

Artículo original

Inmunidad innata y funciones antimicrobianas del capullo durante la estivación de los peces pulmonados

Innate immunity and antimicrobial functions of the cocoon during estivation in lungfish

 Luis F. García

Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética (GICIG), Facultad de Medicina, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Resumen

El paso de los vertebrados de la vida acuática a la terrestre, ocurrido hace 400 millones de años durante el Devoniano, es uno de los eventos más importantes de la evolución animal. Los peces pulmonados, o dipnoos, son los peces vivos más cercanos a los tetrápodos terrestres y su estudio es fundamental para entender la terrestreización y posterior radiación de los vertebrados a los múltiples ecosistemas terrestres. Estos peces poseen los genomas animales más grandes conocidos hasta ahora, con genes necesarios tanto para la vida acuática como para la terrestre. Los peces pulmonados de África (*Protopterus sp.*) y Suramérica (*Lepidosiren paradoxa*) tienen la capacidad de estivar en las temporadas de sequía y entrar en un estado de sopor en el que disminuyen muchas de sus actividades metabólicas y respiran aire. Durante la estivación están expuestos a múltiples microorganismos presentes en el lodo circundante, pero en el caso de los *Protopterus sp.*, exhiben un capullo que actúa como una barrera inmunológica en la que se localizan granulocitos que desarrollan las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), donde quedan atrapados los microorganismos que son controlados por los múltiples compuestos antimicrobianos presentes en el capullo.

Palabras claves: Peces pulmonados; Dipnoos; Estivación; Capullo; Inmunidad innata; Granulocitos; NETs.

Abstract

The transition of vertebrates from aquatic to terrestrial life, which occurred 400 million years ago during the Devonian Period, is one of the most important events in animal evolution. Lungfish, or dipnoans, are the living fish most closely related to terrestrial tetrapods, and their study is essential for understanding the terrestrialization and subsequent radiation of vertebrates into the many terrestrial ecosystems. These fish possess the largest animal genomes known to date, containing genes necessary for both aquatic and terrestrial life. The lungfish of Africa (*Protopterus sp.*) and South America (*Lepidosiren paradoxa*) can aestivate during dry seasons, entering a state of torpor in which many of their metabolic activities decrease and they breathe air. During aestivation, they are exposed to multiple microorganisms present in the surrounding mud. In the case of *Protopterus sp.*, they exhibit a cocoon that acts as an immunological barrier containing granulocytes that develop neutrophil extracellular traps (NETs), which trap and control the multiple antimicrobial compounds present in the cocoon.

Keywords: Lungfish; Dipnoi; Aestivation; Cocoon; Innate immunity; Granulocytes; NETs.

Introducción

Los grandes saltos evolutivos, como el paso de la unicelularidad a la pluricelularidad, del exoesqueleto de los invertebrados al endoesqueleto de los vertebrados, de la vida acuática a la terrestre, entre otros, requieren la acumulación de múltiples cambios genéticos. La conquista de la tierra por los vertebrados acuáticos, evento conocido como terrestreización

Citación: García LF. Inmunidad innata y funciones antimicrobianas del capullo durante la estivación de los peces pulmonados. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2025 Oct 8. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.3272>

Editor: Elizabeth Castañeda

***Correspondencia:**

Luis F. García;
lfernando.garciam@gmail.com

Recibido: 6 de agosto de 2025

Aceptado: 11 de septiembre de 2025

Publicado en línea: 8 de octubre de 2025



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

(Perry *et al.*, 2008), ocurrió en el Devoniano Tardío y fue un evento seminal en la evolución de los vertebrados terrestres que requirió de múltiples adaptaciones anatómicas y fisiológicas (Ashley-Ross *et al.*, 2013; Fishman *et al.*, 1986), pero permitió la radiación de las especies y la ocupación de múltiples ecosistemas terrestres.

Los cambios y adaptaciones requeridos para el paso de la vida acuática a la terrestre incluyen: 1) el cambio de aletas a extremidades anteriores y posteriores (tetrápodos) para la movilidad; 2) la transformación de branquias a uno o dos pulmones para la respiración (Cupello *et al.*, 2022; Bassi *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2017; de Moraes *et al.*, 2005; Nunan *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2023) y la presencia de surfactante recubriendo la superficie de las mucosas respiratorias (Orgeig & Daniels, 1995); 3) las adaptaciones en el cráneo, la boca y la mandíbula para acceder a fuentes de alimentación diferentes; 4) la ubicación espacial en el entorno terrestre que requiere de cuello, y 5) la exposición a microorganismos patógenos existentes en la tierra o el aire.

