



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Ação regulatória de microRNAs durante a regeneração epimórfica em nadadeira caudal de zebrafish (*Danio rerio*)

**BEATRIZ JACINTO ALVES PEREIRA**

**BOTUCATU - SP**

**2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

Ação regulatória de microRNAs durante a regeneração epimórfica em nadadeira caudal de zebrafish (*Danio rerio*)

**Candidato: Beatriz Jacinto Alves Pereira**

**Orientador: Danilo Pinhal**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP, para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU - SP**

**2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pereira, Beatriz Jacinto Alves.

Ação regulatória de microRNAs durante a regeneração  
epimórfica em nadadeira caudal de zebrafish (*Danio rerio*)  
/ Beatriz Jacinto Alves Pereira. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

Capes: 20204000

1. Peixe-zebra. 2. MicroRNAs. 3. Reação em cadeia da  
polimerase. 4. Genética - Pesquisa.

Palavras-chave: Desdiferenciação celular; Regeneração  
epimórfica; miRNA-seq; miRNAs.



*Dedico esse trabalho ao povo brasileiro que sustenta a nação por meio de seu trabalho honesto. A todos pertence por direito o que é produzido nas universidades.*

### **Agradeço:**

Ao meu Deus, pela Sua misericórdia que se renova todos os dias, pela graça alcançada e o amor incondicional.

Aos meus pais, Rose e Valdir, pelo carinho, amor, colo, apoio e torcida. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês.

Ao meu irmão Guilherme, pela amizade e motivação. Amo-te até doer.

Ao meu amado noivo Idinei pelo amor, companheirismo, apoio, incentivo, conversas filosóficas e todos os momentos maravilhoso durante esses anos.

Ao meu orientador, Prof Dr. Danillo Pinhal, pela oportunidade de fazer parte desse projeto fantástico, pelo suporte e incentivo, pela educação científica e pela paciência ao longo de todos esses anos.

A minha psicóloga Fernanda, por manter minha saúde mental em dia no meio de toda essa loucura e sempre me socorrer no meio do desespero.

Aos amigos Eder, Paty, Plínio e Débora, pela amizade, consolo nas dificuldades, risadas, apoio e por terem fé em mim quando eu mesma já não tinha.

À amiga Talita Aleixo pelos desabafos, risadas, cafés, parceria, incentivo e por ser uma pessoa fantástica, um modelo de cientista pra mim. O mundo precisa de mais Talitas.

Às amigas Jordana, Sil, Mariana e Amanda, por tonarem o período de trabalho mais leve, compartilharem conhecimento, me incentivarem sempre e por serem mulheres cientistas maravilhosas.

Aos queridos ICs Felipe e Natascha por me acompanharem nas coletas e fazerem do laboratório um lugar divertido e alegre. Obrigado por me permitirem aprender com vocês enquanto desenvolvíamos esse projeto juntos, por sempre estarem ao meu lado e pela amizade.

Aos amigos do LGEM Arthur 'Messi', Lucas 'Alternar', Lucas 'Lam', Emily, Rafael e Leandro, pelas discussões científicas, por sempre estarem disponíveis e dispostos a me ensinar e ajudar, pela convivência e amizade.

Ao Dr. Luiz (Chokito) Augusto Bovolenta, por toda sua contribuição e dedicação a esse projeto, tempo empreendido em análises, parceria e paciência para compartilhar conhecimento comigo.

Ao Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano por ceder espaço e equipamento para nossas extrações de RNA e a sua aluna Msc Ariana Musa pela prestatividade e simpatia.

À agência FAPESP pelo financiamento desse projeto sob o processo 2018/05484-0 e ao CNPq pela bolsa de mestrado.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação pelo esclarecimento de dúvidas.

Ao conselho do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética), aos funcionários do e ao Departamento de Genética, ao Instituto de Biotecnologia de Botucatu e à UNESP pela infraestrutura cedida para a realização deste projeto.

A todos que participaram deste projeto de maneira direta e indireta.

*“...Se sair a semear  
E as lágrimas do teu rosto  
Não pararem de cair  
Lembre quem te libertou  
É a alegria que o fará  
Voltar a sonhar.”*

*126 – Projeto Sola.*

## Resumo:

Regeneração é a capacidade de reconstruir partes do corpo e formar uma nova estrutura, idêntica morfológica e funcionalmente àquela perdida. De modo geral, a habilidade de regenerar tecidos, órgãos e membros é evolutivamente conservada nos vertebrados, ainda que envolva a ativação de processos celulares distintos, como desdiferenciação, reorganização e rediferenciação das células adjacentes ao tecido injuriado ou amputado. A regeneração denominada "epimórfica", comum em diversos teleósteos, anfíbios e répteis, caracteriza-se pela formação de um agregado de células desdiferenciadas (blastema) que posteriormente se rediferenciam, proliferam e migram para recompor a estrutura originalmente perdida. Durante a regeneração epimórfica, típica na nadadeira caudal do teleósteo *zebrafish* (*Danio rerio*), ocorre extensa desdiferenciação celular de células ósseas (osteoblastos) ativada por mecanismos genéticos ainda não completamente elucidados. Do mesmo modo, pouco se conhece acerca dos mecanismos epigenéticos mediados por microRNAs (miRNAs, pequenos RNAs regulatórios) atuantes no controle da desdiferenciação celular durante a regeneração. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar a atividade de microRNAs na regulação de genes alvo importantes nos processos celulares relacionados à regeneração epimórfica da nadadeira caudal no modelo *zebrafish*. Para isso, realizamos a amputação da nadadeira caudal e coletamos tecidos de 80 *zebrafish*, subdivididos em 8 grupos experimentais: 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas pós-amputação (hpa). Essas amostras foram subdivididas e utilizadas para o sequenciamento em larga escala de microRNAs (miRNA-seq) dos períodos 0, 24, 48 e 72 hpa e para PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR), após etapa prévia de predição *in silico* para seleção de miRNAs (miR-20a-3p, miR-203a-3p, miR-203a-3p, miR-19a-5p e let-7c-3p) e genes alvo candidatos expressos em células ósseas (*sp7*, *runx2*, *bglap* e *spp1*) potencialmente atuantes nas vias de interesse do estudo. Também realizamos análises *in silico* explorando bancos de dados públicos para avaliar se existe conservação evolutiva, nos diferentes grupos de vertebrados, das interações miRNA-alvo preditas. Os dados gerados por miRNA-seq revelaram mais de 600 microRNAs maduros expressos na região da



amputação, sendo 37 miRNAs diferencialmente expressos nos 4 períodos pós-amputação analisados, e 14 miRNAs reconhecidos como relevantes nos processos de formação e reparo do tecido ósseo, com base na literatura. Além disso três miRNAs novos, ainda não reportados previamente no *zebrafish*, tiveram expressão detectada em nosso estudo. Com a análise do perfil de expressão por qPCR, identificamos o pico de expressão dos genes alvo próximo a 12hpa, sugerindo que este se constitui em um período crítico para a ocorrência de desdiferenciação de osteoblastos. A comparação temporal dos perfis de expressão pós-amputação também mostrou expressão negativamente correlacionada entre o gene *sp7* e os quatro miRNAs selecionados, indicando uma potencial atividade coordenada na regulação deste e dos demais genes avaliados. As análises evolutivas revelaram que os sítios de interação do gene *sp7* (na região 3'UTR do gene) aos miRNAs possuem mutações específicas em suas sequências de DNA nas diferentes espécies estudadas, mostrando que os processos moleculares de regeneração epimórfica não são conservados entre os grupos de vertebrados. Interessantemente, nas espécies de mamíferos, cujas sequências 3'UTR de *sp7* são menores e variáveis, não foram detectados sítios de interação para os miRNAs estudados, o que está de acordo com a ausência de ativação da resposta de regeneração epimórfica mediada por blastema observada nesses animais. Juntos, esses resultados evidenciam que a regulação gênica mediada por microRNAs é um mecanismo importante para que haja regeneração epimórfica, particularmente durante a desdiferenciação de osteoblastos induzida pela modulação da atividade de *sp7* que culmina na formação do blastema e restauração da estrutura danificada.

## Abstract

Regeneration is the ability to regain lost parts, making new structures morphologically and functionally identical to the lost one. Generally, this ability to regenerate tissues, organs and limbs is evolutionarily conserved on vertebrates, even if it involves the activation of distinct cellular processes, such as dedifferentiation, reorganization and redifferentiation of cells around to the injured or amputated tissue. The regeneration so-called “epimorphic”, found in teleost fish, amphibians and reptiles, is characterized by a blastema, a mass of dedifferentiated cells that will differentiate, proliferate and migrate to rebuild the lost structure. During epimorphic regeneration, typically found in the caudal fin of the teleost zebrafish (*Danio rerio*), there is an huge cell dedifferentiation of osteoblasts (bone cells) activated by genetic mechanism that have not yet been fully elucidated. Likewise, little is known about the epigenetic mechanisms mediated by microRNAs (miRNAs, small regulatory RNAs) acting in the control of cell dedifferentiation during regeneration. In this context, the present study aimed to characterize the activity of microRNAs in the regulation of important target genes in cellular processes related to epimorphic regeneration of the caudal fin in the zebrafish. To do so, we performed the amputation of the caudal fin and from 80 zebrafish and collected its tissue dividing it in 8 experimental groups: 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 and 90 hours post amputation (hpa). These samples were subdivided and used to perform a large-scale sequencing of microRNAs (miRNA-seq) of the periods 0, 24, 48 and 72 hpa and a real time quantitative PCR (qPCR), after a previous *in silico* prediction to select miRNAs (miR-20a-3p, miR-203a-3p, miR-203a-3p, miR-19a-5p e let-7c-3p) and target genes to be expressed in bone cells (*sp7*, *runx2*, *bglap* e *spp1*), potentially present on the investigated pathways of this study. We also performed *in silico* analysis exploring public databases to evaluate the possibility of evolutive conservation of the miRNA-target interactions predicted in different vertebrate groups. Our data from miRNA-seq shown more than 600 mature microRNAs expressed in the amputation site, with 37 of then differentially expressed in the 4 periods post amputation, and 14 miRNAs known as relevant on process of bone tissue repair and formation, based on literature. Also, three new miRNAs, yet not

previously reported on zebrafish, had its expression detected on our study. The expression profile by qPCR have shown a peak of target genes expression close to the 12 hpa, suggesting that it is a critic period for the differentiation of osteoblasts. The comparison of post amputation's temporal expression profile also shown a negative correlated expression between *sp7* gene and the four selected miRNAs, evince a potential coordinated activity on the regulation of this and the other genes analysed. The evolutive analyses revealed that the interaction sites of *sp7* gene (at the 3'UTR region) for miRNAs have specific mutations in their DNA sequences on all of the studied species, showing that the molecular process of epimorphic regeneration are not conserved between the vertebrate groups. Interestingly, on mammals species, where *sp7* 3'UTR sequences are smaller and variable, were not detected interaction sites for the analyzed miRNAs, what agrees with the absence of response activation of epimórfica regeneration mediated by blastema formation in these animals. Altogether, our results evince that the genic regulation mediated by miRNAs is an important mechanism for the epimorphic regeneration to happens, specifically during the dedifferentiation of osteoblasts induced by the *sp7*'s activity modulation that ends in the blastema formation and restoration of the damaged structure.

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                              |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Figura 1: Distribuição filogenética da regeneração de estruturas.....                                                                                                                                                                                        | 17    |
| Figura 2: Esqueleto da nadadeira caudal de zebrafish e secção transversal.....                                                                                                                                                                               | 19    |
| Figura 3: Processo de regeneração da nadadeira caudal de zebrafish.....                                                                                                                                                                                      | 20    |
| Figura 4: Via canônica da biogênese de microRNAs.....                                                                                                                                                                                                        | 25    |
| Figura 5: Diferentes tipos de pareamento entre miRNAs e MREs de mRNAs.....                                                                                                                                                                                   | 26    |
| Figura 6: Workflow dos procedimentos realizados.....                                                                                                                                                                                                         | 31    |
| Figura 7: Esquema de coleta das amostras de fragmentos de nadadeiras de zebrafish.....                                                                                                                                                                       | 33    |
| Figura 8: Pipeline referente a análise de dados obtidos do sequenciamento.....                                                                                                                                                                               | 36    |
| Figura 9: Fórmula para cálculo de expressão relativa proposta por Livak & Schmittgen (2001).....                                                                                                                                                             | 39    |
| Figura 10: Acompanhamento da regeneração da nadadeira caudal do zebrafish.....                                                                                                                                                                               | 42    |
| Figura 11: Gel de agarose 1% das amostras de 96 e 120 hpa.....                                                                                                                                                                                               | 43    |
| Figura 12: Gráficos de score de qualidade do sequenciamento.....                                                                                                                                                                                             | 44-47 |
| Figura 13: Gráfico com distribuição da quantidade de miRNAs expressos.....                                                                                                                                                                                   | 49    |
| Figura 14: Gráfico de Principal Component Analysis (PCA).....                                                                                                                                                                                                | 50    |
| Figura 15: Diagrama de Venn com número de alvos gerados para o sp7.....                                                                                                                                                                                      | 51    |
| Figura 16: Gráfico com expressão dos genes.....                                                                                                                                                                                                              | 54    |
| Figura 17: Gráfico com expressão dos miRNAs.....                                                                                                                                                                                                             | 56    |
| Figura 18: Sequência dos microRNAs maduros de <i>Danio rerio</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> , <i>Xenopus tropicalis</i> , <i>Anolis carolinensis</i> , <i>Gallus gallus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Homo sapiens</i> ..... | 57-58 |
| Figura 19: Alinhamento da região 3'UTR do gene sp7.....                                                                                                                                                                                                      | 58    |
| Figura 20: Variação do tamanho médio (em pares de base) da região 3'UTR gene sp7.....                                                                                                                                                                        | 59    |
| Figura 21: Principais parâmetros utilizados durante a predição de alvos.....                                                                                                                                                                                 | 62    |
| Figura 22: Gráfico com expressão em fold change do gene sp7 (preto) e dos miRNAs.....                                                                                                                                                                        | 66    |
| Figura 23: Gráfico geral do processo de regeneração da nadadeira caudal de zebrafish.....                                                                                                                                                                    | 67    |
| Figura 24: Comparação do tamanho da região 3'UTR de sp7 entre passeriformes e sauropsídeos.....                                                                                                                                                              | 70    |

## Lista de Quadros

|                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>QUADRO 1</b> - Kits de primers para a análise da expressão dos miRNAs estudados.....                                                                                          | 38 |
| <b>QUADRO 2</b> – Primers para a análise da expressão dos mRNAs estudados.....                                                                                                   | 40 |
| <b>QUADRO 3</b> – Primers dos candidatos a normalizador para os experimentos de RT-qPCR dos mRNAs estudados.....                                                                 | 40 |
| <b>QUADRO 5</b> – Ótimos parâmetros e concentração (ng/ul) encontrados nas amostras.....                                                                                         | 43 |
| <b>QUADRO 6</b> – Resumo dos dados brutos obtidos no sequenciamento de miRNAs das triplicatas amostrais dos períodos 0, 24, 48 e 72hpa.....                                      | 48 |
| <b>QUADRO 7</b> – miRNAs com bom score (>140.00) na ferramenta miRANDA, selecionados como possíveis candidatos a regulação de sp7.....                                           | 52 |
| <b>QUADRO 8</b> – Eficiência obtida para os pares de primers dos genes candidato a normalizador dos experimentos de RT-qPCR de mRNAs.....                                        | 52 |
| <b>QUADRO 9</b> – Eficiência obtida para os pares de primers dos genes do desenvolvimento ósseo avaliados quanto a sua expressão através de RT-qPCR.....                         | 53 |
| <b>QUADRO 10</b> – Resultados em fold change da expressão dos genes de desenvolvimento ósseo durante a regeneração da nadadeira caudal.....                                      | 54 |
| <b>QUADRO 11</b> – Resultados em fold change da expressão dos microRNAs dre-let-7c-3p, dre-mir-19a-5p, dre-miR-20a-3p e miR-203a-3p durante a regeneração da nadadeira caudal... | 55 |

## Sumário

|                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                  | 16 |
| 1.2. Processos celulares e moleculares na regeneração.....          | 17 |
| 1.3. O zebrafish: um modelo animal para estudos de regeneração..... | 18 |
| 1.4. Regeneração da nadadeira caudal em zebrafish.....              | 19 |
| 1.5. Formação do blastema e outros processos celulares.....         | 21 |
| 1.6. Envolvimento dos miRNAs na regeneração.....                    | 23 |
| 2. OBJETIVOS.....                                                   | 29 |
| 2.1. Objetivo geral.....                                            | 29 |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                     | 29 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....                                          | 30 |
| 3.1. Peixes e condições de manutenção.....                          | 30 |
| 3.2. Delineamento experimental.....                                 | 31 |
| 3.3. Procedimentos específicos.....                                 | 32 |
| 3.3.1. Ensaios de regeneração e coleta de amostras.....             | 32 |
| 3.3.2. Extração de RNA total.....                                   | 34 |
| 3.3.3. Quantificação e análise da qualidade do RNA.....             | 34 |
| 3.3.5. Sequenciamento de RNAs e análise dos dados.....              | 35 |
| 3.3.6. Predição bioinformática de alvos.....                        | 36 |
| 3.3.7. Análise de conservação.....                                  | 37 |
| 3.3.8. Análise da expressão gênica em nível transcricional.....     | 38 |
| 3.3.9. Análise de expressão temporal de miRNAs.....                 | 38 |
| 3.3.10 qRT-PCR dos RNAs mensageiros alvo.....                       | 40 |
| 3.3.11 Análise dos resultados dos experimentos de RT-qPCR.....      | 41 |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 4. RESULTADOS.....                                                    | 42 |
| 4.1. Coleta e processamento das amostras.....                         | 42 |
| 4.2. Sequenciamento de miRNAs.....                                    | 43 |
| 4.3. Seleção de microRNAs alvo.....                                   | 50 |
| 4.4. Parâmetros e testes de primers.....                              | 52 |
| 4.5. Análises de expressão por RT-qPCR.....                           | 53 |
| 4.6. Análise da conservação evolutiva da interação microRNA-alvo..... | 56 |
| 5. DISCUSSÃO.....                                                     | 60 |
| 5.1. Sequenciamento de miRNAs.....                                    | 60 |
| 5.2. Seleção de miRNAs.....                                           | 61 |
| 5.3. Análises de expressão por RT-qPCR.....                           | 64 |
| 5.4. Análise da conservação evolutiva das interações miRNAs-sp7.....  | 67 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                          | 71 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                    | 73 |
| 8. MATERIAL SUPLEMENTAR.....                                          | 85 |

## 1. INTRODUÇÃO

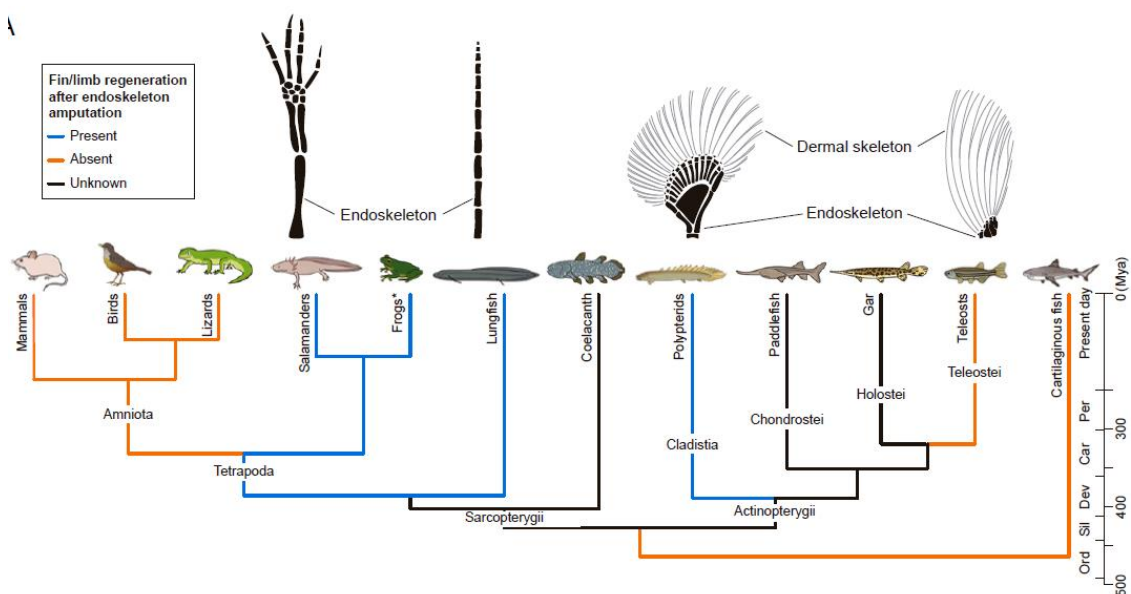
Dentre as diferentes estratégias de sobrevivência no reino animal, a habilidade de substituir tecidos ou estruturas corporais danificadas é uma das mais interessantes. Esse intrigante fenômeno conhecido como regeneração corresponde à capacidade que alguns organismos vivos detêm de reconstruir partes de seu corpo que foram perdidas – seja por injúrias (e.g. Borgens, 1982; Iten e Bryant, 1973), autotomia (e.g. Ramsay et al., 2001; Vitt, 1981), processos de muda (e.g. Skinner, 1962), ou diversos outros fatores – e tem sido importante alvo de estudo no campo das Ciências Biológicas.

Relatos do século XVIII sobre salamandras que regeneravam suas caudas e pernas e gastrópodes com habilidade de regenerar até mesmo suas cabeças (revisado por Tsonis e Fox, 2009), mostram que os estudos iniciais sobre a regeneração tinham como finalidade a descrição desses processos em níveis morfológicos e fisiológicos. Hoje, no século XXI, as pesquisas sobre regeneração buscam compreender como esses processos acontecem nos seres vivos, seus mecanismos celulares e moleculares, se utilizando de temas emergentes como células-tronco, destino celular (Poss, 2010; Tanaka e Reddien, 2011), e suas implicações para a medicina regenerativa (Brockes e Kumar, 2005).

A habilidade de regenerar varia amplamente dentro do reino animal (Bely e Nyberg, 2010). Dentre os vertebrados, anfíbios urodelos são notórios por sua capacidade de reconstruir caudas, membros, mandíbulas, retinas, extensas partes do coração e outras estruturas (revisado em Brockes e Kumar, 2002). Peixes teleósteos também apresentam um significativo poder de regeneração, substituindo nadadeiras, coluna vertebral, tecido nervoso, retina e coração (revisado em Sánchez-Alvarado e Tsonis, 2006). Já sobre os répteis, a maior parte dos estudos acerca de seu potencial de regeneração se concentra na capacidade de reconstruir caudas de lagartos, enquanto outros poucos descrevem a regeneração de caudas e mandíbulas de crocodilos e de cascos de tartarugas (revisado em Alibardi, 2009). Em aves é reportada a ausência de regeneração de estruturas (Bely e Nyberg, 2010), embora haja potencial regenerativo para restaurar células sensoriais ciliadas (Ryals e Rubel, 1988). Mamíferos, por sua vez, renovam constantemente certos tipos celulares - células hematopoiéticas, epitélio intestinal e pele, por



exemplo – podem restaurar alguns tecidos como músculos, sistema nervoso periférico e o fígado, e estruturas como pontas dos dedos e chifres (revisado em Sánchez-Alvarado e Tsonis, 2006; Slack, 2003). Como mostram esses exemplos, embora a capacidade ou habilidade de regenerar tenha sido favorecida pela seleção natural ao longo da evolução dos vertebrados sua abrangência varia amplamente entre espécies (Darnet et al., 2019), e entre as diferentes estruturas ou tecidos do corpo de um mesmo organismo (Figura 1).



**Figura 1: Distribuição filogenética da regeneração de estruturas** pós-amputação de endoesqueleto e esqueleto dermal dentro do grupo dos vertebrados e representação esquemática de ambos os tipos de esqueleto presentes em membros de vertebrados. Linhagens com capacidade de regeneração de membros depois da lesão de endoesqueleto estão marcadas em azul, sem essa capacidade em laranja e grupos sem registro quanto a regeneração de membros em preto. Darnet et al. (2019).

### 1.1. Processos celulares e moleculares na regeneração

A regeneração pode ocorrer por meio de processos celulares distintos tais como crescimento axonal, proliferação celular, diferenciação de células-tronco adultas ou até mesmo desdiferenciação, rediferenciação ou transdiferenciação celular. Estes processos configuram a chamada regeneração epimórfica (Tsonis, 2000) que é caracterizada pela formação de um blastema - estrutura composta por células multipotentes capazes de proliferar, migrar, diferenciar e adquirir uma organização tridimensional para reconstruir a parte corporal perdida (Agrawal et al.,

2010). Maior detalhamento sobre os processos celulares relacionados à formação do blastema é discutido no tópico 1.4.

Além das respostas celulares, os tecidos em regeneração passam por uma série de alterações moleculares. Estudos comparando os perfis transcricionais de tecidos intactos aos de tecidos lesionados, identificaram grupamentos gênicos distintos sendo expressos, o que sugere atuação destes genes na regulação de eventos da regeneração tais como respostas inflamatórias e fechamento da ferida, e desdiferenciação, proliferação e re- ou transdiferenciação das células que irão compor o tecido regenerado (Hui et al., 2014; Lien et al., 2006; Schebesta et al., 2006). Esses perfis também revelam genes específicos controlando processos regenerativos comuns em diversos tecidos como, por exemplo, o gene *hspd1*, responsável pela indução de células mesenquimais e pela formação do blastema em nadadeiras em regeneração, e que também tem sua expressão aumentada durante a regeneração da retina, indicando conservação funcional em diferentes tecidos (Qin et al., 2009).

Diversos estudos também têm mostrado a importância de genes de desenvolvimento e organização de membros – como os genes da família *hox* – nas etapas de regeneração dessas estruturas, apontando para o fato de que a regeneração muitas vezes recapitula acontecimentos celulares e moleculares do desenvolvimento, de maneira que observar os mecanismos de desenvolvimento pode colaborar na compreensão da regeneração ou ausência de regeneração em grupos de vertebrados (Amaral & Schneider, 2019; Nacu et al., 2016; Bryant & Muneoka, 1987).

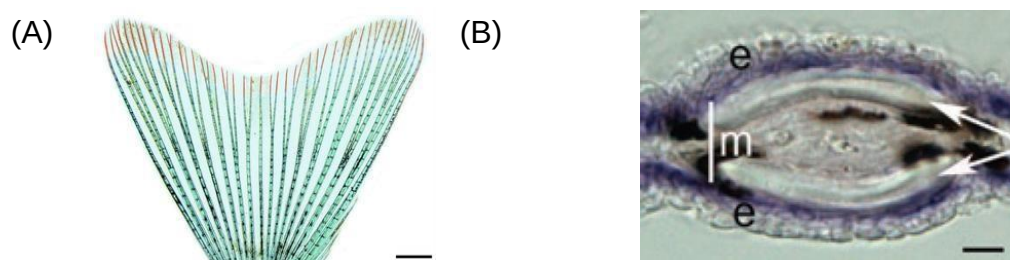
## **1.2. O *zebrafish*: um modelo animal para estudos de regeneração**

O teleósteo *zebrafish* (*Danio rerio*), conhecido no Brasil como “paulistinha”, é um peixe tropical de água doce de origem asiática que tem sido amplamente utilizado como animal modelo em pesquisa. Investigações nos campos da biologia celular e molecular, genética, epigenética e biologia evolutiva e do desenvolvimento (Grunwald e Eisen, 2002; Schier e Giraldez, 2006) tem se valido de protocolos experimentais no *zebrafish* para avanços significativos na produção de conhecimento, incluindo pesquisas sobre regeneração (Gemberling et al., 2013).

Embora diversos outros organismos vertebrados sejam utilizados em estudos sobre regeneração (Sánchez-Alvarado e Tsonis, 2006), o *zebrafish* destaca-se como um modelo versátil e valioso em função da extensiva gama de ferramentas genéticas e moleculares disponíveis, incluindo técnicas de genética direta e reversa, técnicas de transgênese e *cell-tracing*, ferramentas eficientes de manipulação de genes, e potencial para imageamento em tempo real (Chen e Ekker, 2004; Gemberling et al., 2013; Poss, 2010). O *zebrafish* também possui genoma sequenciado e de alta qualidade, com extensa homologia funcional ao genoma humano (Houwe et al., 2013); apresenta rápida taxa de desenvolvimento, baixo custo de aquisição fácil manipulação, podendo ser mantido em biotério. Por possuir embrião transparente, também permite análises funcionais *in vivo*, e observações de maneira não invasiva (Beis e Stainier, 2006). Com alto potencial regenerativo, o *zebrafish* mostrou-se capaz de reconstruir vários tecidos e estruturas danificados, incluindo o coração (Poss et al., 2002b), o tecido nervoso (Becker et al., 1997; Becker e Becker, 2008; Reimer et al., 2008), a retina (Rajaram et al., 2014a,b) e as nadadeiras (Poss et al., 2003).

### 1.3 Regeneração da nadadeira caudal em *zebrafish*

A nadadeira caudal do *zebrafish* é um apêndice desprovido de tecido muscular, suportado por 16-18 raios ósseos que se bifurcam distalmente (Figura 2A) e, entre os quais existe tecido mesenquimal composto por fibroblastos, nervos e vasos sanguíneos (Figura 1B) (Becerra et al., 1983; Pfefferli e Jazwioska, 2015).



**Figura 2: Esqueleto da nadadeira caudal de *zebrafish* e secção transversal.** Figura 2 (A): Esqueleto da nadadeira caudal de *zebrafish*, evidenciando os raios ósseos e suas bifurcações distais, os hemiraios. Imagem adaptada de Pfefferli e Jazwioska (2015). Figura 1 (B): Secção

transversal através de um raio da nadadeira: tecido mesenquimal (m, composto por fibroblastos, células indiferenciadas, vasos sanguíneos e nervos) cercado pelos hemirraios (setas brancas), envolvidos por epitélio (e). Lovine et al. (2007).

A nadadeira caudal do *zebrafish* é uma estrutura especialmente interessante para o estudo do processo de regeneração: é facilmente acessível para manipulação e avaliação e, apesar de apresentar uma organização anatômica simples, seu processo de regeneração consiste na substituição coordenada de diversos tecidos, como osso, epiderme, vasos sanguíneos, nervos, tecido conectivo e pigmentos (Poss et al., 2003). A regeneração da nadadeira ocorre como uma série de acontecimentos organizados e interconectados: cicatrização do ferimento e organização de um epitélio de ferida; formação e maturação do 'blastema', uma massa de células precursoras que darão origem a todos os tipos de células a serem regeneradas; diferenciação celular; e crescimento da estrutura até alcançar o tamanho e a forma da parte a ser substituída (Figura 3).



**Figura 3: Processo de regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish*.** Processo de regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish*: de um dia após a amputação (1 dpa) até o final do processo (20 dpa), quando recuperam a forma e o tamanho idênticos aos da nadadeira intacta ("uncut"). Adaptado de Pfefferli e Jazwioska (2015).

Dentro de algumas horas pós-amputação (hpa), uma fina camada de células epiteliais não proliferativas fecha a ferida, formando uma capa epitelial apical (Poleo et al., 2001; Nakatani et al., 2007). No período de 24 hpa um processo de migração celular torna a capa epitelial mais espessa (Poleo et al., 2001; Poss et al., 2003). Seguindo estes eventos de rearranjo celular, o próximo passo no processo de regeneração é a formação do blastema na extremidade de cada raio da nadadeira amputada (Santamaría et al., 1996; Santos-Ruiz et al., 2002), onde diferentes tipos de células precursoras e células desdiferenciadas entram ou re-entram no ciclo celular para repovoar a parte perdida da nadadeira (Stewart e Stankunas, 2012; Tu e Johnson, 2011). O blastema passa por um processo de maturação formando uma zona distal, composta por células não proliferativas ou de proliferação lenta que vão

originar as células da zona proximal, com alta atividade proliferativa, que representam a fonte de células para o crescimento regenerativo (Poleo et al., 2001; Nechiporuk e Keating, 2002). A indução das vias de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (Poss et al., 2000a; Kawakami et al., 2006), Fgf (Poss et al., 2000b; Lee et al., 2005; Whitehead et al., 2005), Bmp (Smith et al., 2006) e Notch (Grotek et al., 2013; Münch et al., 2013) é essencial tanto para a formação do blastema e manutenção do seu estado proliferativo, quanto para o crescimento da nadadeira. Estes processos de migração, proliferação, rediferenciação, reorganização celulares e crescimento continuam até a completa restauração da estrutura, o que ocorre em aproximadamente duas semanas (Akimenko et al., 2003; Poss et al., 2003).

A alteração da expressão gênica existente ao longo desse processo dá suporte às alterações celulares e morfológicas observadas, fornecendo a base molecular para o processo de regeneração. Padhi e colaboradores (2004) reportaram genes diferencialmente expressos no primeiro e no quarto dia após a injúria, e identificaram 78 e 220 genes com expressão aumentada no início da regeneração e no processo de crescimento da nadadeira, respectivamente. Schebesta e colaboradores (2006) estabeleceram perfis transcricionais da mesma estrutura em 12, 24, 48 e 72 hpa, identificando 829 transcritos diferencialmente expressos durante a regeneração.

