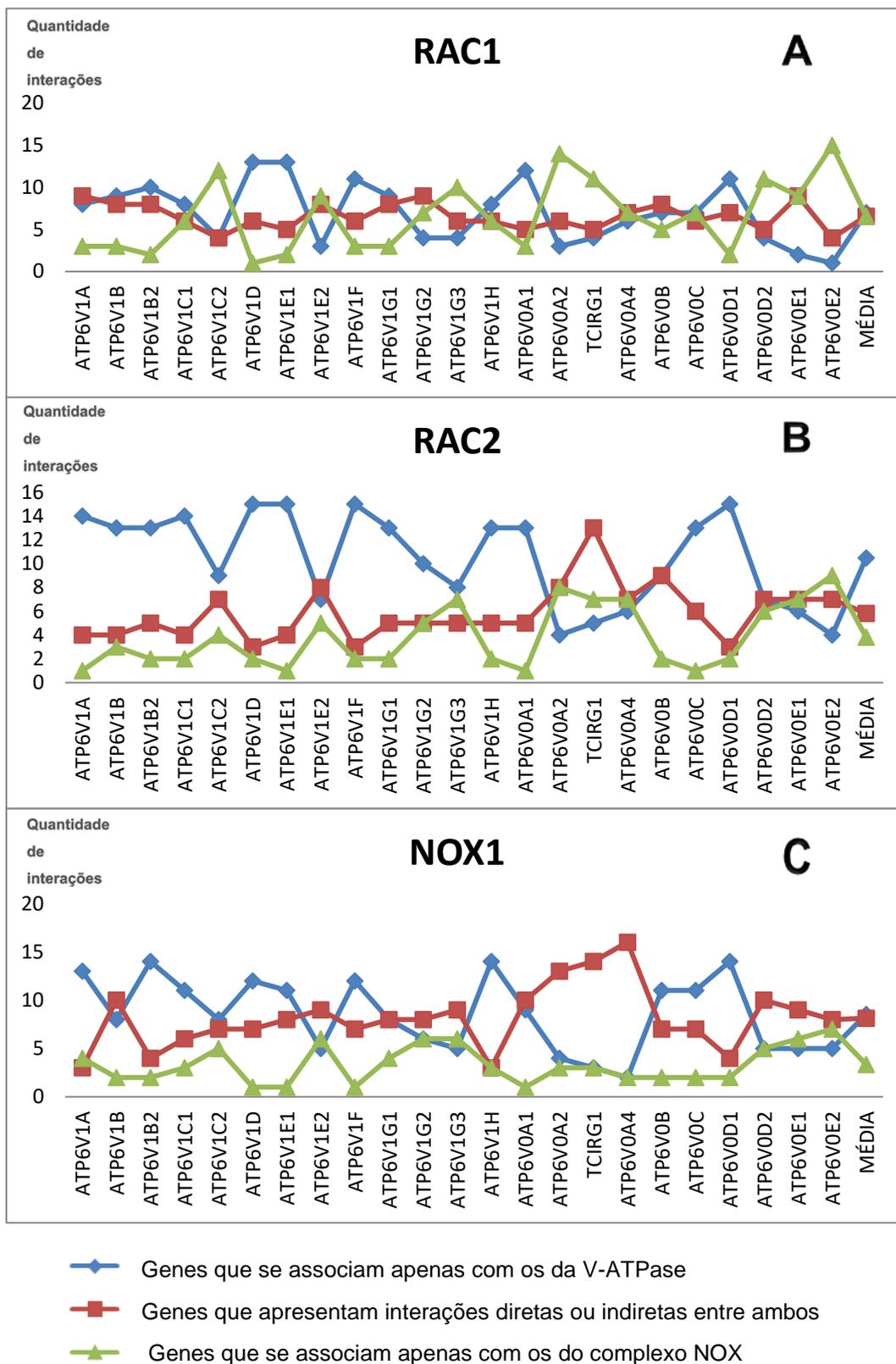
Foram examinadas, em seguida, associações entre os 15 genes do complexo NOX e cada um dos genes da V-ATPase no *Homo sapiens*, que se encontram nos gráficos a seguir:



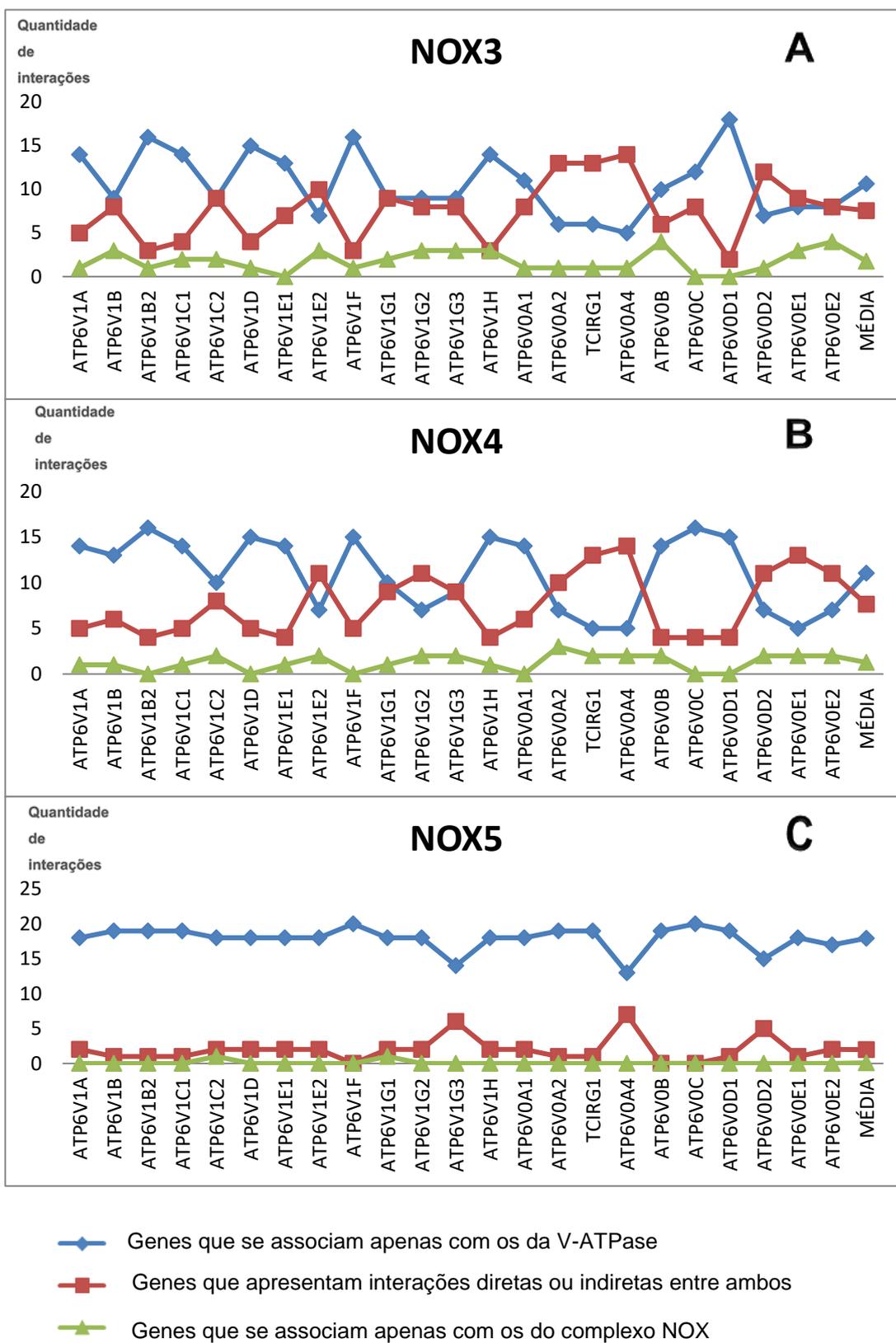
**Figura 28.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NCF1, NCF2 e os genes da V-ATPase em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.



**Figura 29. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NCF4, CYBB, CYBA e os genes da V-ATPase em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**



**Figura 30. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes RAC1, RAC2, NOX1 e os genes da V-ATPase em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**



**Figura 31. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NOX3, NOX4, NOX5 e os genes da V-ATPase em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**

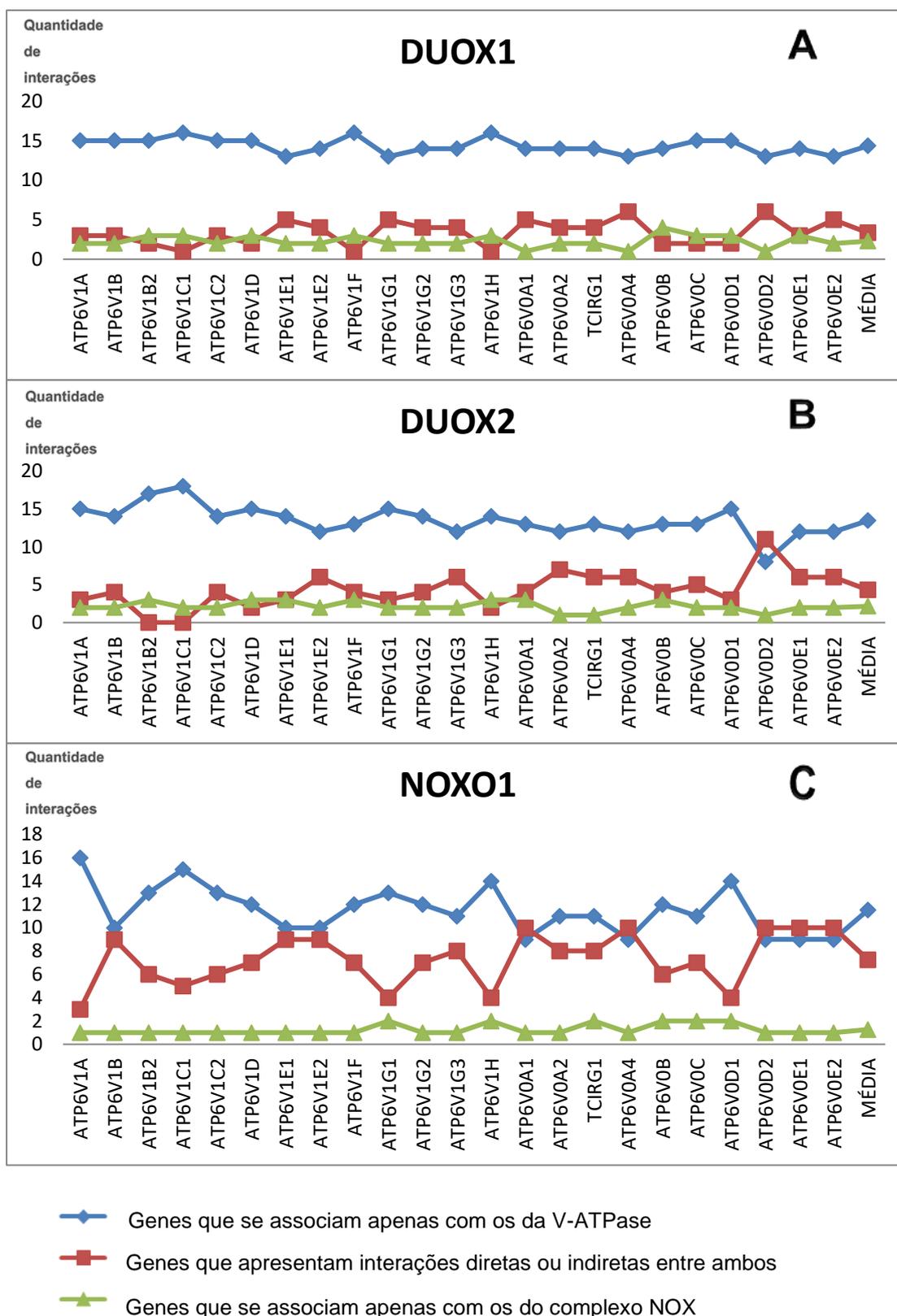
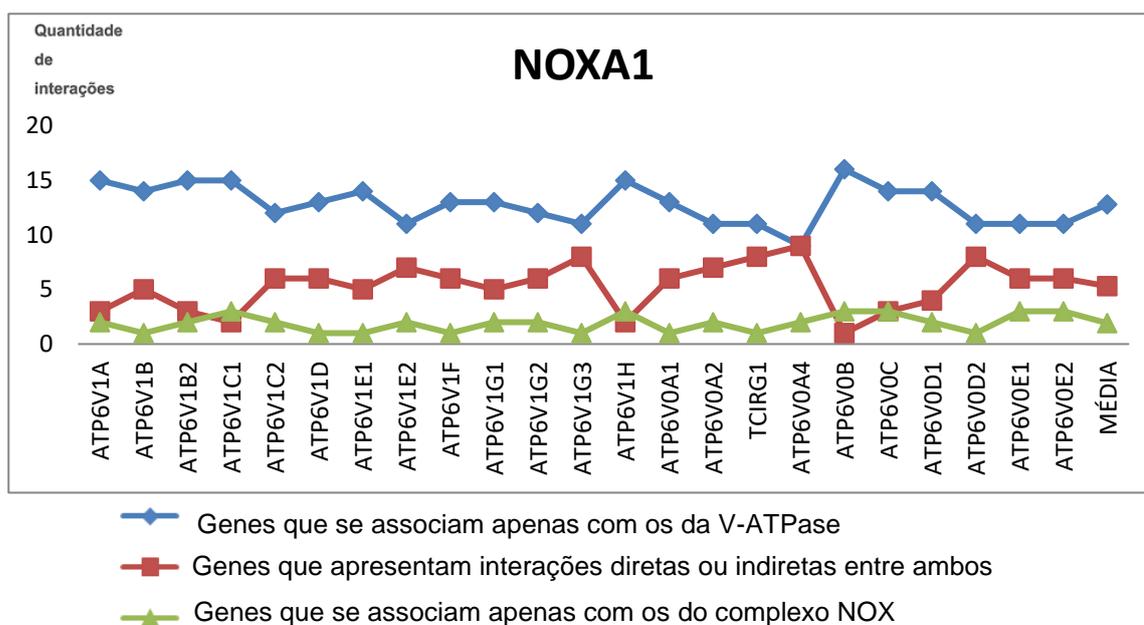
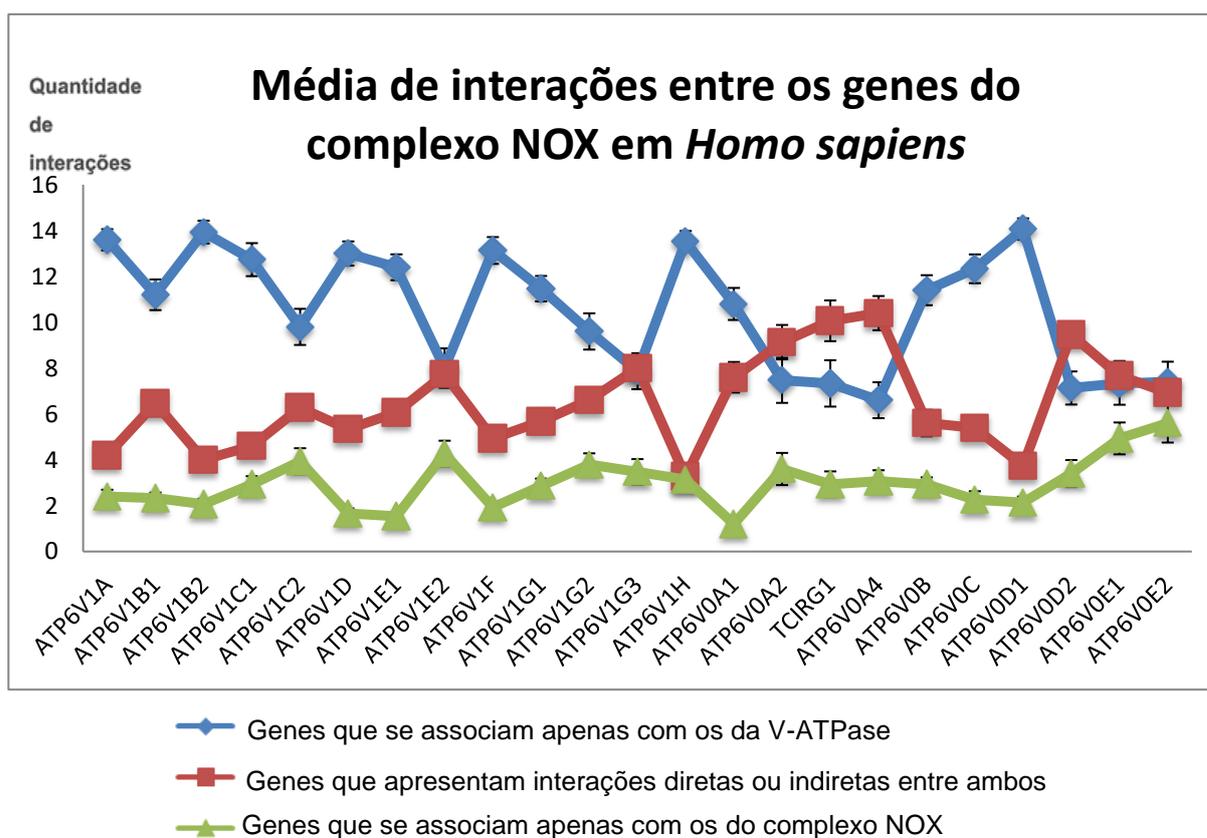