Los peces pulmonados (dipnoos) son los peces vivos más cercanos a los tetrápodos terrestres, con una historia evolutiva de 400 millones de años (Figura 1) (Brinkmann *et al.*, 2004a; Brinkmann *et al.*, 2004b; Palominos *et al.*, 2024; Yokobori *et al.*, 1994; Zhu & Yu, 2002). Los dipnoos tienen adaptaciones tanto a la vida acuática como a la terrestre; en el caso de la terrestre es importante la presencia de pulmones (Figura 2) y de

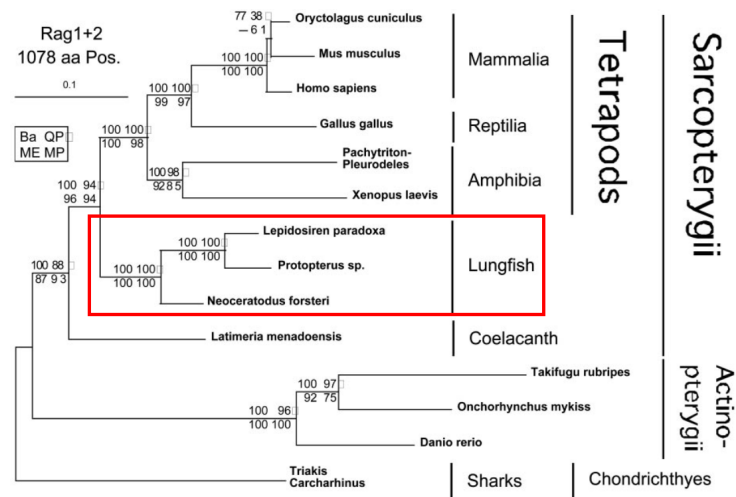


Figura 1. Posición filogenética de los peces pulmonados de acuerdo al análisis de las proteínas RAG1 y RAG2. Tomado de Brinkmann *et al.* (2004b). Árbol filogenético inferido de 14 especies y 1.078 aminoácidos de las secuencias RAG1 y RAG2 (Brinkmann *et al.*, 2004b)

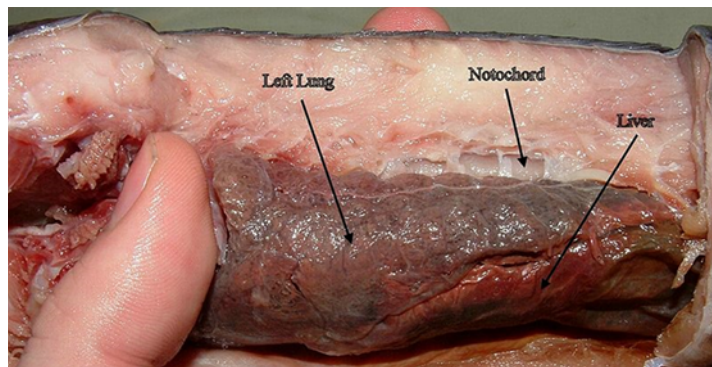


Figura 2. Vista lateral del pulmón disecado de *Protopterus dolloi*. Tomado de <https://en.wikipedia.org/wiki/Lungfish>

vestigios de extremidades anteriores y posteriores diferentes a las aletas, de tal manera que su estudio es fundamental para comprender este quiebre evolutivo. En la presente revisión se presentan las principales características genómicas de los dipnoos y se describen específicamente los mecanismos de inmunidad innata que ocurren durante los períodos de estivación durante las prolongadas temporadas de sequía en *Protopterus* sp., y los que protegen de la infección por parte de los microorganismos presentes en el medio circundante en *Lepidosiren paradoxa*.

Filogenia, taxonomía y estivación

Los peces pulmonados pertenecen al orden de los Ceratodontiformes (Tabla 1), y están distribuidos en tres familias: la familia Neoceratodontidae, con una sola especie viviente, *Neoceratodus forsteri*, que vive en Australia; la familia Protopteridae, con cuatro especies vivientes en África, *Protopterus aethiopicus*, *P. amphibius*, *P. annectens* y *P. dolloi*, y la familia Lepidosirenidae, con una sola especie, *Lepidosiren paradoxa*, que vive en Suramérica, en la cuenca del río Amazonas (Figura 3).

Tabla 1. Taxonomía de los peces pulmonados o dipnoos

Familia	Género	Especie	Continente
Neoceratodontidae	<i>Neoceratodus</i>	<i>forsteri</i>	Australia
Protopteridae	<i>Protopterus</i>	<i>aethiopicus</i>	África
	<i>Protopterus</i>	<i>amphibious</i>	África
	<i>Protopterus</i>	<i>anectens</i>	África
	<i>Protopterus</i>	<i>dolloi</i>	África
Lepidosirenidae	<i>Lepidosiren</i>	<i>paradoxa</i>	Suramérica