#### **1.4 Formação do blastema e outros processos celulares.**

O blastema é uma estrutura multicelular que ocorre desde organismos mais basais, como planárias (Reddien e Sánchez-Alvarado, 2004), até organismos mais derivados, como ascídias (Hamada et al., 2015), peixes (Katogi et al., 2004) e anfíbios (Brockes, 1997). Estudos recentes mostraram semelhanças moleculares e morfológicas entre os blastemas de peixes pulmonados e de anfíbios, sugerindo que os mecanismos envolvidos na formação desta estrutura são bastante conservados e foram importantes na transição do ambiente aquático para o terrestre (Nogueira et al., 2016).

As populações celulares que formam o blastema sofrem uma grande reorganização durante o processo de regeneração da estrutura perdida. A determinação da origem destas células - se formadas pela desdiferenciação de

células maduras ou se provenientes de populações progenitoras pré-existentes - bem como a extensão da multipotência destas células, ainda é alvo de investigações (Tanaka e Reddien, 2011; Singh et al., 2012; Stewart e Stankunas, 2012). No entanto, estudos recentes feitos sobre a formação do blastema nas nadadeiras de *zebrafish* têm mostrado que osteoblastos (Knopf et al., 2011) e escleroblastos (Sousa et al., 2011) maduros se desdiferenciam e entram novamente no ciclo celular a fim de repovoarem as partes ósseas perdidas na amputação da nadadeira. Através da análise da incorporação de BrdU, Knopf e colaboradores (2011) demonstraram que os osteoblastos se proliferam após a amputação e, analisando a movimentação de células marcadas com *Green Fluorescent Protein* (GFP), concluíram que eles migram durante a formação do blastema. Os autores mostram ainda que, à medida que o processo de regeneração acontece, os osteoblastos diminuem a expressão dos marcadores de diferenciação óssea *osterix* (*sp7*) e *osteocalcina* (*bglap*), em comparação com a expressão destes marcadores na nadadeira intacta, e induzem a expressão do fator de transcrição 2 (*runx2*), marcador expresso por células progenitoras ósseas. Desta forma, o processo de desdiferenciação celular é essencial para a regeneração dos elementos ósseos da nadadeira de *zebrafish*.

Ainda, Stewart e Stankunas (2012) demonstraram que a expressão do gene *sp7* é alta na região próxima à lesão e diminui em direção distal ao sítio de amputação. Utilizando uma linhagem transgênica de *zebrafish* na qual o gene da eGFP havia sido introduzido downstream às regiões regulatórias de *sp7* (DeLaurier et al., 2010), os autores verificaram que, à medida em que os osteoblastos migravam para formar o blastema, a expressão de *sp7* era inibida. Porém, mais do que um marcador de diferenciação de osteoblastos, *sp7* é um fator de transcrição necessário para a diferenciação dos osteoblastos e para a formação óssea (Nakashima et al., 2002), de forma que Stewart e Stankunas (2012) sugerem que este fator de transcrição também seja importante no processo de desdiferenciação de osteoblastos durante a regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish*.

Outros genes do desenvolvimento ósseo também são indicados na literatura quanto sua importância para eventos celulares ligados ao blastema, como *runx2*, *bglap* e *spp1*. Rashid e colaboradores (2014) a partir de ensaios de coimunoprecipitação verificaram que de *sp7* e *runx2* agem de maneira sinérgica,

formando um complexo molecular que regula *bglap* – marcador tardio de osteoblastos – aumentando a expressão do fator de crescimento de fibroblastos 3 (*fgf3*) de células mesenquimais, sendo essencial para a diferenciação celular de células ósseas. Kawane e colaboradores (2018) também apontam *runx2* como necessário para proliferação de células progenitoras de osteoblastos através da regulação dos fatores de crescimento de fibroblastos 2 e 3 (*fgf2* e *fgf3*). Estudos também apontam a presença de *runx2* em vias de sinalização de *fgf* e *wnt* no desenvolvimento de membros de mamíferos (Komori, 2011), sendo essas vias reguladas por miRNAs e principais responsáveis pela regeneração em experimentos em nadadeira caudal de *zebrafish* (Thatcher et al., 2008). Quanto ao *bglap*, Cheng e colaboradores (2019) demonstraram que esse marcador tardio de osteoblastos está intrinsicamente ligado a etapa de mineralização óssea e é regulado por *sp7*, de maneira que um *knockout* de *sp7* por CRISPR/Cas9 leva a *down-regulation* de *bglap* e a um desenvolvimento anormal em dentes de larvas de *zebrafish*. *Bglap* também está descrito em vias diferenciação celular (Hoeppner et al., 2009), etapa presente após a formação do blastema na regeneração e em vias semelhantes as da regeneração como propõe Kahler & Westendorf (2003), onde *lef1* – presente na via de sinalização *wnt*/  $\beta$ -catenina (Thatcher et al., 2008) – inibe expressão de *bglap*, quando em interação com *runx2*. Já *spp1* – que também é um marcador tardio de osteoblastos – aparece como principal regulador da etapa de mineralização dessas células, um dos últimos processos celulares da diferenciação de osteoblastos (Chen et al., 2014; Giachelli & Susan Steit, 2000). Srirussamee e colaboradores (2019) verificaram que, após tratamento com estímulos elétricos, macrófagos e pré-osteoblastos secretam *spp1* levando a um aumento na expressão de *runx2* e, consequentemente, a diferenciação dos pré-osteoblastos.

## 1.5 Envolvimento dos miRNAs na regeneração

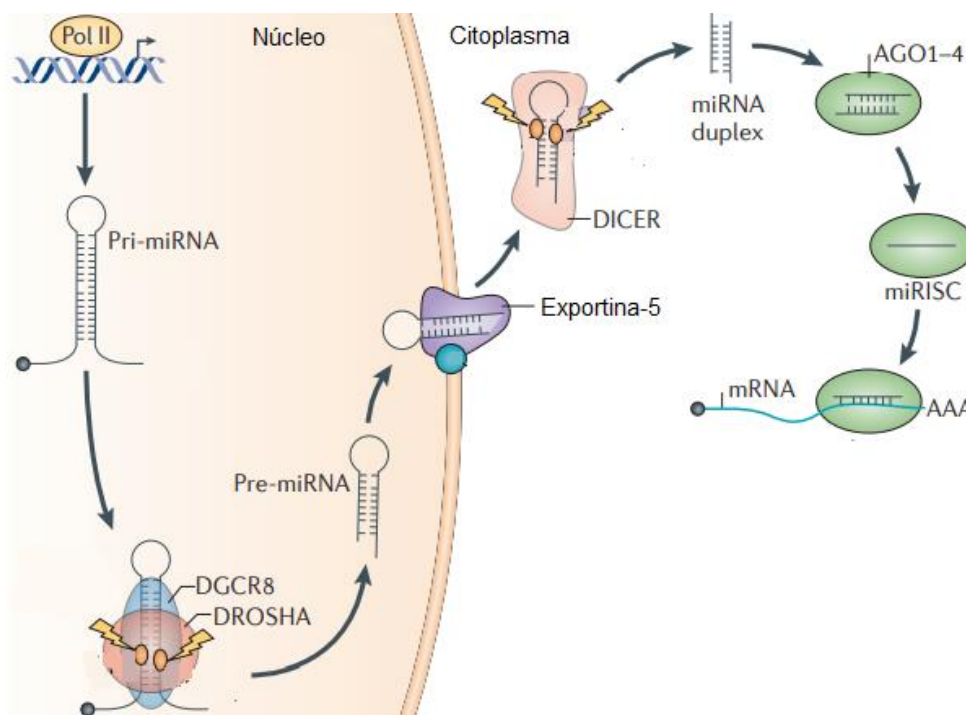
Os perfis de expressão gênica diferencial ao longo do processo de regeneração e entre diferentes tecidos em regeneração sugerem uma regulação gênica estágio e tecido-específica. Os microRNAs (miRNAs) foram descobertos na década de 1990 em estudos sobre o desenvolvimento larval de *C. elegans* (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000). No entanto, estes pequenos RNAs só foram

reconhecidos como uma nova classe de moléculas de RNAs não codificantes (ncRNAs) alguns anos depois (Lee & Ambros, 2001). Essa classe de pequenos RNAs não codificantes é altamente conservada em toda a filogenia animal (Pasquinelli et al., 2000) e tem se mostrado como uma importante classe de reguladores da expressão gênica. Atualmente, sabe-se que eles estão envolvidos com a regulação da organização temporal do desenvolvimento (Li et al., 2005), proliferação celular (Johnnidis et al., 2008), ciclo celular (Wang et al., 2008), manutenção da pluripotência e reprogramação celular (Lüningschrör et al., 2012, Judson et al., 2009), diferenciação (Tay et al., 2008) e destino celular (Cordes et al., 2009), regulação das redes de expressão gênica (He et al., 2007), ajuste fino da expressão gênica (Neo et al., 2014) e manutenção da robustez fenotípica (Goljanek-Whysall et al., 2013), dentre outras funções.

Os transcritos de miRNAs maduros possuem aproximadamente 22 nucleotídeos (Bartel, 2004) e têm sua origem canônica (i.e., por via padrão) a partir de um transcrito maior (aproximadamente 110 pares de base) gerado pela RNA polimerase II chamado “pri-miRNA” que possui estrutura de *hairpin* (i.e, em grampo; Lee et al., 2002; Lee et al., 2004). Ainda no núcleo, o pri-miRNA é reconhecido por um complexo microprocessador formado pelas enzimas Drosha e DGCR8 que cliva uma das extremidades gerando uma estrutura ainda em formato de *hairpin*, mas com aproximadamente 60 pb chamado “pre-miRNA” (Lee et al., 2003; Bartel 2018). Em seguida o pre-miRNA é levado ao citoplasma pela proteína Exportin-5 (Yi et al., 2003; Lund et al., 2004), onde é reconhecido pela enzima Dicer que cliva o loop da estrutura de *hairpin* formando uma molécula de dupla fita chamada “miRNA duplex” (Bartel, 2018). Esse duplex atrai proteínas da família Argonauta (AGO), formando o complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), onde a fita madura do duplex – a que atuará naquele local – se liga a uma das proteínas Argonauta e fica retida no miRISC (Lin e Gregory, 2015), enquanto a outra fita pode ser degradada ou formar outro miRISC para atuar em outro RNA mensageiro (mRNA) (Figura 4). O braço que permanece no miRISC aparece na nomenclatura do miRNA, que são nomeados como “miR-“ mais números e 3p ou 5p para indicar qual fita/braço do miRNA duplex está exercendo a regulação. Caso existam sequências similares, elas geralmente são distinguidas por uma letra após o número. Em casos onde sequências de miRNAs maduros apareçam em diferentes loci genômicos,



acrescenta-se um número ao final. Podemos também especificar a que espécie pertence determinado miRNA adicionando a primeira letra do gênero seguido das duas primeiras letras do epíteto específico no início do nome do miRNA. Por exemplo, o nome dre-203a-1-3p indica que estamos nos referindo ao braço 3p do miRNA mir-203a presente no locus genômico "1" da espécie *Danio rerio*.

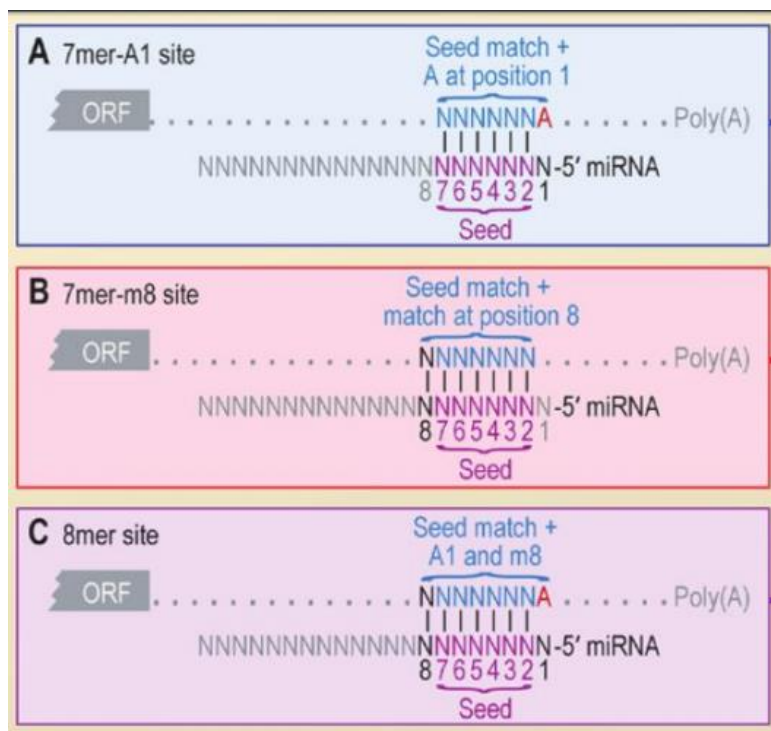


**Figura 4: Via canônica da biogênese de microRNAs.** miRNAs são transcritos primeiramente como pri-miRNAs pela RNA polimerase II no núcleo. O pri-miRNA é clivado por microprocessador que inclui DROSHA e outras enzimas, gerando o pre-miRNA que é exportado para fora do núcleo pela exportina 5 e, posteriormente processado pela DICER, produzindo miRNA duplex. O duplex atrai proteínas argonauta formando o complexo de silenciamento miRISC onde a fita madura do duplex se liga a uma das proteínas argonauta e fica retida no miRISC, enquanto a outra fita pode ser degradada ou formar outro miRISC. Adaptado de Lin e Gregory, 2015.

Esse *duplex* atrai proteínas da família Argonauta (AGO), formando o complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC), onde a fita madura do duplex – a que atuará naquele local – se liga a uma das proteínas Argonauta e fica retida no miRISC (Lin e Gregory, 2015), enquanto a outra fita pode ser degradada ou formar outro miRISC para atuar em outro RNA mensageiro (mRNA).

De maneira geral, a região *seed* – que se encontra na posição 2 a 8 da sequência do miRNA (Bartel, 2009) – se liga a sítios específicos na região 3'UTR do mRNA alvo chamados de *microRNA recognition elements* (MRE) e inibem ou silenciam a expressão deste gene (Bartel, 2004). O pareamento da região *seed* com as MREs é classificado em 3 categorias canônicas: (i) 7mer-A1 – onde a *seed* do miRNA forma pareamento Watson Crick com MRE que possua uma adenina na

posição 1; (ii) 7mer-m8, onde o pareamento Watson Crick se dá entre a MRE e a *seed* do miRNA mais um oitavo nucleotídeo e (iii) 8mer que é um pareamento Watson Crick da MRE com uma adenina na posição 1 e a *seed* do miRNA mais um oitavo nucleotídeo (Figura 5).



**Figura 5: Diferentes tipos de pareamento entre miRNAs e MREs de mRNAs.** (A) pareamento do tipo 7mer-A1 com pareamento Watson Crick da *seed* com MRE que possua uma adenina na posição 1; (B) pareamento tipo 7mer-m8 com pareamento Watson Crick entre a MRE e a *seed* com mais um oitavo nucleotídeo; (C) pareamento tipo 8mer com pareamento Watson Crick da MRE com uma adenina na posição 1 e a *seed* com mais um oitavo nucleotídeo. Adaptado de Bartel, 2009.

Os miRNAs podem agir de diferentes formas: (i) alterando a acessibilidade do gene à maquinaria transcricional via remodelamento da cromatina (Wade et al., 2015), (ii) induzindo a clivagem ou o decaimento do mRNA alvo através da interferência com estruturas que promovem sua estabilidade como a cauda poli-A (Humphreys et al., 2005), (iii) impedindo a ligação do mRNA ao ribossomo (Chendrimada et al., 2007), ou mesmo (iv) promovendo a degradação da proteína nascente tão logo ela seja sintetizada (Olsen e Ambros, 1999). Além disso, os miRNAs são moléculas muito versáteis, capazes de se ligar a sítios localizados na região 5'UTR (Lytle et al., 2007) ou ao corpo do gene (Duursma et al., 2008), bem como provocar aumento da expressão de alguns alvos (Vasudevan et al., 2007).

Diversos trabalhos já demonstraram o envolvimento dos miRNAs na determinação do destino celular e na manutenção dos estados de diferenciação das

células (revisado em Ivey e Srivastava, 2010; Guo et al., 2011; Ribeiro et al., 2014). À medida que as células pluripotentes se comprometem com uma determinada via de diferenciação, a redução da expressão de fatores de transcrição marcadores de pluripotência e o aumento de marcadores específicos de alguma linhagem celular são acompanhados por alterações nos perfis de expressão dos micRNAs (Chen et al., 2007; Lakshmipathy et al., 2007; Bakhshandeh et al., 2012). Enquanto alguns miRNAs estabilizam o estado de pluripotência celular (e.g. Barroso-del Jesus et al., 2009), outros promovem a diferenciação ao alvejar fatores de transcrição associados à pluripotência (e.g. Xu et al., 2009). Os miRNAs também são coadjuvantes nos processos de reprogramação celular (Judson et al., 2009), nos quais células somáticas maduras são revertidas a um estado pluripotente induzido e, posteriormente, rediferenciadas nos mais diversos tipos celulares.

Os miRNAs também já foram identificados como importantes reguladores da expressão gênica durante a regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish*. Comparando os perfis de expressão de miRNAs em diferentes estágios da regeneração da nadadeira caudal ao grupo controle, Yin e colaboradores (2008) encontraram 24 miRNAs com expressão aumentada e 13 com expressão reduzida em nadadeiras recém amputadas, diferentemente dos 51 miRNAs com expressão aumentada e 14 com expressão diminuída detectados durante a formação do blastema. Estes achados sugerem que os miRNAs estão envolvidos em funções estágio-específicas durante o processo de regeneração. Os mesmos autores também encontraram 22 miRNAs influenciados pela sinalização por *fgfs* (*fibroblast growth factors*) - seis deles aumentados e 16 diminuídos. Estudos anteriores mostraram que a sinalização por *fgfs* é essencial para a formação do blastema (Poss et al., 2000b; Lee et al., 2005; Whitehead et al., 2005), sugerindo uma ligação funcional entre estes miRNAs e a regeneração. Entre eles, um miRNA previamente implicado nos processos de desenvolvimento muscular e diferenciação neuronal, o miR-133, chamou a atenção dos pesquisadores. O miR-133 é altamente expresso em nadadeiras não danificadas, mas sua expressão cai 5,6 vezes durante o crescimento regenerativo, e os autores mostram que, se a sinalização por *fgf* for inibida neste estágio, este miRNA restabelece seus níveis de expressão observados em nadadeiras intactas. Yin e colaboradores (2008) reportaram que a injeção de duplexes de miR-133 em nadadeiras em regeneração diminui o crescimento

regenerativo, favorecendo a proliferação celular. De fato, esses autores mostraram que *mps1*, um gene necessário para a proliferação celular do blastema (Poss et al., 2002a), é um alvo *in vivo* do miR-133, fornecendo a ligação entre este miRNA e os eventos de proliferação celular durante a regeneração de nadadeiras. Thatcher e colaboradores (2008) também focaram suas investigações no estudo do envolvimento de miRNAs na regeneração das nadadeiras de *zebrafish*. Usando morfolidos para silenciar a enzima *Dicer*, de forma a comprometer toda a biogênese dos miRNAs, eles mostraram que a ausência de miRNAs afeta significativamente o processo de regeneração. Os autores também observaram que, em condições normais, alvos preditos de miRNAs fortemente aumentados ou diminuídos ao longo do processo de regeneração também tiveram suas expressões moduladas. Os miRNAs miR-2 e miR-338 diminuíram sua expressão ao mesmo tempo em que *hsp60*, uma proteína *heat shock* que protege as células do estresse e da apoptose durante a regeneração (Makino et al., 2005), teve sua expressão aumentada. Outro miRNA, o miR-301, diminuiu sua expressão quando *msxb*, uma proteína que controla a taxa de crescimento do blastema (Akimenko et al., 1995), aumentou sua expressão ao longo da regeneração. Em especial, o miR-203 apresentou diminuição em sua expressão quando *lef1*, um marcador de regeneração inicial (Poss et al., 2000a), teve sua expressão aumentada. Através de ensaios com o gene repórter GFP, os autores verificaram que *lef1*, um fator de transcrição regulado pela sinalização por Wnt, é de fato alvo do miR-203, e usando morfolidos para determinar o efeito da perda da expressão de miR-203 na regeneração, eles observaram aumento na expressão de *lef1* e um aumento notável no crescimento da nadadeira.

Também foram encontrados diversos miRNAs em processos de diferenciação e desenvolvimento de tecido ósseo. Zhang e colaboradores (2011) descreveram o miR-20a como importante fator na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em células ósseas através de sua função regulatória dos genes *Runx2*, *Sp7*, *Bglpa* e *Spp1* – conhecidos marcadores de diferenciação osteogênica. O let-7c, conhecido por sua função como supressor tumoral, apresentou expressão diferencial em vias de proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais, sendo um potencial inibidor da formação e diferenciação de tecido ósseo (Liu et al., 2018). Kocijan e colaboradores (2016) em um estudo de

caso, detectaram a presença do miR-19a em sua forma livre em pacientes com menor ocorrência de fraturas ósseas, correlacionando a expressão desse miRNA com processos associados à homeostase do tecido ósseo.

Os estudos mencionados encontraram outros marcadores de regeneração influenciados por miRNAs. Isto, somado ao fato de que os miRNAs são importantes atores em processos biológicos que requerem robustez na expressão gênica, tais como desenvolvimento e regeneração (Ebert e Sharp, 2012), sugere que a regulação da regeneração da nadadeira caudal por estas pequenas moléculas regulatórias é ainda mais abrangente.

De acordo com banco de dados do SIHSUS, foram registrados 528.703 procedimentos de amputações de membros no Brasil no período de 2008 a 2018 (Brasil, 2019). Embora a nadadeira caudal de *zebrafish* seja constituída de esqueleto dermal, tipo diferente do presente em mamíferos (Darnet et al., 2019), compreender os mecanismos celulares e moleculares dos osteoblastos durante a regeneração da nadadeira caudal pode trazer à luz novas respostas e possibilidades para a medicina regenerativa, auxiliando futuramente milhares de amputados.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Caracterizar a atividade de microRNAs na regulação de genes atuantes nos processos celulares envolvidos na regeneração epimórfica da nadadeira caudal no modelo *zebrafish*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Prospectar microRNAs candidatos à regulação da regeneração epimórfica na nadadeira caudal de *zebrafish* (*Danio rerio*).

- Verificar expressão diferencial de genes associados com a formação óssea – *sp7*, *runx2*, *bglap* e *spp1* - e de microRNAs selecionados nos períodos pré e pós-amputação da nadadeira caudal, analisando possíveis relações regulatórias entre eles.
- Avaliar o nível de conservação evolutiva das interações miRNAs-*sp7* (*in silico*) em diferentes grupos de vertebrados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Peixes e condições de manutenção

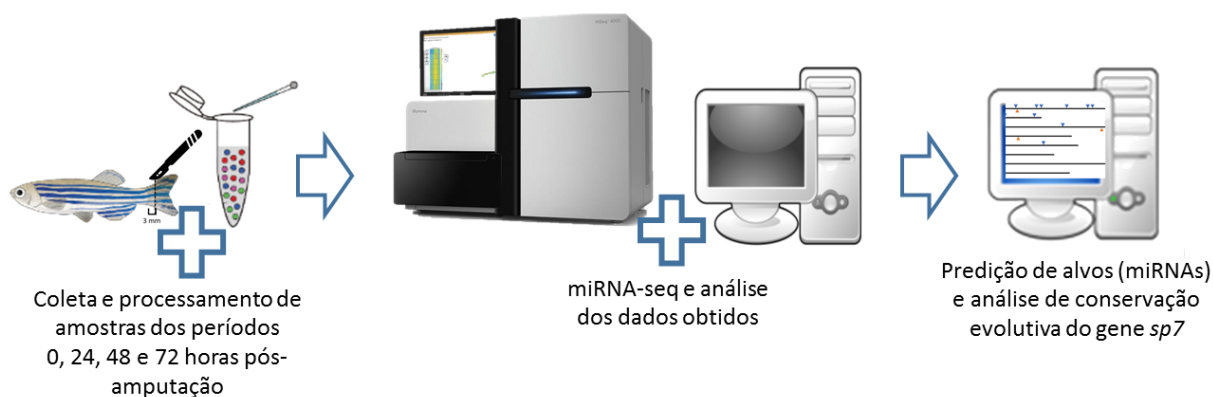
Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com os princípios da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu, sob protocolo CEUA:1122 .

Utilizamos *zebrafish* da linhagem *wild type* provenientes do biotério de peixes do Laboratório Genômica e Evolução Molecular (LGEM), do Departamento de Genética. Os animais foram mantidos em sistema de criação de *zebrafish* automatizado, plataforma Zebtec (Tecniplast, Itália), em aquários de 3,5 ou 8 litros, na densidade de 5 a 10 peixes por litro. A água dos aquários é mantida à temperatura de 28°C, pH em torno de 7.5, amônia < 0,02 ppm, nitrito < 2,0 mg/L e aeração constante. O fotoperíodo é de 14 horas de ciclo claro (09:00 às 23:00h), provida por fonte de luz branca fluorescente (~350 Lux). Trocas parciais de água (10% da água do sistema) são realizadas diariamente e o nível reestabelecido com água de osmose reversa com sal. Os peixes são alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (45-55% de proteína bruta), em quantidade equivalente a 5% do peso vivo.

### 3.2. Delineamento experimental

Considerando-se a potencial atuação do fator de transcrição *sp7* na desdiferenciação de osteoblastos – etapa importante para a formação do blastema durante a regeneração – e a atividade regulatória mediada por microRNAs nos processos de desenvolvimento e regeneração, optamos por utilizar estratégias complementares, *in vitro* e *in silico*, para melhor investigar todo o contexto da regeneração na nadadeira caudal de *zebrafish*, como mostra o delineamento a seguir na Figura 6.

#### a) Análises *in silico*



#### b) Análises *in vitro*



**Figura 6: Workflow dos procedimentos realizados.** Figura 5 a): Workflow da estratégia *in silico*, onde as amostras dos períodos 0, 24, 48 e 72hpa foram coletadas e processadas para serem submetidas a técnica de miRNA-seq ( *i. e.* sequenciamento de moléculas de miRNA) os resultados obtidos foram tratados e analisados de acordo com os procedimentos descritos nos tópicos a seguir. Também realizamos a predição de alvos (miRNAs) candidatos a regulação de *sp7* e verificamos a conservação evolutiva dessa interação proposta. Figura 5 b) Workflow da estratégia *in vivo*, onde realizamos os ensaios de regeneração registrando o crescimento da nadadeira e coletando amostras nos períodos 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120hpa, processamos essas amostras e realizamos testes de RT-qPCR para verificar perfil de expressão dos genes *sp7*, *bglap*, *runx2a*, *runx2b* e *spp1* e dos miRNAs selecionados.

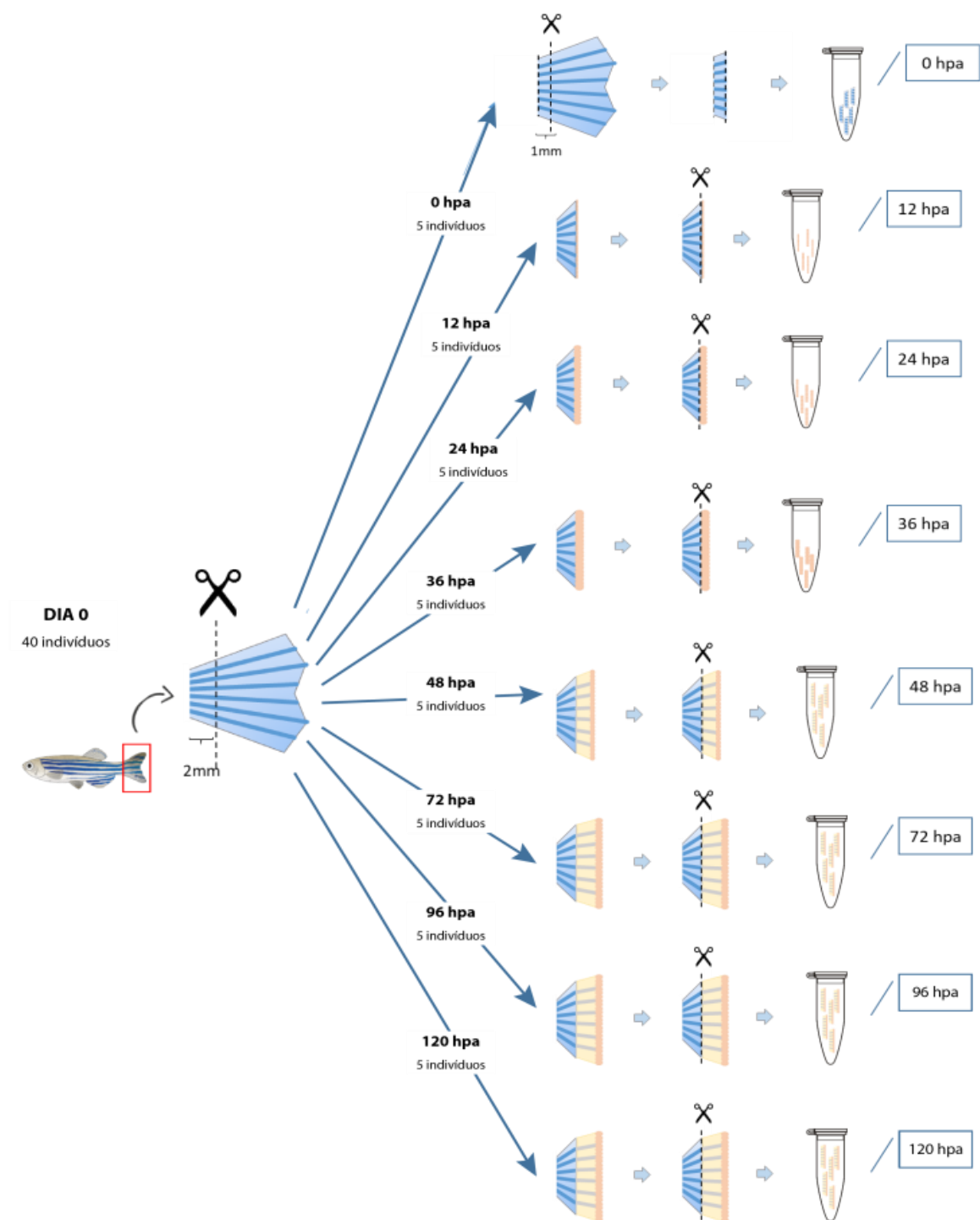
### **3.3. Procedimentos específicos**

#### **3.3.1. Ensaios de regeneração e coleta de amostras**

Para os ensaios de regeneração e coleta das amostras, foram utilizados 80 indivíduos adultos de *zebrafish* (*Danio rerio*) provenientes do biotério de peixes, mantidos conforme detalhado no item 3.1. Todos os indivíduos foram igualmente anestesiados com tricáína (MS-222, Sigma Aldrich) a 150 mg/L de acordo com Collymore e colaboradores (2014).

Ampuamos as nadadeiras a 2 mm da nadadeira caudal de cada indivíduo, padronizando aproximadamente 1 mm de tecido coletado com material cirúrgico devidamente esterilizado e descartável. As amostras coletadas foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-80C°). As coletas foram realizadas em 6 períodos definidos com base na literatura (Brown et al., 2009; Geurtzen et al., 2014; Knopf et al., 2011): 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas pós-amputação (hpa). Cada amostra foi formada por *pool* de tecidos de 5 indivíduos e tomada em duplicatas biológicas, conforme exemplificado na Figura 7.





**Figura 7: Esquema de coleta das amostras de fragmentos de nadadeiras de zebrafish durante a regeneração nos períodos de tempo pré- (0 hpa) e pós- amputação (12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 hpa); hpa: hours post amputation .**

### 3.3.2. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método de extração orgânica com TRIzol® (ThermoFischer Scientific), seguindo protocolo descrito por Chomczynski (1993) com modificações.

As amostras foram colocadas em microtubos de 2 mL contendo *beads* de aço inoxidável (Qiagen) juntamente com 1mL de TRIzol Reagent® por amostra. As amostras foram homogeneizadas utilizando o aparelho *BeadBlaster 24 (BenchMark Scientific, EUA)* e depois mantidas no gelo por 5 minutos. O lisado foi transferido a novo tubo contendo 400 µl de clorofórmio, onde foi novamente homogeneizado por agitação durante 15 s. Em seguida, foi estabilizado por 3 min no gelo e depois levado a centrifugação a 12000 rpm por 15 min a 4°C, resultando em uma mistura trifásica cujo sobrenadante (aproximadamente 450 µl) foi transferido a microtubo contendo 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo foi invertido durante 30 s, mantido por 10 min no gelo e novamente centrifugado a 12000 rpm por 10 min a 4°C. Na etapa seguinte pudemos observar a formação de *pellet* sob o sobrenadante que foi descartado. Adicionamos então 1mL de álcool 75%, seguido de centrifugação a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Descartamos novamente o sobrenadante e adicionamos 1mL álcool 100% ao *pellet*, seguido novamente por centrifugação a 7500 rpm por 5 min a 4°C. Em seguida descartamos o sobrenadante, deixamos a amostra por alguns instantes em temperatura ambiente para completar a secagem e finalizamos o processo diluindo o *pellet* em água ultra-pura para então armazenar as amostras de RNA em ultrafreezer (-80°C).