Figura 32. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes DUOX1, DUOX2, NOXO1 e os genes da V-ATPase em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.



**Figura 33.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes **NOXA1** e os genes da **V-ATPase** em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.



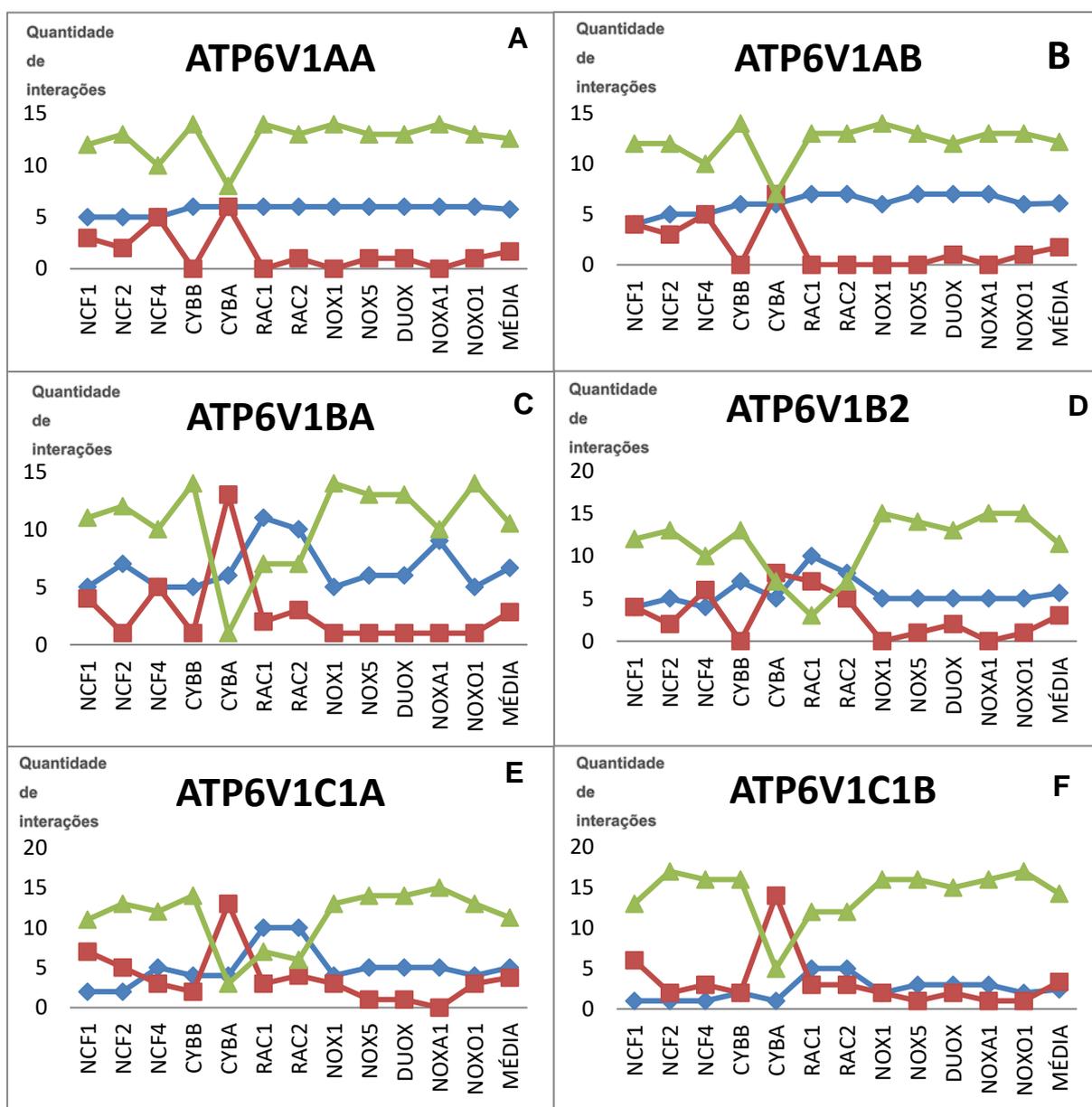
**Figura 34.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes do complexo **NOX (média)** e os genes da **V-ATPase** em *Homo sapiens* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

Na figura 34, temos as médias dessas interações e, em vermelho, vemos que os genes ATP6V0A2, TCIRG1, ATP6V0A4, ATP6V0D2 e ATPV0E1 foram os únicos que apresentaram maior quantidade de interações envolvendo ambos os complexos, superando as que envolveram somente o complexo NOX e as que envolveram somente a V-ATPase, as quais em todos os outros genes (em azul) apresentaram maior quantidade.

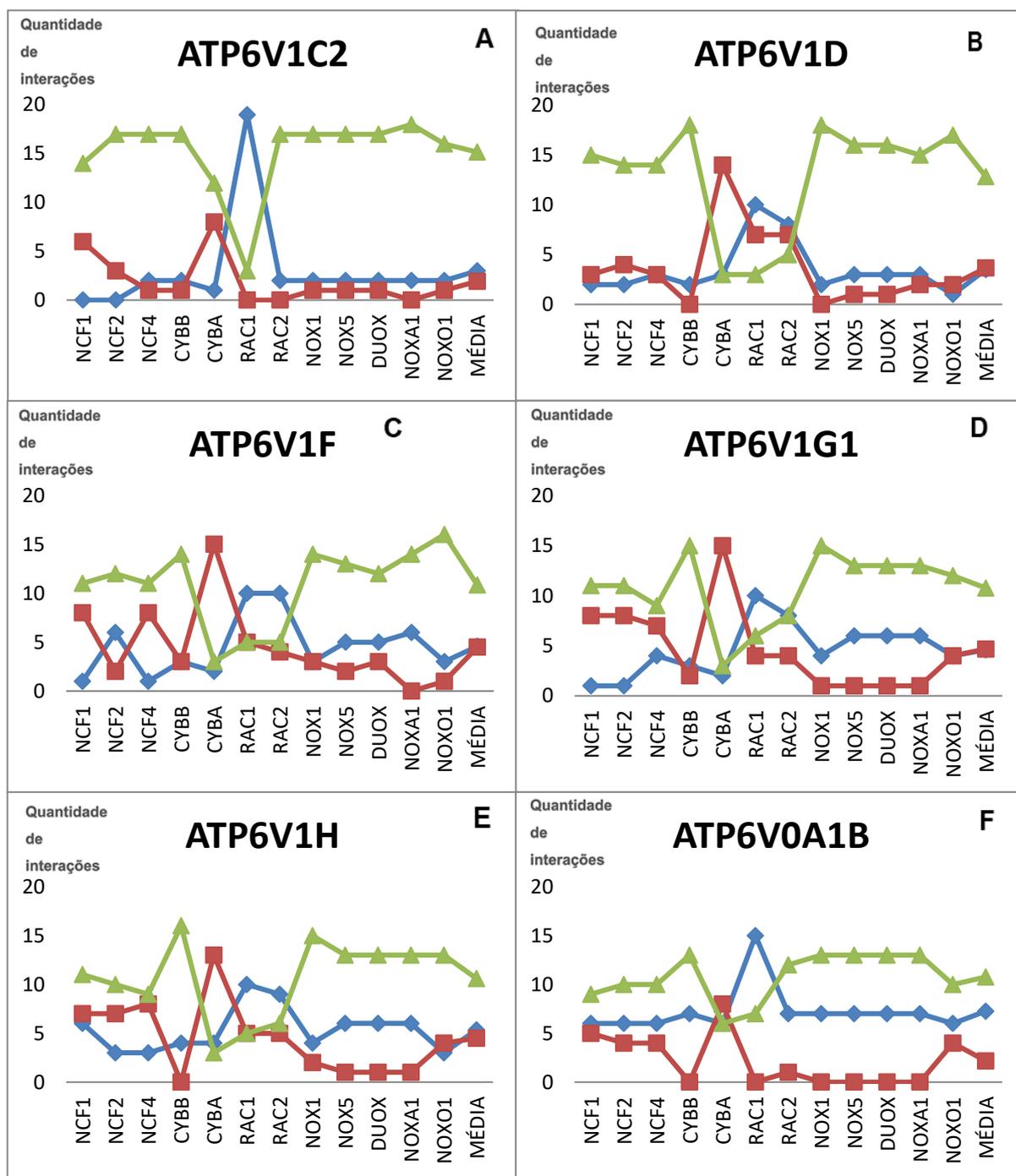
### 5.3 Combinações individuais com os genes da V-ATPase em *Danio rerio*

Os gráficos a seguir mostram a quantificação para *Danio rerio* das associações geradas na plataforma Genemania entre cada gene da V-ATPase e os genes do complexo NOX. No *Danio rerio*, (figura 39) observamos um padrão diferente ao descrito para *Homo sapiens*. Enquanto que nesse a quantidade de genes envolvidos apenas com o complexo NOX foi pequena, cujos valores foram abaixo de 6,6, no *Danio rerio* as quantidades dessas interações foram muito maiores (em verde), variando de 7,4 a 13,22, com excessão do gene CYBA, que codifica p22phox.

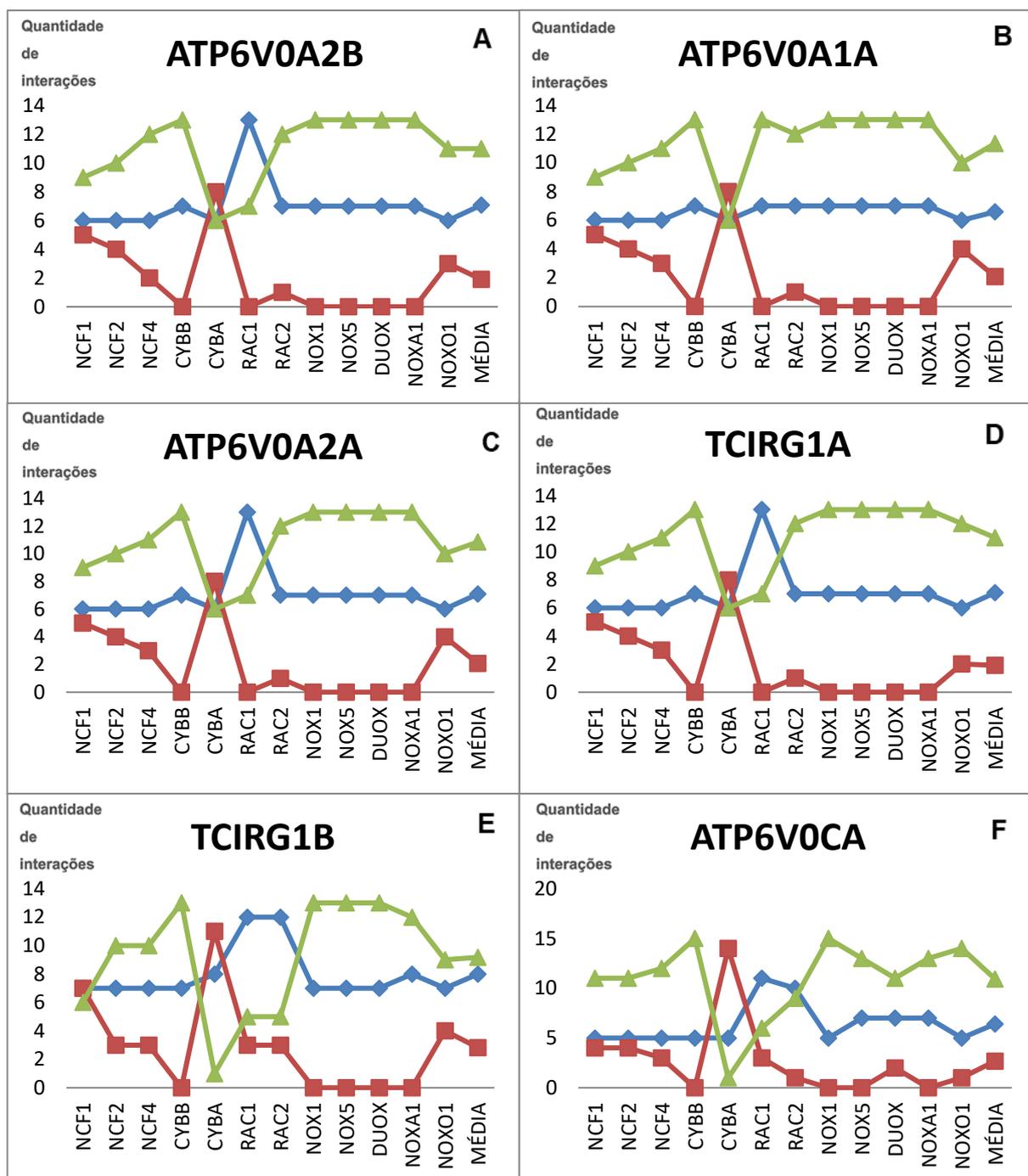
E assim como visto no *Homo sapiens*, o gene CYBA, mostrou maior quantidade de interações envolvendo ambos os complexos em quase todas as combinações e em média 10,3, superando as que envolvem apenas V-ATPase e apenas NOX. Embora isso também tenha sido visto no *Homo sapiens*, esse gene também se destacou porque essa espécie apresentou pouquíssimas interações com ambos, ou seja, as interações diretas e indiretas entre V-ATPase e complexo NOX foram poucas, sendo em todos os outros genes abaixo de 4,8.