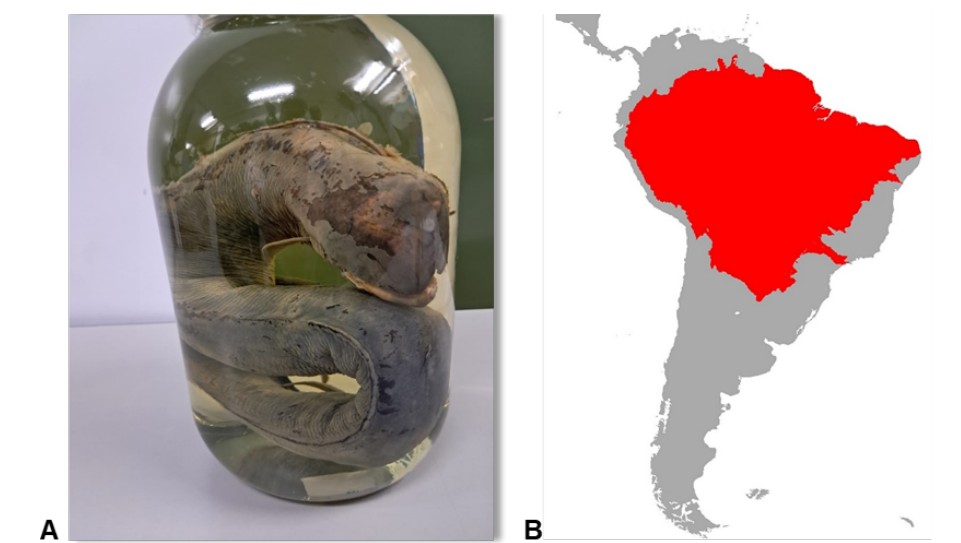


Figura 3. Especímen de *Lepidosiren paradoxa* (A) y su distribución geográfica en Suramérica (B). A. Especímen de *Lepidosiren paradoxa* capturado en Leticia (Colombia) en 1966 durante una excursión del Club Científico Colombiano (3C) en la que participó el autor; actualmente exhibido en el Museo de Ciencias Naturales La Salle, Instituto Tecnológico Metropolitano, Medellín, Colombia. Fotografía tomada el 15/10/2024. B. Distribución de los registros de *Lepidosiren paradoxa* en Suramérica (Ubs6u!d-pongsakorn - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=146682451>;)

Una de las características más peculiares de los dipnoos, específicamente de las cuatro especies de *Protopterus* africanos y de la amazónica *L. paradoxa* (aunque extrañamente no de la australiana *N. forsteri*), es su capacidad de estivar. Esto significa que, además de vivir libres en el agua, pueden vivir en tierra por meses o años durante las temporadas de sequía respirando aire, bien sea dentro de un capullo de moco parcialmente deshidratado en el caso de las especies de *Protopterus*, o en una especie de madriguera en el lodo en el caso de *L. paradoxa* (Casadei & Salinas, 2023; Glass *et al.*, 2009). Durante la estivación los especímenes de *Protopterus sp.* se enrollan, reducen su actividad metabólica y secretan grandes cantidades de moco que se endurece y forma un capullo translúcido de color parduzco que los protege de la desecación y cumple funciones inmunológicas, como se describe más adelante (Casadei & Salinas, 2023; Heimroth *et al.*, 2021; Heimroth *et al.*, 2018). La estivación requiere de complejas adaptaciones fisiológicas (Amelio & Garofalo, 2020; Glass *et al.*, 2009) y de una extensa remodelación de la piel y las mucosas que aumenta drásticamente la vulnerabilidad frente a los patógenos presentes en la tierra o en el aire que respiran por fuera del agua (Heimroth *et al.*, 2021; Sturla *et al.*, 2002), lo que determina la necesidad de adaptaciones en la respuesta inmune que les permitan sobrevivir en estas condiciones extremas.

El genoma de los dipnoos

La hipótesis de que los dipnoos son el eslabón viviente más cercano entre los vertebrados acuáticos y los tetrápodos terrestres se ha visto respaldada por los análisis recientes de sus genomas (Metcalf *et al.*, 2012; Otto, 2021) (Tabla 2). Meyer *et al.* (2021) lograron ensamblar el genoma de los 17 macrocromosomas y 10 microcromosomas de *N. forsteri*, cuyo tamaño total es de 43Gb (14 veces más grande que el genoma humano) y 31.120 genes codificantes, y exhibe una sintenia altamente conservada con los cromosomas de los tetrápodos. Alrededor del 90 % del genoma de *N. forsteri* está compuesto por secuencias repetitivas, principalmente de elementos largos intercalados (*long interspersed nuclear elements*, LINE), las más altas reportadas en genomas animales. El análisis de los genes seleccionados positivamente mostró que estos están relacionados, ante todo, con la preadaptación a la vida terrestre, siendo los principales el surfactante necesario para el mantenimiento de la superficie pulmonar, el regulador del desarrollo pulmonar *ssh*, los receptores olfatorios, particularmente los genes V2R del receptor del órgano vomeronasal, y una expansión del grupo de los genes *hoc* relacionados con el desarrollo de los miembros y, en consecuencia, con el desplazamiento terrestre de los tetrápodos.

Por su parte, Wang *et al.* (2021) estudiaron el genoma de *Protopterus annectens*, el cual tiene 40 Gb en 17 cromosomas con 19.457 genes codificadores de proteínas. En esta especie las relaciones filogenéticas reconstruidas con 5.149 genes ortólogos de otras ocho especies de vertebrados confirmaron que los peces pulmonados constituyen el linaje hermano más cercano a los tetrápodos, de los cuales divergieron hace 419 millones de años, al inicio del Devoniano. El análisis de la expresión génica evidenció, asimismo, el papel de los genes del surfactante de la superficie pulmonar y la transición de aletas a miembros. La comparación de los perfiles de expresión relacionados con la estivación mostró que algunos se regulan negativamente, como los relacionados con la actividad hormonal del cerebro y el colágeno de la matriz extracelular de la piel, en tanto que ocho de los diez genes de proteínas de choque térmico, que pueden tener un papel protector en las temporadas de sequía, se regulan positivamente.