### 3.3.3. Quantificação e análise da qualidade do RNA

Para quantificação (em ug/ul) e checagem de contaminação do RNA total por proteínas e/ou solventes orgânicos avaliou-se as razões de absorbância a 260/280 nm e 230/280 nm fornecidas pelo equipamento NanoDrop 1000 (Thermo-Scientific). A integridade do RNA isolado foi duplamente checada, utilizando-se gel de agarose

a 1% e as razões de absorbância obtidas no equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Somente foram utilizadas no estudo amostras puras ( $A_{260}/A_{280nm} > 1,8$ ;  $A_{260}/A_{230nm} > 2,0$  e  $< 2,3$ ) e íntegras ( $RIN=RNA\ Integrity\ Number > 7,0$ ).

Para eliminar eventual contaminação por DNA genômico, o RNA total foi purificado utilizando-se o kit TURBO DNA-free<sup>TM</sup> (Invitrogen), seguindo o protocolo do fabricante.

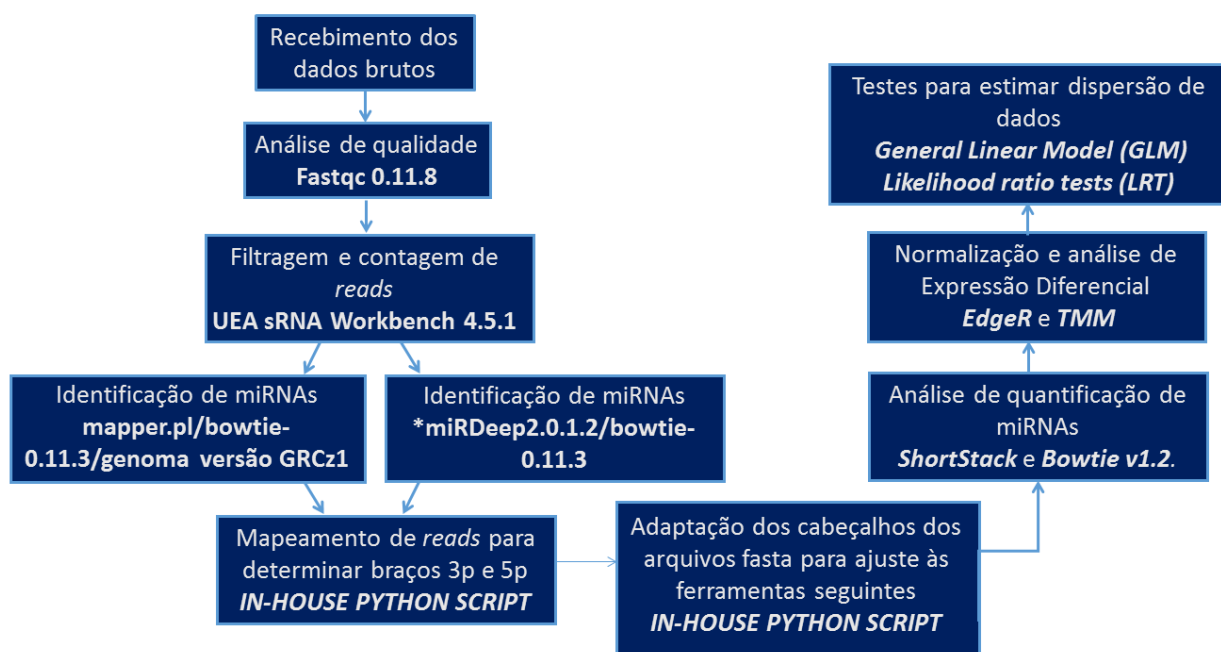
#### 3.3.4. Sequenciamento de RNAs e análise dos dados

Selecionamos amostras dos períodos 0, 24, 48 e 72 hpa para sequenciamento de microRNAs utilizando a plataforma HiSeq 4000 (Illumina, USA) mediante a serviço contratado junto à empresa LC Sciences (Houston, Texas – USA). As amostras foram preparadas e enviadas de acordo com recomendações da própria empresa (<https://www.lcsciences.com/discovery/international-shipping-instructions-total-rna-samples/>). Acesso em 10 de Janeiro de 2019).

A primeira etapa do sequenciamento consiste na criação de bibliotecas de cDNA. Para tal, as amostras de RNA foram ligadas a adaptadores (5' e 3'), fracionadas por tamanho e purificadas por gel de eletroforese de poliacrilamida (PAGE), isolando RNAs de comprimento entre 18 e 40 pares de bases (pb), para então serem transcritas reversamente e amplificadas por RT-PCR. O cDNA resultante foi fracionado em fragmentos entre 90-100 pb para recuperar fragmentos que continham miRNAs. As bibliotecas foram precipitadas, quantificadas e tiveram sua concentração otimizada para realizar o sequenciamento do cDNA que, após purificação, foi agrupado através do Illumina's Cluster Station e então sequenciado na plataforma HiSeq 4000.

Para obter as *reads* (leituras das sequências de DNA vindas do sequenciador) no comprimento de 50 pb, foram utilizados os *softwares* *Illumina's Sequencing Control* e *Illumina's Real-Time Analysis* para analisar o sequenciamento por imagem em tempo real e realizar a análise de *base-calling*.

A análise das *reads* resultantes foi realizada pela nossa equipe seguindo o *pipeline* demonstrado na Figura 8. Os parâmetros e comandos utilizados encontram-se no material suplementar.



**Figura 8: Pipeline referente a análise de dados obtidos do sequenciamento.** Em negrito, as ferramentas utilizadas em cada etapa, com destaque (\*) para a etapa de Identificação de mirnas com a ferramenta *miRDeep* onde as sequencias obtidas foram comparadas com sequências de miRNAs maduros já descritos para *zebrafish* (miRbase Release 22.1: Outubro 2018) e sequências exclusivas da espécie recém processadas e não contidas nas atualizações do miRbase (miRGeneDB v 2.0 [homologia blastn online: megablast]). Também foram utilizados bancos de dados de referência de miRNAs de espécies filogeneticamente próximas a *Danio rerio* (miRbase Release 22.1: October 2018 / teleostei), listados no material suplementar.

### 3.3.5. Predição bioinformática de alvos

Realizamos predição bioinformática de alvos (miRNAs) potencialmente reguladores de *sp7* utilizando as ferramentas TargetScan (<http://www.targetscan.org>, release 6.2), miRANDA-miRSVR (<http://www.microrna.org/>) e RNA22 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/>), com base em estratégia otimizada de seleção de alvos desenvolvida em nosso laboratório (Oliveira et al., 2017). As três ferramentas realizaram busca de alvos no genoma do *zebrafish* e geraram listas de miRNAs candidatos.

### 3.3.6. Análise de conservação

Uma vez que o processo de regeneração ocorre em diferentes grupos de vertebrados de maneiras diferentes, torna-se necessário averiguar se o mecanismo de silenciamento do gene *sp7* pelos miRNAs selecionados é também conservado entre os grupos filogenéticos.

Dessa maneira, comparamos as sequências dos quatro miRNAs (i.e.: miR-203a-3p, miR-20<sup>a</sup>-3p, miR-19a-5p e let-7c-3p) obtidas no banco de dados *miRBase* (<http://www.mirbase.org/>), de espécies de diferentes grupos de 5 grupos de vertebrados: *Danio rerio* (zebrafish), *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-nilo), *Xenopus tropicalis* (sapo), *Anolis carolinensis* (lagarto), *Gallus gallus* (galo), *Mus musculus* (camundongo), *Rattus norvegicus* (rato), e *Homo sapiens* (humano), com enfoque na região *seed*, onde acontece o pareamento do miRNA com o gene.

Para análise da conservação da interação entre os miRNAs e o gene *sp7*, foram mapeadas as regiões 3'UTRs desse gene nas diferentes espécies de vertebrados. A partir da análise de seu genoma completo. Após, com o intuito de verificar potenciais polimorfismos na sequência 3'UTR, foi realizada a predição das interações entre essas regiões e os microRNAs utilizando a ferramenta Genomicus (Nguyen e colaboradores, 2018). Obtivemos as sequências das regiões 3'UTR de 104 espécies selecionadas para comparação com *zebrafish*, sendo 59 obtidas através do banco de dados Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) e as 45 restantes preditas, uma vez que não havia anotação de tal região. A predição desses casos foi feita selecionando-se 4000 pares de base da região flanqueadora à região codificadora na extremidade 3' e, com a ferramenta Poly(A) Signal Miner, determinamos a posição do sítio de poliadenilação, marcador do início da cauda poliA e do final da 3'UTR.

### 3.3.7. Análise da expressão gênica em nível transcricional

Para verificar em que momento do processo regenerativo os genes *sp7*, *bglap*, *runx2a*, *runx2b* e *spp1* e os microRNAs selecionados atuam, amostras de RNA de cada período de tratamento foram analisadas utilizando a técnica de PCR quantitativo em Tempo Real após Transcrição Reversa (RT-qPCR). Todos os experimentos de RT-qPCR foram realizados seguindo as orientações do *MIQE: Minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiment* (Bustin et al., 2009).

### 3.3.8. Análise de expressão temporal de miRNAs

Os miRNAs a serem validados por RT-qPCR foram selecionados de acordo com metodologia descrita no tópico 3.3.5 (a saber: dre-miR-203a-3p, dre-miR-20a-3p, dre-let-7c-3p e dre-mir-19a-5p) e seus *primers* obtidos a partir do genoma de *zebrafish* foram customizados em kits comerciais *TaqMan® MicroRNA Assays* (ThermoFischer Scientific, EUA) conforme demonstrado no Quadro 1. Cada kit contém um tubo contendo um *primer* específico para a retrotranscrição do miRNA e outro tubo contendo uma mistura de *primers forward* e *reverse* específicos para o miRNA estudado e uma sonda para detecção da amplificação do miRNA em tempo real.

**QUADRO 1** - Kits de *primers* para a análise da expressão dos miRNAs estudados.

| miRNA estudado  | Acesso miRBase | <i>TaqMan® microRNA assay ID</i>   |
|-----------------|----------------|------------------------------------|
| dre-let-7c-3p   | MIMAT0031930   | Assay ID 002479 cat (4427975)      |
| dre-miR-19a-5p  | MIMAT0003398   | Assay ID 0088295_mat cat (4440886) |
| dre-miR-20a-3p  | MIMAT0003400   | Assay ID 008212_mat cat (4440886)  |
| dre-miR-203a-3p | MIMAT0001278   | Assay ID 004590_mat cat (4440886)  |

O RNA total extraído conforme descrito no item 3.3.2 foi tratado com DNase I RNase free (ThermoFischer Scientific), de acordo com o protocolo do fornecedor (1 unidade de DNase para 1 ug de RNA).

A transcrição reversa dos miRNAs presentes no RNA total extraído foi realizada utilizando o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (ThermoFischer Scientific, EUA) combinado com o kit *TaqMan® MicroRNA Assays* (ThermoFischer Scientific, EUA), segundo as orientações do fabricante. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico (Chen et al., 2005).

Na reação de qPCR, cada amostra de cDNA produzida foi analisada com ensaios (*primers* e sonda) capazes de discriminar miRNAs maduros que diferem em apenas uma base, utilizando-se pequena quantidade de RNA inicial. O gene U6 snRNA (*small nuclear RNA*), altamente conservado entre os vertebrados, foi utilizado como gene constitutivo para normalização dos resultados de expressão de miRNAs (hsa-snRNA – U6; Assay ID 001973). As reações foram realizadas no Sistema de PCR em Tempo Real *ABI StepOne Plus™* (ThermoFischer Scientific, EUA) utilizando os kits *TaqMan® MicroRNA Assays* (ThermoFischer Scientific, EUA) e *TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (2X)* (ThermoFischer Scientific, EUA). Os valores de Cq (ciclo de quantificação) foram calculados utilizando o software SDS 2.3, utilizando a configuração automática de *baseline* e um *threshold* de 0,2. O Cq é ponto de encontro entre a curva de amplificação corrigida pelo *baseline* e o *threshold* (de acordo com o RDML, [HTTP://rdml.org](http://rdml.org)) (Lefever et al., 2009). A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método do Cq comparativo (Livak & Schmittgen, 2001), onde os valores da quantificação relativa são descritos pelas mudanças na expressão dos alvos em relação à expressão de um grupo controle - no nosso caso, o período 0hpa – utilizando a fórmula descrita na Figura 9.

$$2^{-\Delta\Delta Cq}$$

**FIGURA 9: Fórmula para cálculo de expressão relativa proposta por Livak & Schmittgen (2001),** sendo o primeiro  $\Delta Cq$  resultado da diferença entre a expressão do alvo analisado e do gene normalizador e o segundo  $\Delta Cq$  a diferença entre o primeiro  $\Delta Cq$  e a diferença entre expressão do alvo no grupo controle e do gene normalizador.

### 3.3.9. qRT-PCR dos RNAs mensageiros alvo

Para validar o papel funcional dos genes de desenvolvimento ósseo *sp7*, *bglap*, *runx2a*, *runx2b* e *spp1* durante o processo de regeneração, utilizamos a técnica de RT-qPCR em amostras de todos os tratamentos. Para tal, buscamos na literatura *primers* para amplificar os 5 genes (descritos no Quadro 2) e 5 possíveis normalizadores -  $\beta$ -actina, *gapdh*, *ef1a*, *b2m* e *18s* – cuja sequência se encontra no Quadro 3. Dentre os 5 candidatos, selecionamos o normalizador que apresentou melhor padrão de estabilidade de expressão entre os tratamentos nos testes de eficiência e otimização.

**QUADRO 2** – *Primers* para a análise da expressão dos mRNAs estudados.

| Genes              | Par de <i>primers</i>               | Referência                               |
|--------------------|-------------------------------------|------------------------------------------|
| dre- <i>sp7</i>    | F= 5' CGCTCAATCCTCAAATGCCG 3'       | Customizado (mRNA accession NM_212863.2) |
|                    | R= 5' AATCGCAAGAAGACCTCCCG 3'       |                                          |
| dre- <i>runx2a</i> | F= 5' CCCAACTTTCTGTGCTCGTG 3'       | Customizado (mRNA accession NM_212863.2) |
|                    | R= 5' TTTCTGTCTGTGTCTTCGTGGC 3'     |                                          |
| dre- <i>runx2b</i> | F= 5' ACACCAGACCCTCACTCAG 3'        | Geurtzen et al., 2014                    |
|                    | R= 5' GACAGCGGAGTGGTGGAG 3'         |                                          |
| dre- <i>bglap</i>  | F= 5' TCTTCCTGACTCCTCAGATACTAAAC 3' | Aceto et al., 2015                       |
|                    | R= 5' TTCCAGCCCTCTTCTGTCTC 3'       |                                          |
| dre- <i>spp1</i>   | F= 5' CGCCACAGTCTTCTGTGTACC 3'      | Aceto et al., 2015                       |
|                    | R= 5' TTGAACAATTACAAGCTCTTCTGAG 3'  |                                          |

**QUADRO 3** – *Primers* dos candidatos a normalizador para os experimentos de RT-qPCR dos mRNAs estudados.

| Genes             | Par de <i>primers</i>             | Referência                                  |
|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| dre- <i>bact2</i> | F= 5' GCTAGTGCGGAATATCATCTGCTT 3' | Customizado (mRNA accession NM_181601.4)    |
|                   | R= 5' CATACCAACCATGACACCCTGATG 3' |                                             |
| dre- <i>ef1a</i>  | F= 5' TTCAACGCTCAGGTCATCATCC 3'   | Customizado (mRNA accession NM_131263.1)    |
|                   | R= 5' AAGTAGAGTGCCAGGTTTAGAGA 3'  |                                             |
| dre- <i>gapdh</i> | F= 5' CTCACAAACGAGGACACAACCAAA 3' | Customizado (mRNA accession NM_001115114.1) |
|                   | R= 5' GTCAGAAAGCAGCAGCGGT 3'      |                                             |
| dre- <i>b2m</i>   | F= 5' GCCTTCACCCAGAGAAAGG 3'      | McCurley & Callard, 2008                    |
|                   | R= 5' GCGGTTGGGATTTACATGTTG 3'    |                                             |
| dre- <i>18s</i>   | F= 5' TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG 3'   | McCurley & Callard, 2008                    |
|                   | R= 5' CGGAGGTTCTGAAGACGATCA 3'    |                                             |



Para a otimização da quantidade de *primers* a ser usada nos ensaios de qPCR, testamos as concentrações 0,25; 0,4; 0,5 e 0,7 uM de *primers* em amostras de cauda de *zebrafish*. Avaliamos as curvas de dissociação – que mostram a especificidade dos *primers* e a ocorrência de dimerização - e a variação dos Cqs entre as diferentes concentrações, a fim de verificar a partir de que concentração o Cq não aumenta, o que indica quantidade ótima de primer a ser utilizada em cada reação. Nos testes de eficiência, realizamos diluições seriadas de cDNA molde e, após a reação, fizemos uma regressão entre os Cqs obtidos e o log das concentrações testadas (100 ng, 20 ng, 4 ng, 0,8 ng e 0,16 ng). Utilizando a inclinação da reta da regressão (slope), calculamos a eficiência dos *primers*, conforme sugerido por Michael W. Pfaffl, no trabalho “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR” publicado em 2001.

Todos os experimentos de transcrição reversa para geração de cDNA foram realizados utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA), enquanto a qPCR foi realizada com o mix *Real Q Plus Master Mix green High Rox* (Ampliqon, Dinamarca). Em ambos os protocolos foram seguidas as orientações do fabricante.

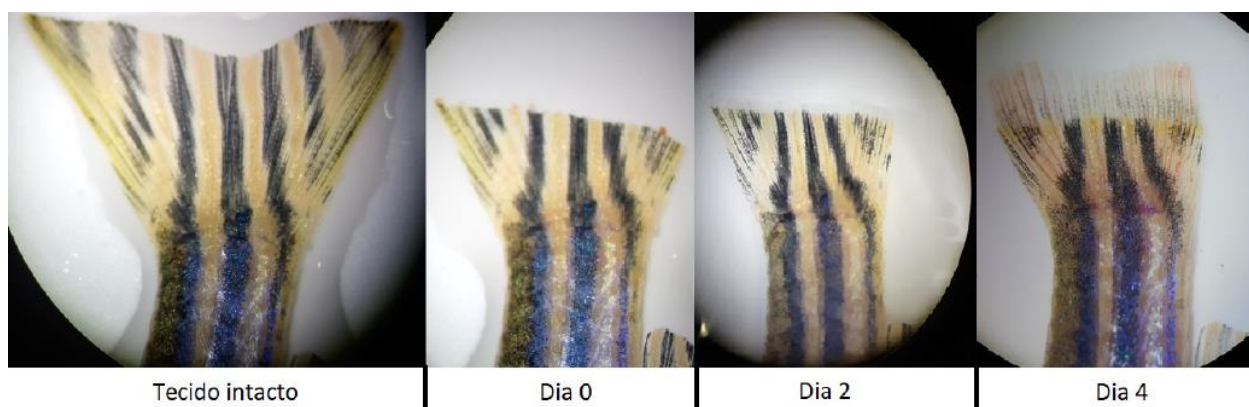
### 3.3.10. Análise dos resultados dos experimentos de RT-qPCR

Os perfis de expressão relativa de todos os experimentos de RT-qPCR foram calculados utilizando o método de Cq comparativo (Livak & Schmittgen, 2001) descrito no item 3.3.8. Os valores de *fold change* obtidos foram submetidos a testes de correlação de *Spearman* (r) para dados não paramétricos, com  $p < 0,5$  utilizando o software GraphPad Prism v7.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Coleta e processamento das amostras

Como descrito no item 3.3.1, as amostras foram coletadas em 7 diferentes períodos, a 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas pós-amputação (hpa). Durante as coletas pudemos acompanhar e registrar o processo de regeneração da nadadeira caudal como mostra a Figura 10.

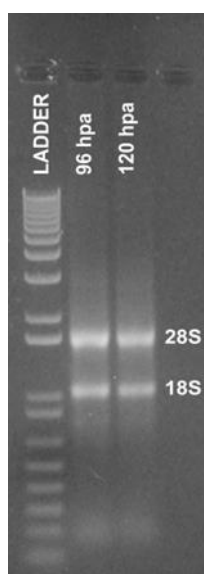


**FIGURA 10: Acompanhamento da regeneração da nadadeira caudal do *zebrafish* em 4 dos períodos estudados: cauda intacta e amputada no período 0hpa, períodos 48hpa (Dia 2) e 96hpa (Dia 4).**

As amostras de RNA total coletadas entre os períodos 0 a 72 hpa apresentaram boa qualidade e concentração, como mostra o Quadro 5 com os valores obtidos no Bioanalyzer. As amostras dos períodos 96 e 120hpa, coletadas posteriormente, apresentaram-se íntegras, como demonstrado em gel de agarose 1% da Figura 11. Sua concentração obtida por Nanodrop foi de 1267 e 1040,6 ng/ul respectivamente, de maneira que consideramos ótimos os parâmetros obtidos.

**QUADRO 5** – Ótimos parâmetros e concentração (ng/ul) encontrados nas amostras dos períodos de 0 a 72hpa submetidas à bioanalyzer. Valores de referência quanto a pureza: A260/280nm > 1,8; A260/230nm >2,0 e <2,3) e quanto a integridade: RIN= > 7,0.

| ID bioanalyzer | ID LGEM | RIN  | Concentração [ng/ul] | 260/280 | 260/230 |
|----------------|---------|------|----------------------|---------|---------|
| 1              | 0 hpa1  | 8.40 | 270                  | 1,93    | 2,02    |
| 2              | 0 hpa2  | 9.10 | 161                  | 1,88    | 1,36    |
| 3              | 12 hpa1 | 8.40 | 137                  | 1,95    | 2,15    |
| 4              | 12 hpa2 | 8.80 | 138                  | 1,93    | 2,29    |
| 5              | 24 hpa1 | 8.80 | 99                   | 1,96    | 2,18    |
| 6              | 24 hpa2 | 8.80 | 164                  | 1,98    | 2,24    |
| 7              | 36 hpa1 | 8.90 | 155                  | 2,01    | 1,96    |
| 10             | 36 hpa2 | 8.70 | 149                  | 2,00    | 2,09    |
| 8              | 48 hpa1 | 9.10 | 175                  | 2,01    | 2,21    |
| 9              | 48 hpa2 | 8.80 | 113                  | 2,00    | 2,11    |
| 11             | 72 hpa1 | 9.0  | 208                  | 2,02    | 1,89    |
| 12             | 72 hpa2 | 8.70 | 153                  | 2,01    | 2,11    |

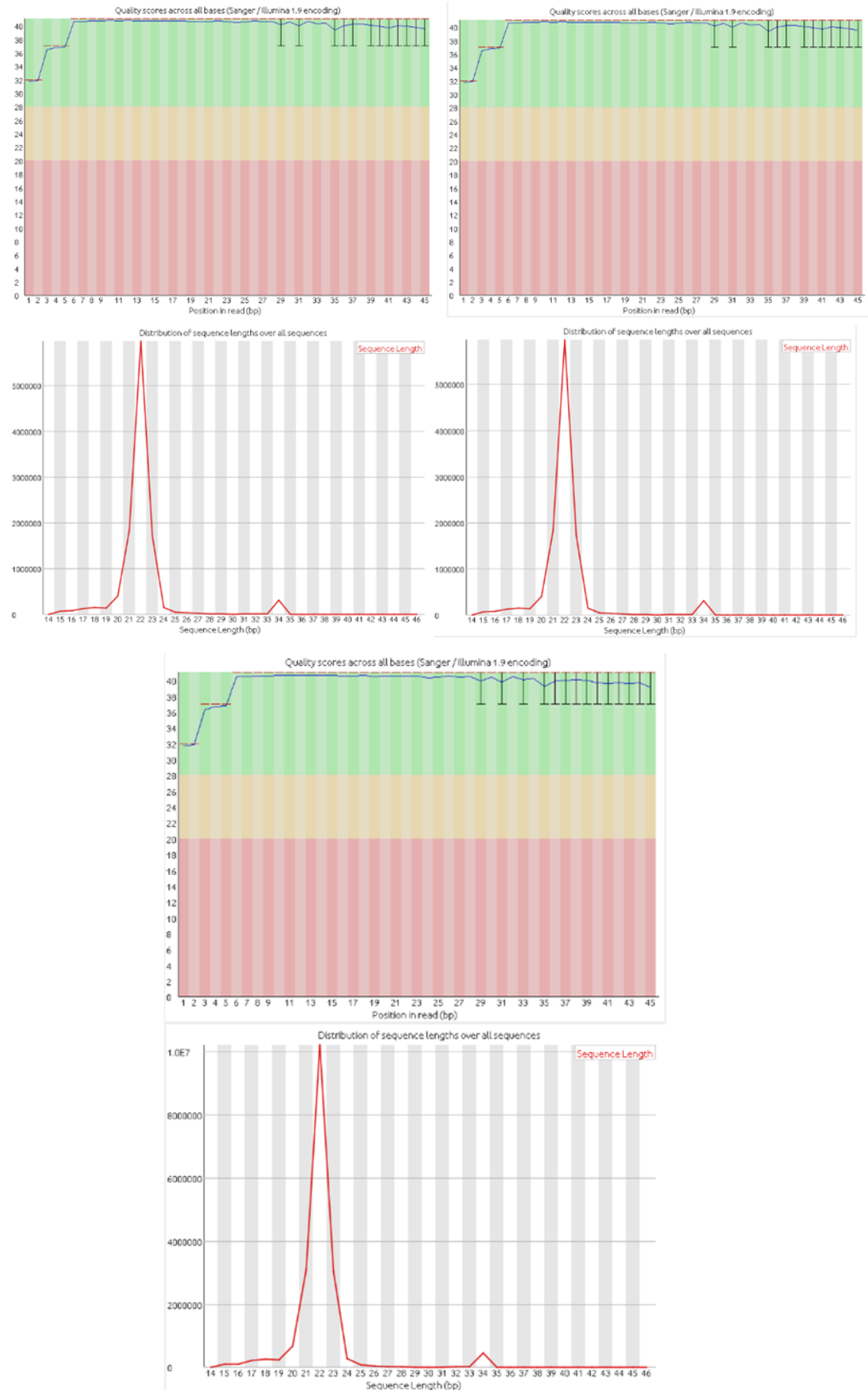


**FIGURA 11:** Gel de agarose 1%. Na primeira coluna podemos ver o marcador ladder 1kb plus e as amostras 96 e 120 hpa nas colunas seguintes, com as bandas 28S e 18S demarcadas, indicando a boa integridade das amostras.

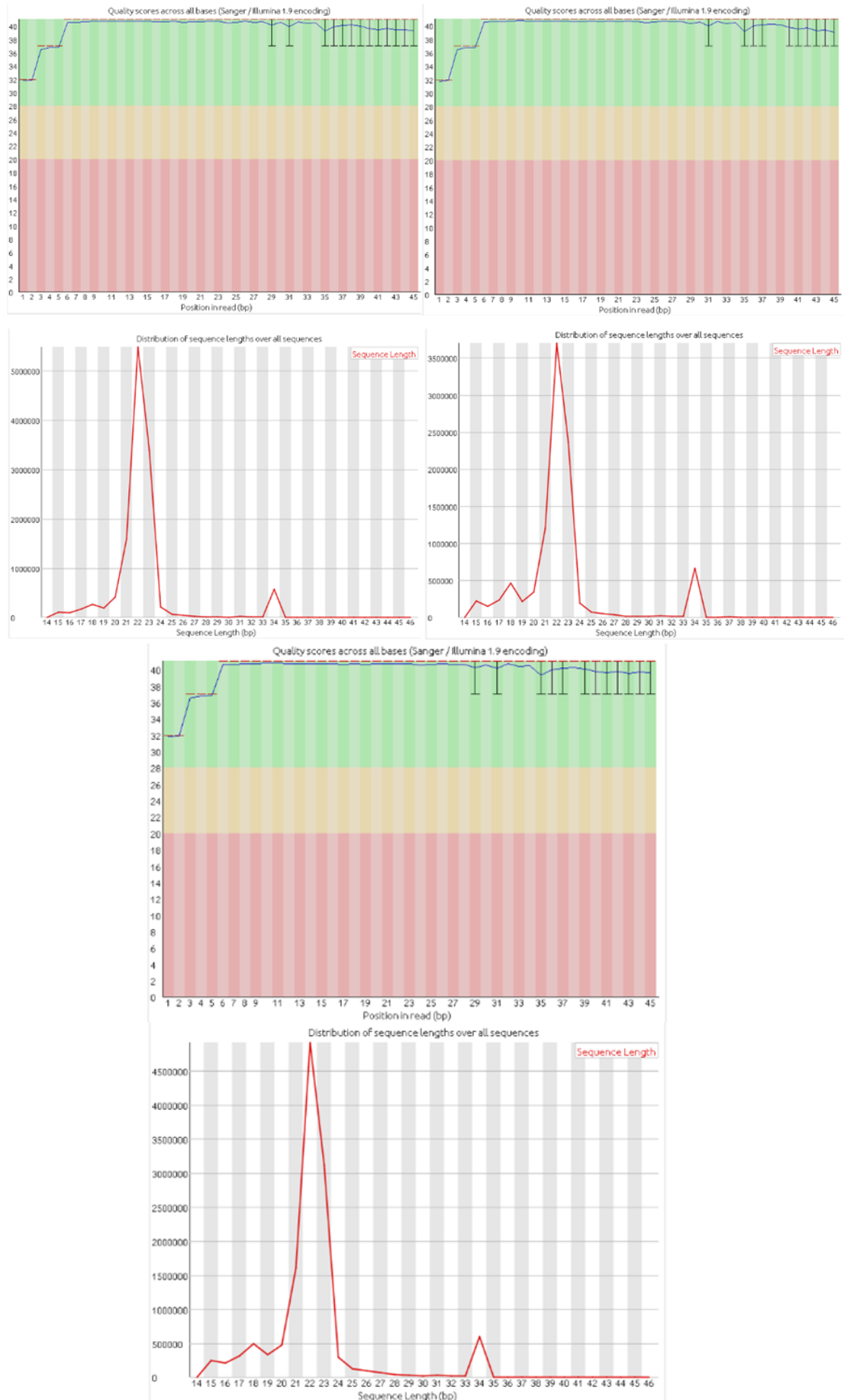
#### 4.2. Sequenciamento de miRNAs.

Conforme pode ser observado na Figura 12, todas as amostras sequenciadas apresentaram ótima qualidade com a presença de grandes picos no comprimento de ~22 pb, que indica presença de miRNAs maduros e picos menores a ~34 pb, que pode indicar a presença de piwi-RNAs, outra classe de pequenos RNAs, cujos dados serão analisados em momento oportuno.