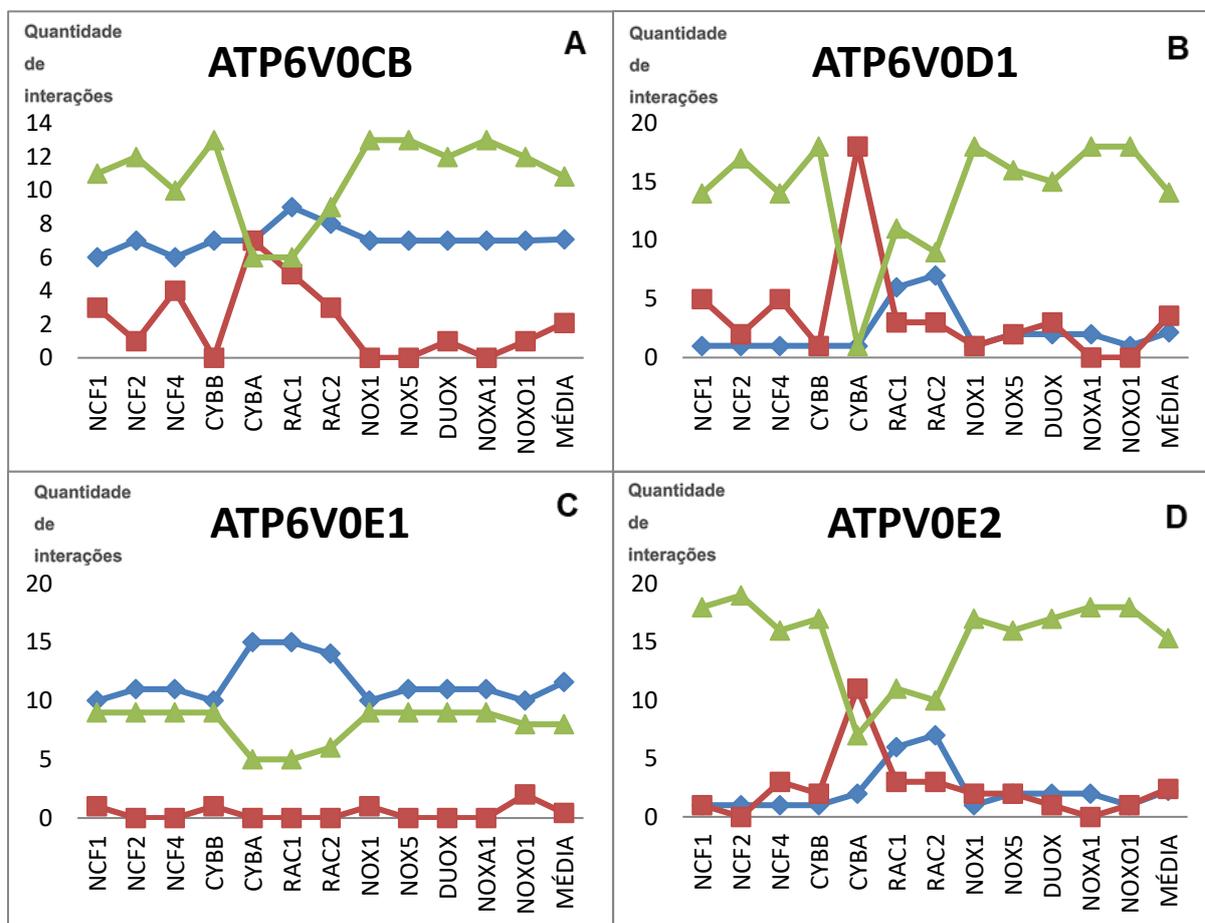
**Figura 35.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1AA, ATP6V1AB, ATP6V1BA, ATP6V1B2, ATP6V1C1A, ATP6V1C1B e os genes do complexo NOX de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.



**Figura 36.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V1C2, ATP6V1D, ATP6V1F, ATP6V1G1, ATP6V1H, ATP6V0A1B e os genes do complexo NOX de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

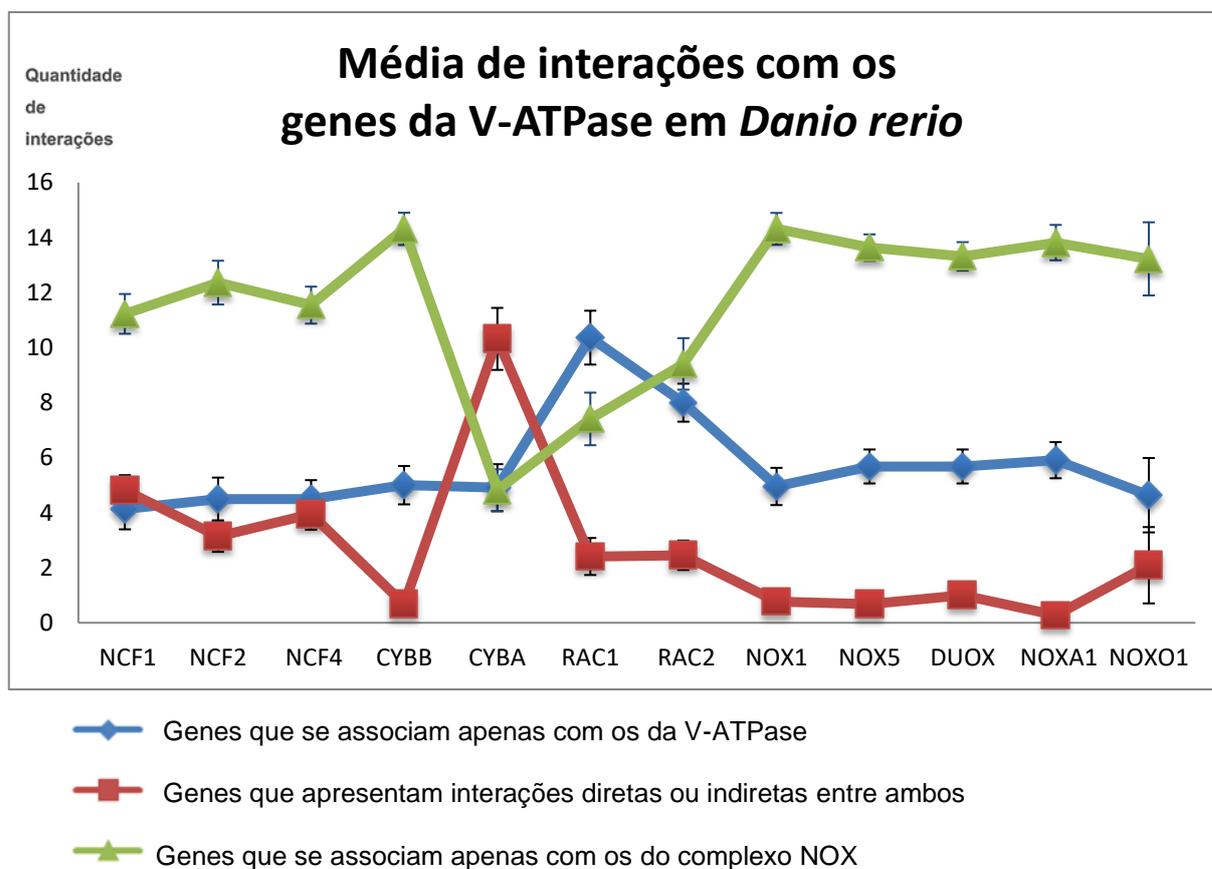


**Figura 37.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V0A2B, ATP6V0A1A, ATP6V0A2A, TCIRG1A, TCIRG1B, ATP6V0CA e os genes do complexo NOX de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes se encontra no eixo Y.



- ◆ Genes que se associam apenas com os da V-ATPase
- Genes que apresentam interações diretas ou indiretas entre ambos
- ▲ Genes que se associam apenas com os do complexo NOX

**Figura 38.** Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes ATP6V0CB, ATP6V0D1, ATP6V0E1, ATP6V0E2 e os genes do complexo NOX de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

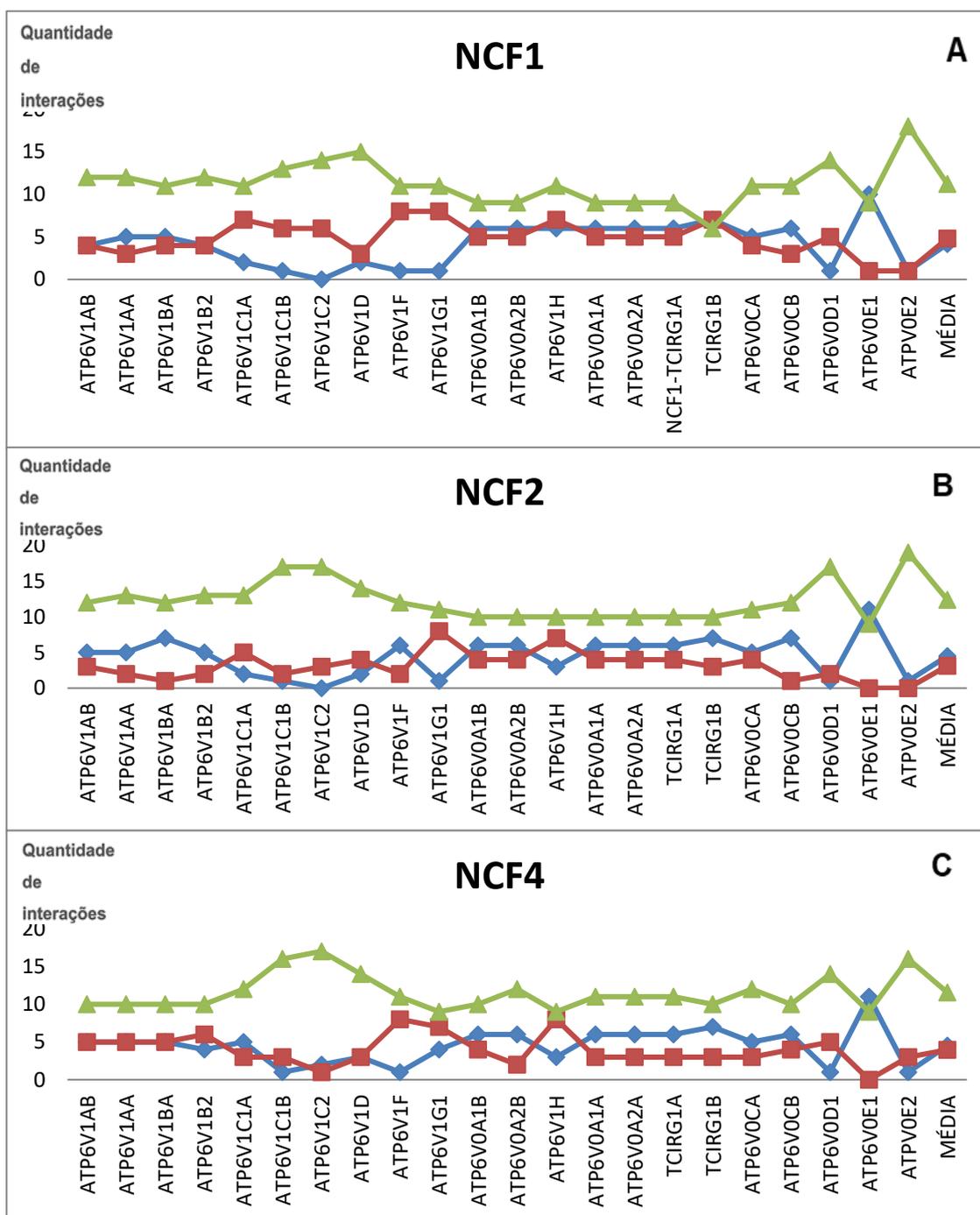


**Figura 39. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase (média) e os genes do complexo NOX de *Danio rerio* geradas no Genemania.** A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