Tabla 2. Características de los genomas gigantes de los dipnoos

Especie	Tamaño	Versus genoma humano	Referencia
<i>Neoceratodus fosteri</i>	43GB	14X	Meyer <i>et al.</i> , 2021
<i>Protopterus annectens</i>	40GB	13X	Wang <i>et al.</i> , 2021
<i>Lepidosiren paradoxa</i>	91Gb	30x	Schartl <i>et al.</i> , 2024

El genoma de *L. paradoxa* (Schartl *et al.*, 2024), por su parte, alcanza 91Gb en 19 cromosomas con 19.777 genes. Es el genoma animal más grande que se haya secuenciado (cerca de 30 veces el tamaño del genoma humano y el doble de los otros dos géneros de dipnoos), y es particularmente rico en ADN repetitivo y en elementos transposables (ET) (cerca de 85Gb), los cuales continúan expandiéndose.

Los órganos y las células de defensa de los dipnoos

El sistema inmune de los dipnoos contiene todos los componentes estructurales, celulares y funcionales de los demás vertebrados gnatostomados, esto es, un sistema inmune innato y un sistema inmune adaptativo, altamente conservados, que se comunican y colaboran para una respuesta inmune efectiva (Rauta *et al.*, 2012). En los dipnoos el sistema inmune tiene la exigencia de responder a los inmunógenos presentes en su fase de vida acuática de nado libre, así como durante la estivación. En cuanto a los estudios realizados sobre el sistema inmune de los dipnoos y su importancia en la adaptación a la vida terrestre, los primeros estudios sobre las células de su sistema inmune datan de principios del siglo XX, cuando Bryce (1906) describió el desarrollo del timo en *L. paradoxa*. Posteriormente, en 1931, Jordan y Speidel (1931) describieron la formación de células sanguíneas en *Protopterus aethiopicus* en condiciones de nado libre y estivación; según estos autores, los principales órganos hematopoyéticos son el bazo, los intestinos y el riñón. Los granulocitos se forman en el intestino, la cápsula renal, las gónadas y el bazo; existen varias formas de estas células, siendo las más frecuentes las eosinofílicas. Una observación importante de este estudio es que los granulocitos eosinofílicos parecen estar asociados con la estivación. Se postula que *Protopterus sp.* tienen la mayor diversidad de granulocitos de todos los vertebrados (Casadei & Salinas, 2023). Bielik y Strauss (1993) estudiaron las características citoquímicas y ultraestructurales de los granulocitos de *L. paradoxa* y los clasificaron tentativamente como eosinofílicos I y II y basofílicos, y confirmaron que los eosinofílicos son los más frecuentes. Riberiro *et al.* (2007) analizaron también en *L. paradoxa* las características morfológicas de las células circulantes y del exudado en el celoma recolectadas en diferentes momentos después de la inyección de tioglicolato, y encontraron linfocitos, monocitos, macrófagos y diferentes poblaciones de fagocitos polinucleares con las características morfológicas de otras especies de vertebrados. Los autores denominaron los granulocitos basofílicos como granulocitos III; la peroxidasa y la fosfatasa alcalina se encontraron principalmente en los granulocitos II, los cuales correspondieron al 85 % de las células del exudado. Mas recientemente, Tacchi *et al.* (2015) estudiaron la estructura de los tejidos linfoides de los dipnoos africanos *P. dolloi* y *P. annectens* y encontraron tanto los más primitivos agregados de células linfoides no encapsulados (LA) como los tejidos linfoides encapsulados más organizados de las mucosas (O-MALT) en la mucosa nasofaríngea e intestinal, donde, además, se encontraron transcritos de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IGH) y de CD3 de los linfocitos T, los cuales aumentaron en presencia de infecciones. Es importante señalar que en los dipnoos también se ha detectado la presencia de componentes del sistema complemento (Sato *et al.*, 1999).

Capullo de estivación

En los peces teleósteos la piel es un epitelio mucoso compuesto por capas de células en contraste con los vertebrados terrestres, cuya piel no contiene células secretoras de moco y está queratinizada. En cuanto a los dipnoos, Heimroth *et al.* (2018), utilizando cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), la base de datos de RNA-seq de Illumina y bases de datos de proteínas de dipnoos publicadas previamente, hicieron el análisis comparativo del inmunoproteoma del moco de *Protopterus dolloi* libre en el agua, durante la terrestreización y en el moco producido por las branquias. El moco cutáneo en fase terrestre se encontró enriquecido en proteínas con funciones antimicrobianas como las histonas y las proteínas S100. Específicamente el análisis ontológico del proteoma del moco cutáneo en fase terrestre mostró funciones relacionadas

con el procesamiento de virus, respuesta a bacterias Gram negativas y señales mediadas por el factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*, TNF). Los autores concluyeron que el moco cutáneo durante la fase de terrestrialización permite una mejor protección contra patógenos externos presentes en la tierra.