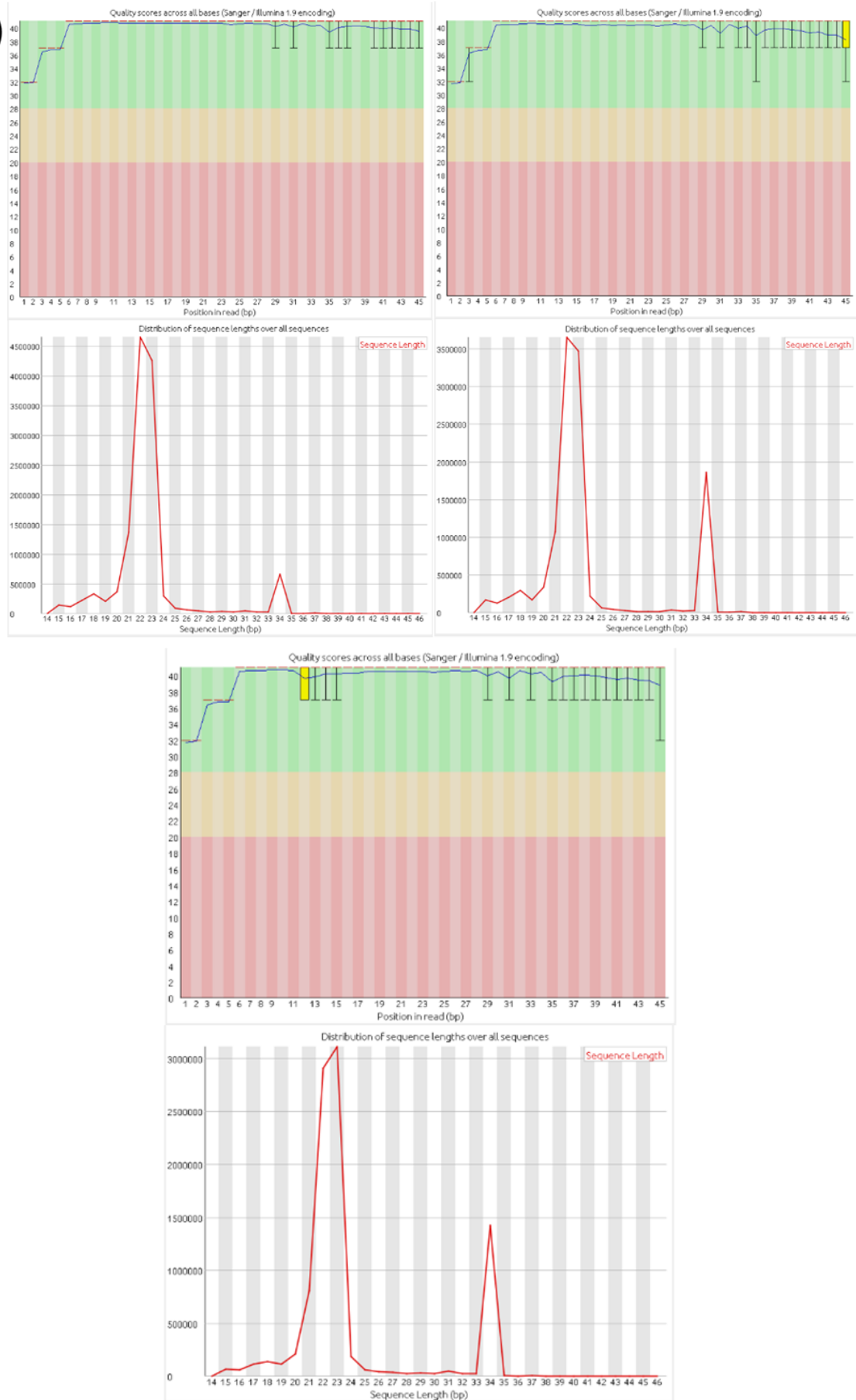
(A)

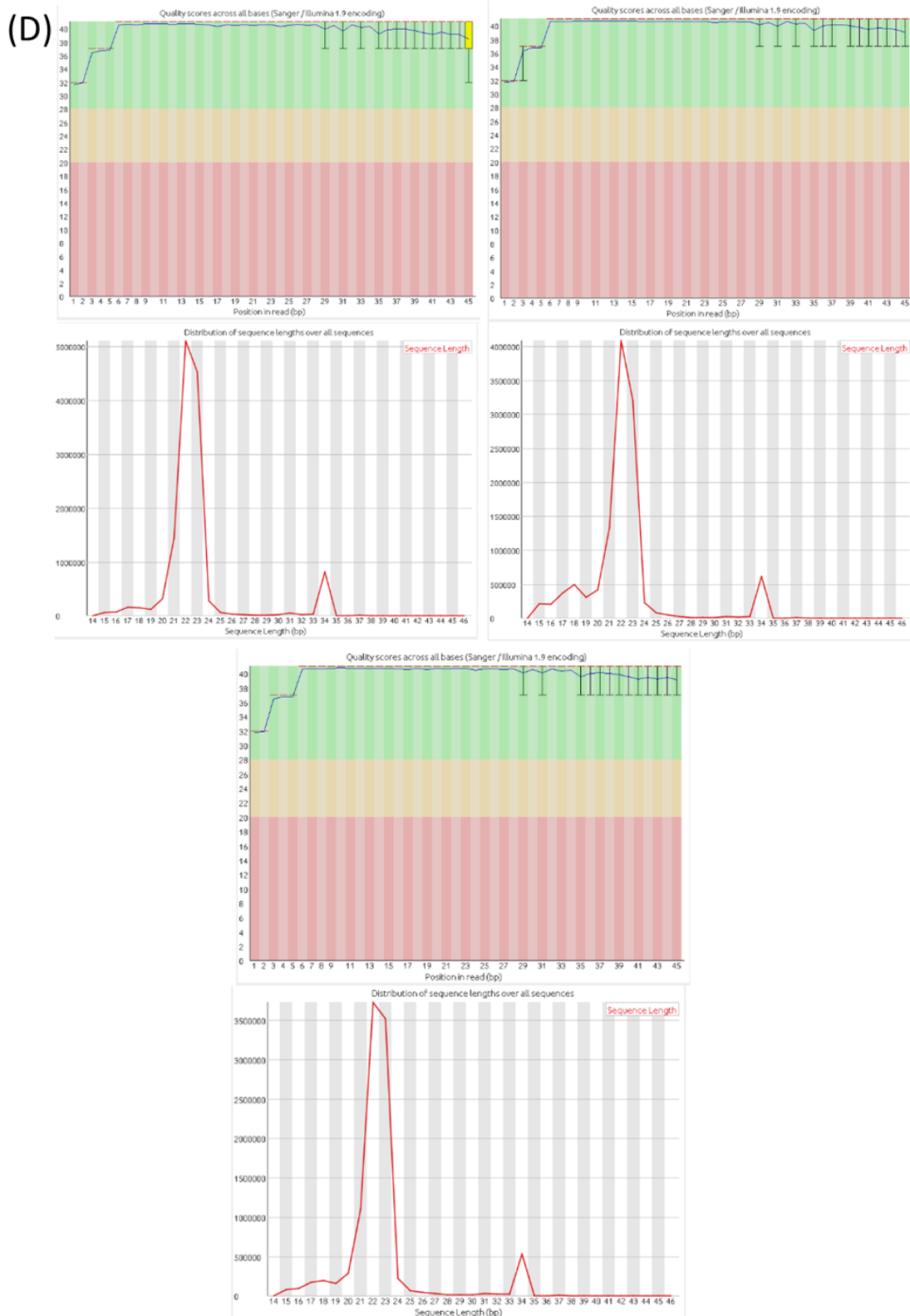


(B)



(C)





**FIGURA 12: Gráficos de score de qualidade do sequenciamento**, apresentando boa qualidade das amostras e de distribuição de tamanho das seqüências, com a presença de grandes picos no comprimento de ~22 pb, que indica presença de miRNAs e picos menores a ~34 pb, que pode indicar a presença de piwi-RNAs sendo (A) referente ao período de 0 hpa, (B) 24 hpa, (C) 48 hpa e (D) 72 hpa.

Na primeira etapa de quantificação de miRNAs verificamos 290 microRNAs precursores (pré-miRNAs) expressos, dentre os 369 pré-miRNAs descritos nos bancos de dados *miRBase* e *miRGeneDB* para *zebrafish*. Também identificamos 34 pré-miRNAs potencialmente novos, não anotados nessa espécie, e que apresentaram boa taxa de verdadeiro positivo, como mostra o Quadro 6.

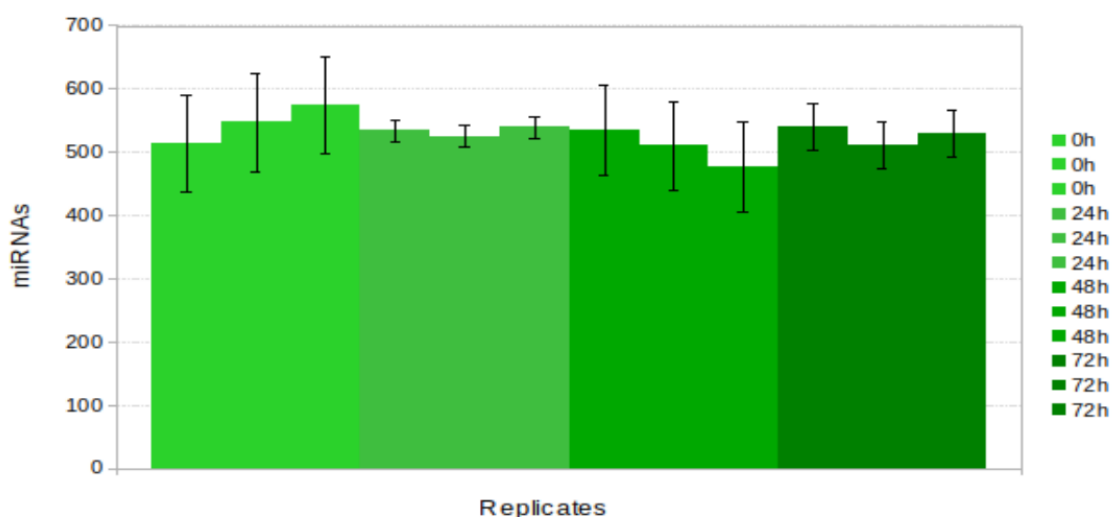
Utilizando um método mais robusto para a quantificação (Shortstack-unique) foi possível detectar 629 miRNAs maduros (5p/3p) expressos, somando-se toda a diversidade verificada nos diferentes intervalos de regeneração.

A análise seguinte, referente à diversidade de miRNAs expressos entre os intervalos de regeneração analisados, revelou que não houve variação significativa na expressão ( $P > 0,05$ ) como mostra a Figura 13.

**QUADRO 6** – Resumo dos dados brutos obtidos no sequenciamento de miRNAs das triplicatas técnicas amostrais dos períodos 0, 24, 48 e 72hpa.

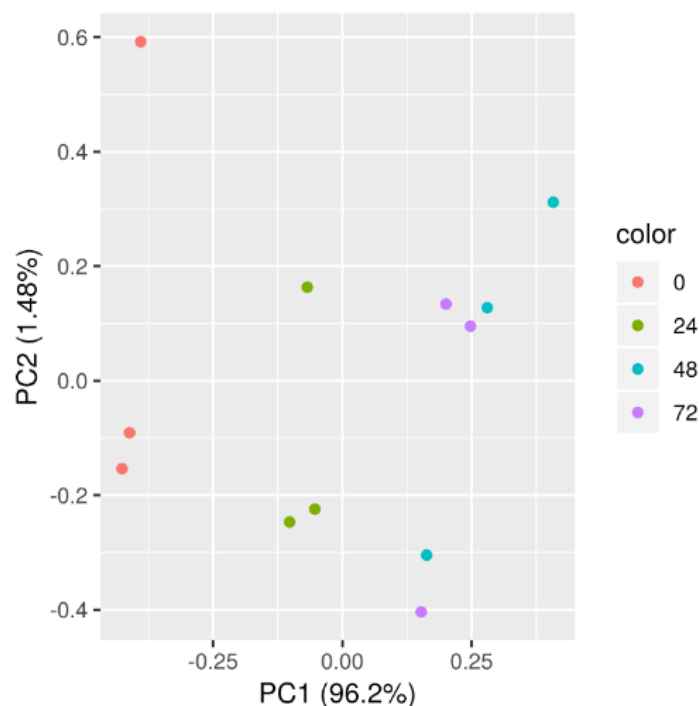
|                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Reads totais                                                                | 116415993 |
| Reads mapeadas                                                              | 103735993 |
| Reads não mapeadas                                                          | 12680000  |
| Potenciais novos pre-miRNAs<br>(mirdeep score de alta confiança $\geq 4$ )  | 34        |
| Potenciais novos pre-miRNAs<br>(mirdeep score de baixa confiança $\leq 4$ ) | 138       |
| Pre-miRNAs conhecidos<br>(mirdeep score de alta confiança $\geq 4$ )        | 251       |
| Pre-miRNAs conhecidos<br>(mirdeep score de baixa confiança $\leq 4$ )       | 39        |
| Total de pre-miRNAs identificados                                           | 462       |





**FIGURA 13:** Gráfico com distribuição da quantidade de miRNAs expressos (>0 reads) entre as triplicatas dos períodos 0, 24, 48 e 72 horas pós-amputação (hpa). As barras de erro representam intervalo de confiança ( $\alpha = 0,05$ ).

Na análise de expressão diferencial, geramos um gráfico de dispersão de *Principal Component Analysis* (PCA) utilizando *General Linear Model* (GLM) para estimar a dispersão dos dados, juntamente com o *Likelihood Ratio Tests* (LRT) e TMM para a normalização dos counts. Dessa maneira, observamos que apenas os grupos referentes aos períodos de 0 hpa e 24 hpa se distinguem de forma clara dos demais quanto ao nível de expressão. Conforme observado no PCA, podemos observar mais elementos DEs entre as amostras 0 hpa e demais tempos (0 hpa vs 24, 48 e 72 hpa) do que entre as demais comparações intra grupos (48vs24, 72vs24, 72vs48) (Figura 14).



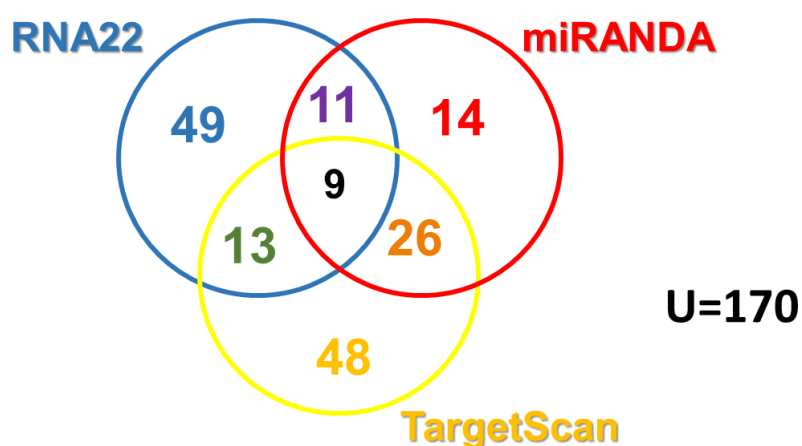
**FIGURA 14: Gráfico de Principal Component Analysis (PCA).** Os círculos em dispersão indicam elementos diferencialmente expressos entre os grupos. Os vermelhos indicam os dados em triplicata referentes as amostra de 0 hpa, círculos em verde, referente as amostras de 24hpa, círculos azuis referentes as amostras de 48 hpa e círculos roxos às amostras de 72hpa. Apenas os grupos referentes aos períodos de 0 hpa e 24 hpa se distinguem de forma clara dos demais enquanto os períodos 48 e 72 hpa se agrupam.

Encontramos no total 37 miRNAs diferencialmente expressos ao longo dos 4 períodos estudados, listados no material suplementar. Interessantemente, 3 desses miRNAs ainda não haviam sido descritos no *zebrafish*: *dre-miR-n0134-3p*|2:21375500-21375558:-; *dre-miR-n0145-3p*|4:32492719-32492785:-; *dre-miR-n0048-5p*|19:16028528-16028588:-.

#### 4.3. Seleção de microRNAs alvo

A predição bioinformática de alvos das ferramentas TargetScan, miRANDA-miRSVR e RNA22 apresentaram, respectivamente 96, 60 e 82 microRNAs candidatos à regulação do gene *sp7* no *zebrafish*, sendo que a pequena intersecção entre os resultados obtidos é de apenas 9 miRNAs. Dentre esses miRNAs não estão contemplados os alvos com melhores desempenhos nas análises individuais de cada ferramenta. Já na intersecção das ferramentas TargetScan e miRANDA, obtivemos um total de 26 possíveis alvos, abrangendo alguns dos miRNAs com

melhor desempenho apresentados individualmente pela ferramenta TargetScan. Na intersecção miRANDA e RNA22 aparecem 11 alvos em comum, sendo que essa intersecção também exclui diversos miRNAs com alto desempenho nas análises individuais e, na intersecção RNA22 e TargetScan, temos um total de 13 possíveis alvos. Sendo assim, a união dos resultados individuais das ferramentas utilizadas soma um total de 170 miRNAs candidatos à regulação do gene *sp7* (Figura 15).



**FIGURA 15: Diagrama de Venn com número de alvos gerados para o *sp7* por cada ferramenta utilizada: RNA22, miRANDA e TargetScan.**

Selecionamos, quatro miRNAs: dre-let-7c-3p, dre-miR-19a-5p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203a-3p que apresentaram boa performance (score >140.00 na ferramenta miRANDA) como mostra o Quadro 7. As listas totais geradas por cada ferramenta se encontram reunidas no material suplementar.

**QUADRO 7** – miRNAs com bom score (>140.00) na ferramenta miRANDA, selecionados como possíveis candidatos a regulação de *sp7*.

| ID miRNA              | Score por Sítio de interação                             | Score total |
|-----------------------|----------------------------------------------------------|-------------|
| <u>dre-let-7c-3p</u>  | 145.00                                                   | 145.00      |
| <u>dre-mir-19a-5p</u> | 170.00<br>159.00                                         | 329.00      |
| dre-miR-20a-3p        | 142.00                                                   | 142.00      |
| dre-miR-203a-3p       | 151.00<br>143.00<br>143.00<br>143.00<br>142.00<br>142.00 | 864.00      |

#### 4.4. Parâmetros e testes de primers

Otimizamos as concentrações dos *primers* a serem utilizados nas reações e calculamos sua eficiência. Todos apresentaram expressão ótima na menor concentração de primers testada (0,25µM) e picos alinhados em suas curvas de melting. Calculamos a eficiências dos primers, sendo a dos candidatos a normalizadores listadas no Quadro 8 e dos demais genes no Quadro 9.

**QUADRO 8** – Eficiência obtida para os pares de *primers* dos genes candidato a normalizador dos experimentos de RT-qPCR de mRNAs.

| Gene           | Eficiência |
|----------------|------------|
| <b>b-actin</b> | 1,92       |
| <b>ef1a</b>    | 2,38       |
| <b>gapdh</b>   | 1,7        |
| <b>b2m</b>     | 1,46       |
| <b>18s</b>     | 1,90       |

**QUADRO 9** – Eficiência obtida para os pares de *primers* dos genes do desenvolvimento ósseo avaliados quanto a sua expressão através de RT-qPCR.

| Gene          | Eficiência |
|---------------|------------|
| <b>runx2a</b> | 2,05       |
| <b>runx2b</b> | 1,93       |
| <b>bglap</b>  | 1,85       |
| <b>spp1</b>   | 1,82       |
| <b>sp7</b>    | 2,05       |

Uma vez que devem ser considerados eficientes os *primers* que apresentam eficiência próxima de 2, selecionamos o gene da  $\beta$ -actina2 como normalizador para os experimentos de RT-qPCR dos mRNAs.

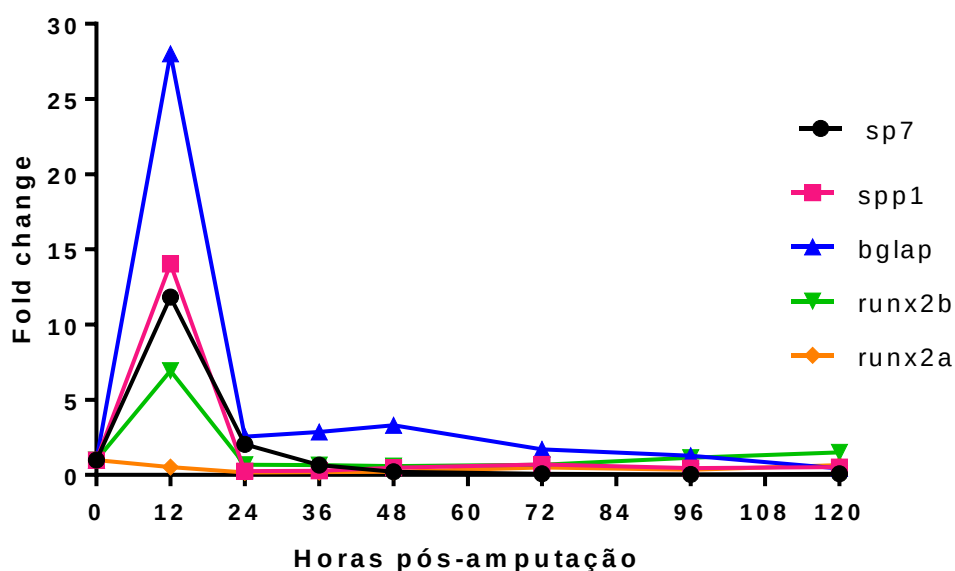
#### 4.5. Análises de expressão por RT-qPCR

Verificamos a expressão dos genes *sp7*, *runx2a*, *runx2b*, *bglap* e *spp1* em amostras da nadadeira caudal de *zebrafish* antes da amputação (0hpa) e em 7 períodos após a amputação (12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 hpa), utilizando o gene  $\beta$ -actina2 como normalizador. Os resultados em *fold change* encontram-se no Quadro 10, onde podemos observar que, com exceção do *runx2a*, todos os genes tiveram um grande aumento de expressão no período de 12 hpa: *sp7* aumentou em mais de 10 folds, *spp1* teve um aumento de 14 folds, *bglap* aumentou em quase 30 folds e *runx2b* aumentou em quase 7 folds. No período seguinte (24 hpa) todos apresentam uma queda drástica, de maneira que a expressão de *runx2b* fica meio fold menor do que sua expressão inicial; *sp7* continua diminuindo até o período de 96 hpa, tendo um leve aumento em 120 hpa; enquanto o *bglap* já volta a subir em 48 hpa, diminuindo pela metade em 72 hpa e atingindo expressão de -0,5 fold em relação a sua expressão inicial no período 0 hpa (Figura 16).

**QUADRO 10** – Resultados em *fold change* da expressão dos genes de desenvolvimento ósseo durante a regeneração da nadadeira caudal.

| Genes         | <i>Fold Change</i> por período |        |        |        |        |        |        |         |
|---------------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|               | 0 hpa                          | 12 hpa | 24 hpa | 36 hpa | 48 hpa | 72 hpa | 96 hpa | 120 hpa |
| <i>sp7</i>    | 1                              | 11,83  | 2,03   | 0,65   | 0,21   | 0,07   | 0,04   | 0,07    |
| <i>bglap</i>  | 1                              | 28,01  | 2,55   | 2,87   | 3,3    | 1,71   | 1,28   | 0,43    |
| <i>runx2b</i> | 1                              | 6,93   | 0,67   | 0,65   | 0,58   | 0,68   | 1,15   | 1,51    |
| <i>runx2a</i> | 1                              | 0,53   | 0,16   | 0,18   | 0,21   | 0,49   | 0,34   | 0,65    |
| <i>spp1</i>   | 1                              | 14,04  | 0,26   | 0,27   | 0,48   | 0,7    | 0,46   | 0,52    |

### Genes desenvolvimento ósseo



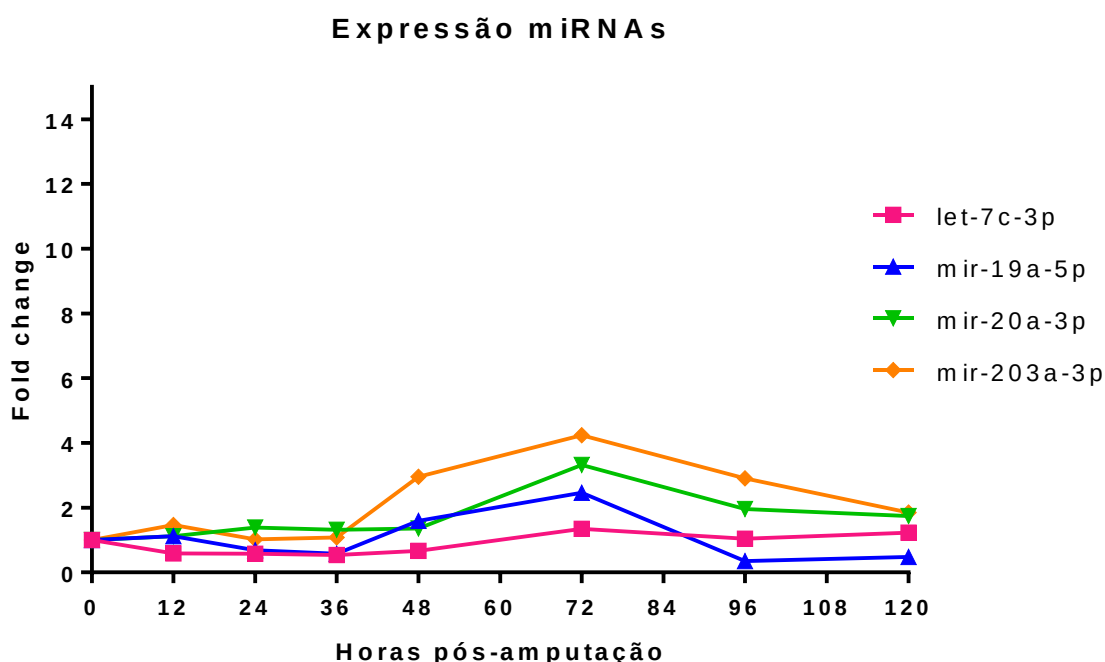
**FIGURA 16:** Gráfico com expressão dos genes *sp7* (preto), *spp1* (magenta), *bglap* (azul), *runx2b* (verde) apresentando pico no período 12hpa em 24hpa enquanto *runx2a* (laranja) permanece com expressão basal ao longo dos períodos pós-amputação da nadadeira caudal do zebrafish.

Verificamos também a expressão dos microRNAs dre-let-7c-3p, dre-mir-19a-5p, dre-miR-20a-3p e miR-203a-3p nas mesmas amostras e períodos que os genes citados acima, utilizado como normalizador o gene snRNA U6 de Homo sapiens. Os resultados em *fold change* encontram-se no Quadro 11, onde observamos que cada miRNA apresentou um perfil de expressão ligeiramente distinto dos demais. O único miRNA a apresentar diminuição de expressão no período de 12 hpa ( $\sim 0,5$  Fold Change), dre-let-7c-3p volta a ter sua expressão aumentada a partir do período de 48hpa, atingindo seu pico em 72 hpa (0,3 Fold change a mais que sua expressão

inicial) e diminui para sua expressão basal em 96 hpa, voltando a subir em 120 hpa. Assim como os demais miRNAs, dre-miR-19a-5p tem um pequeno aumento no período de 12 hpa e cai para quase metade da sua expressão nos dois períodos seguintes, voltando a subir 1 fold em 48 hpa, 2 folds em 72 hpa, para também cair de novo a partir do período 96 hpa, chegando a sua menor expressão. Enquanto o dre-miR-20a-3p tem sua expressão gradativamente aumentada em mais de 2 folds até o período 72 hpa para então começar a diminuir no período de 96 hpa, o dre-miR-203a-3p tem sua expressão aumentada em aproximadamente meio fold em 12 hpa e logo cai para sua expressão inicial em 24 hpa, voltando a subir em seguida, atingindo um aumento de mais de 3 folds em 72 hpa. Assim como todos os demais miRNAs analisados, o dre-miR-203a-p também apresenta uma queda, dessa vez de quase 2 folds a partir de 96 hpa (Figura 17).

**QUADRO 11** – Resultados em *fold change* da expressão dos microRNAs dre-let-7c-3p, dre-mir-19a-5p, dre-miR-20a-3p e miR-203a-3p durante a regeneração da nadadeira caudal.

| miRNAs                 | <b><i>Fold Change</i> por período</b> |               |               |               |               |               |               |                |
|------------------------|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
|                        | <b>0 hpa</b>                          | <b>12 hpa</b> | <b>24 hpa</b> | <b>36 hpa</b> | <b>48 hpa</b> | <b>72 hpa</b> | <b>96 hpa</b> | <b>120 hpa</b> |
| <b>dre-let-7c-3p</b>   | 1                                     | 0,59          | 0,58          | 0,54          | 0,67          | 1,35          | 1,04          | 1,23           |
| <b>dre-miR-19a-5p</b>  | 1                                     | 1,12          | 0,69          | 0,58          | 1,59          | 2,46          | 0,35          | 0,48           |
| <b>dre-miR-20a-3p</b>  | 1                                     | 1,12          | 1,39          | 1,32          | 1,36          | 3,32          | 1,96          | 1,74           |
| <b>dre-miR-203a-3p</b> | 1                                     | 1,47          | 1,02          | 1,08          | 2,96          | 4,24          | 2,91          | 1,85           |



**FIGURA 17: Gráfico com expressão dos miRNAs** dre-let-7c-3p (azul), dre-mir-19a-5p (roxo), dre-miR-20a-3p (verde) e miR-203a-3p (laranja) que apresentam expressão crescente entre os períodos 36 a 72hpa seguidos de diminuição até o período 120hpa da nadadeira caudal do *zebrafish*.

Após obter os perfis de expressão de ambos os experimentos, realizamos teste de correlação de Spearman ( $r$ ) para avaliar a possibilidade de correlação entre a expressão dos miRNAs com a expressão encontrada do gene *sp7* (Figura 17).

Com exceção do miRNA dre-miR-19a-5p, todos os miRNAs apresentaram valores ( $r$ ) negativos, indicando possível correlação negativa, sendo os valores -0,71 para o dre-let-7c-3p, -0,77 para o dre-miR-20a-3p – sendo esse o único valor estatisticamente significativo ( $\alpha = 0,05$ ) – e -0,68 para o dre-miR-203a-3p.

#### 4.6. Análise da conservação evolutiva da interação microRNA-alvo

As sequências dos microRNAs maduros obtidas conforme descrito no item 3.3.6 e, como pode ser observado na Figura 18 A e B, apenas o miRNA let-7c-3p apresentou sequência completamente igual em todas as espécies analisadas. Embora apresente terminação diferente em mamíferos (alteração de “U” nos demais grupos para “A” em mamíferos), o miRNA miR-203a-3p apresenta região *seed* bem conservada entre os vertebrados. Dentre os que mais apresentaram variações, o



miR-19a-5p não apresentou tantas variações ao longo da sequência, mas uma *seed* com diversas variações. Já o miR-20a-3p, que também apresentou variações entre as sequências, coloca em evidência o acréscimo de 5 nucleotídeos em *Gallus gallus*, de maneira que sua *seed* é totalmente distinta das demais.

As mesmas espécies foram utilizadas para compararmos as sequências da região 3'UTR do gene *sp7* e as MREs dos miRNAs let-7c-3p, miR-19a-5, miR-20a-3p e miR-203a-3p como mostra a Figura 19. Podemos observar que grupos mais basais como peixes e anfíbios apresentaram MREs para todos os miRNAs selecionados e em maior quantidade, enquanto o grupo dos mamíferos não apresentou MREs para os miRNAs analisados. Já no grupo das aves e dos répteis, podemos observar um número menor de MREs, de maneira que o grupo das aves apresenta MRE apenas para o miR os reptéis não apresentam MREs para o miR-203a-3p.