#### 5.4 Combinações individuais com genes do complexo NOX em *Danio rerio*

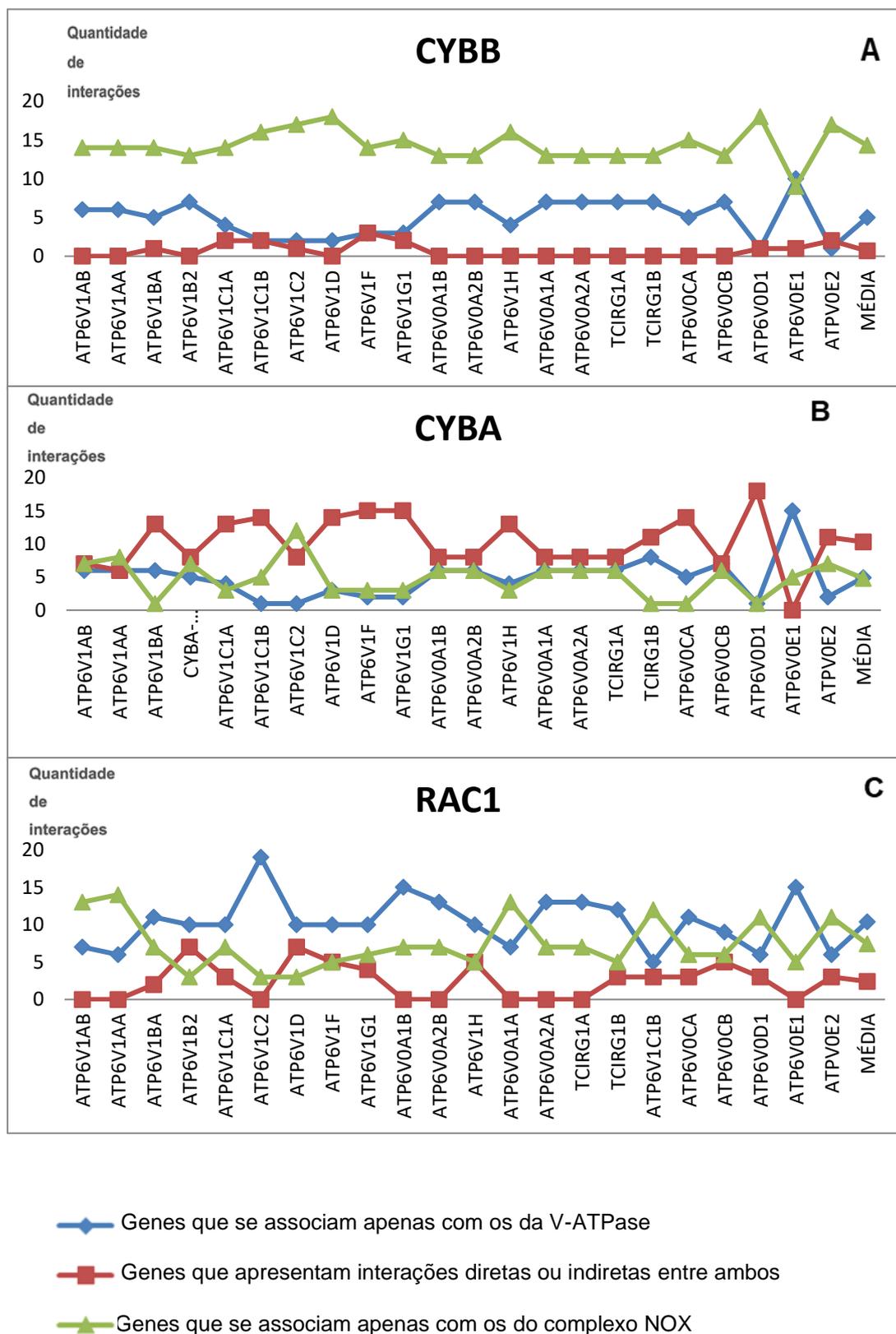
Ao analisar as interações individuais dos genes do complexo NOX com cada um dos genes da V-ATPase em *Danio rerio* (figura 45), constatamos mais uma vez que as interações entre os dois complexos (em vermelho) foram em número muito menor, variando entre 0,4 e 4,7, apresentando 2,7 em média, e vemos um destaque muito grande das interações envolvendo apenas os genes do complexo NOX (em verde) variando entre 8 e 15,6, e apresentando 11,6 em média. Enquanto que as interações envolvendo apenas a V-ATPase mostraram uma média de 5,6. Esse padrão foi visto em todas as interações, exceto nas do gene que codifica a subunidade 'e' do domínio de membrana V0 da V-ATPase, o ATPV0E1, onde o padrão é diferente em todas as interações individuais, mostrando uma média de 11,6 interações

envolvendo apenas a V-ATPase, 8 interações envolvendo o complexo NOX apenas e 0,4 interações entre a V-ATPase e o complexo NOX.

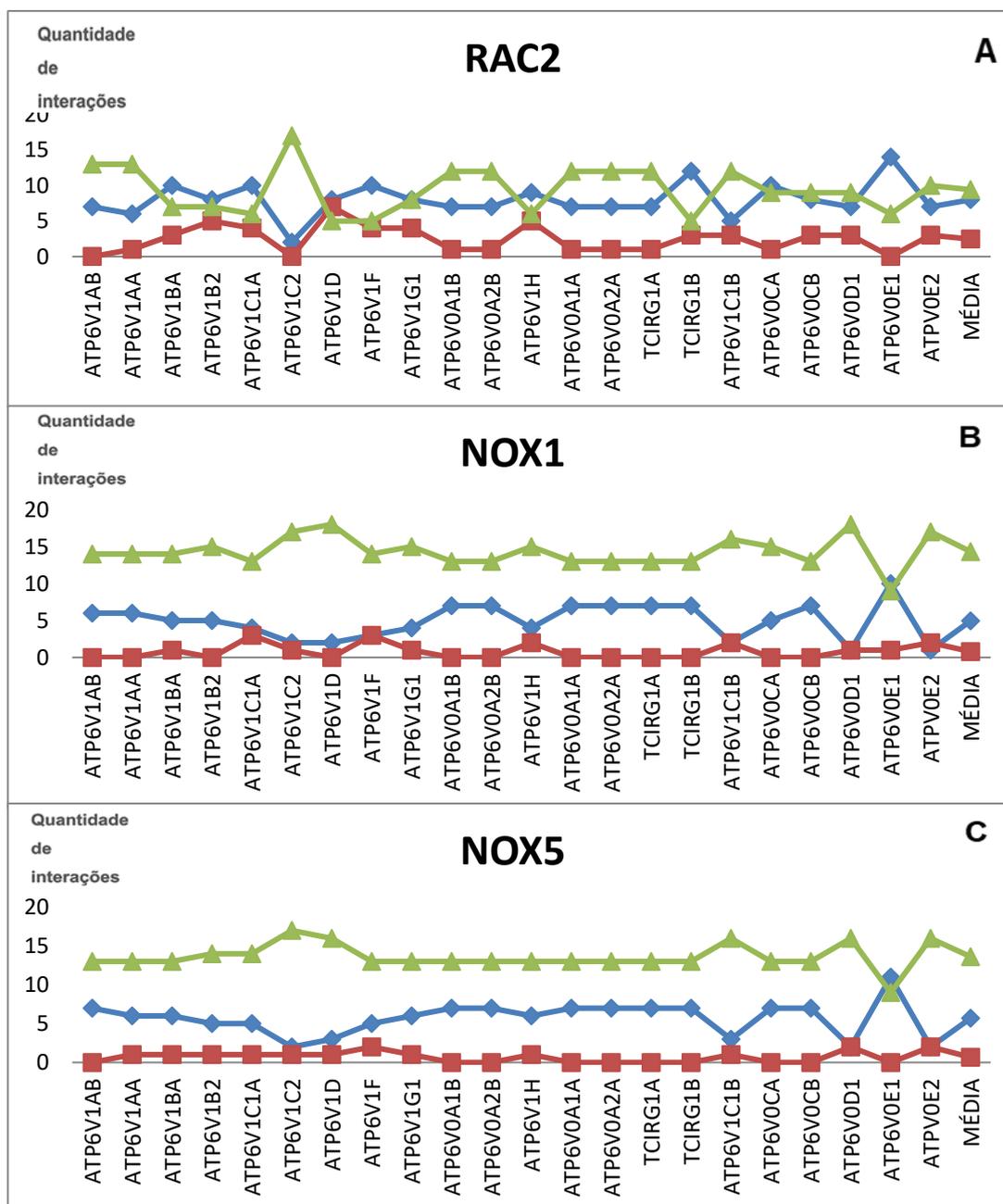


- ◆ Genes que se associam apenas com os da V-ATPase
- Genes que apresentam interações diretas ou indiretas entre ambos
- ▲ Genes que se associam apenas com os do complexo NOX

**Figura 40. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes NCF1, NCF2, NCF4 e os genes da V-ATPase de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**

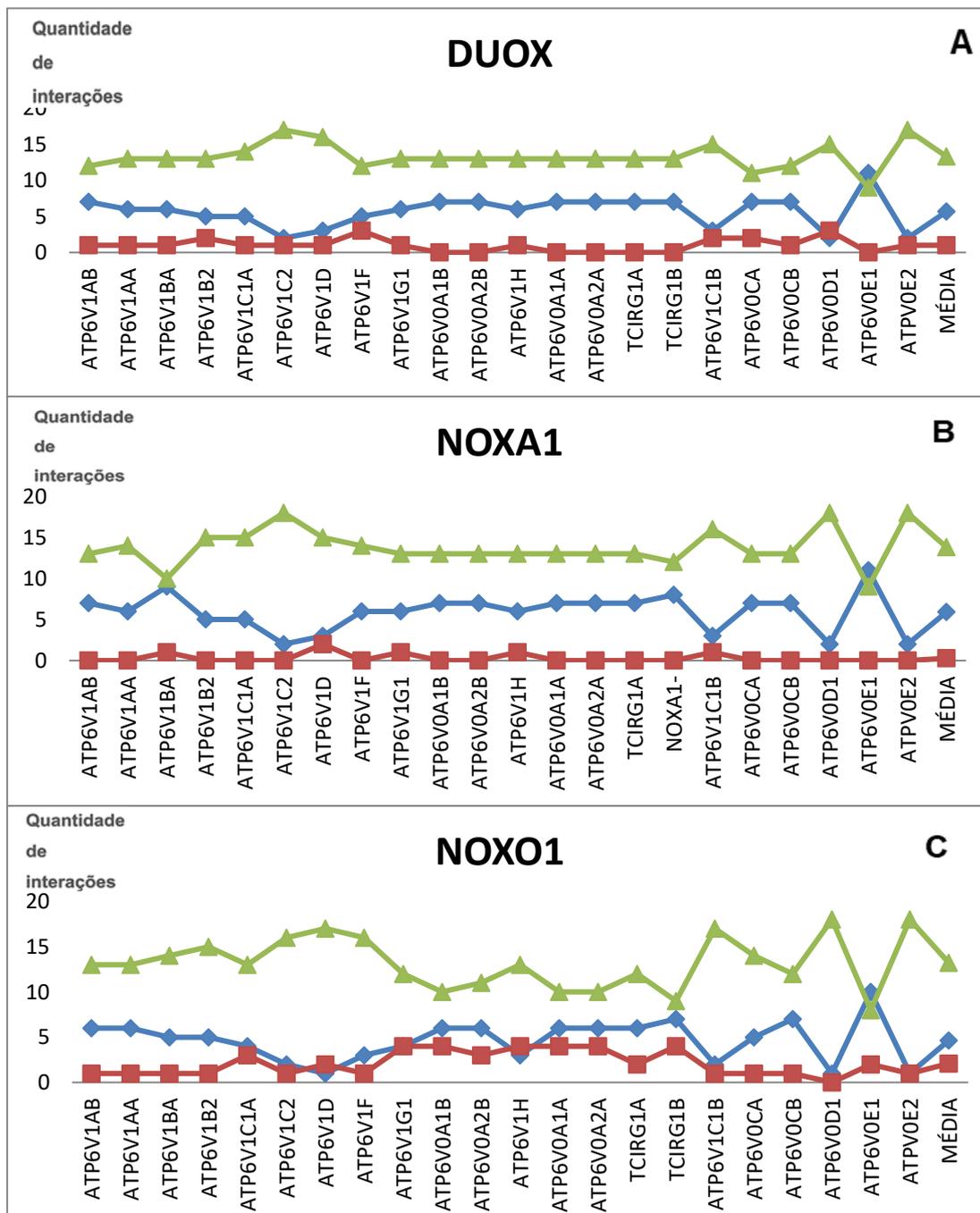


**Figura 41. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes CYBB, CYBA, RAC1 e os genes da V-ATPase de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**



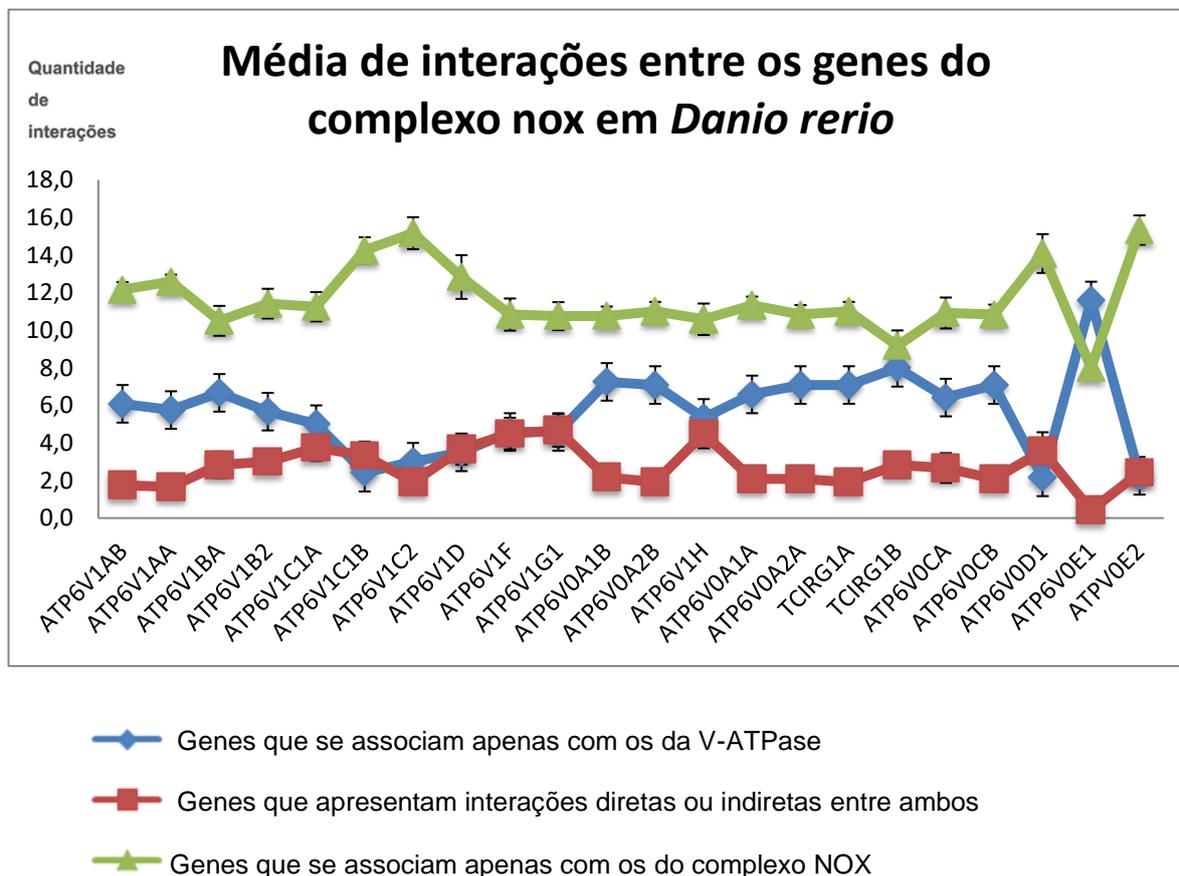
- ◆ Genes que se associam apenas com os da V-ATPase
- Genes que apresentam interações diretas ou indiretas entre ambos
- ▲ Genes que se associam apenas com os do complexo NOX

**Figura 42. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes RAC2, NOX1, NOX5 e os genes da V-ATPase de *Danio rerio* geradas no Genemania. A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.**



- ◆ Genes que se associam apenas com os da V-ATPase
- Genes que apresentam interações diretas ou indiretas entre ambos
- ▲ Genes que se associam apenas com os do complexo NOX

**Figura 43. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes DUOX, NOXA1, NOXO1 e os genes da V-ATPase de *Danio rerio* geradas no Genemania.** A quantidade de redes de interações se encontra no eixo Y.