Más recientemente, el grupo de **Heimroth et al.** (2021) demostró que en *P. dolloi* el capullo formado durante la estivación no es una estructura inerte, sino que está formado por capas con una estructura celular bien definida, compuesta por células epiteliales, endoteliales, caliciformes e inmunes, además de una red de canales recubiertos por células escamosas, con presencia de un gran número de bacterias en grumos, lo que sugiere que el capullo se forma por el desprendimiento sucesivo de capas de células epiteliales y proliferación de las células epiteliales aplanadas en la capa externa del capullo (**Figura 4**).

En cuanto al papel de los granulocitos que en la fase de nado libre migran de los depósitos de estas células en el intestino, los riñones y las gónadas hacia la piel y del capullo al inicio de las temporadas de sequía y sus funciones en la defensa antimicrobiana, los autores encontraron que al iniciarse la terrestrialización hubo un aumento de granulocitos circulantes acumulados a las dos semanas en la piel, lo que demostró histológicamente y por la expresión del mRNA del receptor de la quimiocina 2 (*cxc2*), la elastasa (*elane*) y la mieloperoxidasa (*mpo*); asimismo, observaron áreas con desprendimiento de la epidermis de la membrana basal e infiltración por granulocitos. En el capullo también encontraron una alta transcripción de genes de células epiteliales como la citoqueratina 8 (*ck8*), de péptidos antimicrobianos como las defensinas- β (*dfb1* a *dfb4*), de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (*il1b*) y la interleucina 8 (*il8*), productos de las células caliciformes como las mucinas 2 y 4 (*muc2* y *muc4*), y productos de los granulocitos (*cxc2*, *elane*, *mpo*) (**Casadei & Salinas, 2023**).

En conjunto, estos hallazgos demuestran que durante la terrestrialización se produce un capullo vivo donde se atrapan bacterias y hay transcripción activa de genes con prolongada acción antimicrobiana. Uno de los hallazgos más interesantes de este estudio fue la demostración de que durante la terrestrialización los granulocitos que salen del cuerpo entran a ser parte integral del capullo y sufren ETosis (ET), una forma de muerte celular en la que se libera la cromatina decorada con histonas y hasta 30 proteínas globulares, muchas con actividad antimicrobiana, las cuales forman redes extracelulares que permiten atrapar bacterias y hongos y que se conocen como trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*, NETs) (**Casadei & Salinas, 2023**) (**Figura 4**). El papel protector de estas trampas extracelulares se demostró aplicando aerosoles de la enzima ADNasaI por varios días en la superficie de animales en estivación, lo cual resultó en lesiones cutáneas, hemorragias, edema de la cabeza, prolapso del ano y septicemia por bacterias tipo cocos (**Figura 5**).

Amelio y Garafolo (2023) estudiaron en *P. dolloi* los cambios morfológicos y funcionales de la piel a los 0, 5 y 40 días de inducción de la estivación mediante microscopía de luz e inmunofluorescencia. A los seis días encontraron una disminución del grosor de la epidermis, de las células caliciformes productoras de moco (que ya no se requieren para la formación del capullo) y de las células epidérmicas presentes en la capa media de la epidermis. A los 40 días el grosor de la epidermis aumentó y las células caliciformes y epidérmicas disminuyeron y se localizaron en la capa externa de la epidermis. Mediante inmunofluorescencia, los hallazgos más relevantes fueron el aumento de la enzima aldehído oxidasa (AO), la disminución a los seis días y posterior recuperación de la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS) y de las proteínas de choque térmico (HSP70 y HSP90), posiblemente para preservar la estructura tisular y facilitar el retorno posestivación. La HSP70 se localizó principalmente en el citoplasma de las células epidérmicas y en la membrana de las células productoras de moco, lo que sugiere, según los autores, que desempeñaría un papel protector contra el daño oxidativo.

Recientemente, **Palominos et al.** (2024) estudiaron los cambios ocurridos durante la inducción de la estivación en *P. annectens* de África occidental. Los análisis por microscopía electrónica mostraron gran cantidad de bacterias y hongos en la superficie