(A)

| let-7c-3p                    | sequência |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Danio rerio</i>           | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Xenopus laevis</i>        | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Anolis carolinensis</i>   | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Gallus gallus</i>         | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Mus musculus</i>          | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Rattus norvegicus</i>     | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |
| <i>Homo sapiens</i>          | C         | U | G | U | A | C | A | A | C | C | U | U | C | U | A | G | C | U | U | C |

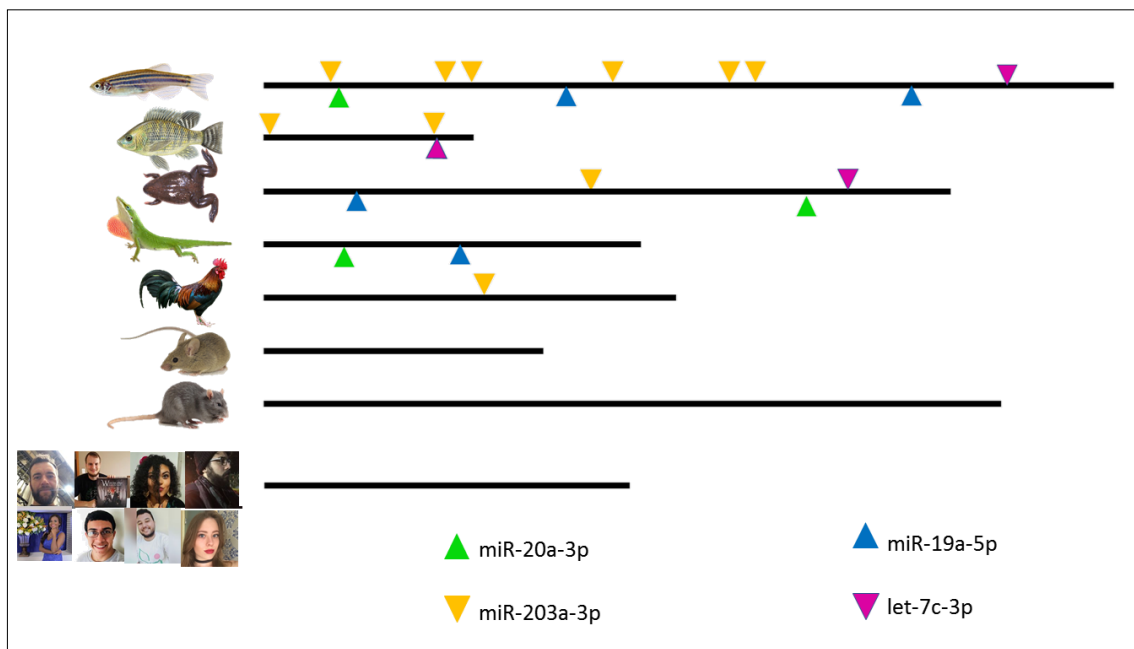
| miR-19a-5p                   | sequência |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|------------------------------|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Danio rerio</i>           | -         | C | U | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Oreochromis niloticus</i> | -         | - | - | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | G |
| <i>Xenopus laevis</i>        | U         | C | - | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Anolis carolinensis</i>   | -         | - | U | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Gallus gallus</i>         | -         | - | - | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Mus musculus</i>          | -         | - | U | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Rattus norvegicus</i>     | -         | - | U | C | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |
| <i>Homo sapiens</i>          | -         | - | - | A | G | U | U | U | U | G | C | A | U | A | G | U | U | G | C | A |

(B)

| miR-20a-3p            |   |   |   |   | sequência |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |
|-----------------------|---|---|---|---|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| Danio rerio           | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | G | U | G | U | G | A | G | C | A | C | U | U | G | A | A | G | - |  |
| Oreochromis niloticus | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | A | U | G | U | A | A | G | C | A | C | U | U | G | A | A | G | U |  |
| Xenopus laevis        | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | U | A | A | U | G | A | G | C | A | C | U | U | A | A | A | - | - |  |
| Anolis carolinensis   | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | U | U | A | C | G | A | G | C | A | C | U | U | A | A | A | G | U |  |
| Gallus gallus         | A | A | U | C | U         | A | C | U | G | C | A | U | A | U | A | A | G | C | A | C | U | U | A | A | A | G | U |  |
| Mus musculus          | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | U | U | A | C | G | A | G | C | A | C | U | U | A | A | A | G | - |  |
| Rattus norvegicus     | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | U | U | A | C | G | A | G | C | A | C | U | U | A | C | A | - | - |  |
| Homo sapiens          | - | - | - | - | A         | C | U | G | C | A | U | U | A | U | G | A | G | C | A | C | U | U | A | A | A | G | - |  |

| miR-203a-3p           |   |   |   |   | sequência |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------|---|---|---|---|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--|--|--|--|--|--|
| Danio rerio           | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | U | G |  |  |  |  |  |  |
| Oreochromis niloticus | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | U | G |  |  |  |  |  |  |
| Xenopus laevis        | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | U | G |  |  |  |  |  |  |
| Anolis carolinensis   | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | U | G |  |  |  |  |  |  |
| Gallus gallus         | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | U | G |  |  |  |  |  |  |
| Mus musculus          | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | A | G |  |  |  |  |  |  |
| Rattus norvegicus     | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | A | G |  |  |  |  |  |  |
| Homo sapiens          | G | U | G | A | A         | A | U | G | U | U | U | A | G | G | A | C | C | A | C | U | A | G |  |  |  |  |  |  |

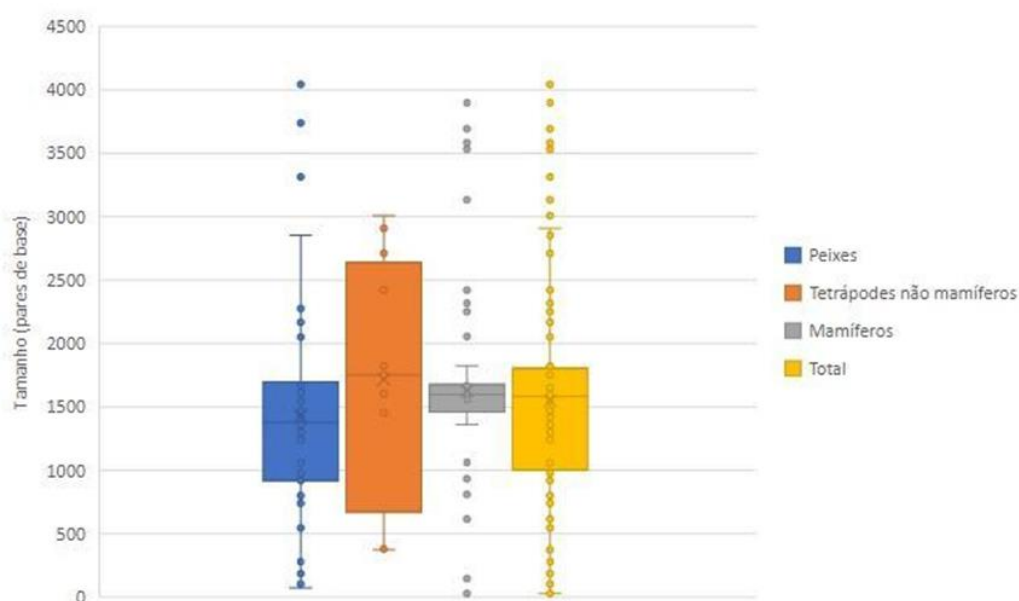
**FIGURA 18:** Sequência dos microRNAs maduros de *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*, *Xenopus tropicalis*, *Anolis carolinensis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*. 12(A) Sequência dos miRNAs maduros let-7c-3p - totalmente conservado entre as espécies analisadas - e miR-19a-5p, mais variado entre os grupos, com seed não conservada devido a adição de bases no início e fim da sequência. 12(B) Sequência dos miRNAs maduros miR-20a-3p – bem variado entre os grupos e com adição de 5 bases em *Gallus gallus*, a seed mais distinta entre as espécies analisadas - e miR-203a-3p que, mesmo apresentando uma variação em sua porção terminal dentro do grupo dos mamíferos, apresenta região seed totalmente conservada entre as espécies analisadas



**FIGURA 19:** Alinhamento da região 3'UTR do gene *sp7* das espécies (descritas do topo para baixo): *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*, *Xenopus tropicalis*, *Anolis carolinensis*, *Gallus gallus*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*. Os sítios de ligação miRNA-alvo (MREs) existentes nas sequências de DNA estão destacados com pontas de seta para os miRNAs let-7c-3p (magenta), miR-19a-5p (azul), miR-20a-3p (verde) e miR-203a-3p (laranja), de maneira que se observa diminuição da presença / quantidade de MREs em aves e mamíferos em relação a peixes e anfíbios.

Realizamos também a predição de alvos dos miRNAs dre-let-7c, dre-miR-19a-5p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203-3p para as demais espécies em que obtivemos a sequência da região 3'UTR do *sp7* utilizando as ferramentas miRNDa e TargetScan. Somando os resultados obtidos com ambas as ferramentas, encontramos interações do dre-let-7c-3p em 33% das espécies de peixes, 17% dos anfíbios e em 4% dos mamíferos, somando 19% do total de espécies analisadas; para o dre-miR-19a-5p foram encontradas interações em 17% das espécies de peixes, 8% dos anfíbios e nenhuma interação em mamíferos, totalizando 8% das espécies analisadas. Já para o dre-miR-20-3p foram encontradas interações em 40% das espécies de peixes, 33% das espécies de anfíbios e 17% das espécies de mamíferos, incluindo as espécies *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Finalmente, para o dre-miR-203a-3p, foram preditas interações com a região 3'UTR do *sp7* de 48% das espécies de peixes, 17% das espécies de anfíbios e 2% das espécies de mamíferos.

Entre as diferenças entre a região 3'UTR do *sp7*, destacamos também a variedade de tamanhos (em pares de base) encontrados entre os grupos de vertebrados analisados – peixes, tetrápodes não mamíferos e mamíferos (Figura 20). A lista completa contendo o tamanho dessa região e os miRNAs preditos se encontra no material suplementar.



**FIGURA 20: Variação do tamanho médio (em pares de base) da região 3'UTR gene *sp7* entre peixes (azul), tetrápodes não mamíferos (laranja) e mamíferos (cinza), sendo o grupo com maior variedade de tamanhos de 3'UTR de *sp7* o grupo dos tetrápodes não mamíferos, e o menos variável o dos mamíferos.**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Sequenciamento de miRNAs

Os dados de caracterização de expressão de microRNAs por sequenciamento em larga escala, e em especial, a análise desses dados por PCA (Figura 10) demonstram um agrupamento diferencial dos transcritos dos mais de 600 microRNAs expressos, entre os diferentes períodos analisados. De fato, Pfefferli & Jázwinska (2009) descrevem, em seu trabalho sobre a regeneração da nadadeira caudal, eventos ordenados e agrupados por períodos, de maneira que cada etapa da regeneração é marcada por eventos específicos. Dentre os períodos descritos, os autores caracterizam o período 0 hpa como o tecido em homeostase, 24 hpa como momento de proliferação de células mesenquimais e formação do blastema e, o período de 48 hpa até 120 hpa, como o de crescimento do blastema e formação das actinotriquiás – que são pequenas espículas fusiformes que sustentam as bordas da nadadeira caudal dos teleósteos. Nesse contexto, sabendo-se que os miRNAs realizam ajuste fino da transcrição e podem cooperar para regular genes com funções biológicas semelhantes (Oliveira et al., 2019), era esperado que encontrássemos os mesmos miRNAs expressos em períodos cujos processos celulares fossem semelhantes, resultando em um menor número de elementos diferencialmente expressos. Isso de fato fora o resultado obtido quando da comparação entre os períodos 48 hpa e 72 hpa - caracterizados primordialmente pelos mesmos eventos: proliferação e diferenciação celular. Por outro lado, o oposto pode ser esperado quando analisamos os períodos 0hpa e 24hpa, demonstrados por nós como mais distintos dos demais quanto à expressão de miRNAs. Se em 0hpa encontramos um tecido em homeostase, sem grandes mudanças celulares, nos demais vemos um tecido injuriado passando por diversos processos moleculares e celulares para reconstrução do tecido, o que resultaria na expressão de elementos regulatórios distintos. Já observando o período 24 hpa, onde encontramos proliferação celular de células mesenquimais e formação do blastema, também encontramos miRNAs diferencialmente expressos na comparação aos demais períodos, o que é justificável pela regulação molecular igualmente distinta requerida neste momento específico.

Observando-se em detalhe os 37 miRNAs diferencialmente expressos ao longo dos quatro períodos analisados por sequenciamento de miRNAs, verificou-se que 14 deles são reportados na literatura como envolvidos na regulação de mecanismos de desenvolvimento ou regeneração do tecido ósseo: miR-29-5p, miR-21-5p, miR-31-3p, miR-16b-3p, miR-144-3p, miR-181b-3p, miR-2188-5p, miR-15a-3p, miR-23b-3p, miR-135c-5p, miR-181a-3p, miR-23b-5p, miR-29-5p, miR-181a-5p.

Dentre esses, gostaríamos de destacar a presença de miRNAs que, de acordo com a literatura, podem estar envolvidos com os genes do desenvolvimento ósseo analisados: miR-31-3p, miR-16b-3p, miR-135c-5p e miR-21-5p.

Além de regular *sp7* no processo de diferenciação celular das células da medula óssea em *Homo sapiens* (Baglío et al., 2013) o miR-31-3p também pode ser regulado por *runx2* (Deng et al., 2013), mostrando que, além da regulação direta entre *sp7* e *runx2* (Rashid et al., 2014) também pode haver regulação indireta desses genes mediada pela atividade de miRNAs, uma vez que *runx2* regula miR-31-3p que por sua vez é regulador de *sp7*.

Comparando-se o período 72hpa com os períodos 0hpa e 24hpa, encontramos os miRNAs miR-135c-5p e miR-21-5p apresentando expressão diferencial e aumentada. Estes dois microRNAs, por meio da inibição de *HIF1AN* e *SMAD*, respectivamente, aumentam a expressão de *runx2* e *sp7*, iniciando assim o processo de diferenciação celular de osteoblastos em roedores (Zhu et al., 2019; Arumugam et al., 2018).

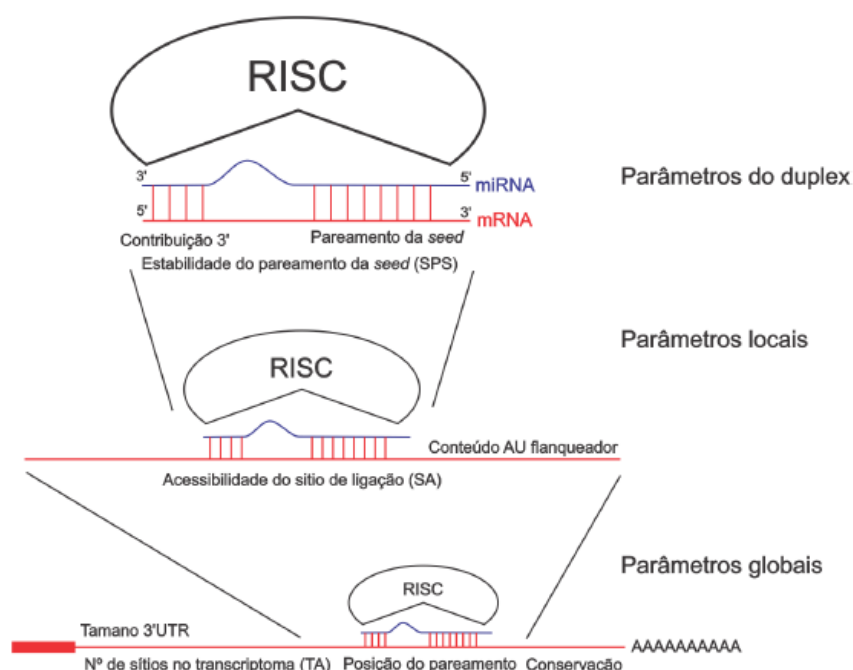
Já o miR-16b-3p, que se encontra diferencialmente expresso positivamente em 0hpa em relação a 24hpa, foi recentemente descrito como regulador de *Runx2* e *Bglap* em *Homo sapiens*, de maneira que sua inibição diminui *Runx2* e aumenta *Bglap* (Castaño et al., 2019).

Ademais, encontramos 3 novos microRNAs de *zebrafish* diferencialmente expressos, sendo n-0134-3p o único miRNA entre os períodos 48hpa e 72hpa, o que aumenta nosso interesse em investigá-los, além de apresentarem boa pontuação e já estarem descritos para outras espécies como tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*).

## 5.2. Seleção de miRNAs

Embora a importância do fator de transcrição *sp7* para a desdiferenciação celular durante a regeneração tenha sido reportada previamente (Stewart & Stankunas, 2012), ainda permanecem pouco conhecidos os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo. Dessa maneira, executamos outra estratégia, já direcionada à busca de miRNAs candidatos à regulação de *sp7* e que estivessem expressos nas amostras tendo como base os dados de sequenciamento, para melhor compreender este evento comum à regeneração epimórfica.

As três ferramentas de predição utilizadas - TargetScan, miRANDA-miRSVR e RNA22 - baseiam-se em parâmetros semelhantes que podem ser divididos em três grupos (Figura 21): parâmetros de duplex – que consistem nos parâmetros de pareamento da *seed*, contribuição 3' e estabilidade do pareamento da *seed*; parâmetros locais – que consideram a influência da região 3'UTR no reconhecimento do mRNA como alvo de miRNAs; e os parâmetros globais – que envolvem a aferência de propriedades da 3'UTR do mRNA alvo que têm influência indireta no reconhecimento deste mRNA como alvo, como por exemplo, o tamanho dessa região, número de sítios de ligação, entre outros (Betel et al., 2010).



**FIGURA 21: Principais parâmetros utilizados durante a predição de alvos.** Figura de Betel et al. (2010) editada por Oliveira (2017).

Entretanto, para selecionar os melhores candidatos, consideramos também as diferenças entre as ferramentas. O RNA22 é a única ferramenta entre as três que inclui combinações entre sítios fora da região 3'UTR e da região seed dos miRNAs (Oliveira et al., 2017). Por isso, mesmo resultando em um menor número de alvos quando comparado com TargetScan, apresentou mais resultados inéditos do que as demais ferramentas utilizadas e, possivelmente, com mais chances de falso positivo/negativo. A ferramenta TargetScan é a única que classifica o tipo de ligação da região seed (e. g. 8-mer; 7-mer) e o score apresentado pelas três ferramentas não é proporcional ou relacionável, de maneira que Oliveira e colaboradores (2017) indicam que a melhor estratégia para ranquear a pontuação dos miRNAs é utilizar a lista gerada pela ferramenta miRANDA.

Sendo assim, utilizamos uma estratégia de três etapas para selecionar bons candidatos à regulação do fator de transcrição sp7: (i) selecionar miRNAs com boa performance na ferramenta miRANDA; (ii) se os candidatos estiverem em intersecções com a ferramenta TargetScan, dar preferência aos que apresentarem ligações do tipo 8-mer e 7-mer que são consideradas ligações mais fortes (Agarwal et al., 2015); (iii) Verificar se há indícios na literatura para possível papel funcional dos miRNAs selecionados no processo de regeneração epimórfica da nadadeira caudal do *zebrafish*.

Selecionamos, então, quatro miRNAs: dre-let-7c-3p, dre-miR-19a-5p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203a-3p que apresentaram boa performance na ferramenta miRANDA, como mostra o Quadro 7. Ademais, let-7c-3p e miR-20a-3p apresentaram ligação do tipo 7-mer e miR-203a-3p 8-mer na TargetScan, sendo que apenas o miR-19a-5p não estava presente no resultado obtido com essa ferramenta.

Na literatura, os quatro miRNAs apresentam evidências de seu papel no processo de regeneração do tecido ósseo. Kocijan e colaboradores (2016) verificaram a presença do miRNA miR-19a livre em pacientes com menos fraturas ósseas, indicando uma forte relação desse miRNA com a homeostase desse tecido. O miRNA let-7c, muito conhecido por sua função de supressor tumoral, tem sido relatado como potencial inibidor da formação e diferenciação de tecido ósseo, aparecendo em vias de proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais (Liu et al. 2018). Já o miR-20a, em contexto de diferenciação de células ósseas em

*Homo sapiens*, é um importante regulador para a diferenciação de células-tronco mesenquimais em células ósseas, aumentando a expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, como Runx2 e Sp7 (Zhang et al., 2011); enquanto o miR-203 tem sido identificado em processos de regulação indireta de vias de diferenciação de osteoblastos, alvejando genes como Dlx5, que por sua vez inibe Runx2 e Sp7 em cultura celular de *Homo sapiens* (Laxman et al., 2017), ou impedindo formação de blastema inibindo a via da  $\beta$ -catenina (Tu et al., 2016), o que impede a formação óssea heterotrópica.

Sendo assim, os quatro microRNAs selecionados mostram-se como bons candidatos à regulação de *sp7* dentro do contexto da diferenciação celular, etapa importante da regeneração epimórfica da nadadeira caudal de *zebrafish*.

### 5.3. Análises de expressão por RT-qPCR

De acordo com Dirckx e colaboradores (2013), o início do processo de regeneração óssea é marcado pela migração e recrutamento de células com potencial de diferenciação em tecido ósseo. Sabendo que, no caso das nadadeiras de *zebrafish*, tem sido demonstrado que osteoblastos (Knopf et al., 2011) e escleroblastos (Sousa et al., 2011) maduros se desdiferenciam e entram novamente no ciclo celular, podemos atribuir o pico de expressão dos 3 marcadores de ossificação no período de 12 hpa (Figura 16) à migração de células ósseas e mesenquimais em diferentes estágios de diferenciação para então iniciar a desdiferenciação antes do período de 24 hpa, marcado pela diferenciação de células mesenquimais e formação do blastema com células desdiferenciadas, como sugerem Pfefferli e Jázwinska (2015).

Apesar da grande importância gene *runx2* para diferenciação de osteoblastos (Komori 2011), nossos resultados sugerem que a cópia paráloga *runx2a* não possui envolvimento com o processo de regeneração, uma vez que sua expressão apresentou-se baixa em todos os períodos coletados (Figura 16); enquanto *runx2b* pode desempenhar um papel importante na rediferenciação celular de osteoblastos - como indica o aumento de sua expressão a partir do período de 96 hpa - e até mesmo na desdiferenciação, uma vez que tem sido apontado como regulador



associado ao *sp7* no processo de desenvolvimento do tecido ósseo (Rashid et al., 2014).

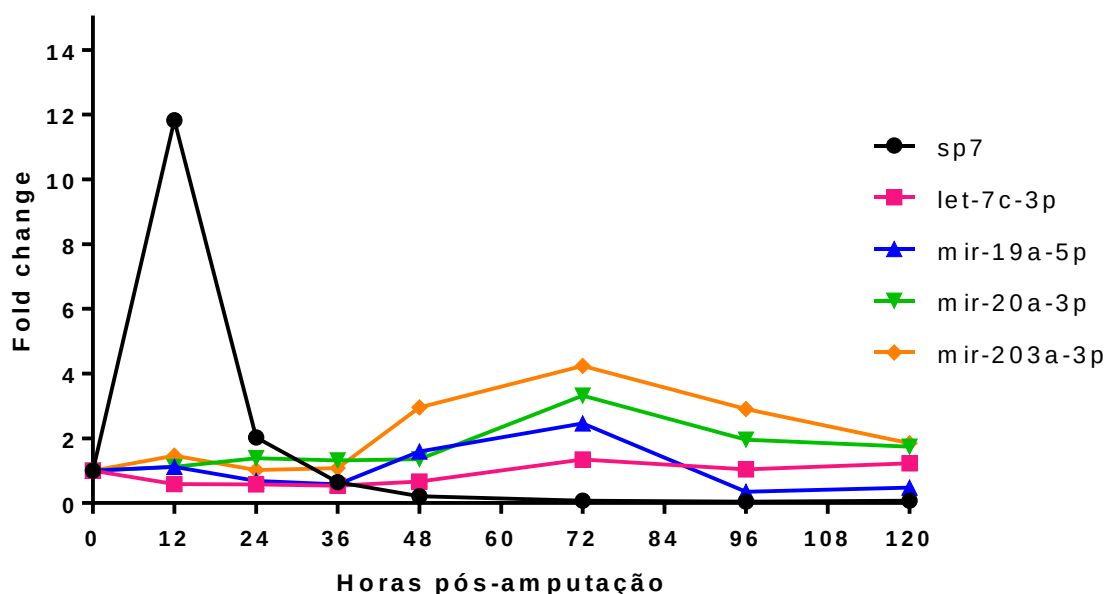
Outro ponto interessante é que o grande aumento da expressão de *bglap* e sua queda apenas após a expressão de *sp7* apresentar níveis mais baixos é a possibilidade de função reguladora exercida por *sp7* sobre *bglap*, como observado recentemente por Chen e colaboradores (2019) durante o desenvolvimento de dentes e ossificação em *zebrafish*.

Observando os resultados obtidos nos experimentos de expressão dos miRNAs, decidimos olhar com cautela para os valores de Cq gerados pela expressão do dre-miR-19a-5p, que apresentou curva de ampliação mais tardiamente que os demais miRNAs analisados. Entretanto, pela técnica de RT-qPCR, considerada "*gold standard*" e sensível o suficiente para detectar pequenas variações na expressão de miRNAs, também verificamos que em dados de sequenciamento registrados na base de dados miRBase, poucas reads por milhão foram reportadas para o dre-miR-19a-5p (variando de 0,308 a 25 reads por milhão), o que corrobora nossos achados.

Associando os resultados de expressão de cada miRNA e do gene *sp7* (Figura 21), observamos que apenas o dre-let-7c-3p e dre-miR-203a-3p aparentemente apresentam perfil de expressão antagônico ao do *sp7*. Coincidentemente, ao rodar teste o estatístico *Spearman* (*r*) de correlação para dados não paramétricos com intervalo de confiança de 95%, esses mesmos miRNAs, juntamente com o dre-miR-20a-3p, apresentaram os valores mais negativos (-0.7066; -0.6826 e -0.7665, respectivamente), mostrando maior correlação negativa, sendo apenas o resultado do dre-miR-20a-3p estatisticamente significativo, com  $p=0.0325$ .

Entretanto, sabendo que miRNAs podem se organizar em clusters para regulação fina de mecanismos biológicos (Oliveira et al., 2019) não descartamos a hipótese de que esses miRNAs regulem *sp7* de maneira cooperativa, o que torna necessária a validação das interações propostas por experimentos adicionais que avaliem a interação física entre essas moléculas.

### Expressão gene *sp7* e miRNAs

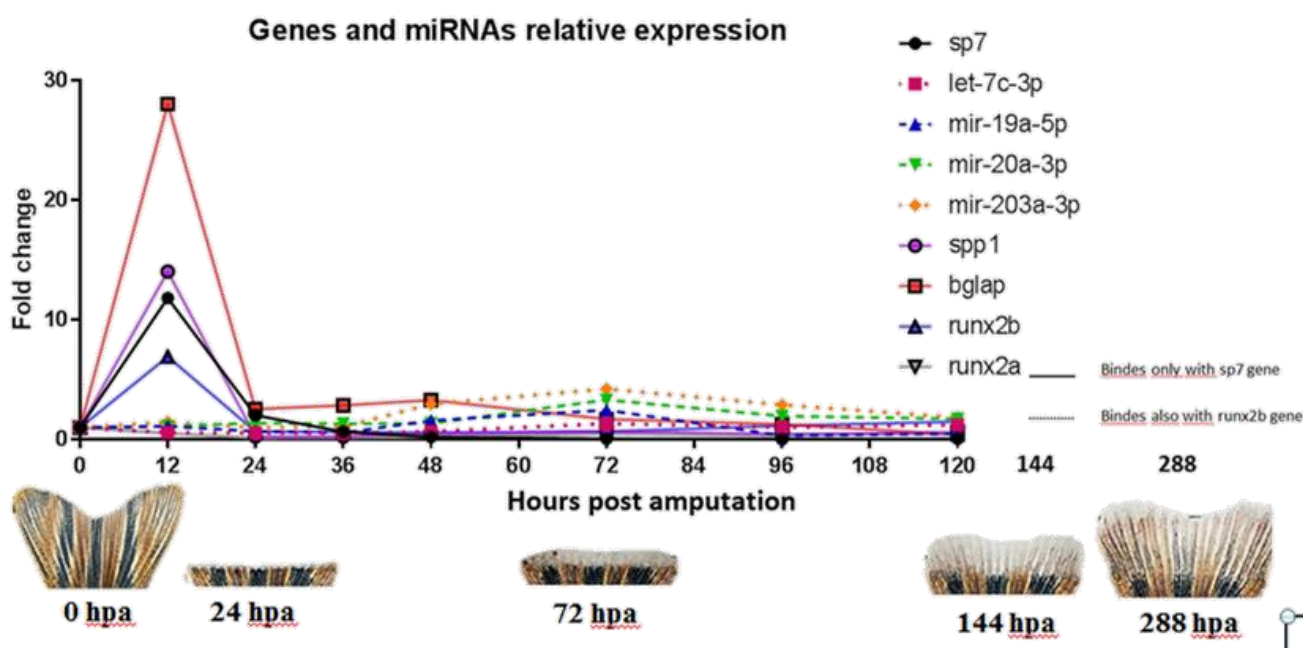


**FIGURA 21:** Gráfico com expressão em *fold change* do gene *sp7* (preto) e dos miRNAs dre-mir-19a-5p (roxo), dre-let-7c-3p (azul), dre-miR-203a-3p (laranja) e dre-miR-20a-3p (verde), mostrando expressão antagônica do *sp7* – que tem sua expressão diminuída no período de 24hpa em diante – e dos miRNAs que apresentam crescimento de expressão no período 36hpa até 72hpa.

Da mesma maneira, podemos observar que alguns miRNAs analisados quanto a sua regulação sobre *sp7* também têm sido validados em outros alvos que atuam no processo de diferenciação celular de osteoblastos e, portanto, na regeneração - e. g. dre-miR-203a-3p e miR-20a-3p validados quanto a sua regulação sobre *runx2* durante regeneração de nadadeira caudal de *zebrafish* (Tatcher et al., 2008) e em experimentos *in vitro* (Zhag et al., 2011) respectivamente, o que aponta para a complexidade envolvida no processo de desdiferenciação celular, com miRNAs regulando diversos alvos com a mesma função biológica e também outras formas de regulação que não apenas os miRNAs, mas também a interação entre os genes do desenvolvimento ósseo como a interação entre *sp7* e *runx2* que regula outros genes como *bglap* e *spp1* (Rashid et al., 2014; Srirussamee et al., 2019).

Sendo assim, nossos resultados sugerem que o processo de regeneração recapitula eventos do desenvolvimento ósseo ao reativar genes conhecidos por serem marcadores ósseos como *runx2b* e *bglap* e que o processo de desdiferenciação celular pode se dar pela inibição de *sp7* por meio da regulação

exercida por uma rede de microRNAs, que também alvejam outros genes da grande via da regeneração, como o próprio *runx2b* (Figura 22).



**FIGURA 22:** Composição de gráfico de expressão dos genes envolvidos no desenvolvimento ósseo (*sp7*, *runx2a*, *runx2b*, *bglap* e *spp1*) e os quatro miRNAs analisados nesse estudo, comparado aos estágios da regeneração da nadadeira caudal de *zebrafish* registrado por Pfefferli e Jázwinska (2015).

#### 5.4. Análise da conservação evolutiva das interações miRNAs-*sp7*

Ainda investigando a regulação de *sp7* durante o evento da desdiferenciação celular da regeneração epimórfica, analisamos as sequências dos miRNAs selecionados e da região 3'UTR do *sp7*, onde, canonicamente se dá o pareamento miRNA-gene, a partir do ligamento da região *seed* (posição 2 a 8 da sequência do miRNA) com as *microRNA recognition elements* (MREs), que são sítios de ligação no mRNA alvo (Bartel 2018).

Encontrar sequências tão semelhantes entre os grupos como o let-7c-3p e o miR-203a-3p (Figura 18) pode indicar, além da conservação evolutiva desse miRNA e de sua função, também a conservação do mecanismo molecular no qual está inserido. Entretanto, se observarmos os miRNAs miR-19a-5p e miR-20a-3p podemos ver que ocorreram mudanças na região *seed* ao longo da evolução. Em ambos os casos, as respectivas regiões *seed* se apresentam mais conservadas

dentro do grupo dos mamíferos, mas diferentes de todas as demais espécies a que foram comparadas, sendo em *Gallus gallus* o caso mais discrepante, havendo deslocamento da *seed* devido a adição de bases na porção 5'.

Podemos perceber que, embora o gene *sp7* esteja presente em todos os vertebrados analisados (Figura 19), há variações quanto a seu tamanho em pares de base e a quantidade de sítios de ligação para os miRNAs analisados. Mesmo os miRNAs que possuem sequência madura mais conservada, não possuem MREs em mamíferos e há uma diminuição da presença de MREs em *Anolis carolinensis* e *Gallus gallus*, de maneira que no galo só encontramos ligação para o miR-203a-3p e no lagarto para os miRNAs miR-20a-3p e miR-19a-5p.

Entretanto, é possível verificar a presença de sítios de interação dos miRNAs com o *sp7* predominantemente em grupos onde há registro de regeneração epimórfica como em peixes e anfíbios. Nos grupos que apresentaram menos sítios, podemos encontrar répteis que, embora realizem a regeneração epimórfica para recuperar estruturas perdidas, essas ainda assim são restritas cauda, mandíbula e, em alguns casos, cascos, mas não membros (revisado em Alibardi, 2009) e aves que regeneram tipos celulares, mas não estruturas (Ryals e Rubel, 1988). Interessantemente, o único grupo que não apresenta sítio algum é o grupo dos mamíferos no qual, recentemente, foi relatada a ausência de regeneração epimórfica. Mamíferos são capazes de regenerar órgãos e pontas dos dígitos, mas essa recuperação não se dá por meio da formação de blastema, que caracteriza a regeneração epimórfica (Sensate et. al 2019).

Quando mudamos de estratégia e realizamos também a predição de alvos dos miRNAs dre-let-7c, dre-miR-19a-5p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203-3p para um número maior de espécies, conseguimos encontrar interações do o dre-miR-20-3p em mamíferos, incluindo as espécies *Homo sapiens* e *Mus musculus* que, quando analisamos anteriormente comparando suas respectivas sequências de miRNAs e 3' UTR não apresentaram nenhuma interação. Quando observarmos as sequências do miR-20a-3p dessas duas espécies de mamíferos e compararmos com *zebrafish* (Figura 18) podemos ver que há diferenças na região *seed*, o que pode justificar o pareamento da sequência de *zebrafish* no *sp7* de mamíferos enquanto seus próprios miRNAs não realizam essa interação, apontando para uma possível perda de função da regulação do miRNA miR-20a-3p sobre *sp7* em mamíferos,

considerando a recém descoberta da ausência de regeneração epimórfica nesse grupo (Sensiate et al. 2019). O mesmo acontece para dre-miR-203a-3p, foram preditas interações com a região 3'UTR do *sp7* em 2% das espécies de mamíferos, que anteriormente não apresentaram interações.

Essa aparente perda de função regulatória dos miRNAs miR-20a-3p e miR-203a-3p pode estar associada à expansão do repertório de famílias de miRNAs nos eutérios durante o processo evolutivo - evento que possibilitou o surgimento de novos programas de desenvolvimento nesse grande grupo (Meuinier et al. 2016) - somada à facilidade com que miRNAs sofrem mutações e tem ganho ou perda na capacidade de reconhecer MREs (Berezikov et al. 2011).

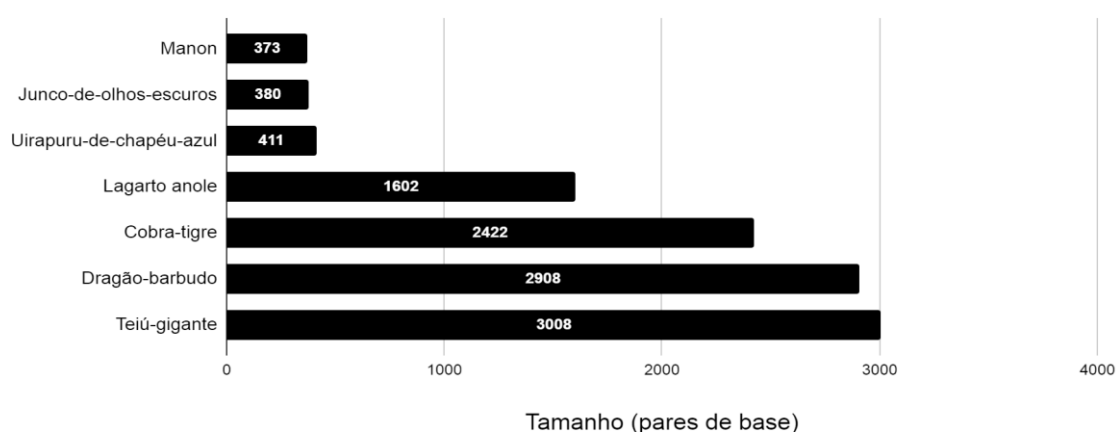
Embora a porcentagem total de espécies de vertebrados que apresentaram interações com os quatro miRNAs analisados seja pequena, vemos que esse número aumenta quando observamos grupos menores que apresentam registro de regeneração epimórfica como peixes e anfíbios, o que sugere que essas interações podem ter maior relevância para esses grupos.