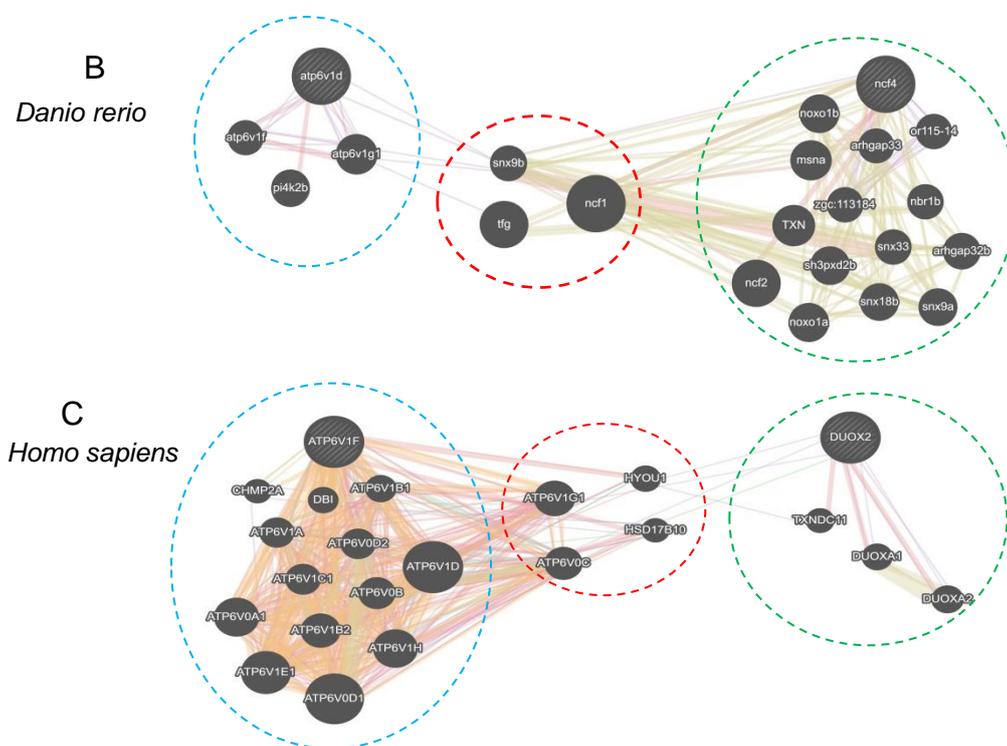
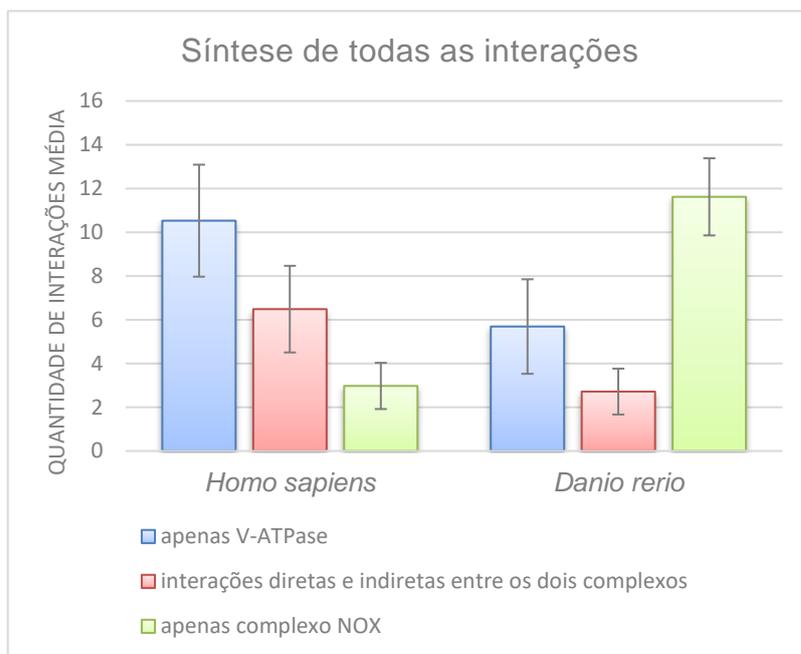


**Figura 44. Quantificação das redes de interação geradas pela combinação entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX (média) em *Danio rerio* geradas no Genemania.** A quantidade de redes de interações geradas se encontra no eixo Y.

### 5.5 Comparação da quantificação das combinações individuais entre *Homo sapiens* e *Danio rerio*

Podemos ver no gráfico da figura 45-A, sintetizando todas as interações individuais no Genemania, que o *Danio rerio*, animal mais primitivo, que conserva a capacidade regenerativa em alguns tecidos, foi o campeão ao apresentar o maior número de interações envolvendo apenas os genes do complexo NOX, 11,6 em média, quando há um link entre a V-ATPase e este complexo, e 5,7 envolvendo somente membros da V-ATPase. Já no *Homo sapiens* o que predominou foi a quantidade de interações envolvendo apenas os membros da V-ATPase, em média 10,5 da V-ATPase com 3 do complexo NOX, mostrando que há um aumento do

comprometimento dos genes dessa bomba em animais com uma complexidade maior de tecidos. Além disso, a quantidade de interações diretas e indiretas, através de pontes de interações com outros genes entre os dois complexos foi maior no *Homo sapiens* apresentando média 2,7 no *Danio rerio* e 6,5 no *Homo sapiens*.



**Figura 45: Síntese da análise quantitativa dos genes dos complexos V-ATPase e NOX.** Gráfico de barras em A. Em B (*Danio rerio*) e C (*Homo sapiens*) dois exemplos do comportamento padrão das

interações em ambas as espécies. Circulados na cor azul os genes envolvidos apenas com os da V-ATPase, circulados em verde os envolvidos apenas com os do complexo NOX e em vermelho os envolvidos com interações diretas e indiretas entre ambos os complexos.

Em B e C observamos dois exemplos, um de cada espécie, das associações interativas geradas e do padrão que se repetiu em quase todas, podemos ver a complexidade do número e tipo de interações envolvendo os genes da V-ATPase no *Homo sapiens* e o padrão invertido para o *Danio rerio*.

O maior comprometimento, no *Danio rerio*, dos membros do complexo NOX demonstram que pode estar havendo um controle maior e, por conseguinte, mais afinado e ajustado da sinalização envolvendo a participação de espécies reativas de oxigênio nesses tecidos.

## 5.6 Interações diretas encontradas

Numa análise qualitativa das variadas interações diretas encontradas entre genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX observa-se claramente que no *Danio rerio* há pouca diversidade de interações envolvendo ambos os complexos e os genes do complexo NOX que foram encontrados (NCF1, CYBA e NCF4) são apenas os que participam da ativação da isoforma NOX2 do complexo da NADPH oxidase, que é altamente expressa em fagócitos (figura 13) (Bedard e Krause, 2007) além de mostrar apenas interações de coexpressão.

Enquanto que no *Homo sapiens* as interações envolvendo ambos foram maiores tanto no número quanto na complexidade de tipos e membros envolvidos. Além disso, os genes NOX5, altamente expressos nos tecidos linfóides, testículos (figura 13), e DUOX1/2, que codificam para as isoformas da NADPH oxidase ativadas por cálcio (figura 12) e que são altamente expressos nos tecidos da tireóide (figura 13) (Bedard e Krause, 2007), além de obterem o destaque no *Homo sapiens* por apresentar quantidades muito maiores de interações envolvendo somente os membros da V-ATPase (figura 27), não apresentaram alterações em relação ao padrão dos demais genes no *Danio rerio* (figura 39), e apresentaram maior

diversidade qualitativa de interações (genéticas e coexpressão) com vários genes da V-ATPase (figura 46).

<i>Homo sapiens</i>	CYBA	NOX4	NOX1	DUOX2	NCF2	DUOXA2	NOX01	NOX5	CYBB	NCF1	NCF4	RAC1	DUOX1
ATP6V0A2	COEXPRESSÃO			COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO		INTERAÇÕES GENÉTICAS	INTERAÇÕES GENÉTICAS		COEXPRESSÃO			
ATP6V1B2	COEXPRESSÃO		COEXPRESSÃO		COEXPRESSÃO				COEXPRESSÃO				
ATP6V1G2	COEXPRESSÃO			COEXPRESSÃO		COEXPRESSÃO					COEXPRESSÃO		
TCIRG1	COEXPRESSÃO			COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO						COEXPRESSÃO		
ATP6V0D1	COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO		COEXPRESSÃO									
ATP6V1B1		COEXPRESSÃO	COLOCALIZAÇÃO	COEXPRESSÃO									
ATP6V0A4		COEXPRESSÃO	COLOCALIZAÇÃO	COEXPRESSÃO									
ATP6V1A	COEXPRESSÃO	INTERAÇÕES GENÉTICAS		COEXPRESSÃO									
ATP6V0E1	COEXPRESSÃO							INTERAÇÕES GENÉTICAS					COLOCALIZAÇÃO
ATP6V1G3		COEXPRESSÃO											
ATP6V1F													INTERAÇÕES GENÉTICAS
ATP6V1G1				COEXPRESSÃO		COEXPRESSÃO	INTERAÇÕES GENÉTICAS						
ATP6V1D1	COEXPRESSÃO												
ATP6V0C				COEXPRESSÃO								COEXPRESSÃO	
ATP6V0D2		COEXPRESSÃO											

<i>Danio rerio</i>	NCF1	CYBA	NCF4
ATP6V1BA	COEXPRESSÃO		
ATP6V1C1B		COEXPRESSÃO	
ATP6V1F		COEXPRESSÃO	
ATP6V1D	COEXPRESSÃO		
ATP6V1C1A		COEXPRESSÃO	
ATP6V1E1B	COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO	
ATP6V1H		COEXPRESSÃO	
TCIRG1B	COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO	COEXPRESSÃO
ATP6V0CA	COEXPRESSÃO		

LEGENDA:

- COEXPRESSÃO
- COLOCALIZAÇÃO
- INTERAÇÕES GENÉTICAS

Figura 46: Esquema indicando características qualitativas de todas as interações diretas encontradas nas redes de interação individuais geradas no Genemania entre os genes da V-ATPase e os genes do complexo NOX em *Homo sapiens* e *Danio rerio*.

Ao apontar um elo entre a V-ATPase e a NADPH oxidase, relacionado com o sistema imunológico mais basal (fagócitos) no *Danio rerio*, esses dados fortalecem a hipótese a qual a produção de ROS e a sinalização bioelétrica, dadas principalmente pelas atividades diferenciais da NADPH oxidase e da V-ATPase, primeiras respostas do tecido lesionado dos animais que regeneram, quando interligadas, estariam relacionadas com células do sistema imunológico inato, principalmente macrófagos, possivelmente para participar de sua ativação e recrutamento para o local da lesão. Essas células se mostram críticas para a regeneração em algumas espécies como peixe-zebra e axalote (Lai et al., 2017; Godwin e Rosenthal et al., 2013).

Enquanto que nas espécies que diminuíram muito essas capacidades, como o *Homo sapiens*, as relações entre a V-ATPase e os membros do complexo NOX são maiores e apontam para uma complexidade tecidual maior e envolvimento com o sistema imune adaptativo, visto que nesses o elo entre ambos os complexos enzimáticos apontou para a ativação de outras isoformas da NADPH oxidase (NOX5 e DUOX1/2), que são altamente expressas em tecidos linfoides, testículos e de tireóide.

## 5.7 Interações indiretas encontradas

Na figura 48 estão relatados todos os genes que participam de pontes de interações indiretas entre os membros da V-ATPase e os membros do complexo NOX em *Homo sapiens* e *Danio rerio* que foram encontrados nas combinações individuais geradas no Genemania.

As pistas encontradas dão um direcionamento para o rumo das investigações moleculares dos processos regenerativos: precisamos relacionar os genes garimpados com os já descritos que estão envolvidos na regeneração e com os que estão envolvidos na ativação de elementos sistema imunológico inato.