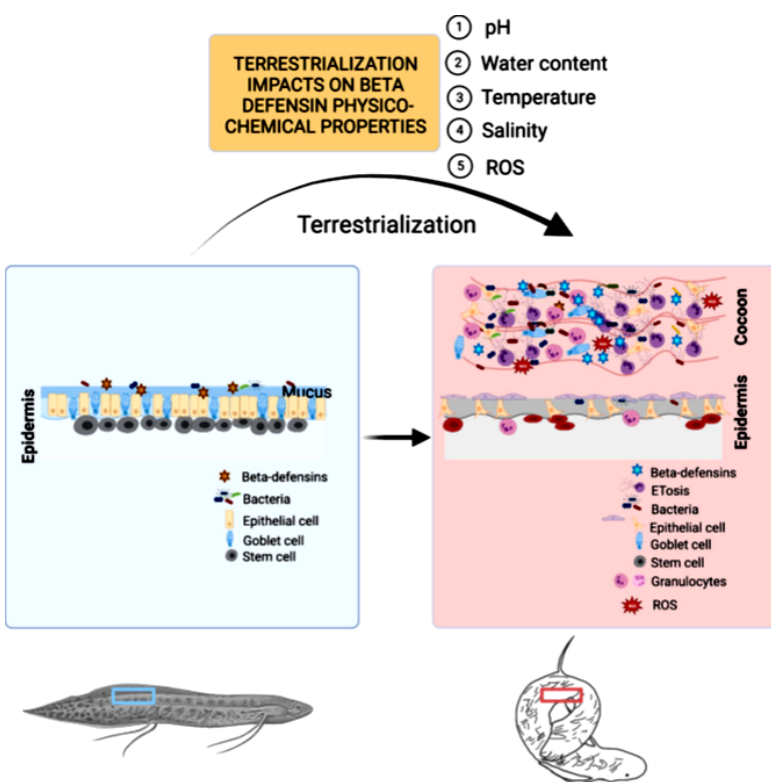


Figura 4. Diagrama de los cambios que ocurren en los peces pulmonados africanos durante la terrestrialización y algunos factores ambientales que pueden afectar a los péptidos antimicrobianos. Tomado de Casadei y Salinas (2023)



Figura 5. El tratamiento con ADNsA-I en *Protopterus dolloi* terrestrializado produce lesiones cutáneas, hemorragias, edema de la cabeza (G), prolapso del ano (H) y septicemia. Tomado de Heimroth *et al.* (2021)

externa del capullo que no parecían comprometer la salud de los animales, con lo que se comprueba que este es una barrera que impide el acceso de los gérmenes a la piel. Para determinar la posible actividad antimicrobiana del capullo, se tomaron muestras del capullo a las dos y seis semanas de estivación que fueron cocultivadas con *Escherichia coli*; sin embargo, no se detectó ninguna actividad inhibitoria en las muestras tomadas en estos dos tiempos. El estudio histológico de muestras teñidas con yoduro de propidio y DAPI demostró que la mayoría de las células de las capas interna y externa del capullo estaban vivas en los dos momentos estudiados y correspondían a núcleos de granulocitos; además, se visualizaron trampas de neutrófilos (NETs). Tomados todos estos hallazgos en conjunto, como lo sugiere Olena (2021), podría concluirse que convierten el capullo en una “chaqueta” inmunológica extracorporal.

La respuesta inmune de la especie *L. paradoxa* suramericana se ha estudiado menos; sin embargo, recientemente **Bernades et al.** (2024) describieron el transcriptoma en muestras de piel de tres especímenes sometidos a injurias en tres momentos diferentes; estudiaron en particular los genes de las lectinas, glicoproteínas con capacidad de unir carbohidratos, y entre estos, los de las interlectinas, miembros de la familia de las lectinas dependientes de Ca^{2+} que contienen un dominio conservado de fibrinógeno (FReD) que les permite aglutinar microorganismos, lo que sugiere que participan en la inmunidad innata. A los siete días después de la injuria, se identificó la interlectina 2 (LpITLN2-B), la cual presentó una alta afinidad por disacáridos como la D-manosa y las moléculas de Poli(I-C) y LPS, lo que apunta a una actividad antimicrobiana.

Conclusiones

Los peces pulmonados o dipnoos son el eslabón más cercano en el paso de los vertebrados de la vida acuática a la terrestre. Estos peces exhiben características anatómicas y fisiológicas, así como un sistema inmune (tema de interés específico de esta revisión), que les permiten vivir tanto en el agua como fuera de ella. Una de las peculiaridades más notorias es su capacidad de estar en las temporadas de sequía; en estas condiciones respiran aire y entran en un estado de sopor que posibilita a las especies de *Protopterus* vivir por largos periodos dentro de un capullo. Este capullo está formado por células epiteliales y moco secretado por las células caliciformes de la piel, y es infiltrado por células de la respuesta inmune innata, como los granulocitos eosinofílicos, que al morir por ETosis liberan el ADN que forma redes (NETs) con gran variedad de proteínas cuya actividad antimicrobiana les permite contener a las bacterias y hongos atrapados en ellas. La respuesta inmune en los dipnoos durante la estivación es una muestra de los complejos eventos evolutivos del sistema inmune que permiten responder a los microorganismos patógenos presentes en los diferentes hábitats que ocupan las especies durante su ciclo vital.

Agradecimientos

A la memoria de Octavio Martínez López, director del Club Científico Colombiano (3C); a Dany Zulay Urrego del Museo de Ciencias Naturales de La Salle del Instituto Tecnológico Metropolitano (ITM) DE Medellín, Colombia; a Sally Station, por la traducción del resumen al inglés; a Mauricio Rojas, por la lectura crítica del manuscrito y por sus sugerencias para mejorarlo, y a Lina María Vélez, por su acompañamiento y apoyo permanentes.