Observamos que o gene *sp7* também apresenta grande variação dentro dos grupos em que analisamos. Em mamíferos, por exemplo, temos espécies com menores tamanhos como o rato-canguru (*Dipodomys ordii*) com 43 pares de base; o esquilo listrado (*Ictidomys tridecemlineatus*) com 28 pares de base; e tamanhos maiores como o gato (*Felis catus*) com 3898 pares de base. O mesmo pode ser observado no grupo dos peixes, onde encontramos o *Cynoglossus semilaevis*, um peixe da família Cynoglossidae, com 73 pares de e o *zebrafish* (*Danio rerio*) com 4043 pares de base. Tais resultados vão de encontro com o proposto por Chen e colaboradores (2012) que correlacionaram positivamente o tamanho médio da 3'UTR nas espécies animais com sua a complexidade morfológica, uma vez que essa região do *sp7* varia tanto em grupos mais derivados quanto nos mais basais.

Outra possível explicação para a variação de tamanho da 3' UTR do *sp7* é a proposta de Wang e colaboradores (2019) que, ao comparar o tamanho do 3'UTR de diversos ortólogos entre diferentes metazoários, mostraram que o padrão de variação do tamanho depende das características individuais de cada gene, correlacionando o aumento de tamanho ao aumento de complexidade do processo no qual o gene está envolvido. Sabendo que o gene *sp7* é também fator de transcrição necessário para a diferenciação dos osteoblastos e para a formação

óssea (Nakashima et al., 2002), além da sua possível relevância para o processo de desdiferenciação desse mesmo tipo celular durante a regeneração epimórfica (Stewart e Stankunas, 2012) e que o aumento dessas sequências pode aumentar a quantidade de sítios de interação e, portanto, a probabilidade de regulação por miRNAs (Ji et al. 2009), podemos especular que o maior tamanho da região 3'UTR em grupos mais basais pode estar associado ao papel do gene *sp7* ao intricado processo da regeneração epimórfica já registrada nesses grupos.

Uma evidência para essa hipótese é a presença de grandes 3'UTRs nas espécies de sauropsídeos da nossa lista: o teiú-gigante (*Salvator merianae*), o dragão-barbudo (*Pogona vitticeps*), a cobra-tigre (*Notechis scutatus*) e o lagarto anole (*Anolis carolinensis*), que, após sofrerem autotomia, têm suas partes recuperadas por meio da regeneração epimórfica (Jacnyak et al., 2017), enquanto este mesmo evento não é relatado em passeriformes, que apresentaram menores tamanhos dessa mesma região (Figura 23).



**FIGURA 23:** Tamanho em pares de base da região 3'UTR das três espécies de passeriformes analisados - Manon (*Lonchura domestica*), Junco-de-olhos-escuros (*Junco hyemalis*) e o Uirapuru-de-chapéu-azul (*Lepidothrix coronata*) – seguidos pelos quatro sauropsídeos analisados - teiú-gigante (*Salvator merianae*), dragão-barbudo (*Pogona vitticeps*), cobra-tigre (*Notechis scutatus*) e lagarto anole (*Anolis carolinensis*).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A regeneração epimórfica é um processo intrincado onde diversos mecanismos celulares igualmente complexos são ativados: desde o fechamento da ferida e cicatrização, passando pela desdiferenciação celular e formação de blastema, rediferenciação e proliferação celular, culminando na recuperação de uma estrutura idêntica a perdida. Dentre os complexos mecanismos moleculares que embasam as alterações celulares durante a regeneração epimórfica, nosso trabalho buscou compreender como miRNAs e genes alvo, elementos chave neste processo, se comportam durante a ativação desta interessante via de regeneração.

Primeiramente, observando nossos resultados de miRNA-seq, vemos que, apesar dos quase 30 anos de sua descoberta, ainda não esgotamos o conhecimento sobre miRNAs, suas diversas funções e o número absoluto de miRNAs descritos, de maneira que nosso trabalho sugere ao menos três novos miRNAs a serem anotados no genoma de *zebrafish*, espécie que já soma mais de 370 miRNAs maduros descritos no banco de dados miRBase. Quanto à sua função na regeneração da nadadeira caudal, nossos dados sugerem que miRNAs podem estar associados a outras etapas que não somente à regeneração do tecido ósseo, uma vez que apenas metade dos miRNAs diferencialmente expressos que encontramos estão descritos na literatura com algum envolvimento nos mecanismos de formação e reparo de osteoblastos, tipo celular predominante na nadadeira caudal de *zebrafish*.

A partir das análises de expressão relativa por qPCR, verificamos que o processo de desdiferenciação celular é realmente importante para formação do blastema e provavelmente aconteça próximo ao período de 12 horas após a amputação, uma vez que nesse período encontramos um pico de expressão de todos os marcadores de osteoblastos, tanto iniciais quanto tardios, seguido uma queda abrupta de sua expressão no período de 24hpa. Nossos resultados sugerem que a regulação do gene *sp7* é importante para a desdiferenciação celular, e que esse mecanismo faz parte de uma complexa rede molecular que envolve a regulação intergênica e clusterização de miRNAs, de maneira que pelo menos três miRNAs (i.e. dre-let-7c-3p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203a-3p) atuem de maneira cooperativa para regulação de *sp7* e de outros genes como *runx2*.

Olhando mais de perto para essa interação entre os miRNAs e o gene *sp7*, nossa análise de conservação evolutiva mostra que, assim como o fenômeno da regeneração se apresenta de maneira distinta entre os grupos de vertebrados, o mesmo acontece com os mecanismos moleculares. Embora espécies que apresentem registros de regeneração epimórfica tenham sequências mais conservadas da região 3'UTR do *sp7* e dos miRNAs let-7c-3p, miR-19a-5p, miR-20a-3p e miR-203a-3p, espécies com tipos diferentes de regeneração ou até menos com capacidade de regeneração de estruturas diferentes como células e órgãos, apresentam maior divergência na região 3'UTR do *sp7* e menor número de MREs para interação com esses miRNAs, podendo inclusive não apresentar MRE alguma. Entretanto, verificamos que algumas sequências de *zebrafish* dos miRNAs analisados conseguem se parear a região 3'UTR de *sp7* de mamíferos, apontando para a possibilidade de que foram mutações acumuladas nos miRNAs maduros que levaram a perda desse mecanismo de regulação do *sp7* e, possivelmente à perda da regeneração epimórfica do tecido ósseo ao longo do processo evolutivo.

Dessa maneira, nosso trabalho corrobora com a hipótese de que a regulação do fator de transcrição *sp7* é relevante para o processo de desdiferenciação celular, evento de fundamental importância na regeneração epimórfica, mas também aponta para uma rede de regulação gênica complexa cuja investigação poderá ser melhor direcionada em trabalhos futuros a partir dos avanços trazidos pelo presente estudo.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal V, Johnson SA, Reing J, Zhang L, Tottey S, Wang G, Hirschi KK, Braunhut S, Gudas LJ, Badylak SF. Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107(8):3351-5.
- Akimenko MA, Johnson SL, Westerfield M, Ekker M. Differential induction of four *msx* homeobox genes during fin development and regeneration in *zebrafish*. *Development*. 1995; 121(2):347-57.
- Akimenko MA, Marí-Beffa M, Becerra J, Géraudie J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn*. 2003; 226(2):190-201.
- Alibardi L. Regeneration in reptiles and its position among vertebrates. In: *Morphological and Cellular Aspects of Tail and Limb Regeneration in Lizards*. 2009. pp. 1-49.
- Amaral DB, Schneider I. Um mecanismo molecular compartilhado na padronização de nadadeiras em peixes pulmonados e membros em tetrápodes. Orientador: Igor Schneider. 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/11302>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2020
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*. 2010; 11(10):R106.
- Bakhshandeh B, Soleimani M, Hafizi M, Paylakhi SH, Ghaemi N. MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. *Mol Biol Rep*. 2012; 39(7):7569-81.
- Barroso-del Jesus A, Lucena-Aguilar G, Menendez P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle*. 2009; 8(3):394-8.
- Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. 2018. 173(1), 20-51.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2):281-97.
- Bartel, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. 2009. *Cell* 136, 215–233.
- Becerra J, Montes GS, Bexiga SR, Junqueira LC. Structure of the tail fin in teleosts. *Cell Tissue Res*. 1983; 230(1):127-37.

- Becker CG, Becker T. Adult *zebrafish* as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci*. 2008; 26(2-3):71-80.
- Becker T, Wullmann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult *zebrafish*. *J Comp Neurol*. 1997; 377(4):577-95.
- Beis D, Stainier DY (2006) In vivo cell biology: following the *zebrafish* trend. *Trends in cell biology*, 16(2):105-112.
- Bely AE, Nyberg KG. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol*. 2010; 25(3):161-70.
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010. 11(8):R90.
- Borgens RB. Mice regrow the tips of their foretoes. *Science*. 1982; 217(4561):747-50.
- Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016; 34(5):525-7.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS, Sistema de Informações Hospitalares. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def> [Acessado em 08 de julho de 2019].
- Brockes JP. Amphibian limb regeneration: rebuilding a complex structure. *Science*. 1997;276(5309):81-7.
- Brockes JP, Kumar A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(8):566-74.
- Brockes JP, Kumar A. Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science*. 2005; 310(5756):1919-23.
- Bryant, SV, Muneoka K. "Views of limb development and regeneration." *Trends in Genetics* 2 (1986): 153-159.
- Bustin S et al. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." (2009): 611-622.
- Chan, S. N., Abu Bakar, N., Mahmood, M., Ho, C. L., Shaharuddin, N. A. Molecular cloning and characterization of novel phytocystatin gene from turmeric, *Curcuma longa*. 2014. *BioMed research international*, 2014.

- Chen E, Ekker SC. *Zebrafish* as a genomics research model. *Curr Pharm Biotechnol*. 2004; 5(5):409-13.
- Chen C, Ridzon D, Lee CT, Blake J, Sun Y, Strauss WM. Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mamm Genome*. 2007; 18(5):316-27.
- Chen Z et al. "Sp7/osterix positively regulates dlx2b and bglap to affect tooth development and bone mineralization in *zebrafish* larvae." *Journal of Biosciences* 44.6 (2019): 127.
- Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, Pasquinelli AE, Shiekhattar R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 2007; 447(7146):823-8.
- Choi YJ, Lin CP, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, Zhong Y, Kim SY, Bennett MJ, Chen C, Ozturk A, Hicks GG, Hannon GJ, He L. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol*. 2011;13(11):1353-60.
- Collymore, C., Tolwani, A., Lieggi, C., Rasmussen, S. Efficacy and safety of 5 anesthetics in adult *zebrafish* (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. 2014; 53(2), 198-203.
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009; 460(7256):705-10.
- Darnet S et al. "Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.30 (2019): 15106-15115.
- DeLaurier A, Eames BF, Blanco-Sánchez B, Peng G, He X, Swartz ME, Ullmann B, Westerfield M, Kimmel CB. *Zebrafish* sp7:EGFP: a transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration. *Genesis*. 2010; 48(8):505-11.
- Duursma AM, Kedde M, Schrier M, le Sage C, Agami R. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*. 2008; 14(5):872-7.
- Ebert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*. 2012; 149(3):515-24.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. The *zebrafish* as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet*. 2013; 29(11):61120.

- Giachelli C M, Steitz S. "Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization." *Matrix Biology* 19.7 (2000): 615-622.
- Goljanek-Whysall K, Sweetman D, Abu-Elmagd M, Chapnik E, Dalmay T, Hornstein E, Münsterberg A. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor *Pax3* confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 108(29):11936-41.
- Grotek B, Wehner D, Weidinger G. Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2013; 140(7):1412-23.
- Grunwald DJ, Eisen JS. Headwaters of the *zebrafish* emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Genet*. 2002; 3(9):717-24.
- Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2011; 39(6):608-16.
- Guo X, Liu Q, Wang G, Zhu S, Gao L, Hong W, Chen Y, Wu M, Liu H, Jiang C, Kang J. microRNA-29b is a novel mediator of Sox2 function in the regulation of somatic cell reprogramming. *Cell Res*. 2013; 23(1): 142-56.
- Hamada M, Goricki S, Byerly MS, Satoh N, Jeffery WR. Evolution of the chordate regeneration blastema: Differential gene expression and conserved role of notch signaling during siphon regeneration in the ascidian *Ciona*. *Dev Biol*. 2015;405(2):304-15.
- He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA, Hannon GJ. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007; 447(7148):1130-4.
- Howe K et al. "The *zebrafish* reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* 496.7446 (2013): 498-503.
- Hui SP, Sengupta D, Lee SG, Sen T, Kundu S, Mathavan S, Ghosh S. Genome wide expression profiling during spinal cord regeneration identifies comprehensive cellular responses in *zebrafish*. *PLoS One*. 2014; 9(1):e84212.
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(47):16961-6.

- Lovine MK. Conserved mechanisms regulate outgrowth in *zebrafish* fins. *Nat Chem Biol.* 2007; 3(10):613-8.
- Iten LE, Bryant SV. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: length, rate, and stages. *Wilhelm Roux Arch Entwickl Mech Org.* 1973; 173(4):263-282.
- Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell.* 2010; 7(1):36-41.
- Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, Brummelkamp TR, Fleming MD, Camargo FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature.* 2008; 451(7182):1125-9.
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Bluelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol.* 2009; 27(5):459-61.
- Judson RL, Greve TS, Parchem RJ, Bluelloch R. MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(10):1227-35.
- Kahler, Rachel A., and Jennifer J. Westendorf. "Lymphoid enhancer factor-1 and  $\beta$ -catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter." *Journal of Biological Chemistry* 278.14 (2003): 11937-11944.
- Katogi R, Nakatani Y, Shin-i T, Kohara Y, Inohaya K, Kudo A. Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev.* 2004;121(7-8):861-72.
- Kawakami Y, Rodriguez Esteban C, Raya M, Kawakami H, Martí M, Dubova I, Izpisua Belmonte JC. Wnt/beta-catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes Dev.* 2006; 20(23):3232-7.
- Kawane T et al. "Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3." *Scientific reports* 8.1 (2018): 1-17.
- Knopf F, Hammond C, Chekuru A, Kurth T, Hans S, Weber CW, Mahatma G, Fisher S, Brand M, Schulte-Merker S, Weidinger G. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the *zebrafish* fin. *Dev Cell.* 2011; 20(5):713-24.
- Kozomara A, Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl Acid Res.* 2014, 42(Database issue):D68-D73.

- Kocijan, R. Circulating microRNA signatures in patients with idiopathic and postmenopausal osteoporosis and fragility fractures. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2016 ; 101(11), 4125-4134.
- Komori, Toshihisa. "Signaling networks in RUNX2-dependent bone development." *Journal of cellular biochemistry* 112.3 (2011): 750-755.
- Lakshmipathy U, Love B, Goff LA, Jörnsten R, Graichen R, Hart RP, Chesnut JD. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(6):1003-16.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75(5):843-54.
- Lee Y, Grill S, Sanchez A, Murphy-Ryan M, Poss KD. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2005; 132(23):5173-83. X
- Lee, Y; Jeon, K; Lee, J.T; Kim, S; Kim, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002. 21,4663–4670.
- Lee, Y; Ahn, C; Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003. 425(6956):415-419.
- Lee, Y; Kim, M; Han, J; Yeom, K.H; Lee, S; Baek, S.H; and Kim, V.N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004. 23, 4051–4060.
- Li M, Jones-Rhoades MW, Lau NC, Bartel DP, Rougvie AE. Regulatory mutations of *mir-48*, a *C. elegans* *let-7* family microRNA, cause developmental timing defects. *Dev Cell*. 2005; 9(3):415-22.
- Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoillis A, Liu W, Xue Y, Cai J, Guo X, Qin B, Zhang R, Wu J, Lai L, Teng M, Niu L, Zhang B, Esteban MA, Pei D. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *J Biol Chem*. 2011;286(19):17359-64.
- Lien CL, Schebesta M, Makino S, Weber GJ, Keating MT. Gene expression analysis of *zebrafish* heart regeneration. *PLoS Biol*. 2006; 4(8):e260.
- Lin, S., Gregory, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews Câncer*. 2015. 15(6), 321.
- Liu, G. X., Ma, S., Li, Y., Yu, Y., Zhou, Y. X., Lu, Y. D., ... & Yu, J. H. Hsa-let-7c controls the committed differentiation of IGF-1-treated mesenchymal stem cells

- derived from dental pulps by targeting IGF-1R via the MAPK pathways. *Experimental & molecular medicine*. 2018; 50(4), 25.
- Livak KJ, Schmittgen TD. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta$ CT method." *methods* 25.4 (2001): 402-408.
- Lovine MK. "Conserved mechanisms regulate outgrowth in *zebrafish* fins." *Nature chemical biology* 3.10 (2007): 613.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004. 303(5654):95-98.
- Lüningschrör P, Stöcker B, Kaltschmidt B, Kaltschmidt C. miR-290 cluster modulates pluripotency by repressing canonical NF- $\kappa$ B signaling. *Stem Cells*. 2012; 30(4):655-64.
- Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(23):9667-72.
- Makino S, Whitehead GG, Lien CL, Kim S, Jhawar P, Kono A, Kawata Y, Keating MT. Heat-shock protein 60 is required for blastema formation and maintenance during regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(41):14599-604.
- Münch J, González-Rajal A, de la Pompa JL. Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2013; 140(7):1402-11.
- Nacu E et al. "FGF8 and SHH substitute for anterior–posterior tissue interactions to induce limb regeneration." *Nature* 533.7603 (2016): 407-410.
- Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002; 108(1):17-29.
- Nakatani Y, Kawakami A, Kudo A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev Growth Differ*. 2007; 49(2):145-54.
- Nechiporuk A, Keating MT. A proliferation gradient between proximal and *msxb*-expressing distal blastema directs *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2002; 129(11):2607-17.
- Neo WH, Yap K, Lee SH, Looi LS, Khandelvia P, Neo SX, Makeyev EV, Su IH. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte

- differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *J Biol Chem*. 2014; 289(30):20788-801.
- Nogueira AF, Costa CM, Lorena J, Moreira RN, Frota-Lima GN, Furtado C, Robinson M, Amemiya CT, Darnet S, Schneider I. Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. *Nat Commun*. 2016; 7: 13364.
- Oliveira AC. Avaliação meta-classificatória de ferramentas de predição de alvos de microRNAs e análise de enriquecimento funcional de alvos utilizando Homo sapiens como modelo biológico. 2017. Dissertação cedida pelo autor.
- Oliveira AC, Bovolenta LA, Nachtigall PG, Herkenhoff ME, Lemke N, Pinhal D. Combining results from distinct microRNA target prediction tools enhances the performance of analysis. *Front Genet*. 2017; 8:59.
- Oliveira AC et al. "Understanding the Modus Operandi of MicroRNA Regulatory Clusters." *Cells* 8.9 (2019): 1103.
- Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*. 1999; 216(2):671-80.
- Padhi BK, Joly L, Tellis P, Smith A, Nanjappa P, Chevrette M, Ekker M, Akimenko MA. Screen for genes differentially expressed during regeneration of the *zebrafish* caudal fin. *Dev Dyn*. 2004; 231(3):527-41.
- Pasquinelli AE et al. (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408:86-89.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2015; 29(9), e45-e45.
- Pfefferli C, Jaźwioska A. The art of fin regeneration in *zebrafish*. *Regeneration (Oxf)*. 2015; 2(2):72-83.
- Poleo G, Brown CW, Laforest L, Akimenko MA. Cell proliferation and movement during early fin regeneration in *zebrafish*. *Dev Dyn*. 2001; 221(4):380-90.
- Poss KD, Shen J, Keating MT. Induction of *lef1* during *zebrafish* fin regeneration. *Dev Dyn*. 2000a; 219:282-6.
- Poss KD, Shen J, Nechiporuk A, McMahon G, Thisse B, Thisse C, Keating MT. Roles for Fgf signaling during *zebrafish* fin regeneration. *Dev Biol*. 2000b; 222: 347-58.



- Poss KD, Nechiporuk A, Hillam AM, Johnson SL, Keating MT. *Mps1* defines a proximal blastemal proliferative compartment essential for *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2002a; 129:5141-9.
- Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in *zebrafish*. *Science*. 2002b; 298(5601):2188-90.
- Poss KD, Keating MT, Nechiporuk A. Tales of regeneration in *zebrafish*. *Dev Dyn*. 2003; 226:202-10.
- Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet*. 2010; 11(10):710-22.
- Qin Z, Barthel LK, Raymond PA. Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in *zebrafish*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(23):9310-5.
- Rajaram K et al. Dynamic miRNA expression patterns during retinal regeneration in *Zebrafish*: reduced dicer or miRNA expression suppresses proliferation of Muller glia-derived neuronal progenitor cells *Dev. Dyn.*, 243 (2014a), pp. 1591-1605
- Rajaram K et al. miR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult *zebrafish* retina regeneration *Dev. Biol.*, 392 (2014b), pp. 393-403
- Ramsay K, Bergmann M, Veale L, Richardson CA, Kaiser MJ, Vize SJ, Feist SW. Damage, autotomy and arm regeneration in starfish caught by towed demersal fishing gears. *Mar Biol*. 2001; 138:527-36.
- Rashid H et al. "Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes." *Connective tissue research* 55.sup1 (2014): 83-87.
- Reddien PW, Sánchez-Alvarado A. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:725-57.
- Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler -- a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35(Web Server issue):W193-200.
- Reimer MM, Sörensen I, Kuscha V, Frank RE, Liu C, Becker CG, Becker T. Motor neuron regeneration in adult *zebrafish*. *J Neurosci*. 2008; 28(34):8510-6.
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000; 403(6772):901-6.

- Ribeiro AO, Schoof CR, Izzotti A, Pereira LV, Vasques LR. MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering. *Microna*. 2014; 3(1):45-53.
- Ryals BM, Rubel EW. Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult *Coturnix* quail. *Science*. 1988; 240(4860):1774-6.
- Sánchez-Alvarado A, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet*. 2006; 7:873-84.
- Santamaría JA, Marí-Beffa M, Santos-Ruiz L, Becerra J. Incorporation of bromodeoxyuridine in regenerating fin tissue of the goldfish *Carassius auratus*. *J Exp Zool*. 1996; 275(4):300-7.
- Santos-Ruiz L, Santamaría JA, Ruiz-Sánchez J, Becerra J. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Dev Dyn*. 2002; 223(2):262-72.
- Schebesta M, Lien CL, Engel FB, Keating MT. Transcriptional profiling of caudal fin regeneration in *zebrafish*. *Scientific World Journal*. 2006; 6(Suppl. 1):38-54.
- Schier AF, Giraldez AJ. MicroRNA function and mechanism: insights from *zebrafish*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006; 71:195-203.
- Simms, D., Cizdziel, P. E., Chomczynski, P. TRIzol: A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*. 1993; 15(4), 532-535.
- Singh SP, Holdway JE, Poss KD. Regeneration of amputated *zebrafish* fin rays from de novo osteoblasts. *Dev Cell*. 2012; 22(4):879-86.
- Skinner DM. The structure and metabolism of a crustacean integumentary tissue during a molt cycle. *Biol Bull*. 1962; 123(3):635-47.
- Slack JMW. Regeneration research today. *Dev Dyn*. 2003; 226:162-6.
- Smith A, Avaron F, Guay D, Padhi BK, Akimenko MA. Inhibition of BMP signaling during *zebrafish* fin regeneration disrupts fin growth and scleroblasts differentiation and function. *Dev Biol*. 2006; 299(2):438-54.
- Sousa S, Afonso N, Bensimon-Brito A, Fonseca M, Simões M, Leon J, Roehl H, Cancela ML, Jacinto A. Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during *zebrafish* fin regeneration. *Development*. 2011; 138(18):3897-905.
- Srirussamee K et al. "Direct electrical stimulation enhances osteogenesis by inducing Bmp2 and Spp1 expressions from macrophages and preosteoblasts." *Biotechnology and Bioengineering* 116.12 (2019): 3421-3432.

- Stewart S, Stankunas K. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during *zebrafish* fin regeneration. *Dev Biol.* 2012; 365(2):339-49.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One.* 2011; 6(7):e21800.
- Tam S, Tsao MS, McPherson JD. Optimization of miRNA-seq data preprocessing. *Brief Bioinform.* 2015; 16(6):950-63.
- Tanaka EM, Reddien PW. The cellular basis for animal regeneration. *Dev Cell.* 2011; 21(1):172-85.
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to *Nanog*, *Otc4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 2008; 455(7216):1124-8.
- Thatcher EJ, Paydar I, Anderson KK, Patton JG. Regulation of *zebrafish* fin regeneration by microRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 18384-9.
- Tsonis PA. Regeneration in vertebrates. *Dev Biol.* 2000; 221:273-84.
- Tsonis PA, Fox TP. Regeneration according to Spallanzani. *Dev Dyn.* 2009; 238: 2357-63.
- Tu S, Johnson SL. Fate restriction in the growing and regenerating *zebrafish* fin. *Dev Cell.* 2011; 20(5):725-32.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science.* 2007; 318(5858):1931-4.
- Vitt LJ. Tail autotomy and regeneration in the tropical skink, *Mabuya heathi*. *J Herpetol.* 1981; 15(4):454-457.
- Wade SL, Langer LF, Ward JM, Archer TK. MiRNA-mediated regulation of the SWI/SNF chromatin remodeling complex controls pluripotency and endodermal differentiation in human ESCs. *Stem Cells.* 2015; 33(10):2925-35.
- Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet.* 2008; 40(12):1478-83.
- Whitehead GG, Makino S, Lien CL, Keating MT. *fgf20* is essential for initiating *zebrafish* fin regeneration. *Science.* 2005; 310:1957-60.
- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell.* 2009; 137(4):647-58.

Yi R et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Gen Dev.* 2003. 17:3011-3016.

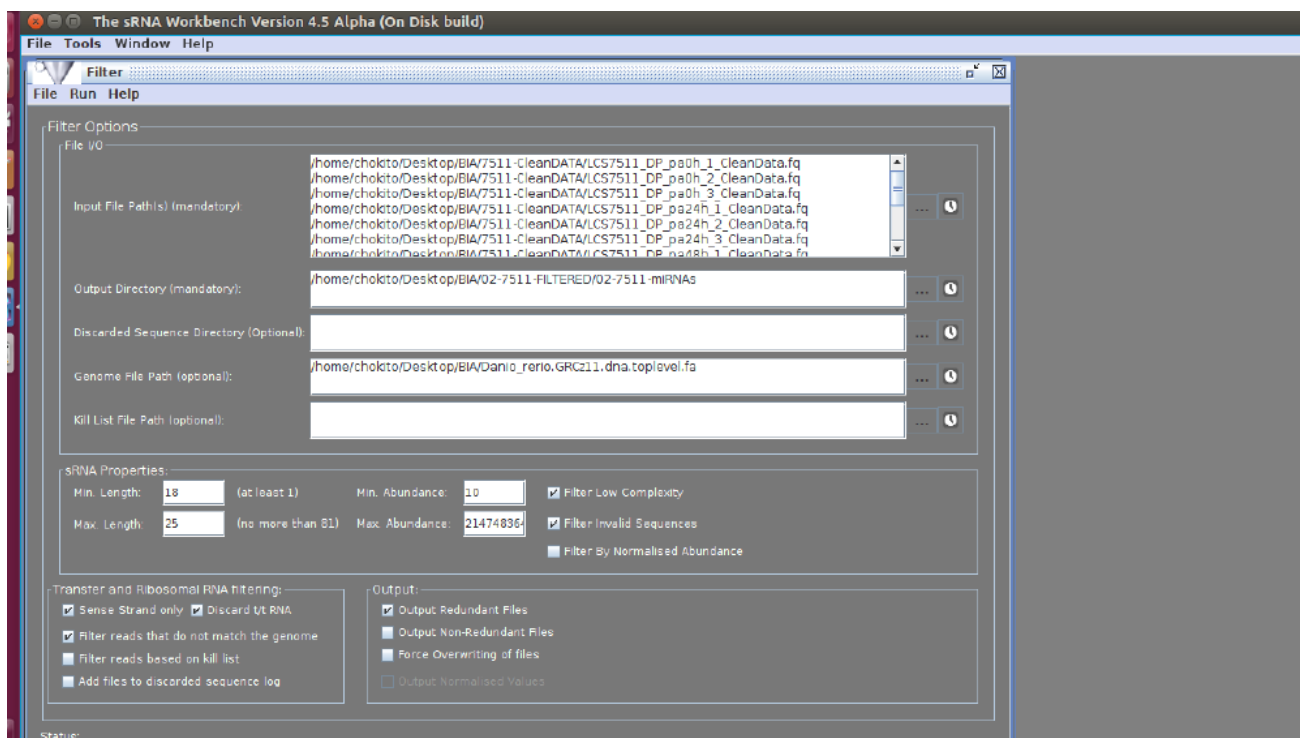
Yin VP, Thomson JM, Thummel R, Hyde DR, Hammond SM, Poss KD. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in *zebrafish*. *Gen Dev.* 2008; 22:728-33.

Zhang JF et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling, *RNA Biology*, 2011; 8:5, 829-38.