GENES QUE FORMAM PONTES DE ASSOCIAÇÃO ENTRE OS GENES DA V-ATPase E OS GENES DO COMPLEXO NOX						
Encontrados apenas no <i>Homo sapiens</i>			Encontrados apenas no <i>Danio rerio</i>			Encontrados em ambos
AASS	ERLEC1	PREX1	ACTN1	PORA	SDC4	ARHGAP33
ABCG2	EVI2B	PRKACB	AFG312	PPP3R1B	SI:CH211-214P16.1	ARHGDIG
ABLIM3	FCER1G	PTPN1	BX957348.4	PTGS2A	SI:DKEY-102G19.3	GSR
ACAP2	FHIT	RASGRF1	CALM3A	PTPN6	SLC7A7	ICMT
AGO	FOXO1	RBP4	CDC42	PTPRC	SNX12	NOS2
ALDOC	FTSJ1	RFK	CDCA4	RAB11BB	SNX16	RAC3
ALOX5AP	GET3	RHBDD1	CLIC1	RAB14	SNX3	TFG
AP2B1	HDAC4	RHOH	COPE	RAB15	SNX4	TNFAIP8L2
AP2M1	HSD17B10	RNASE6	COTL1	RAB1AB	SNX9B	TNFAIP8L2A
AP2M1	HYOU1	ROCK1	CYB5R1	RAB1BA	SOCS3A	
AP2S1	IFITM3	RUBCN	CYB5R3	RAB1BB	SRGN	
AQP3	IL18RAP	RUNX2	DNAJC3B	RAB20	SRI	
ARDM1	INS	SH3GL3	DPF2	RAB32A	SRP72	
ARFIP2	INSR	SH3PXD2A	ELF1	RAB35B	TEC	
ARPC1B	IQGAP1	SLC12A3	FAM49BA	RAB3C	TIAL1	
ATP5F1B	ITGB2	SLC23A1	FLI1B	RAB3C	TMEM50A	
ATP5MC2	JUN	SLC38A9	GM1	RAB41	TNFAIP8L2A	
ATP6AP1	KDELRL1	SMS	IFT88	RAB4B	TRAPPC8	
ATP6AP2	KLHL20	SNX10	IGMN	RAB5AA	TRIM9	
BAIAP2	LIMA1	SOD1	ITGAE2	RAB5B	TTC21B	
CACNA1G	MGAM	SPI1	KIFPB	RAB5C	TXN	
CARD9	MMP9	STEAP1	LCP1	RAB6A	UBE2AL	
CD4	MYO1F	STX16	LITAF	RAC3A	UCHL1	
CD8B	NOD2	TFRC	MD3B	RAC3B	ZGC:101679	
CORO1A	PAK1	TLR4	MPZL2B	RBM47	ZGC:113184	
CTSB	PAK3	TNFRSF12A	MSNA	RGS13	ZGC:64051	
CYBC1	PDXDC1	TNFRSF1A	MYL9B	RHOAA	ZIG152863	
CYTH2	PFKP	TPO	NAPAB	RHOAC		
DEF6	PIK3R2	TXNDC11	NBR1B	RHOGB		
DOCK2	PIP4P1	USP47	NDOR	RHOV		
DOCK3	PLD2	VAMP2	NDOR1	RPL26		
DOCK6	PPKACB	VCAM1	NOS1	RSRP1		
DOCK8	PPP2R3B	WAS	NRROS	SAMSN1A		
ELMO1	PRDX6		PIK3R3A	SBF1		

**Figura 47: Genes que fazem ponte de intercessão de interações indiretas envolvendo ambos os complexos (V-ATPase e NADPH oxidase)**

Diante da possibilidade de criar tecnologias que proporcionem melhorias nos processos de cicatrização dos tecidos que não regeneram é preciso cautela e paciência para esperar uma melhor elucidação dos enigmas da regeneração, uma vez que há a hipótese a qual preconiza que o câncer é uma tentativa de regeneração mal sucedida (Logan e Nusse, 2004), pois o desencadeamento de ambos os processos possuem muitas similaridades, e a diferença é que no câncer a proliferação é desordenada e na regeneração finamente controlada. Entre as inúmeras similaridades, um estudo realizado em axalote encontrou semelhanças físicas entre o blastema mesenquimal frouxo e a estrutura tumoral (Rojas-Muños et al., 2009; Logan e Nusse, 2004), além da utilização das vias de sinalização do desenvolvimento embrionário e semelhanças moleculares, como a ativação de p53, uma proteína supressora tumoral, que é crítica para que a regeneração ocorra (Knapp et al., 2013; Stewart et al., 2013; Yun et al., 2013), bem como fatores de crescimento e oncogenes, tais como AMPK, PI3K/AKT e Myc que juntamente com p53 promovem a glicólise aeróbica (Efeito Warburg) e a produção de ácidos graxos em grande escala para prover a biossíntese de nucleotídeos (Vander Heiden et al., 2009). Entender a chave desse ordenamento e controle nos processos regenerativos talvez também nos ajudaria a elucidar a origem do descontrole proliferativo da tumorigênese.

Para entender os fatores que ativam processos de proliferação extremamente ordenados daqueles que falham ou que optam por fazer apenas reparos sem recuperar as partes perdidas ou lesionadas, ainda são necessárias análises mais refinadas com o foco nos genes da V-ATPase e do complexo NOX que se destacaram, em nível de expressão por órgão, tipo de tecido, tempo do desenvolvimento e ativação por lesão. Também é preciso validar esses achados em nível de expressão e montagem dos complexos enzimáticos nos tecidos recém-amputados, e a nível funcional nos mesmos, verificando as atividades dos complexos proteicos e como são reguladas a sinalização de ROS e a sinalização bioelétrica, para que se consiga desvendar uma assinatura molecular de reprogramação metabólica, que guia o tecido lesionado para a sua plena reconstrução após lesão, envolvendo proliferação celular ordenada, e assim desvendar o que foi perdido nos tecidos que fazem apenas reparos e não conseguem esses feitos regenerativos.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Conclusão geral

Os dados obtidos mostraram que o elo entre a V-ATPase e a NADPH oxidase nos animais com capacidades regenerativas envolve interações com o sistema imunológico inato (fagócitos), com maior participação das subunidades da NADPH oxidase (NOX2). Enquanto que, nos que diminuíram muito as capacidades regenerativas, há um maior envolvimento da NADPH oxidase com os membros da V-ATPase e a participação de outras isoformas (NOX5 e DUOX1/2), que são altamente expressas em tecidos linfóides, testículos e de tireóide, mostrando que nos animais que promovem um simples reparo, o elo entre ambos os complexos envolve a participação do sistema imunológico adaptativo, fruto de uma complexidade tecidual maior.

### 6.2 Conclusões específicas

- No *Homo sapiens* a quantidade de interações e envolvimento é maior entre os genes da V-ATPase que se associam entre si e entre outros que se associam somente com os seus especialmente nas interações com NOX5, DUOX1, DUOX2, NOXA1, NOXO1 e RAC2;

- NOX5 e DUOX1/2, isoformas da NADPH oxidase ativadas por cálcio, altamente expressas nos linfócitos, testículos e tireóide, tiveram um destaque muito grande no número de interações envolvendo apenas os membros da V-ATPase em *Homo sapiens*;

- Em *Homo sapiens* os genes ATP6V0A2, TCIRG1, ATP6V0A4, ATP6V0D1 e ATP6V0E1 foram os únicos que apresentaram maior quantidade de interações envolvendo ambos os complexos (V-ATPase e NADPH oxidase) em quantidade que superasse as interações envolvendo somente o complexo NOX e as que envolveram somente os genes da V-ATPase;

- O gene CYBA se destacou nas duas espécies ao possuir número de interações envolvendo ambos os complexos (V-ATPase e NADPH oxidase)

superando as interações envolvendo somente os genes da V-ATPase e somente os genes da NADPH oxidase, embora no *Danio rerio* essa diferença foi com maior destaque, uma vez que nessa espécie houve raras interações envolvendo os dois complexos;

- No *Danio rerio* a quantidade de genes que participam de associações interativas envolvendo apenas os membros do complexo NOX foi a maior quantidade de interações encontradas nas duas espécies, enquanto que a quantidade de interações envolvendo ambos os complexos foram muito pequenas;

- No *Danio rerio* as quantidades de interações envolvendo o gene ATP6V0E1, gene que codifica a subunidade 'e' do domínio de membrana V0 da V-ATPase, apresentou um padrão diferente de todos os demais genes. Com um número muito maior de interações envolvendo somente genes da V-ATPase, semelhante ao encontrado em quase todos os genes no *Homo sapiens*;

- O número e os tipos de interações diretas envolvendo ambos os complexos (NOX e V-ATPase) é maior em *Homo sapiens* e aponta para o sistema imunológico adaptativo, em contraste com o que ocorre no *Danio rerio*, que apresentou poucas interações diretas, restritas à NOX2, isoforma da NADPH oxidase altamente expressa nos fagócitos.

## 7 REFERÊNCIAS

- Adams DS, Robinson KR, Fukumoto T, Yuan S, Albertson RC, Yelick P, Kuo L, McSweeney M, Levin M. (2006) Early, H<sup>+</sup>-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Development*. 133: 1657–1671;
- Adams, D. S., Masi, A., and Levin, M. (2007) H<sup>+</sup> pump-dependent changes in membrane voltage are an early mechanism necessary and sufficient to induce *Xenopus* tail regeneration. *Development*. 134, 1323–1335;
- Adams, D. S., Tseng, A.-S., and Levin, M. (2013) Light-activation of the Archaelhodopsin H<sup>+</sup>-pump reverses age-dependent loss of vertebrate regeneration: sparking system-level controls *in vivo*. *Biol. Open* 2, 306–313;
- Adzick, N.S., Lorenz, H.P. (1994) Cells, matrix, growth factors, and the surgeon. The biology of scarless fetal wound repair. *Ann. Surg.* 220, 10–18;
- Ago T, Nuno H, Ito T, Sumimoto H: (1999) Mechanism for phosphorylation-induced activation of the phagocyte NADPH oxidase protein p47(phox). Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47(phox), thereby activating the oxidase. *J Biol Chem*. 274:3 3644-33653;
- Albertus M, Resnick IM, Kitchell KF (2011) Questions concerning Aristotle's *On Animals* (The Fathers of the Church: Mediaeval Continuation, Volume 9). The Catholic University of America Press, Washington;
- Altizer, A.M. et al. (2001) Endogenous electric current is associated with normal development of the vertebrate limb. *Dev. Dyn.* 221: 391– 401;
- Alvarado, Alejandro Sánchez e Newmark Phillip A. (1998) *The use of planarians to dissect the molecular basis of metazoan regeneration*. 6(4), 0–0;

- Andrews CAR (1994) *Amulets of Ancient Egypt*. The British Museum Press, London;
- Apollodorus FJ (1921) *Apollodorus, The Library, Book 2*. Harvard University Press, Cambridge;
- Aristotle, Balme DM, Gotthelf A, Peck AL (1965) *Historia animalium*. Heinemann\ Harvard University Press, London/ Cambridge, MA;
- Aruoma, O. I. (1998) *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(2), 199–212;
- Awazu S, Matsuoka T, Inaba K, Satoh N, Sasakura Y (2007) High-throughput enhancer trap by remobilization of transposon Minos in *Ciona intestinalis*. *Genesis*. 45: 307–317;
- Babior, BM. (2004) *NADPH oxidase*. *Curr Opin Immunol*. 16(1): 42–47. doi:10.1016/j.coi.2003.12.001;
- Baguña J, Saló E, Romero R, Garcia-Fernández J, Bueno D, et al. (1994) Regeneration and pattern formation in planarians: cells, molecules and genes. *Zool. Sci*. 11: 781–95;
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, aging. ***Cell*** 120: 483–495;
- Barfurth, D. (1894) Sind die Extremitäten der Frosche regenerationsfähig? *Arch. f. Entwmech.*, I: 117-123;
- Bates E. (2015) Ion Channels in Development and Cancer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 31(1): 231–247;
- Batot G, Martel C, Capdeville N, Wientjes F, Morel F: (1995) Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using

specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem* 234:208-215;

Beane WS, Morokuma J, Adams DS, Levin M. (2011) A chemical genetics approach reveals H,K-ATPase-mediated membrane voltage is required for planarian head regeneration. *Chem Biol* 18: 77–89;

Beck, C. W., Christen, B., Slack, J. M. (2003) Molecular pathways needed for regeneration of spinal cord and muscle in a vertebrate. *Dev. Cell* 5, 429–439;

Beck, C. W., Izpisua Belmonte, J. C., & Christen, B. (2009) Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. *Developmental Dynamics*, 238(6), 1226–1248;

Becker T, Wullmann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. (1997) Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol.* 377: 577–595;

Becker, R.O. (1972) Stimulation of partial limb regeneration in rats. *Nature.* 235: 109–111;

Bedard, K., Krause, K-H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87: 245–313;

Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S., Terskikh, A. V., et al. (2006) Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat. Methods* 3, 281–286. Bely AE, Nyberg KG (2010) Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol* 25(3):161–170;

Bely, A. E. (2010) *Evolutionary Loss of Animal Regeneration: Pattern and Process.* *Integrative and Comparative Biology*, 50(4), 515–527;

- Bely, A. E., & Nyberg, K. G. (2010) *Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. Trends in Ecology & Evolution, 25(3), 161–170;*
- Bely, A. E., & Sikes, J. M. (2010) Latent regeneration abilities persist following recent evolutionary loss in asexual annelids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107, 1464;*
- Bely, A., (2006) Distribution of segment regeneration ability in the Annelida. *Integrative and Comparative Biology 46, 508–518;*
- Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M. (1996) Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol 376: 253– 264;*
- Berrill, N. J. (1952) Regeneration and budding in worms. *Biological Reviews, 27, 401–438;*
- Bideau L, Kerner P, Hui J, Vervoort M, Gazave E. (2021) Animal regeneration in the era of transcriptomics. *Cell Mol Life Sci. Apr;78(8):3941-3956;*
- Blackiston DJ, McLaughlin KA, Levin M. (2009) Bioelectric controls of cell proliferation: ion channels, membrane voltage and the cell cycle. *Cell Cycle 8: 3519–3528;*
- Blaszak Czeslaw (2009) *Zoologia: invertebrados. T1. Ed. ciências. Varsóvia. ISBN 978-83-01-16108-8;*
- Borgens, R.B. et al. (1984) Stump currents in regenerating salamanders and newts. *J. Exp. Zool. 231, 249–256;*
- Brand M, Granato M, NussleinVolhard C. (2002) Keeping and raising zebrafish. In: Nusslein-Volhard C, Dahm R, editors. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; pp. 7-37;