Referencias

- Amelio, D. & Garofalo, F.** (2020). The NOS/NO system in an example of extreme adaptation: The African lungfish. *Journal of Thermal Biology*, 90, 102594. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102594>
- Amelio, D. & Garofalo, F.** (2023). Morpho-functional changes of lungfish *Protopterus dolloi* skin in the shift from freshwater to aestivating conditions. *Comparative and Biochemical Physiology, Part B Biochemistry and Molecular Biology*, 266, 110846. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2023.110846>
- Ashley-Ross, M. A., Hsieh, S. T., Gibb, A. C., Blob, R. W.** (2013). Vertebrate Land Invasions—Past, Present, and Future: An Introduction to the Symposium. *Integrative and Comparative Biology*, 53(2), 192-196. <https://doi.org/10.1093/icb/ict048>
- Bassi, M., Klein, W., Fernandes, M. N., Perry, S. F., Glass, M. L.** (2005). Pulmonary Oxygen Diffusing Capacity of the South American Lungfish *Lepidosiren paradoxa*: Physiological Values by the Bohr Method. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4), 560-569. <https://doi.org/10.1086/430230>
- Bernardes, G., Serra, G. M., Silva, L., Martins, M. P., Perez, L. N., Molfetta, F. A., Santos, A. V., Schneider, M. P. C.** (2024). Potential Involvement of the South American Lungfish Interlectin-2 in Innate-Associated Immune Modulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(9), 4798. <https://doi.org/10.3390/ijms25094798>
- Bielek, E. & Strauss, B.** (1993). Ultrastructure of the granulocytes of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: Morphogenesis and comparison to other leucocytes. *Journal of Morphology*, 218(1), 29-41. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052180103>

- Brinkmann, H., Denk, A., Zitzler, J., Joss, J. J., Meyer, A. (2004a). Complete mitochondrial genome sequences of the South American and the Australian lungfish: testing of the phylogenetic performance of mitochondrial data sets for phylogenetic problems in tetrapod relationships. *Journal of Molecular Evolution*, 59(6), 834-848. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0122-8>
- Brinkmann, H., Venkatesh, B., Brenner, S., Meyer, A. (2004b). Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 101(14), 4900-4905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400609101>
- Bryce, T. H. (1906). Note on the Development of the Thymus Gland in *Lepidosiren paradoxa*. *Journal Anatomy Physiology*, 40(Pt 2), 91-99.
- Casadei, E. & Salinas, I. (2023). Fighting pathogens in two battlefields: Antimicrobial defenses in the African lungfish. *PLoS Pathogens* 19(4), e1011302. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011302>
- da Silva, G. S., Giusti, H., Sanchez, A. P., do Carmo, J. M., Glass, M. L. (2008). Aestivation in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: effects on cardiovascular function, blood gases, osmolality and leptin levels. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 164(3), 380-385. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.08.009>
- da Silva, G. S. F., Ventura, D. A. D. N., Zena, L. A., Giusti, H., Glass, M. L., Klein, W. (2017). Effects of aerial hypoxia and temperature on pulmonary breathing pattern and gas exchange in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integr Physiol*, 207, 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.001>
- de Moraes, M. F., Holler, S., da Costa, O. T., Glass, M. L., Fernandes, M. N., Perry, S. F. (2005). Morphometric comparison of the respiratory organs in the South American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4), 546-559. <https://doi.org/10.1086/430686>
- Fishman, A. P., Pack, A. I., Delaney, R. G., Galante, R. J. (1986). Estivation in *Protopterus*. *J Morphol*, 190(S1), 237-248. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051900416>
- Glass, M. L., Amin-Naves, J., da Silva, G. S. F. (2009). Aestivation in Amphibians, Reptiles, and Lungfish. In M. L. Glass & S. C. Wood (Eds.), *Cardio-Respiratory Control in Vertebrates: Comparative and Evolutionary Aspects* (pp. 179-189). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-93985-6_8
- Heimroth, R. D., Casadei, E., Benedicenti, O., Amemiya, C. T., Muñoz, P., Salinas, I. (2021). The lungfish cocoon is a living tissue with antimicrobial functions. *Science Advances*, 7(47), eabj0829. <https://doi.org/doi:10.1126/sciadv.abj0829>
- Heimroth, R. D., Casadei, E., Salinas, I. (2018). Effects of Experimental Terrestrialization on the Skin Mucus Proteome of African Lungfish (*Protopterus dolloi*). *Frontiers in Immunology* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01259>
- Jordan, H. E. & Speidel, C. C. (1931). Blood formation in the African lungfish, under normal conditions and under conditions of prolonged estivation and recovery. *J Morphol* 51(2), 319-371. <https://doi.org/10.1002/jmor.1050510203>
- Metcalfe, C. J., Filée, J., Germon, I., Joss, J., Casane, D. (2012). Evolution of the Australian Lungfish (*Neoceratodus forsteri*) Genome: A Major Role for CR1 and L2 LINE Elements. *Molecular Biology and Evolution*, 29(11), 3529-3539. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss159>
- Meyer, A., Schloissnig, S., Franchini, P., Du, K., Woltering, J. M., Irisarri, I., Wong, W. Y., Nowoshilow, S., Kneitz, S., Kawaguchi, A., Fabrizius, A., Xiong, P., Dechaud, C., Spaink, H. P., Volf, J.-N., Simakov, O., Burmester, T., Tanaka, E. M., Schartl, M. (2021). Giant lungfish genome elucidates the conquest of land by vertebrates. *Nature*, 590(7845), 284-289. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03198-8>
- Nunan, B. L. C. Z., Silva, A. S., Wang, T., da Silva, G. S. F. (2019). Respiratory control of acid-base status in lungfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Mol Integr Physiol*, 237, 110533. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110533>
- Olena, A. (2021). Lungfish cocoons are alive, sort of. *The Scientist*. https://www.the-scientist.com/lungfish-cocoons-are-alive-sort-of-6943https://www.realclearscience.com/2021/11/18/lungfish_cocoons_are_alive_sort_of_804142.html 7
- Orgeig, S. & Daniels, C. B. (1995). The evolutionary significance of pulmonary surfactant in lungfish (Dipnoi). *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 13(2), 161-166. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb.13.2.7626285>
- Otto, G. (2021). Giant genomes of lungfish. *Nature Reviews Genetics*, 22(4), 199-199. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00337-9>