## 8. MATERIAL SUPLEMENTAR

### 8.1. Parâmetros e comandos utilizados nas análises de miRNA-seq.

Depois de geradas as corridas Illumina descritas no item 3.3.4, realizamos a análise da qualidade do sequenciamento pelo FastQC v0.11.8, seguido da contagem de reads e filtragem utilizando o UEA sRNA Workbench 4.5.1, com os parâmetros de input informados na imagem abaixo:



Em seguida as reads foram mapeadas para identificação dos miRNAs, primeiramente utilizando o programa Bowtie 1.2.3 (mapper.pl/bowtie-0.11.3) contra o genoma de zebrafish atualizado (versão GRCz11) com o comando:

```
root@mirdeep:/mnt/running# nohup mapper.pl /mnt/combined.fa -c -l 18 -g dre -m -p /mnt/GRCz11 -s collapsedReads.fa -t collapsedVsgenome.arf -v -n &
```

Que gerou o seguinte log:

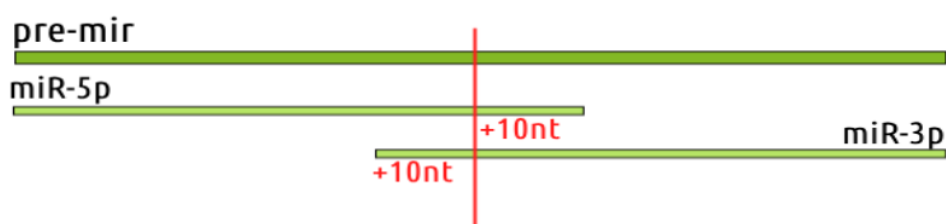
```
discarding short reads
collapsing reads
mapping reads to genome index
trimming unmapped nts in the 3' ends
Log file for this run is in mapper_logs and called mapper.log_376
Mapping statistics

#desc  total  mapped  unmapped      %mapped %unmapped
total: 116415993 103735993 12680000 89.108 10.892
dre: 116415993 103735993 12680000 89.108 10.892
```

Ainda na identificação, as reads foram processadas utilizando o programa miRDeep 2.0 (miRDeep2.0.1.2) a partir do comando:

```
root@mirdeep:/mnt/running# miRDeep2.pl /mnt/combined.fa /mnt/Danio_rerio.GRCz11.dna.toplevel.v2.fa collapsedVsgenome.arf /mnt/00-Reference/dre-mirgenedbEXCLUSIVOS-mirbase.fa /mnt/00-Reference/teleostei-mirbase.fa /mnt/00-Reference/dre-pre-mirgenedbEXCLUSIVOS-mirbase.fa -t Zebrafish -P
```

As reads foram mapeadas utilizando um script em python desenvolvido pela nossa equipe de maneira a confrontar os transcritos maduros contra o segmento de origem no pre-miRNA determinando assim sua origem como 5p ou 3p, conforme segue indicado:



Para poder quantificar os miRNAs utilizando as ferramentas ShortStack e Bowtie v1.2., os cabeçalhos dos arquivos fasta das reads filtradas e também do genoma de referência foram adaptados para se ajustar à ferramenta com o comando abaixo:

```
chokitopeter:~/Desktop/countsBia$ nohup ShortStack --readfile /home/chokitopeter/Desktop/dataBIA/LCS7511_DP_pa72h_3_unc.fa --genomefile /home/chokitopeter/Desktop/countsBia/precursor-dre.v2.fa --outdir /home/chokitopeter/Desktop/countsBia/LCS7511_DP_pa72h_3 --bowtie_cores 20 --sort_mem 64M --mismatches 1 --mmap u --bowtie_m 50 --ranmax 3 --dicernin 18 --dicernmax 25 --nohp --pad 75 --mincov 5 > pa72h_3.out &
```

## 8.2. Lista de espécies de peixes teleósteos utilizada para confrontar dados de sequencias de miRNAs do miRNA-seq.

Durante a identificação dos miRNAs realizada pela ferramenta miRDeep, os dados obtidos foram comparados aos dados de peixes teleósteos listados abaixo, disponíveis no banco de dados miRBase:

- Teleostei
  - [Astatotilapia burtoni](#) (298 precursors, 236 mature) [AstBur1.0]
  - [Cyprinus carpio](#) (134 precursors, 146 mature)
  - [Danio rerio](#) (355 precursors, 373 mature) [GRCz11]
  - [Electrophorus electricus](#) (20 precursors, 34 mature) [MSU\_v1.0]
  - [Fugu rubripes](#) (131 precursors, 108 mature) [FUGU5]
  - [Gadus morhua](#) (401 precursors, 516 mature) [GadMor\_May2010]
  - [Hippoglossus hippoglossus](#) (39 precursors, 36 mature)
  - [Ictalurus punctatus](#) (281 precursors, 205 mature)
  - [Metriaclichia zebra](#) (256 precursors, 184 mature) [M\_zebra\_UMD1]
  - [Neolamprologus brichardi](#) (251 precursors, 182 mature) [NeoBri1.0]
  - [Oryzias latipes](#) (168 precursors, 146 mature) [MEDAKA1]
  - [Oreochromis niloticus](#) (812 precursors, 695 mature)
  - [Pundamilia nyererei](#) (250 precursors, 182 mature) [PunNye1.0]
  - [Paralichthys olivaceus](#) (20 precursors, 38 mature)
  - [Salmo salar](#) (371 precursors, 497 mature)
  - [Tetraodon nigroviridis](#) (132 precursors, 109 mature) [Tetraodon8]

### 8.3. Lista de miRNAs diferencialmente expressos entre os períodos 0, 24, 48 e 72hpa.

| Períodos                           | total | Elementos Diferencialmente Expressos      |
|------------------------------------|-------|-------------------------------------------|
| 48vs0<br>48vs24<br>72vs0<br>72vs24 | 1     | dre-miR-729-3p 4:13584503-13584566:+      |
| 24vs0<br>48vs0<br>72vs0            | 8     | dre-miR-29-5p 6:47467921-47467982:+       |
|                                    |       | dre-miR-21-3p 10:28198932-28198993:-      |
|                                    |       | dre-miR-144-3p 5:42272092-42272150:-      |
|                                    |       | dre-miR-21-3p 15:17373821-17373880:+      |
|                                    |       | dre-miR-15a-3p 1:46722632-46722692:-      |
|                                    |       | dre-miR-23b-5p 8:30167674-30167731:-      |
|                                    |       | dre-miR-21-5p 10:28198932-28198993:-      |
|                                    |       | dre-miR-181b-3p 22:22825803-22825864:-    |
| 48vs0<br>48vs24<br>72vs48          | 1     | dre-miR-n0134-3p 2:21375500-21375558:-    |
| 24vs0<br>48vs0                     | 4     | dre-miR-n0145-3p 4:32492719-32492785:-    |
|                                    |       | dre-miR-n7550-5p KN150608.1:50557-50642:+ |
|                                    |       | dre-miR-31-3p 7:73263754-73263815:-       |
|                                    |       | dre-miR-n10856-3p 3:1207096-1207164:-     |
| 24vs0<br>72vs0                     | 2     | dre-miR-144-5p 5:42272092-42272150:-      |
|                                    |       | dre-miR-2188-5p 5:69021880-69021940:-     |
| 48vs0<br>72vs0                     | 6     | dre-miR-16a-3p 15:1543868-1543933:+       |
|                                    |       | dre-miR-21-3p 15:17373761-17373844:+      |
|                                    |       | dre-miR-728-5p 24:26190563-26190624:+     |
|                                    |       | dre-miR-181a-3p 22:22826010-22826074:-    |
|                                    |       | dre-miR-21-5p 15:17373821-17373880:+      |
|                                    |       | dre-let-7a-5p 11:27503238-27503310:-      |
| 72vs0<br>72vs24                    | 1     | dre-let-7a-5p 5:29990465-29990532:+       |
| 24vs0                              | 1     | dre-miR-16b-3p 1:46722415-46722480:-      |
| 48vs0                              | 7     | dre-miR-181a-5p 3:34197497-34197546:+     |
|                                    |       | dre-let-7a-5p 15:21437885-21437952:+      |
|                                    |       | dre-miR-125b-3p 5:29998774-29998836:+     |
|                                    |       | dre-miR-29b3-5p 23:32440125-32440189:-    |
|                                    |       | dre-miR-723-3p KN149706.1:28040-28099:-   |
|                                    |       | dre-miR-728-3p 2:4569299-4569361:-        |
|                                    |       | dre-miR-728-3p 24:26190563-26190624:+     |
| 72vs0                              | 5     | dre-miR-n10752-5p 17:2649860-2649919:-    |
|                                    |       | dre-miR-n183-3p 4:396723-396797:+         |
|                                    |       | dre-miR-n0048-5p 19:16028528-16028588:-   |

|        |   |                                        |
|--------|---|----------------------------------------|
|        |   | dre-miR-15c-3p 15:1543649-1543720:+    |
|        |   | dre-miR-129-3p 4:19047476-19047542:-   |
| 72vs24 | 1 | dre-miR-135c-5p 23:18063202-18063264:- |

#### 8.4. Predições das interações microRNAs-sp7 das análises de conservação.

Lista das predições de posições de MREs para interação dos miRNAs dre-let-7c-3p, dre-miR-19a-5p, dre-miR-20a-3p e dre-miR-203a-3p obtidas utilizando as ferramentas miRANDA e TargetScan:

| Espécie               | Miranda        |           |            |                                 |
|-----------------------|----------------|-----------|------------|---------------------------------|
|                       | Posição        |           |            |                                 |
|                       | miR-19a-5p     | let-7c-3p | miR-20a-3p | miR-203a-3p                     |
| Zebrafish             | 1211, 2578     | 2955      | 308        | 869, 269, 1469, 2075, 756, 1962 |
| Cavefish              | 1396           | 1203      |            |                                 |
| Fugu                  |                |           |            |                                 |
| Tetraodon             |                |           |            |                                 |
| Stickleback           |                |           |            |                                 |
| Tilapia               |                | 694       |            | 711                             |
| Amazon molly          |                |           | 1109       |                                 |
| Platyfish             |                |           | 1103       |                                 |
| Spotted gar           | 1452           |           |            |                                 |
| P. kingsleyae         | 1806           |           |            |                                 |
| Asian bonytongue      |                |           | 699        | 307                             |
| Huchen                |                |           |            |                                 |
| Northern pike         | 106, 1232, 648 |           | 1005       | 89                              |
| Big-finned mudskipper |                |           |            |                                 |
| Tiger tail seahorse   |                |           |            |                                 |
| Ballan wrasse         |                | 1101      | 1989       |                                 |
| Ocean sunfish         |                |           |            | 639                             |
| Climbing perch        |                |           | 2030       | 1388, 698                       |
| Swamp eel             |                | 1026      | 240        |                                 |
| Zig-zag eel           |                |           |            | 679                             |
| Barramundi perch      |                |           |            |                                 |
| Yellowtail amberjack  | 422            | 1177      |            | 814                             |
| Greater amberjack     | 405, 422       |           |            | 809                             |
| Turbot                |                | 1130      |            | 770                             |
| Tongue sole           |                |           |            |                                 |
| Bicolor damselfish    |                |           |            |                                 |
| Spiny chromis         |                |           |            |                                 |
| Clown anemonefish     |                |           |            | 736, 66                         |



|                                |      |      |            |         |
|--------------------------------|------|------|------------|---------|
| Orange clownfish               |      |      |            | 806, 66 |
| Lyretail cichlid               |      | 676  |            | 693     |
| Burton's mouthbrooder          |      | 676  |            | 693     |
| Makobe Island cichlid          |      | 674  |            |         |
| Zebra mbuna                    |      | 675  |            | 692     |
| Eastern happy                  |      | 673  |            | 690     |
| Indian medaka                  |      |      |            |         |
| Japanese medaka HdrR           |      |      |            |         |
| Mangrove rivulus               |      |      | 695        | 59      |
| Guppy                          | 2670 |      | 1112, 3375 | 2582    |
| Shortfin molly                 |      |      | 1110       |         |
| Sailfin molly                  |      |      | 1107       |         |
| Western mosquitofish           |      |      | 1093       |         |
| Monterrey platyfish            |      |      | 1103       |         |
| Sheepshead minnow              |      |      |            |         |
| Mummichog                      |      |      | 1159       |         |
| Channel catfish                |      |      |            |         |
| Red-bellied piranha            |      |      |            | 342     |
| Electric eel                   |      |      |            |         |
| Coelacanth                     |      |      |            |         |
| Frog                           |      |      | 1359       |         |
| Anole Lizard                   |      |      | 689        |         |
| Chicken                        |      |      |            | 922     |
| Painted turtle                 | 1518 |      |            |         |
| Australian saltwater crocodile |      |      |            |         |
| Pink-footed goose              |      |      | 210        |         |
| Blue-crowned manakin           |      |      |            |         |
| Dark-eyed junco                |      |      |            |         |
| Bengalese finch                |      |      |            |         |
| Mainland tiger snake           |      |      |            |         |
| Central bearded dragon         |      | 2875 |            |         |
| Argentine black and white tegu |      |      |            |         |
| Human                          |      |      | 989        |         |
| Chimpanzee                     |      |      |            |         |
| Bonobo                         |      |      |            |         |
| Gorilla                        |      |      |            |         |
| Gibbon                         |      |      |            |         |
| Olive baboon                   |      |      |            |         |
| Vervet monkey                  |      |      |            |         |
| Sooty mangabey                 |      |      |            |         |
| Crab-eating macaque            |      |      |            |         |
| Pig-tailed macaque             |      |      |            |         |
| Drill                          |      |      |            |         |
| Angola colobus                 |      |      |            |         |

|                                        |  |  |      |  |
|----------------------------------------|--|--|------|--|
| Marmoset                               |  |  |      |  |
| Bolivian squirrel monkey               |  |  |      |  |
| Capuchin                               |  |  |      |  |
| Mas night monkey                       |  |  |      |  |
| Bushbaby                               |  |  |      |  |
| Mouse lemur                            |  |  |      |  |
| Coquerels sifaka                       |  |  |      |  |
| Rabbit                                 |  |  |      |  |
| Guinea pig                             |  |  |      |  |
| Degu                                   |  |  |      |  |
| Long-tailed chinchilla                 |  |  |      |  |
| Naked mole-rat female                  |  |  |      |  |
| Damara mole rat                        |  |  |      |  |
| Upper galilee mountains blind mole rat |  |  |      |  |
| Rat                                    |  |  |      |  |
| Shrew mouse                            |  |  |      |  |
| Ryukyu mouse                           |  |  | 993  |  |
| Mouse                                  |  |  | 960  |  |
| Northern American deer mouse           |  |  |      |  |
| Prairie vole                           |  |  |      |  |
| Chinese hamster CHOK1GS                |  |  |      |  |
| Golden Hamster                         |  |  |      |  |
| Squirrel                               |  |  |      |  |
| Kangaroo rat                           |  |  |      |  |
| Cow                                    |  |  |      |  |
| Goat                                   |  |  |      |  |
| Pig                                    |  |  | 2144 |  |
| Horse                                  |  |  |      |  |
| Ferret                                 |  |  |      |  |
| Dog                                    |  |  |      |  |
| Leopard                                |  |  |      |  |
| Cat                                    |  |  |      |  |
| Elephant                               |  |  |      |  |
| Common wonbat                          |  |  |      |  |

| TargetScan |            |           |            |                                 |
|------------|------------|-----------|------------|---------------------------------|
| Espécie    | Posição    |           |            |                                 |
|            | miR-19a-5p | let-7c-3p | miR-20a-3p | miR-203a-3p                     |
| Zebrafish  |            | 2967      | 321        | 1484, 1977, 2089, 284, 771, 883 |
| Cavefish   |            | 1214, 828 |            | 1653                            |
| Fugu       |            |           |            |                                 |
| Tetraodon  |            |           | 391        |                                 |

|                       |  |              |               |           |
|-----------------------|--|--------------|---------------|-----------|
| Stickleback           |  |              |               |           |
| Tilapia               |  | 708,<br>3694 |               | 723, 96   |
| Amazon molly          |  |              | 1127          |           |
| Platyfish             |  |              | 1121          |           |
| Spotted gar           |  |              |               |           |
| P. kingsleyae         |  |              |               |           |
| Asian bonytongue      |  | 630          | 717           | 321       |
| Huchen                |  |              |               |           |
| Northern pike         |  |              | 1020          | 106       |
| Big-finned mudskipper |  |              |               |           |
| Tiger tail seahorse   |  |              |               |           |
| Ballan wrasse         |  | 1115         | 2000          |           |
| Ocean sunfish         |  |              | 651           |           |
| Climbing perch        |  |              | 2044          | 1402, 710 |
| Swamp eel             |  | 1040         | 255           | 1350      |
| Zig-zag eel           |  |              | 201           | 693       |
| Barramundi perch      |  |              |               |           |
| Yellowtail amberjack  |  | 1191         |               | 1530, 826 |
| Greater amberjack     |  |              |               | 821       |
| Turbot                |  | 1144         |               | 1471, 782 |
| Tongue sole           |  |              |               |           |
| Bicolor damselfish    |  |              |               | 76, 85    |
| Spiny chromis         |  |              | 252           |           |
| Clown anemonefish     |  | 734          |               | 748, 80   |
| Orange clownfish      |  | 804          |               | 80, 818   |
| Lyretail cichlid      |  | 690          |               | 705, 99   |
| Burton's mouthbrooder |  | 690          |               | 100, 705  |
| Makobe Island cichlid |  | 688          |               | 98        |
| Zebra mbuna           |  | 689          |               | 101, 704  |
| Eastern happy         |  | 687          |               | 101, 702  |
| Indian medaka         |  |              |               |           |
| Japanese medaka HdrR  |  |              |               |           |
| Mangrove rivulus      |  |              | 710           | 71        |
| Guppy                 |  |              | 1130,<br>3389 | 2596      |
| Shortfin molly        |  |              | 1128          |           |
| Sailfin molly         |  |              | 1125          |           |
| Western mosquitofish  |  |              | 1111          |           |
| Monterrey platyfish   |  |              | 1121          |           |
| Sheepshead minnow     |  |              |               |           |
| Mummichog             |  |              | 1173          |           |
| Channel catfish       |  |              |               |           |
| Red-bellied piranha   |  |              |               | 357       |
| Electric eel          |  |              |               |           |
| Coelacanth            |  | 920          |               |           |

|                                        |  |              |      |      |
|----------------------------------------|--|--------------|------|------|
| Frog                                   |  |              | 1373 |      |
| Anole Lizard                           |  |              | 699  |      |
| Chicken                                |  |              |      | 936  |
| Painted turtle                         |  | 1635         |      | 2345 |
| Australian saltwater crocodile         |  |              | 257  |      |
| Pink-footed goose                      |  |              | 224  |      |
| Blue-crowned manakin                   |  |              |      |      |
| Dark-eyed junco                        |  |              |      |      |
| Bengalese finch                        |  |              |      |      |
| Mainland tiger snake                   |  |              |      |      |
| Central bearded dragon                 |  | 2891,<br>528 |      |      |
| Argentine black and white tegu         |  |              |      |      |
| Human                                  |  |              | 1003 |      |
| Chipanzee                              |  |              |      |      |
| Bonobo                                 |  |              |      |      |
| Gorilla                                |  |              | 431  |      |
| Gibbon                                 |  |              |      |      |
| Olive baboon                           |  |              |      |      |
| Vervet monkey                          |  |              |      |      |
| Sooty mangabey                         |  |              |      |      |
| Crab-eating macaque                    |  |              |      |      |
| Pig-tailed macaque                     |  |              | 2104 |      |
| Drill                                  |  |              |      |      |
| Angola colobus                         |  |              |      |      |
| Marmoset                               |  |              |      |      |
| Bolivian squirrel monkey               |  |              |      |      |
| Capuchin                               |  |              |      |      |
| Mas night monkey                       |  |              |      |      |
| Bushbaby                               |  |              |      |      |
| Mouse lemur                            |  |              |      |      |
| Coquerels sifaka                       |  |              |      |      |
| Rabbit                                 |  |              |      |      |
| Guinea pig                             |  |              |      |      |
| Degu                                   |  |              |      |      |
| Long-tailed chinchilla                 |  |              |      |      |
| Naked mole-rat female                  |  |              |      |      |
| Damara mole rat                        |  |              |      |      |
| Upper galilee mountains blind mole rat |  |              |      |      |
| Rat                                    |  |              |      |      |
| Shrew mouse                            |  |              |      |      |
| Ryukyu mouse                           |  |              | 1013 | 959  |
| Mouse                                  |  |              | 980  |      |
| Northern American deer mouse           |  |              |      |      |
| Prairie vole                           |  |              | 911  |      |

|                         |  |      |      |  |
|-------------------------|--|------|------|--|
| Chinese hamster CHOK1GS |  |      |      |  |
| Golden Hamster          |  |      |      |  |
| Squirrel                |  |      |      |  |
| Kangaroo rat            |  |      |      |  |
| Cow                     |  |      |      |  |
| Goat                    |  |      |      |  |
| Pig                     |  |      | 2157 |  |
| Horse                   |  |      |      |  |
| Ferret                  |  |      |      |  |
| Dog                     |  |      | 154  |  |
| Leopard                 |  | 1344 |      |  |
| Cat                     |  | 1356 |      |  |
| Elephant                |  |      |      |  |
| Common wonbat           |  |      |      |  |

### 8.5. Tamanho da região 3'UTR do gene *sp7*.

Lista com tamanho em pares de base da região 3'UTR do gene *sp7* encontrado nos grupos de vertebrados analisados: peixes, tetrápodes não mamíferos e mamíferos. As células preenchidas em vermelho indicam que a sequência e o tamanho foram obtidos diretamente do Ensembl. As preenchidas em roxo indicam que a sequência e o tamanho foram preditos utilizando a ferramenta Poly(A) Signal Miner.

| Espécie              | Tamanho da 3'UTR em pares de base |
|----------------------|-----------------------------------|
| Zebrafish            | 4043                              |
| Electric eel         | 800                               |
| Cavefish             | 1697                              |
| Red-bellied piranha  | 977                               |
| Channel catfish      | 1087                              |
| Mummichog            | 1454                              |
| Platyfish            | 1377                              |
| Monterrey platyfish  | 1377                              |
| Western mosquitofish | 1358                              |
| Amazon molly         | 1252                              |
| Mangrove rivulus     | 1434                              |

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Japanese medaka HdrR  | 1241 |
| Indian medaka         | 1067 |
| Zebra mbuna           | 1471 |
| Eastern happy         | 2167 |
| Makobe Island cichlid | 2051 |
| Burton's mouthbrooder | 1585 |
| Lyretail cichlid      | 2052 |
| Tilapia               | 3739 |
| Orange clownfish      | 984  |
| Tongue sole           | 73   |
| Turbot                | 1669 |
| Greater amberjack     | 1101 |
| Yellowtail amberjack  | 1543 |
| Barramundi perch      | 103  |
| Zig-zag eel           | 1383 |
| Swamp eel             | 1609 |
| Climbing perch        | 2054 |
| Tetraodon             | 772  |
| Fugu                  | 2276 |
| Ocean sunfish         | 813  |
| Ballan wrasse         | 2853 |
| Stickleback           | 316  |
| Tiger tail seahorse   | 279  |
| Northern pike         | 2280 |
| Asian bonytongue      | 1057 |
| P. kingsleyae         | 2186 |
| Spotted gar           | 3314 |
| Shortfin molly        | 1384 |
| Sailfin molly         | 1381 |
| Sheepshead minnow     | 1416 |
| Big-finned mudskipper | 545  |
| Huchen                | 320  |
| Bicolor damselfish    | 185  |
| Spiny chromis         | 740  |
| Clown anemonefish     | 919  |

|                                        |      |
|----------------------------------------|------|
| Coelacanth                             | 1301 |
| Frog                                   | 1752 |
| Argentine black and white tegu         | 3008 |
| Mainland tiger snake                   | 2422 |
| Central bearded dragon                 | 2908 |
| Anole Lizard                           | 1602 |
| Painted turtle                         | 2711 |
| Pink-footed goose                      | 1822 |
| Chicken                                | 1752 |
| Blue-crowned manakin                   | 411  |
| Bengalese finch                        | 373  |
| Dark-eyed junco                        | 380  |
| Australian saltwater crocodile         | 1454 |
| Common wonbat                          | 2251 |
| Guinea pig                             | 1610 |
| Degu                                   | 146  |
| Long-tailed chinchilla                 | 1587 |
| Naked mole-rat female                  | 1824 |
| Damara mole rat                        | 1062 |
| Squirrel                               | 28   |
| Kangaroo rat                           | 43   |
| Ryukyu mouse                           | 1560 |
| Shrew mouse                            | 1687 |
| Rat                                    | 3133 |
| Chinese hamster CHOK1GS                | 3532 |
| Golden Hamster                         | 3693 |
| Northern American deer mouse           | 1360 |
| Prairie vole                           | 933  |
| Upper galilee mountains blind mole rat | 616  |
| Rabbit                                 | 1666 |
| Coquerels sifaka                       | 28   |
| Mouse lemur                            | 832  |
| Bushbaby                               | 1613 |
| Bonobo                                 | 1588 |
| Chimpanzee                             | 1570 |

|                          |      |
|--------------------------|------|
| Human                    | 1571 |
| Gorilla                  | 1587 |
| Gibbon                   | 1595 |
| Angola colobus           | 1592 |
| Crab-eating macaque      | 1600 |
| Pig-tailed macaque       | 2318 |
| Drill                    | 1599 |
| Sooty mangabey           | 1599 |
| Olive baboon             | 1580 |
| Vervet monkey            | 1575 |
| Bolivian squirrel monkey | 28   |
| Marmoset                 | 1598 |
| Capuchin                 | 1617 |
| Mas night monkey         | 1596 |
| Cow                      | 1652 |
| Goat                     | 2421 |
| Pig                      | 3583 |
| Leopard                  | 1638 |
| Cat                      | 3898 |
| Dog                      | 810  |
| Ferret                   | 2055 |
| Horse                    | 1620 |
| Elephant                 | 1625 |

#### 8.6. Resultado das predições de miRNAs candidatos a regulação de *sp7*.

Resultados das predições de miRNAs candidatos a regulação de *sp7* gerados pelas três ferramentas: TargetSan, miRANDA e RNA22.



| Resultado da predição de miRNAs candidatos a regulação de <i>sp7</i> pela ferramenta TargetScan |            |                   |           |           |         |                         |                       |                       |                 |                  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------------|-----------|-----------|---------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|------------------|--|
| Gene ID                                                                                         | Species ID | Mirbase ID        | Site Type | UTR start | UTR end | 3' pairing contribution | local AU contribution | position contribution | TA contribution | SPS contribution |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-let-7c-3p     | 7mer-m8   | 2967      | 2973    | 0.003                   | -0.064                | 0.090                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-let-7d-3p     | 7mer-m8   | 2967      | 2973    | 0.003                   | -0.064                | 0.090                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-103       | 7mer-1a   | 21        | 27      | -0.002                  | 0.038                 | -0.048                | 0.011           | -0.067           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-107a-3p   | 8mer-1a   | 504       | 511     | 0.003                   | -0.076                | 0.013                 | 0.018           | -0.066           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-107b      | 8mer-1a   | 504       | 511     | 0.003                   | -0.076                | 0.013                 | 0.018           | -0.066           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-125b-1-3p | 8mer-1a   | 2306      | 2313    | 0.024                   | -0.002                | 0.265                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-125b-2-3p | 7mer-1a   | 2425      | 2431    | 0.004                   | -0.031                | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-125c-3p   | 8mer-1a   | 2167      | 2174    | -0.018                  | -0.024                | 0.265                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-126a-5p   | 7mer-1a   | 1937      | 1943    | -0.002                  | -0.032                | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-126b-5p   | 7mer-1a   | 1937      | 1943    | -0.002                  | -0.032                | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-130a      | 7mer-m8   | 3061      | 3067    | 0.012                   | -0.043                | 0.077                 | -0.002          | 0.004            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-130b      | 7mer-m8   | 3061      | 3067    | 0.021                   | -0.043                | 0.077                 | -0.002          | 0.004            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-130c-3p   | 7mer-m8   | 3061      | 3067    | 0.021                   | -0.043                | 0.077                 | -0.002          | 0.004            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-133a-2-5p | 7mer-1a   | 1424      | 1430    | 0.004                   | -0.037                | 0.106                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-133a-5p   | 7mer-1a   | 1424      | 1430    | 0.004                   | -0.037                | 0.106                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-137-3p    | 7mer-1a   | 3383      | 3389    | 0.001                   | -0.036                | 0.022                 | -0.001          | 0.030            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-138-3p    | 7mer-1a   | 3078      | 3084    | 0.008                   | 0.006                 | 0.055                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-138-5p    | 7mer-1a   | 1424      | 1430    | 0.001                   | -0.037                | 0.106                 | 0.006           | -0.066           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-141-3p    | 7mer-1a   | 2453      | 2459    | 0.001                   | -0.045                | 0.114                 | 0.016           | 0.025            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-142a-5p   | 7mer-1a   | 2180      | 2186    | 0.004                   | 0.010                 | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-142b-5p   | 7mer-1a   | 2180      | 2186    | 0.004                   | 0.010                 | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-153a-3p   | 7mer-1a   | 3380      | 3386    | -0.002                  | -0.047                | 0.022                 | -0.008          | 0.014            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-153b-3p   | 7mer-1a   | 3380      | 3386    | -0.002                  | -0.047                | 0.022                 | -0.008          | 0.014            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-153c-3p   | 7mer-1a   | 3380      | 3386    | -0.002                  | -0.047                | 0.022                 | -0.008          | 0.014            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-16c-3p    | 7mer-m8   | 1351      | 1357    | 0.003                   | -0.017                | 0.129                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-17a-2-3p  | 7mer-m8   | 321       | 327     | 0.012                   | -0.028                | -0.016                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-17a-3p    | 7mer-m8   | 321       | 327     | 0.012                   | -0.028                | -0.016                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-17a-5p    | 7mer-1a   | 832       | 838     | 0.008                   | -0.000                | 0.041                 | 0.025           | 0.044            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-181b-3-3p | 7mer-1a   | 3845      | 3851    | -0.002                  | 0.002                 | -0.029                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-181b-3p   | 7mer-1a   | 3845      | 3851    | -0.002                  | 0.002                 | -0.029                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-181d-3p   | 7mer-1a   | 3845      | 3851    | 0.001                   | 0.002                 | -0.029                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-182-3p    | 7mer-1a   | 2637      | 2643    | 0.004                   | 0.002                 | 0.103                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-183-3p    | 8mer-1a   | 344       | 351     | 0.024                   | -0.008                | -0.027                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-190a      | 7mer-1a   | 523       | 529     | -0.002                  | -0.008                | 0.007                 | -0.022          | 0.041            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-190b      | 7mer-1a   | 523       | 529     | -0.002                  | -0.008                | 0.007                 | -0.022          | 0.041            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-192       | 7mer-1a   | 1238      | 1244    | -0.006                  | -0.039                | 0.085                 | -0.023          | -0.031           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-19a-3p    | 7mer-m8   | 3060      | 3066    | -0.007                  | -0.021                | 0.077                 | 0.004           | 0.019            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-19b-3p    | 7mer-m8   | 3060      | 3066    | -0.007                  | -0.021                | 0.077                 | 0.004           | 0.019            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-19c-3p    | 7mer-m8   | 3060      | 3066    | -0.007                  | -0.021                | 0.077                 | 0.004           | 0.019            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-19d-3p    | 7mer-m8   | 3060      | 3066    | -0.007                  | -0.021                | 0.077                 | 0.004           | 0.019            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-200a-3p   | 7mer-1a   | 2453      | 2459    | 0.001                   | -0.045                | 0.114                 | 0.016           | 0.025            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-203a-3p   | 8mer-1a   | 1484      | 1491    | 0.024                   | -0.047                | 0.261                 | 0.051           | 0.105            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-203b-3p   | 8mer-1a   | 1484      | 1491    | 0.024                   | -0.047                | 0.261                 | 0.051           | 0.105            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-204-3p    | 7mer-1a   | 1798      | 1804    | 0.008                   | -0.051                | 0.114                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-20a-3p    | 7mer-m8   | 321       | 327     | 0.012                   | -0.028                | -0.016                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-20b-5p    | 7mer-1a   | 832       | 838     | 0.008                   | -0.000                | 0.041                 | 0.025           | 0.044            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-2187-5p   | 7mer-1a   | 2866      | 2872    | 0.001                   | -0.042                | 0.078                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-2189      | 8mer-1a   | 1288      | 1295    | -0.018                  | -0.036                | 0.211                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-219-5p    | 7mer-1a   | 1289      | 1295    | -0.002                  | -0.019                | 0.091                 | -0.027          | 0.034            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-2192      | 7mer-m8   | 1545      | 1551    | -0.007                  | -0.008                | 0.151                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-2195      | 8mer-1a   | 3495      | 3502    | 0.003                   | -0.038                | 0.023                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-2196      | 7mer-m8   | 3697      | 3703    | 0.012                   | -0.023                | -0.014                | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-24        | 7mer-1a   | 2888      | 2894    | 0.015                   | -0.018                | 0.076                 | 0.028           | -0.069           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-24b-3p    | 7mer-1a   | 2888      | 2894    | 0.015                   | -0.018                | 0.076                 | 0.028           | -0.069           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-25-3p     | 7mer-1a   | 3382      | 3388    | 0.004                   | -0.034                | 0.022                 | 0.000           | 0.023            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-27c-5p    | 8mer-1a   | 1384      | 1391    | 0.003                   | -0.063                | 0.235                 | NA              | NA               |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-29a       | 8mer-1a   | 32        | 39      | 0.024                   | -0.014                | -0.106                | -0.003          | -0.085           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-29b       | 8mer-1a   | 32        | 39      | -0.018                  | -0.014                | -0.106                | -0.003          | -0.085           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-29b3-3p   | 8mer-1a   | 32        | 39      | -0.018                  | -0.014                | -0.106                | -0.003          | -0.085           |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-301a      | 7mer-m8   | 3061      | 3067    | -0.007                  | -0.043                | 0.077                 | -0.002          | 0.004            |  |
| ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7                                                       | 7955       | dre-miR-301b-3p   | 7mer-m8   | 3061      | 3       |                         |                       |                       |                 |                  |  |