- Breton, Sylvie e Brown, Dennis (2013) Regulation of Luminal Acidification by the V-ATPase. *Physiology* Published Vol. 28 no. 5, 318-329;
- Brockes, J. e Kumar, A. (2008) Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 356-CB24-21 525-549;
- Brockes, J.P., (1998) Regeneration and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1377, M1–11;
- Brondsted HV (1969) *Planarian Regeneration*. Pergamon Press, London;
- Broussonet M. (1786) Observations sur la regeneration de quelques parties du corps des poissons. In: *Hist d. l'Acad Roy des Sciences*;
- Brown FD, Keeling EL, Le AD, Swalla BJ (2009) Whole body regeneration in a colonial ascidian, *Botrylloides violaceus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312:885–900;
- Burr HS, Hovland CI. (1937) Bio-electric correlates of development in amblystoma. *The Yale J Biol Med* 9: 540–549;
- Busse, S. M., McMillen, P. T., and Levin, M. (2018) Cross-limb communication during *Xenopus hindlimb* regenerative response: non-local bioelectric injury signals. *Development* 145:dev164210;
- Cameron CB, Garey JR, Swalla BJ (2000) Evolução do plano corporal cordado: novos insights de análises filogenéticas de deuterostômios filos. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4469–4474;
- Carlson BM, (2007) *Principles of Regenerative Biology*. London: Elsevier. 379;
- Carlson, M.E., Hsu, M., Conboy, I.M., (2008) Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454, 528–532;

- Carpio Y, Estrada MP. (2006) Zebrafish as a genetic model organism. *Biotechnologia Aplicada*. 23:265-270;
- Chandebois R. (1980) The dynamics of wound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II—Distalization. *Dev. Growth Differ.* 22:693–704;
- Chang, J., Baker, J., and Wills, A. (2017) Transcriptional dynamics of tail regeneration in *Xenopus tropicalis*. *Genesis* 55:e23015;
- Chávez MN, Aedo G, Fierro FA, Allende ML, Egaña JT. (2016) Zebrafish as an emerging model organism to study angiogenesis in development and regeneration. *Frontiers in Physiology*.;7:56;
- Chen, C., Fok, S. K.-W., Hsieh, Y., Chen, C., Hsu, F., Chang, Y., & Chen, J. (2020) *General characterization of regeneration in Aeolosoma viride (Annelida, Aeolosomatidae)*. *Invertebrate Biology*;
- Chitramuthu BP (2013) Modeling human disease and development in zebrafish. *Human Genet Embryology*;3:e108;
- Christen, B., Beck, C. W., Lombardo, A., and Slack, J. M. W. (2003) Regeneration-specific expression pattern of three posterior Hox genes. *Dev. Dyn.* 226;
- Cipriano, D. J., Wang, Y., Bond, S., Hinton, A., Jefferies, K. C., Qi, J., & Forgac, M. (2008) *Structure and regulation of the vacuolar ATPases*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7-8), 599–604.355;
- Cohen A, Berrill NJ (1936) The development of isolated blastomeres of the ascidian egg. *J Exp Zool* 74:91–117;
- Dahlberg C, Auger H, Dupont S, Sasakura Y, Thorndyke M, Joly JS (2009) Refining the *Ciona intestinalis* model of central nervous system regeneration. *PLoS One* 4(2):e4458;

- Dahm R, Geisler R. (2006) Learning from small fry: The zebrafish as a genetic model organism for aquaculture fish species. *Marine Biotechnology*;8(4):329-345;
- Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H (2006) Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature* 439(7079):965–968;
- Dent, J. M. (1962) Limb regeneration in larvae and metamorphosing individuals of the South African clawed toad. *J. Morphol.* 110, 61–77;
- Dubois F, Wolff E (1947) Sur une méthode d'irradiation localisée permettant de mettre en évidence la migration des cellules de régénération chez les planaires. *Société de Biologie Strasbourg* 141:903–906;
- Dubois F. (1949) Contribution à l'étude de la migration des cellules de régénération chez les Planaires dulcicoles. *Bull. Biol. Fr. Belg.* 83:213–83;
- Duellman WE, Trueb L (1986) *Biology of amphibians*. McGraw-Hill, New York;
- Elliott, S. A., & Alvarado, A. S. (2018) *Planarians and the History of Animal Regeneration: Paradigm Shifts and Key Concepts in Biology*. *Planarian Regeneration*, 207–239;
- Endo, T., Tamura, K., & Ide, H. (2000) Analysis of Gene Expressions during Xenopus Forelimb Regeneration. *Developmental Biology*, 220(2), 296–306;
- Falconi, R., Gugnali, A., & Zaccanti, F. (2015) Quantitative observations on asexual reproduction of *Aeolosoma viride* (Annelida, Aphanoneura). *Invertebrate Biology*, 134, 151–161;
- Fernando, W. A., Leininger, E., Simkin, J., Li, N., Malcom, C. A., Sathyamoorthi, SMuneoka, K. (2011) Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Developmental Biology*, 350, 301–310;

- Ferreira, F., Luxardi, G., Reid, B., and Zhao, M. (2016) Early bioelectric activities mediate redox-modulated regeneration. *Development* 143, 4582–4594;
- Ferreira, F., Raghunathan, V., Luxardi, G., Zhu, K., and Zhao, M. (2018) Early redox activities modulate *Xenopus tail* regeneration. *Nat. Commun.* 9:4296;
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000) *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.* *Nature*, 408(6809), 239–247;
- Fisher TR (1976) Oxygen uptake of the solitary tunicate *Styela plicata*. *Biol Bull* 151(2):297–305;
- Forgac, Michael (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (11), 917;
- Foulkes, R. H. (1953) Regeneration of the anterior end of *Aulophorus furcatus* (Naididae) with special reference to effect of X-rays. *Biological Bulletin*, 105, 80–86;
- Franklin, B. M., Voss, S. R., and Osborn, J. L. (2017) Ion channel signaling influences cellular proliferation and phagocyte activity during axolotl tail regeneration. *Mech. Dev.* 146, 42–54;
- Freeman G. (1964) The role of blood cells in the process of asexual reproduction in the tunicate *Perophora*. *J Exp Zool.* ;156:157–184;
- Freytag GE (1974) Urodeles and caecilians. In: Freytag GE, Grzimek B, Kuhn O, Thenius E (eds) *Grzimek's animal life encyclopedia*, vol 5: Fishes 2/ Amphibians. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 309-356;
- Frost DR (1985) *Amphibian species of the world. A taxonomic and geographic reference.* Allen Press and Association of Systematic Collections, Lawrence, Kansas;

- Fujita H, Nanba H (1971) Fine structure and its functional properties of the endostyle of ascidians, *Ciona intestinalis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 121(4):455–469;
- Galliot B, Chera S. (2010) The Hydra model: disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends Cell Biol.* ;20:514–523;
- Galloway, T. W. (1899) Observations on non-sexual reproduction in *Dero vaga*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College*, 35, 115–140;
- Gardiner, D.M., Carlson, M.R., Roy, S., (1999) Towards a functional analysis of limb regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 385–393;
- Gardiner, D.M., Endo, T., Bryant, S.V., (2002) The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 345–352;
- Giangrande A, Licciano M (2014) Regeneration and clonality in Metazoa. The price to pay for evolving complexity. *Invertebr Reprod Dev* 58(1):1–8;
- Gibson, G. D., & Paterson, I. G. (2003) Morphogenesis during sexual and asexual reproduction in *Amphipolydora vestalis* (Polychaeta: Spionidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37, 741–752;
- Glasby, C. J., & Timm, T. (2008) Global diversity of polychaetes (Polychaeta; Annelida) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595, 107–115;
- Glasby, C. J., Timm, T., Muir, A. I., & Gil, J. (2009) Catalogue of non-marine Polychaeta (Annelida) of the world. *Zootaxa*, 52, 1–52;
- Godwin, J. W., & Rosenthal, N. (2014) *Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: Immunological influences on regenerative success. Differentiation*, 87(1-2), 66–75;

- Godwin, J. W., Pinto, A. R., and Rosenthal, N. A. (2013) Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 9415–9420;
- Gordon, T., & Shenkar, N. (2018) *Solitary Ascidians as Model Organisms in Regenerative Biology Studies. Marine Organisms as Model Systems in Biology and Medicine*, 321–336;
- Gore AV, Monzo K, Cha YR, Pan W, Weinstein BM (2012) Vascular development in the zebrafish. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*;2(5):a006684;
- Goss RJ (1969) *Principles of Regeneration*. Academic Press. New York;
- Goss RJ (1992) The evolution of regeneration: adaptive or inherent? *J Theor Biol* 159(2):241–260;
- Goswami M, Gupta I, Jha P (2005) *Sapta matrikas* in Indian art and their significance in Indian sculpture and ethos: a critical study. *Anistoriton* 9
- Grounds, M.D., (1998) Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann. NY Acad. Sci.* 854, 78–91;
- Habas R, Dawid IB. (2005) Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier?. *J Biol* 4:2;
- Handen JS. (2002) The industrialization of drug discovery. *Drug Discovery Today*; 7(2):83-85;
- Harty, Mark; Anton W. Neff; Michael W. King; Anthony L. Mescher (2003) Regeneration or scarring: An immunologic perspective. , 226(2), 268–279;

- Hawkins WE, Overstreet RM, Fournie JW, Walker WW. (1985) Development of aquarium fish models for environmental carcinogenesis: Tumor induction in seven species. *Journal of Applied Toxicology*; 5:261-264;
- Hayashi, S., Kawaguchi, A., Uchiyama, I., Kawasumi-Kita, A., Kobayashi, T., Nishide, H., et al. (2015) Epigenetic modification maintains intrinsic limb-cell identity in *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev. Biol.* 406, 271–282;
- Hesiod H, Evelyn-White H (1914) *The Homeric hymns and Homerica*. Harvard University Press, Cambridge;
- Heusser HR (1974) Frogs and toads. In: Freytag GE, Grzimek B, Kuhn O, Thenius E (eds) *Grzimek's animal life encyclopedia*, vol 5: fishes 2/amphibians. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 357-383;
- Hietaniemi, K., Peltonen, J., Paavolainen, P., (1995) An experimental model for nonunion in rats. *Injury* 26, 681–686;
- Hinton, A.; Sennoune, S. R.; Bond, S. Fang, M.; Reuveni, M. Sahagian, G. G.; Jay, D.; Martínéz- Zaguilán, R.; Forgac, Michael (2009) Function of a subunit isoforms of the V-ATPase in pH homeostasis and vitro invasion oMDA- MB231 human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 16400- 16408;
- Ho, D. M., and Whitman, M. (2008) TGF-beta signaling is required for multiple processes during *Xenopus* tail regeneration. *Dev. Biol.* 315, 203–216;
- Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoïn S, Casanova J, Wildeman A, Bechoua S, Ausiello DA, Brown D, and Marshansky V, (2006). V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 8: 124–136;
- Illingsworth, C.M., (1974) Trapped fingers and amputated fingertips in Children. *J. Pediatr. Surg.* 9, 853–858;

- Jeffery WR (2012) Siphon regeneration capacity is compromised during aging in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Mech Ageing Dev* 133(9):629–636;
- Joly JS, Kano S, Matsuoka T, Auger H, Hirayama K, et al. (2007) Culture of *Ciona intestinalis* in closed systems. *Developmental Dynamics* 236: 1832–1840;
- Takebe, A. D., & Wills, A. E. (2019) *More Than Just a Bandage: Closing the Gap Between Injury and Appendage Regeneration. Frontiers in Physiology, 10*;
- Kanungo J, Cuevas E, Ali SF, Paule MG (2014) Zebrafish model in drug safety assessment. *Current Pharmaceutical Design.*;20(34):5416-5429;
- Kari G, Rodeck U, Dicker AP. (2007) Zebrafish: An emerging model system for human disease and drug discovery. *Clinical Pharmacology and Therapeutics.*;82(1):70-80;
- Kawamura K, Sugino Y, Sunanaga T, Fujiwara S (2008) Multipotent epithelial cells in the process of regeneration and asexual reproduction in colonial tunicates. *Develop Growth Differ* 50:1–11;
- Keijzer, F., van Duijn, M., & Lyon, P. (2013) *What nervous systems do: early evolution, input–output, and the skin brain thesis. Adaptive Behavior, 21(2), 67–85.*;
- Knapp, D., Schulz, H., Rascon, C. A., Volkmer, M., Scholz, J., Nacu, E., et al. (2013) Comparative transcriptional profiling of the axolotl limb identifies a tripartite regeneration-specific gene program. *PLoS One* 8:e61352;
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008) *Wnt signal transduction pathways. Organogenesis, 4(2), 68–75.*;
- Kott P (2005) Espécies novas e pouco conhecidas de Didemnidae (Ascidiacea, Tunicata) da Austrália (Parte 3). *J Nat Hist* 39: 2409–2497;

- Kurtz I, Schrank AR. (1955) Bioelectrical properties of intact and regenerating earthworms *Eisenia foetida*;
- Lai, S. L., Marín-Juez, R., Moura, P. L., Kuenne, C., Lai, J. K. H., Tsedeke, A. T., et al. (2017) Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. *eLife* 6:e25605;
- Lambert CC (2005) Historical introduction, overview, and reproductive biology of the protochordates. *Can J Zool* 83(1):1–7;
- Lambeth JD. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* ;4:181–189;
- Lee J, Gardiner D (2012) Regeneration of Limb Joints in the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *PLoS One* 7(11):e50615;
- Lenhoff SG, Lenhoff HM (1986) Hydra and the birth of experimental biology, 1744: Abraham Trembley's memoirs concerning the natural history of a type of freshwater polyp with arms shaped like horns. Boxwood Press, Pacific Grove;
- Levin M, Thorlin T, Robinson KR, Nogi T, Mercola M. (2002) Asymmetries in H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and cell membrane potentials comprise a very early step in left-right patterning. *Cell* 111: 77–89;
- Levin M. (2007) Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol* 17: 262–271;
- Levin M. (2009) Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 20: 543–556;
- Liebeskind, B. J., Hillis, D. M., & Zakon, H. H. (2015) *Convergence of ion channel genome content in early animal evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(8), E846–E851;*