- Palominos, M. F., Bharadwaj, R., Tralka, C., Trang, K., Aka, D., Alami, M., Andrews, D., Bartlett, B. I., Golde, C., Liu, J., Le-Pedroza, M., Perrot, R., Seiter, B., Sparrow, C., Shapira, M., Martin, C. H. (2024). The West African lungfish secretes a living cocoon during aestivation with uncertain antimicrobial function. *bioRxiv*, 2024.07.05.602297. <https://doi.org/10.1101/2024.07.05.602297>
- Perry, S. F., Euverman, R., Wang, T., Loong, A. M., Chew, S. F., Ip, Y. K., Gilmour, K. M. (2008). Control of breathing in African lungfish (*Protopterus dolloi*): a comparison of aquatic and cocooned (terrestrialized) animals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 160(1), 8-17. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2007.06.015>
- Rauta, P. R., Nayak, B., Das, S. (2012). Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. *Immunology Letters*, 148(1), 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2012.08.003>
- Ribeiro, M. L., DaMatta, R. A., Diniz, J. A., de Souza, W., do Nascimento, J. L., de Carvalho, T. M. (2007). Blood and inflammatory cells of the lungfish *Lepidosiren paradoxa*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(1), 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.10.005>
- Sato, A., Sülthmann, H., Mayer, W. E., Figueroa, F., Tichy, H., Klein, J. (1999). cDNA sequence coding for the α' -chain of the third complement component in the African lungfish. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49(4), 367-375. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1999.00512.x>
- Schartl, M., Woltering, J. M., Irisarri, I., Du, K., Kneitz, S., Pippel, M., Brown, T., Franchini, P., Li, J., Li, M., Adolphi, M., Winkler, S., de Freitas Sousa, J., Chen, Z., Jacinto, S., Kvon, E. Z., Correa de Oliveira, L. R., Monteiro, E., Baia Amaral, D.,...Meyer, A. (2024). The genomes of all lungfish inform on genome expansion and tetrapod evolution. *Nature*, 634, 96-103. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07830-1>
- Sturla, M., Paola, P., Carlo, G., Angela, M. M., Maria, U. B. (2002). Effects of induced aestivation in *Protopterus annectens*: a histomorphological study. *Journal of Experimental Zoology*, 292(1), 26-31. <https://doi.org/10.1002/jez.1139>
- Tacchi, L., Larragoite, Erin T., Muñoz, P., Amemiya, Chris T., Salinas, I. (2015). African Lungfish Reveal the Evolutionary Origins of Organized Mucosal Lymphoid Tissue in Vertebrates. *Current Biology*, 25(18), 2417-2424. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.066>
- Wang, K., Wang, J., Zhu, C., Yang, L., Ren, Y., Ruan, J., Fan, G., Hu, J., Xu, W., Bi, X., Zhu, Y., Song, Y., Chen, H., Ma, T., Zhao, R., Jiang, H., Zhang, B., Feng, C., Yuan, Y.,...Wang, W. (2021). African lungfish genome sheds light on the vertebrate water-to-land transition. *Cell*, 184(5), 1362-1376.e1318. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.047>
- Yokobori, S., Hasegawa, M., Ueda, T., Okada, N., Nishikawa, K., Watanabe, K. (1994). Relationship among coelacanths, lungfishes, and tetrapods: a phylogenetic analysis based on mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 38(6), 602-609. <https://doi.org/10.1007/BF00175880>
- Zhang, R., Liu, Q., Pan, S., Zhang, Y., Qin, Y., Du, X., Yuan, Z., Lu, Y., Song, Y., Zhang, M., Zhang, N., Ma, J., Zhang, Z., Jia, X., Wang, K., He, S., Liu, S., Ni, M., Liu, X.,...Fan, G. (2023). A single-cell atlas of West African lungfish respiratory system reveals evolutionary adaptations to terrestrialization. *Nature Communications*, 14(1), 5630. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41309-3>
- Zhu, M. & Yu, X. (2002). A primitive fish close to the common ancestor of tetrapods and lungfish. *Nature*, 418(6899), 767-770. <https://doi.org/10.1038/nature00871>