- Lin, G., and Slack, J. M. W. (2008) Requirement for Wnt and FGF signaling in *Xenopus tadpole* tail regeneration. *Dev. Biol.* 316, 323–335;
- Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004) *THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 781–810;
- Lotufo, T. M. C. (2002) Ascidiacea (Chordata:Tunicata) do litoral tropical brasileiro. Tese (Doutorado em Ciências: Área de Zoologia). 184p. São Paulo. USP;
- Love, N. R., Chen, Y., Bonev, B., Gilchrist, M. J., Fairclough, L., Lea, R., et al. (2011) Genome-wide analysis of gene expression during *Xenopus tropicalis* tadpole tail regeneration. *BMC Dev. Biol.* 11:70;
- Love, N. R., Chen, Y., Ishibashi, S., Kritsiligkou, P., Lea, R., Koh, Y., et al. (2013) Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus tadpole* tail regeneration. *Nat. Cell. Biol.* 15, 222–228;
- Lund E. (1947) *Bioelectric fields and growth*. Austin: University of Texas Press;
- Mackie GO, Burighel P (2005) The nervous system in adult tunicates: Current research directions. *Can J Zool* 83(1):151–183;
- Mackie GO, Wyeth RC (2000) Conduction and coordination in deganglionated ascidians. *Can J Zool* 78: 1626–1639;
- Marotta, R., Ferraguti, M., & Martin, P. (2003) Spermiogenesis and seminal receptacles in *Aeolosoma singulare* (Annelida, Polychaeta, Aeolosomatidae). *Italian Journal of Zoology*, 70, 123–132;
- Marques, L. M. P. (2016) O papel da V-ATPase no processo de regeneração tecidual no poliqueta *aeolosoma sp.*;

- Marsh G, Beams H. (1957) Electrical Control of morphogenesis in regenerating *Dugesia tigrina*. *J Cell Comp Physiol* 39: 191–211;
- Marsh, D.R., Criswell, D.S., Carson, J.A., Booth, F.W., (1997) Myogenic regulatory factors during regeneration of skeletal muscle in young, adult, and old rats. *J. Appl. Physiol.* 83, 1270–1275;
- Marshansky V, Futai M (2008). V- type H<sup>+</sup>- ATPase in vesicular trafficking targeting, regulation and function. *Curr Cell Biol* 20: 415-426;
- Martin, P., (1997) Wound healing – Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81;
- McCaig CD, Rajnicek AM, Song B, Zhao M. (2005) Controlling cell behavior electrically: current views and future potential;
- McCaig CD, Song B, Rajnicek AM. (2009) Electrical dimensions in cell science. *J Cell Sci* 122: 4267–4276;
- McCusker, C., Bryant, S. V., & Gardiner, D. M. (2015) The axolotl limb blastema: Cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration*, 2, 54–71;
- Medina BN, Santos de Abreu I, Cavalcante LA, Silva WA, da Fonseca RN, Allodi S (2015) 3-acetylpyridine induced degeneration in the adult ascidian neural complex: reactive and regenerative changes in glia and blood cells. *Dev Neurobiol* 75(8):877–893;
- Michalopoulos, G.K., DeFrances, M.C., (1997) Liver regeneration. *Science* 276, 60–66;
- Millar RH (1971) The biology of ascidians. *Adv Mar Biol* 9:1–100;

- Monniot C, Monniot F, Laboute P (1991) Coral reef ascidians of New Caledonia. Orstom, Paris;
- Monteiro, J., Aires, R., Becker, J. D., Jacinto, A., Certal, A. C., and Rodríguez-León, J. (2014) V-ATPase proton pumping activity is required for adult zebrafish appendage regeneration. *PLoS One* 9:e92594;
- MORAES, Paula Louredo. "Subfilo Urochordata"; *Brasil Escola*. Disponível em: <https://brasilecola.uol.com.br/biologia/urochordata.htm>. Acesso em 05 de agosto de 2021;
- Narayan RK (1972) The Ramayana. Penguin Books, New York;
- Newmark PA, Sánchez Alvarado A. (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 3:210–19;
- Nuccitelli R, Robinson K, Jaffe L. (1986) On electrical currents in development. *Bioessays* 5: 292–294;
- Nuccitelli R. (2003) Endogenous electric fields in embryos during development, regeneration and wound healing. *Radiat Prot Dosimetry* 106: 375–383;
- Okamoto, M., (1997) Simultaneous demonstration of lens regeneration from dorsal iris and tumour production from ventral iris in the same newt eye after carcinogen administration. *Differentiation* 61, 285–292;
- Okamoto, M., Ohsawa, H., Hayashi, T., Owaribe, K., Tsonis, P.A., (2007) Regeneration of retinotectal projections after optic tectum removal in adult newts. *Mol. Vis.* 13, 2112–2118;
- Pallas PS. (1774) *Spicilegia zoologica quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus atque commentariis illustrantur*: Berolini, Prostant, Apud Gottl;

- Paredes, R., Ishibashi, S., Borrill, R., Robert, J., and Amaya, E. (2015) *Xenopus*: an *in vivo* model for imaging the inflammatory response following injury and bacterial infection. *Dev. Biol.* 408, 213–228;
- Parish, C.L., Beljajeva, A., Arenas, E., Simon, A., (2007) Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development* 134, 2881–2887;
- Parsons TS, Williams EE (1963) The relationship of modern Amphibia: a re-examination. *Quart Rev Biol* 38:26-53;
- Pelegri F. (2002) Mutagenesis. In: NussleinVolhard C, Dahm R, editors. *Zebrafish: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; pp. 145-174;
- Pestarino M, Fiala Medioni A, Ravera F (1988) Ultrastructure of the branchial wall of a lower chordate: the ascidian *Ciona intestinalis*. *J Morphol* 197(3):269–276;
- Pfannenstiel, H. D. (1974) Regeneration in the gonochoristic polychaete *Ophryotrocha notoglandulata*. *Marine Biology*, 24, 269–272;
- Pliny BJ, Riley HT (1856) *The natural history of pliny*, vol. V. Henry G. Bohn, London;
- Poss KD (2010) Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet.* 11(10): 710–722;
- Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. (2003) Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental Dynamics.* 226: 202-210;
- Poss, K. D., Keating, M. T., and Nechiporuk, A., (2003) Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental Dynamics* 226 (2), 202;

- Radashevsky, V. I. (1996) Morphology, ecology and asexual reproduction of a new polydorella species (*Polychaeta: Spionidae*) from the South China Sea. *Bulletin of Marine Science*. 58: 684–693;
- Rahman Khan, F., Sulaiman Alhewairini, S. (2019) Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism. *Current Trends in Cancer Management*;
- Reddien, P. W., & Alvarado, A. S. (2004) *FUNDAMENTALS OF PLANARIAN REGENERATION*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 725–757;
- Reisinger E, Kelbetz S. (1964) Fine structure and discharge mechanism of rhabdites. *Z. Wiss. Mikrosk.* 65:472–508;
- Rojas-Muñoz, A., Rajadhyksha, S., Gilmour, D., van, Bebbber F, Antos, C., Rodríguez, Esteban C, et al. (2009) ErbB2 and ErbB3 regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev. Biol.* 327, 177–190;
- Rosales, C. (2018) Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.* 9:113;
- Roy, S., & Gatién, S. (2008) *Regeneration in axolotls: a model to aim for!* *Experimental Gerontology*, 43(11), 968–973;
- Roy, S., Lévesque, M., (2006) Limb regeneration in axolotl: is it superhealing? *TSW Dev. Embryol.* 1, 12–25;
- Santoriello C, Zon LI. Hooked (2012) Modeling human disease in zebrafish. *The Journal of Clinical Investigation*;122(7):2337-2343;
- Schmitz, J.P., Hollinger, J.O., (1986) The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin. Orthop.*, 299–308;

- Segal AW, Garcia R, Goldstone AH, Cross AR, Jones OTG (1981) Cytochrome b-245 of neutrophils is also present in human monocytes, macrophages and eosinophils. *Biochem J*, 196:363-367;
- Shenkar N, Gordon T (2015) Gut-spilling in chordates: evisceration in the tropical ascidian *Polycarpa mytiligera*. *Sci Rep* 5:9614;
- Shenkar N, Swalla BJ (2011) Global diversity of Ascidiacea. *PLoS One* 6;
- Shi R, Borgens RB. (1995) Three-dimensional gradients of voltage during development of the nervous system as invisible coordinates for the establishment of embryonic pattern. *Dev Dyn* 202: 101–114;
- Simões, M. G., Bensimon-Brito, A., Fonseca, M., Farinho, A., Valério, F., Sousa, S., et al. (2014) Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC Dev. Biol.* 14:49;
- Singer, M., and Craven, L. (1948) The growth and morphogenesis of the regenerating forelimb of adult *Triturus* following denervation at various stages of development. *J. Exp. Zool.* 108, 279–308;
- Sisken, B.F. and Fowler, I. (1981) Induction of limb regeneration in the chick-embryo. *Anat. Rec.* 199, A238–A239;
- Sisken, B.F. et al. (1993) Prospects on clinical-applications of electrical stimulation for nerve regeneration. *J. Cell. Biochem.* 51, 404–409;
- Skořid, Helen Nilsson, Matthias Obst, (2011) Potential for clonal animals in longevity and ageing studies Received: 20 December 2010 / Accepted: 28 March 2011 / Published online: 9 April 2011 Springer Science+Business Media B.V;

- Smith AN, Lovering RC, Futai M, Takeda J, Brown D, Karet FE (2003) Revised nomenclature for mammalian vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase subunit genes. *Mol Cell* 12: 801-803;
- Smith, M. E. (1985) Population and reproductive dynamics of *Nais communis* (Oligochaeta: Naididae) from a wisconsin limnocrone. *The American Midland Naturalist*, 114, 152–158;
- Smith, R. M. and Curnutte, J. T., (1991) Molecular Basis of Chronic Granulomatous Disease. *Blood* 77: 673-686;
- Smith, S.D. (1981) The role of electrode position in the electrical induction of limb regeneration in subadult rats. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 661–670;
- Spallanzani, L. (1768) *Prodromo sa un Opera da Imprimersi sopra le Riproduzioni animali.* Modena 7;
- Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D, Hendricks JD, et al. (2000) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz [a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicologic Pathology*;28:705-715;
- Stevens TH and Forgac M. (1997) Structure, function and regulation of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase. *Annu Rev Dev Biol* 13: 779–808;
- Stewart, R., Rascón, C. A., Tian, S., Nie, J., Barry, C., Chu, L. F., et al. (2013) Comparative RNA-seq analysis in the unsequenced axolotl: the oncogene burst highlights early gene expression in the blastema. *PLoS Comput. Biol.* 9:e1002936;
- Stocum, D. L. (1995) "Wound Repair, Regeneration and Artificial Tissues." Landes, Austin;

- Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T., & Weidinger, G. (2007) *Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. Genes & Development, 21(11), 1292–1315;*
- Storz, G., & Imlay, J. A. (1999). *Oxidative stress. Current Opinion in Microbiology, 2(2), 188–194;*
- Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. (2009) Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev Reports 5: 231–246;*
- Swallow CJ, Grinstein S and Rotstein OD, (1990), A vacuolar type H<sup>+</sup>-ATPase regulates cytoplasmic pH in murine macrophages. *J Biol Chem 265: 7645–7654;*
- Taiz, L. e Zeiger, E. (2009) *Fisiologia Vegetal, 4<sup>o</sup>ed – Porto Alegre, Artmet;*
- Taniguchi, Y., Watanabe, K., and Mochii, M. (2014) Notochord-derived hedgehog is essential for tail regeneration in *Xenopus* tadpole. *BMC Dev. Biol. 14:27;*
- Tiozzo S, Brown FD, De Tomaso AW (2008) Regeneration and stem cells in ascidians. In: Bosch TCG (ed) *Stem cells from hydra to man*. Springer, New York, pp 95–112;
- Todd, J. T. (1823) On the process of reproduction of the members of the aquatic salamander. *Quart. J. Sci. Lit. Arts 16, 84–96;*
- Tseng, A. S., Beane, W. S., Lemire, J. M., Masi, A., and Levin, M. (2010) Induction of vertebrate regeneration by a transient sodium current. *J. Neurosci. 30, 13192–13200;*
- Tseng, A.-S., and Levin, M. (2012) Transducing bioelectric signals into epigenetic pathways during tadpole tail regeneration. *Anat. Rec. 295, 1541–1551;*

- Tsonis, P.A., (1983) Effects of carcinogens on regenerating and non-regenerating limb in amphibia. *Anticancer Res.* 3, 195–202;
- Vaananen HK, Karhukorpi E-K, Sunquist K, Wallmark B, Roinine I, Hentune T, Tuukkanen J and Lakkakorpi P (1990) Evidence for the presence of H1-ATPase types in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111: 1305–1311;
- Vandenberg LN, Morrie RD, Adams DS. (2011) V-ATPase-dependent ectodermal voltage and pH regionalization are required for craniofacial morphogenesis. *Dev Dyn.* 240: 1889–1904;
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009) Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033;
- Vervoort M (2011) Regeneration and development in animals. *Biol Theory.* 6(1): 25–35;
- Voskoboynik A, Simon-Blecher N, Soen Y, Rinkevich B, De Tomaso AW, Ishizuka KJ, Weissman IL (2007) Striving for normality: whole body regeneration through a series of abnormal generations. *FASEB J* 21(7): 1335–1344;
- Voskoboynik A, Soen Y, Rinkevich Y, Rosner A, Ueno H, Reshef R, Ishizuka KJ, Palmeri KJ, Moiseeva E, Rinkevich B, Weissman IL (2008) Identification of the endostyle as a stem cell niche in a colonial chordate. *Cell Stem Cell* 3(4):456–464;
- Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP (2004) Renal vacuolar-ATPase. *Physiol Rev*84: 1263-1314;
- Whyte, J. L., Smith, A. A., & Helms, J. A. (2012) *Wnt Signaling and Injury Repair. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(8), a008078–a008078;

- Wolff E. (1962) Recent researches on the regeneration of planaria. In *Regeneration. 20th Growth Symposium*, ed. D Rudnick, pp. 53– 84. New York: Ronald Press;
- Yakushiji, N., Suzuki, M., Satoh, A., Sagai, T., Shiroishi, T., Kobayashi, H., et al. (2007) Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Dev. Biol.* 312, 171–182;
- Yamaguchi, Masamitsu; Hideki Yoshida; Fumiko Hirose; Yoshihiro H. Inoue; Yuko Hayashi; Masahiro Yamagishi; Yoshimi Nishi; Katsuyuki Tamai; Kengo Sakaguchi; Akio Matsukage (2001) *Ectopic expression of BEAF32A in the Drosophila eye imaginal disc inhibits differentiation of photoreceptor cells and induces apoptosis*, 110(5), 313–321;
- Yun, M. H., Gates, P. B., and Brockes, J. P. (2013) Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 17392–17397;
- Zattara, E. E., & Bely, A. E. (2016) Phylogenetic distribution of regeneration and asexual reproduction in Annelida: Regeneration is ancestral and fission evolves in regenerative clades. *Invertebrate Biology*, 135, 400–414;
- Zeleny, C., (1909) Some experiments on the effect of age upon the rate of regeneration. *J. Exp. Zoolog.* 7, 563–593;