| context+ score         | context+ score percentile | UTR region                  | UTR-miRNA pairing | mature miRNA sequence         | miRNA family      | Group # |
|------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|---------|
| -0.091                 |                           | 0 ACCCAUAAUUGGGUUUGUACAU    |                   | CCUUUCGAUCUCCAACAUGUC         | dre-let-7c-3p     | 1       |
| -0.091                 |                           | 0 ACCCAUAAUUGGGUUUGUACAU    |                   | CCUUUCGAUCUCCAACAUGUC         | dre-let-7d-3p     | 2       |
| -0.142                 |                           | 0 GUCCCCAGGACACACUGCUGCAG   |                   | AGUAUCGGGACAUGUUACGACGA       | dre-miR-103       | 3       |
| -0.355                 |                           | 66 AACAAACACUCUAAAAAUGCUGCA |                   | ACUAUCGGGGACAUGUUACGACGA      | dre-miR-107a-3p   | 6       |
| -0.355                 |                           | 66 AACAAACACUCUAAAAAUGCUGCA |                   | UUUCGGGACAUGUUACGACGA         | dre-miR-107b      | 8       |
| 0.04                   |                           | 0 UUAACCUAUGCUCUUUGAACCCGA  |                   | UCGAGGGUUCUUGGAUUGGGCA        | dre-miR-125b-1-3p | 9       |
| 0.013                  |                           | 0 ACACAACAGUCUGAACACCCAU    |                   | UCGAGGGCUCUUGGGUUGGGC         | dre-miR-125b-2-3p | 10      |
| -0.024                 |                           | 0 GGGUUUGCCCAUAUU--UGACCCGA |                   | CAGAGGGUUCGAGGACUGGGCA        | dre-miR-125c-3p   | 13      |
| 0.00600000000000001    |                           | 0 CACUGGUUUA AAAACAAUUAUAA  |                   | GCGCAUGGUUUUCAUUUUAC          | dre-miR-126a-5p   | 15      |
| 0.00600000000000001    |                           | 0 CACUGGUUUA AAAACAAUUAUAA  |                   | GCGCAUGGUUUUCAUUUUAC          | dre-miR-126b-5p   | 17      |
| -0.072                 |                           | 0 UUUAGAGAAAAACUUUGCACUC    |                   | UACGGGAAAAUUGUAACGUGAC        | dre-miR-130a      | 19      |
| -0.063                 |                           | 0 UUUAGAGAAAAACUUUGCACUC    |                   | UACGGGAAAGUAAUAACGUGAC        | dre-miR-130b      | 20      |
| -0.063                 |                           | 0 UUUAGAGAAAAACUUUGCACUC    |                   | UACGGGAAAAUUAUAACGUGAC        | dre-miR-130c-3p   | 21      |
| -0.0009999999999999999 |                           | 33 AAUUGAAAAUUA AAAACAGCAC  |                   | AAACCAAGGUAAAAUGGUCGA         | dre-miR-133a-2-5p | 22      |
| -0.0009999999999999999 |                           | 33 AAUUGAAAAUUA AAAACAGCAC  |                   | UAAACCAAGGUAAAAUGGUCGA        | dre-miR-133a-5p   | 25      |
| -0.058                 |                           | 0 AGAAAAACUUUGUAUGCAUAAA    |                   | AUGCGCAUAAGAAUUCGUUAUU        | dre-miR-137-3p    | 28      |
| -0.0049999999999999999 |                           | 0 GCACUCACUCUUA AAAAUAGAC   |                   | UGGGACCACAACACUUAUCG          | dre-miR-138-3p    | 29      |
| -0.064                 |                           | 33 AAUUGAAAAUUA AAAACAGCAC  |                   | GCCGGACUAAGUGUUGGGUCGA        | dre-miR-138-5p    | 30      |
| 0.037                  |                           | 0 ACCUAGAAUUUUUAAAGUGUUAU   |                   | CGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU        | dre-miR-141-3p    | 33      |
| 0.054                  |                           | 0 UUUGACCCGAGCCAGCUUUAUAA   |                   | UCAUCACGAAAGAUGAAUAC          | dre-miR-142a-5p   | 36      |
| 0.054                  |                           | 0 UUUGACCCGAGCCAGCUUUAUAA   |                   | AUCAUCACGACAGAUGAAUAC         | dre-miR-142b-5p   | 38      |
| -0.095                 |                           | 0 GAGAGAAAAACUUUGUAUGCAAU   |                   | CUAGUGAAAAACACUGAUACGUU       | dre-miR-153a-3p   | 40      |
| -0.095                 |                           | 0 GAGAGAAAAACUUUGUAUGCAAU   |                   | CGAGUAAAAACACUGAUACGUU        | dre-miR-153b-3p   | 41      |
| -0.095                 |                           | 0 GAGAGAAAAACUUUGUAUGCAAU   |                   | CUAGUAAAAACACUGAUACGUU        | dre-miR-153c-3p   | 42      |
| -0.0050000000000000001 |                           | 33 UGUUGUUGUAACCCAAUAUUGGG  |                   | AGUCGUCGUGCUGUUAUAACCU        | dre-miR-16c-3p    | 43      |
| -0.152                 |                           | 0 AUAUGCAUAGAACUAACUGCAGG   |                   | CGAACUUCACGGAGGUGACGUCA       | dre-miR-17a-2-3p  | 50      |
| -0.152                 |                           | 0 AUAUGCAUAGAACUAACUGCAGG   |                   | GAUCUUCACGGAGGUGACGUCA        | dre-miR-17a-3p    | 51      |
| 0.044                  |                           | 0 AUCAUUUAUUCAGUUCACUUUAG   |                   | AUGGACGUGACAUUCGUGAAAC        | dre-miR-17a-5p    | 52      |
| -0.103                 |                           | 50 CUUCAAUUCUGGUGUACAGUGAAC |                   | AACGUAAAGUAACAAGUCACUC        | dre-miR-181b-3-3p | 53      |
| -0.103                 |                           | 50 CUUCAAUUCUGGUGUACAGUGAAC |                   | AAACGUAAAGUAACUAGUCACUC       | dre-miR-181b-3p   | 54      |
| -0.1                   |                           | 50 CUUCAAUUCUGGUGUACAGUGAAC |                   | AAACGUGAGUAACCAAGUCACUC       | dre-miR-181d-3p   | 55      |
| 0.035                  |                           | 0 GGGUCAAAUAGGGACAGAACCAA   |                   | AUCAACCGGUACAGAUUUUGGU        | dre-miR-182-3p    | 56      |
| -0.258                 |                           | 50 CGUCAUUUAUUCAGUGUAAUUCA  |                   | AAUACCGGGAAACCAUUAAGU         | dre-miR-183-3p    | 57      |
| -0.058                 |                           | 0 UGCAUUGUUCAAAACCAUAUCAG   |                   | UGGAUUAUAUAGUUUGUAUAGU        | dre-miR-190a      | 59      |
| -0.058                 |                           | 0 UGCAUUGUUCAAAACCAUAUCAG   |                   | GUUGGCUUAUAGUUUGUAUAGU        | dre-miR-190b      | 60      |
| -0.088                 |                           | 50 AUUCAAAACUUAUCAGGUCAAA   |                   | CCGACAGCUUAAGUA----UCCAGUA    | dre-miR-192       | 61      |
| -0.048                 |                           | 0 UUUUGAGAGAAAAACUUUGCACU   |                   | AGUCAAAACGUUAUCUAAACGUGU      | dre-miR-19a-3p    | 65      |
| -0.048                 |                           | 0 UUUUGAGAGAAAAACUUUGCACU   |                   | AGUCAAAACGUACCUAACGUGU        | dre-miR-19b-3p    | 68      |
| -0.048                 |                           | 0 UUUUGAGAGAAAAACUUUGCACU   |                   | GCUCAAAACGUACCUAACGUGU        | dre-miR-19c-3p    | 70      |
| -0.048                 |                           | 0 UUUUGAGAGAAAAACUUUGCACU   |                   | AGUCAAAACGUACCCAACGUGU        | dre-miR-19d-3p    | 72      |
| 0.037                  |                           | 0 ACCUAGAAUUUUAAAGUGUUAU    |                   | UGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU        | dre-miR-200a-3p   | 73      |
| 0.147                  |                           | 0 AAAAUAAUUAUGGGUCAUUUCAA   |                   | GUUACCAGGAUUUGUAAAGUG         | dre-miR-203a-3p   | 76      |
| 0.147                  |                           | 0 AAAAUAAUUAUGGGUCAUUUCAA   |                   | GUUACCAGGACUUGUAAAGUG         | dre-miR-203b-3p   | 82      |
| -0.003                 |                           | 0 CUUGCAUAAUAAAACCCAGCAU    |                   | CGCAGGGAAACUGAAGGGUCGG        | dre-miR-204-3p    | 88      |
| -0.152                 |                           | 0 AUAUGCAUAGAACUAACUGCAGG   |                   | GAAGUUCACGAGUGUGACGUCA        | dre-miR-20a-3p    | 89      |
| 0.044                  |                           | 0 AUCAUUUAUUCAGUUCACUUUAG   |                   | GAUGGACGUGACACUCGUGAAAC       | dre-miR-20b-5p    | 91      |
| -0.037                 |                           | 0 UUGAAAAGUGUUAUUUAUUUAAA   |                   | AUUUUGUCCGAUAUGAUUAAUU        | dre-miR-2187-5p   | 92      |
| -0.09                  |                           | 0 CCCAUUUUGACCCAAACAUAU     |                   | UGUGUCGACUAUGUUUGUAGU         | dre-miR-2189      | 93      |
| 0.003                  |                           | 0 CCAUAAUUUGACCCAAACAUAU    |                   | UUUUAAACGCCAAACCGUUAGU        | dre-miR-219-5p    | 94      |
| 0.016                  |                           | 0 GCGUCAUUUAUUCAGUUCACUUC   |                   | CAGAGUACUGGAAAGUGAAA          | dre-miR-2192      | 95      |
| -0.259                 |                           | 0 UUUGUCCAUUUUGACCCAAUA     |                   | GUGGGAAUUGAGUGGGGUAGA         | dre-miR-2195      | 97      |
| -0.145                 |                           | 0 GUGUCUUUAUUCUGUCAGAGAGU   |                   | CAGGGUUUACCGUCGUGUCUCC        | dre-miR-2196      | 98      |
| -0.042                 |                           | 0 AAAAAUAUUAGGUUUGAGCCAG    |                   | GACAAGGACGACUUGACUCGGU        | dre-miR-24        | 99      |
| -0.042                 |                           | 0 AAAAAUAUUAGGUUUGAGCCAG    |                   | GCCAAGGACGACUUGACUCGGU        | dre-miR-24b-3p    | 100     |
| -0.059                 |                           | 0 GAGAAAAACUUUGUAUGCAUAA    |                   | AGUCUGGCUCUGUUCACGUUAC        | dre-miR-25-3p     | 101     |
| -0.072                 |                           | 37 ACAAAACCAACCAUUGGGUAAA   |                   | GUAACAAGUGUUCACCCAUUUC        | dre-miR-27c-5p    | 102     |
| -0.431                 |                           | 0 ACACUGCUGCAGGAUUGGUGCUA   |                   | AUUGGCUAAGUUUACCACGAU         | dre-miR-29a       | 110     |
| -0.473                 |                           | 0 ACACUGCUGCAGGAUUGGUGCUA   |                   | UGUGACUAAAGUUU-ACCACGAU       | dre-miR-29b       | 111     |
| -0.473                 |                           | 0 ACACUGCUGCAGGAUUGGUGCUA   |                   | UUGUGACUAAAGUUU-ACCACGAU      | dre-miR-29b3-3p   | 112     |
| -0.091                 |                           | 0 UUUGAGAGAAAAACUUUGCACUC   |                   | GAAACUGUUAUGAUAAACGUGAC       | dre-miR-301a      | 116     |
| -0.081                 |                           | 0 UUUGAGAGAAAAACUUUGCACUC   |                   | GUUACUGUUAUGAUAAACGUGAC       | dre-miR-301b-3p   | 117     |
| -0.081                 |                           | 0 UUUGAGAGAAAAACUUUGCACUC   |                   | GAUACUGUUAUGAUAAACGUGAC       | dre-miR-301c-3p   | 118     |
| 0.007                  |                           | 0 UUUUUUGUGUACUUUCUGAAAAA   |                   | CGUCGUUUUGUAGUCUGACUUUC       | dre-miR-30a-3p    | 120     |
| 0.007                  |                           | 0 UUUUUUGUGUACUUUCUGAAAAA   |                   | CGACGUUUUGUAGGCUGACUUUC       | dre-miR-30e-3p    | 121     |
| -0.028                 |                           | 0 ACUGUACAUGUACAUAUGCUGGC   |                   | GUUGUUUUAGUGACUACGACCU        | dre-miR-338       | 122     |
| -0.028                 |                           | 0 ACUGUACAUGUACAUAUGCUGGC   |                   | CGUUGUUUUAGUGACUACGACCU       | dre-miR-338-3p    | 124     |
| -0.059                 |                           | 0 GAGAAAAACUUUGUAUGCAUAA    |                   | AUGUCUACCUAUGGCACGUUAA        | dre-miR-363-3p    | 126     |
| -0.12                  |                           | 66 CAUUUAAAUUUAAUUGAACAAAU  |                   | AUUGCGCUCGGCUUGCUUUUU         | dre-miR-375       | 127     |
| -0.026                 |                           | 0 UUCAUUCUUAAACUAUGCUUUG    |                   | UUUAGAGCUAAAGUUU-----UACGAAAA | dre-miR-3906      | 130     |
| -0.081                 |                           | 0 UUUGAGAGAAAAACUUUGCACUC   |                   | GGGAUAAUCGUUAUAACGUGAU        | dre-miR-454a      | 133     |
| -0.081                 |                           | 0 UUUGAGAGAAAAACUUUGCACUC   |                   | GGGAUAAUCGUUAUAACGUGAU        | dre-miR-454b      | 134     |
| -0.012                 |                           | 0 AAUUUGGGUUGAAACAAUGCAGC   |                   | GCGUGUCACACAUUUUACGUCC        | dre-miR-460-5p    | 135     |
| -0.05                  |                           | 0 UUUAAACCAUCAUUGUGUCACAU   |                   | CGUCGGCAUGUAUACUACAGUGA       | dre-miR-489       | 136     |
| -0.139                 |                           | 0 UCAAAUCUAUUUAUGUCUUAAA    |                   | AUUUGUAUGUGACGUUACGAAUU       | dre-miR-499-5p    | 137     |
| -0.105                 |                           | 0 AGAGAGCAGUUUUGAGACCUUCA   |                   | UUGACCAUUGGUAAACUGGAAGU       | dre-miR-7146-3p   | 138     |
| 0.021                  |                           | 0 AUAAACCCAACCAUUUGGUUAAA   |                   | UGAUACCUCCAGUUACCAAU          | dre-miR-7146-5p   | 139     |
| -0.098                 |                           | 0 AUGUAGGGUUAUUUUUUCCAUAU   |                   | GUCAUAGUCGCUCAUAAAGGUA        | dre-miR-7148-5p   | 140     |
| -0.074                 |                           | 0 UGGGUUAAAUGUGUCCUUUAAA    |                   | UUGUCAGCGUUUAAGGGAAAUU        | dre-miR-724       | 141     |
| -0.034                 |                           | 0 CGAGCCAGCUUUUAUAAAGACUGU  |                   | CGACCCUCCUUAACUUCUGACU        | dre-miR-727-5p    | 142     |
| 0.016                  |                           | 0 ACAACAGUCUGAACACCCAUAU    |                   | UUGGGUCCAGCAUAGUAUGGGUAC      | dre-miR-729       | 144     |
| -0.108                 |                           | 33 CCAUUGGGUUA AAAAGUGUCAUU |                   | GCUAGGCCUCUUUUGCACAGUAA       | dre-miR-731       | 146     |
| 0.019                  |                           | 20 UGGGUUAAAAGUGUCAUUUAAA   |                   | GCCAUGCUAAGACGUCGUUAAUG       | dre-miR-734       | 149     |
| 0.01                   |                           | 33 AAUUGAAAAUUA AAAACAGCAC  |                   | UGGCGGAAGCCUGGUCGG            | dre-miR-735-5p    | 153     |
| -0.155                 |                           | 0 UCAAAUCUAUUUAUGUCUUAAA    |                   | UUUUGAAAAACAAGCAGAAUG         | dre-miR-736       | 156     |
| -0.244                 |                           | 66 GCACACGUUGGUUUUUUGAUUU   |                   | AUAAAAGAAAUCCAAAACUAA         | dre-miR-737-3p    | 157     |
| -0.162                 |                           | 0 AAGUGUUAUUUAUUAAAAAAA     |                   | UUUUAGUUUUUGGAUUUUUUUG        | dre-miR-737-5p    | 159     |
| -0.135                 |                           | 91 ACUAUUGGGUUCAUUCUUUUUAA  |                   | UGACAUGGUUUGGUGAAAAUA         | dre-miR-740       | 160     |
| 0.055                  |                           | 0 UAUUUGACCCGAGCCAGCUUUAU   |                   | UGAAAGCCAAUAGAUCCGAAU         | dre-miR-9-3p      | 171     |
| 0.055                  |                           | 0 UAUUUGACCCGAGCCAGCUUUAU   |                   | AUGUAAGCCAAGAGAUCCGAAU        | dre-miR-9-4-3p    | 172     |
| 0.055                  |                           | 0 UAUUUGACCCGAGCCAGCUUUAU   |                   | AUGAAAGCCAAGAGAUCCGAAU        | dre-miR-9-7-3p    | 173     |
| -0.074                 |                           | 50 UCAAAUAUGGACAACCCAACCA   |                   | UCGUAACGCCGGCUAGGGUUGGA       | dre-miR-92a-2-5p  | 174     |
| -0.055                 |                           | 0 GAGAAAAACUUUGUAUGCAUAA    |                   | UGUCCGGCCUGUUCACGUUAU         | dre-miR-92a-3p    | 180     |
| -0.074                 |                           | 50 UCAAAUAUGGACAACCCAACCA   |                   | UCGUAAACGAUGGUUAGGGUUGGA      | dre-miR-92a-5p    | 181     |
| -0.059                 |                           | 0 GAGAAAAACUUUGUAUGCAUAA    |                   | CCUCCGGCCCGCUCACGUUAU         | dre-miR-92b-3p    | 187     |
| 0.037                  |                           | 0 AUCAUUUAUUCAGUUCACUUUAG   |                   | AUGGACGUGUUUGUCUGAAAA         | dre-miR-93        | 188     |
| 0.013                  |                           | 25 AGUGUGAUUUUAAAAUAAUUUAU  |                   | UAUAACCGUGAUGUGUAUUUAC        | dre-miR-96-3p     | 189     |

| Resultado da predição de miRNAs candidatos a regulação de <i>sp7</i> pela ferramenta RNA22 |                     |                     |     |                            |        |                              |                          |                                               |    |    |          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|-----|----------------------------|--------|------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------|----|----|----------|
| dre-miR-34a                                                                                | ENSDARG00000019516  | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[6,25]      | -15.40 | GTCCCCAGGACACACTGCTG         | TGGCAGTGCTCTTAGCTGGTTGT  | .....(((((((.....))))))....))..               | 14 | 20 | 0.065500 |
| dre-miR-430a-3p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[878,900]   | -12.60 | TTACCCATTTTCATGA AACACTTG    | TAAGTGCTATTTGTTGGGGTAG   | (((((((.....((.....))))))....))..             | 14 | 23 | 0.053300 |
| dre-miR-222a-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1109,1130] | -12.00 | GGCCAAACTCAACTATTGGGTT       | TGCTCAGTAGTCAGTGTAGATCC  | ((.....(((.....((((.....))))))....))..        | 15 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-182-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2096,2119] | -12.60 | TGAAACACTTGCCGTGTTGTAA       | TTTGGCAATGGTAGAACTCACA   | .....(((((((.....))))))....))..               | 14 | 24 | 0.169000 |
| dre-miR-430c-3p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2084,2106] | -12.72 | TCACCCATTTTCATGA AACACTTG    | TAAGTGCTCTCTTTGGGGTAG    | ..(((((((.....((.....))))))....))..           | 13 | 23 | 0.169000 |
| dre-miR-210-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2184,2204] | -14.20 | ATAAAGACTGTACATGTACAT        | CTGTGCGTGTGACAGCGGCTAA   | .....(((((((.....))))))....))..               | 13 | 21 | 0.055700 |
| dre-miR-182-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2597,2615] | -13.50 | CTATTGGTGATTGGAACCA          | TGGTTCTAGACTTGCCAACTA    | ..(((((((.....((.....))))))....))..           | 14 | 19 | 0.180000 |
| dre-miR-204-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2820,2844] | -13.10 | TTGTCAAATATGGACAAACCCAACC    | GGCTGGGAAGTCAAAGGGACGC   | ..(((((((.....((.....))))))....))..           | 13 | 25 | 0.224000 |
| dre-let-7b                                                                                 | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2901,2922] | -12.00 | GATTAAAAACAGCCATTATTTTT      | TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT   | (((((((.....((((.....))))))....))..           | 19 | 22 | 0.166000 |
| dre-let-7a                                                                                 | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2991,3013] | -12.40 | TTTGGAACAACCCAGCTATTTTA      | TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT   | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 14 | 23 | 0.347000 |
| dre-let-7c-5p                                                                              | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2991,3013] | -12.40 | TTTGGAACAACCCAGCTATTTTA      | TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT   | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 14 | 23 | 0.347000 |
| dre-let-7d-5p                                                                              | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2991,3013] | -14.20 | TTTGGAACAACCCAGCTATTTTA      | TGAGGTAGTTGGTTGTATGGTT   | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 15 | 23 | 0.347000 |
| dre-miR-210-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3713,3734] | -16.60 | TGGGCTTCCAATACATGCACAC       | CTGTGCGTGTGACAGCGGCTAA   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 15 | 22 | 0.043700 |
| dre-miR-19b-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[51,72]     | -15.50 | AATGATGCAAAACAAACAAACA       | AGTTTTGCTGGTTTGCAATCAG   | ..(((((((.....((.....))))))....))..           | 15 | 22 | 0.000963 |
| dre-miR-19c-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[51,72]     | -12.90 | AATGATGCAAAACAAACAAACA       | AGTTTTGCAGGATTGCATCCGG   | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 14 | 22 | 0.000963 |
| dre-miR-15a-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[888,911]   | -17.60 | CATGAAACACTTGCTGTGTTGTTA     | TAGCAGCACAGAATGGTTGTG    | ((.....(((.....((((.....))))))....))..        | 16 | 24 | 0.053300 |
| dre-miR-15b-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[889,911]   | -14.70 | ATGAAACACTTGCTGTGTTGTTA      | TAGCAGCATCATGTTTGTGA     | ..(((((((.....((.....))))))....))..           | 16 | 23 | 0.053300 |
| dre-miR-16a                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[888,911]   | -13.00 | CATGAAACACTTGCTGTGTTGTTA     | TAGCAGCACGTA AATATTGGTG  | ((.....(((.....((((.....))))))....))..        | 18 | 24 | 0.053300 |
| dre-miR-16b                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[889,911]   | -15.20 | ATGAAACACTTGCTGTGTTGTTA      | TAGCAGCACGTA AATATTGGAG  | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 13 | 23 | 0.053300 |
| dre-miR-16c-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[889,911]   | -13.40 | ATGAAACACTTGCTGTGTTGTTA      | TAGCAGCATGTA AATATTGGAG  | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 13 | 23 | 0.053300 |
| dre-miR-19d-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[900,923]   | -17.60 | GCTGTGTTGTTAA AACCCAAGTT     | AGCTTTGCGGGGTGGGCAGTCAGC | (((((.....(((.....((.....))))))....))..       | 17 | 24 | 0.053300 |
| dre-miR-16c-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2231,2254] | -12.50 | TTGGTTGTTTTCCTCAATGTTGGT     | TCCAATATTGCTCGTGCTGCTGA  | ((.....(((.....((((.....))))))....))..        | 14 | 24 | 0.154000 |
| dre-miR-20a-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2661,2682] | -13.30 | ATTTGGGTTGAAACAAATGCAGC      | ACTGCAGTGTGAGCACTGAAG    | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 14 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-23a-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3546,3566] | -13.50 | GCTTCAGTTAGTCTGGAGTTT        | GAATTCCTGGCAGAGTGATT     | ...(((((((.....((((.....))))))....))..        | 15 | 21 | 0.201000 |
| dre-miR-25-5p                                                                              | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1,25]      | -14.10 | CCTCTGTCCCAGGACACACTGCTG     | AGGCGGAGACTTGGGCAGCTGCC  | ...(((((((.....((((.....))))))....))..        | 15 | 25 | 0.065500 |
| dre-miR-107a-3p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3,27]      | -14.80 | TCTGTCCCCAGGACACACTGCTGCA    | AGCAGCATTGTACAGGGCTATCA  | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 13 | 25 | 0.065500 |
| dre-miR-124-6-5p                                                                           | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1,19]      | -13.70 | CCTCTGTCCCCAGGACACA          | CGTGTTCCAGCGCGACCTTGAT   | .....(((((((.....((((.....))))))....))..      | 12 | 19 | 0.065500 |
| dre-miR-92b-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[579,601]   | -13.00 | AACCTGCAATAAAAAACAGCATTT     | AGGTTGGGATGTTGTGTCAGTGT  | (((((.....(((.....((.....))))))....))..       | 18 | 23 | 0.160000 |
| dre-miR-92a-2-5p                                                                           | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[995,1023]  | -12.60 | ACATATGCTGGGTCATGATAGCCAGACT | AGGTTGGGATCGGCCGCAATGCT  | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 17 | 29 | 0.059900 |
| dre-miR-30c-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1109,1127] | -13.80 | GGCCAAACTCAACTATTGG          | CCGGGAGTGGGATGTTTGCCT    | (((((.....(((.....((.....))))))....))..       | 17 | 19 | 0.224000 |
| dre-miR-124-4-5p                                                                           | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1728,1752] | -13.90 | ATCAGGTC A AATATTGGACAAACACA | TGTGTTCA CAGTGGACCTTGAT  | (((((.....(((.....((.....))))))....))..       | 16 | 25 | 0.031400 |
| dre-miR-103                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2093,2116] | -12.50 | TCATGAAACACTTGCCGTGTTGTT     | AGCAGCATTTGTACAGGGCTATGA | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 19 | 24 | 0.169000 |
| dre-miR-92a-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2162,2182] | -12.30 | ATATTTGACCCGAGCCAGCTT        | AGGTTGGGATTGGTAGCAATGCT  | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 14 | 21 | 0.055700 |
| dre-miR-23a-3-5p                                                                           | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3546,3566] | -13.10 | GCTTCAGTTAGTCTGGAGTTT        | GGATTCTGGCAGAGTGATT      | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 15 | 21 | 0.201000 |
| dre-miR-27b-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3543,3567] | -12.20 | CAGGCTTCAGTTAGTCTGGAGTTTC    | AGAGCTTAGCTGATTGTTGAACA  | .....(((((((.....((((.....))))))....))..      | 15 | 25 | 0.201000 |
| dre-miR-30a-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3543,3564] | -13.30 | CAGGCTTCAGTTAGTCTGGAGT       | CTTTCAGTCTGATGTTTGCTGC   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 14 | 22 | 0.201000 |
| dre-miR-122                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[3527,3551] | -13.20 | CAGTACACAAGA AACTTCAGGCTTCA  | TGGAGTGTGACAATGGTGTTTG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 16 | 25 | 0.201000 |
| dre-miR-132-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[892,911]   | -12.90 | AAACACTTGCTGTGTTGTTA         | TAACAGTCTACAGCCATGGTCG   | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 12 | 20 | 0.053300 |
| dre-miR-125c-3p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1062,1084] | -12.90 | CTCTCTAAAAAATGTTGGGCTGT      | ACGGGTCAAGGACTTGGGAGAC   | ..(((((((.....(((.....))))))....))..          | 14 | 23 | 0.347000 |
| dre-miR-138-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2084,2108] | -12.00 | TCACCCATTTTCATGA AACACTTGCC  | AGCTGGTGTGTGAATCAGGCCG   | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 15 | 25 | 0.169000 |
| dre-miR-153b-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2110,2132] | -12.50 | TGTTGTTAA AACCCAAAGTTGGG     | GTCATTTTTGTGGTTTGCAGT    | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 18 | 23 | 0.169000 |
| dre-miR-128-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2683,2705] | -13.10 | ATTTATTAGAGTGAACAGCCTTA      | CGGGCCGTGGCACTGTATGAGA   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 17 | 23 | 0.224000 |
| dre-miR-125b-1-3p                                                                          | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2964,2985] | -12.40 | GGTTTGTACATATTTGATCCGA       | ACGGGTATAGTTCTTGGGAGCT   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 16 | 22 | 0.347000 |
| dre-miR-375                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[149,173]   | -12.60 | AAATGTTGGGTACATGTGGACAAA     | TTTGTTCTGTTCCGCTCGCGTTA  | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 18 | 25 | 0.356000 |
| dre-miR-455-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[985,1007]  | -13.70 | CTGTACATGTACATATGCTGGGT      | ATGCAGTCCATGGGCATATACAC  | ..(((((((.....(((.....))))))....))..          | 16 | 23 | 0.059900 |
| dre-miR-454a                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1064,1083] | -12.80 | CTCTAAAAAATGTTGGGCTG         | TAGTGCAATATTGCTAATAGGG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 16 | 20 | 0.347000 |
| dre-miR-454b                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1062,1083] | -14.00 | TGCTCTAAAAAATGTTGGGCTG       | TAGTGCAATATTGCTTATAGGG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 18 | 22 | 0.347000 |
| dre-miR-194a                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1605,1624] | -12.90 | ACACTTGCTGTGTTGTATA          | TGTAACAGCAACTCCATGTGG    | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 16 | 20 | 0.058200 |
| dre-miR-194b                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1604,1624] | -12.50 | AACACTTGCTGTGTTGTATA         | TGTAACAGCCGCTCCATGTGGA   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 16 | 21 | 0.058200 |
| dre-miR-181c-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1867,1889] | -13.30 | CCCAACCATTTGGTTAA AATGTG     | CACATTCATTGCTGTCGGTGGG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 16 | 23 | 0.333000 |
| dre-miR-206-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2076,2095] | -13.10 | TCCATATTTCCACCATTTCA         | TGGAATGTAAGGAAGTGTGTGG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 17 | 20 | 0.169000 |
| dre-miR-338                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2193,2212] | -12.10 | GTACATCTACCATATGCTGGC        | TCCAGCATGATGATTGTTGTG    | ..(((((((.....(((.....))))))....))..          | 13 | 20 | 0.055700 |
| dre-miR-153a-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2674,2697] | -15.80 | CAATGCAGCATTTATTAGAGTGAA     | GTCATTTTTGTGATGTTGCAGCT  | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 16 | 24 | 0.224000 |
| dre-miR-301b-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2673,2694] | -14.90 | ACAATGCAGCATTTATTAGAGT       | GCTTGACGATGTTGCACTAC     | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 16 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-301c-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2673,2694] | -17.50 | ACAATGCAGCATTTATTAGAGT       | GCTCTGACGATGTTGCACTAC    | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 16 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-139-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[13,29]     | -13.50 | GGACACACTGCTGCAGG            | TCTACAGTGCAATGTGCT       | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 14 | 17 | 0.065500 |
| dre-miR-457a                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[890,911]   | -14.90 | TGAAACACTTGCTGTGTTGTTA       | AAGCAGCACATCAATATTGGCA   | .....(((((((.....((.....))))))....))..        | 12 | 22 | 0.053300 |
| dre-miR-457b-5p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1064,1086] | -12.16 | CTCTAAAAAATGTTGGGCTGTTT      | AAGCAGCACATAA AACTGGAG   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 14 | 23 | 0.347000 |
| dre-miR-457b-3p                                                                            | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1107,1128] | -12.00 | ATGGCCAAACTCAACTATTGGG       | TCCAGTATTGCTGTTCTGCTGT   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 18 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-31                                                                                 | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2090,2109] | -13.70 | ATTTTCATGAAACACTTGCCG        | TGGCAAGATGTTGGCATAGCTG   | .....(((((((.....((((.....))))))....))..      | 14 | 20 | 0.169000 |
| dre-miR-139-3p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2058,2079] | -15.00 | AAATCAACTTTGCGTTTGTCCA       | TGGGGAGGCAGCGCTGTTGGAAT  | ...(((((((.....((((.....))))))....))..        | 16 | 22 | 0.169000 |
| dre-miR-729                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2068,2092] | -12.60 | TGCGTTTGTCATATTTACCCATT      | CATGGGTATGATACGACCTGGGTT | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 16 | 25 | 0.169000 |
| dre-miR-456                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2404,2422] | -13.40 | GGACAAACACAACAGTCTG          | CAGGCTGGTTAGATGGTTGTCA   | ..(((((((.....((((.....))))))....))..         | 15 | 19 | 0.016100 |
| dre-miR-461                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2600,2623] | -12.30 | ITGGTGATTGAAACCAATTTTGG      | TCAGGAATGGGCTAAATGCCAA   | (((((.....(((.....((((.....))))))....))..     | 19 | 24 | 0.180000 |
| dre-miR-460-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2661,2682] | -12.00 | ATTTGGGTTGAAACAATGCAGC       | CCTGCATTGTACACACTGTGCG   | .....(((((((.....((((.....))))))....))..      | 12 | 22 | 0.224000 |
| dre-miR-107b                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[5,27]      | -14.80 | TGTCGCCAGGACACACTGCTGCA      | AGCAGCATGTACAGGGCTTT     | ....(((((((.....((.....))))))....))..         | 13 | 23 | 0.065500 |
| dre-miR-196d                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[302,324]   | -12.40 | TCCAATATGCATAGAACTAAGTG      | TAGGTAGTTTTATGTTGTGGG    | ...(((((((.....((((.....))))))....))..        | 18 | 23 | 0.048200 |
| dre-miR-2184                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[884,905]   | -12.80 | ATTTTCATGAAACACTTGCTGTG      | AACAGTAAGAGTTTATGTGCT    | ....(((((((.....(((.....))))))....))..        | 14 | 22 | 0.053300 |
| dre-miR-2189                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[1274,1295] | -14.10 | CCATATTTGACCCAAACAATCA       | TGATTGTTGTATCAGCTGTGT    | .....(((((((.....((((.....))))))....))..      | 14 | 22 | 0.156000 |
| dre-miR-15c                                                                                | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2096,2117] | -15.30 | TGAAACACTTGCCGTGTTGTTA       | AAGCAGCGCGTCATGGTTTTC    | ..(((((((.....(((.....((((.....))))))....)).. | 16 | 22 | 0.169000 |
| dre-miR-735-5p                                                                             | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2165,2181] | -14.30 | TTTGACCCGAGCCAGCT            | GGCTGGTCCGAAGCGGT        | ..(((((((.....(((.....))))))....))..          | 13 | 17 | 0.055700 |
| dre-miR-196c                                                                               | ENSDARG000000019516 | ENSDART000000128793 | sp7 | target from/to=[2420,2442] | -12.00 | CTGAACAACCCATATATAACCTA      | TAGGT                    |                                               |    |    |          |



|                  |                                           |                            |        |                          |                          |                                             |    |    |          |
|------------------|-------------------------------------------|----------------------------|--------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------------|----|----|----------|
| dre-miR-2188-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[2662,2681] | -12.50 | TTTGGGTTGAAACAATGCAG     | CTGTGTGAGGTTAGACCTATC    | ..((((((..(((.( <b>(</b> ))))))...)))..}}   | 15 | 20 | 0.224000 |
| dre-miR-2185-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[3554,3575] | -15.90 | TAGTCTGGAGTTTCCTTCATTA   | CGGTGCAGGACTCCGCGGCTC    | .(((((((..((( <b>(</b> )))))))))))).        | 17 | 22 | 0.201000 |
| dre-miR-7133-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[1191,1209] | -12.50 | TTGGGTTACAACAACACTA      | TGGTGTTGTGTGTTAAACTGTA   | ...((((((((((( <b>(</b> ))))))))))..}}      | 16 | 19 | 0.285000 |
| dre-miR-181d-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[1865,1889] | -14.60 | AACCCAACCATTGGTTAAAATGTG | TACATTCATTGATGTCGTTGGGTT | (((((((...{.. <b>(</b> ))))))..})....       | 17 | 25 | 0.333000 |
| dre-miR-338-3p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[2193,2212] | -12.30 | GTACATGTACATATGCTGGC     | TCCAGCATCAGTGATTTGTTC    | ((((((..(((.. <b>(</b> ))))))..}).))...     | 15 | 20 | 0.055700 |
| dre-miR-128-3-5p | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[2686,2705] | -12.20 | TATTAGAGTGAACAGCCTTA     | CGGGGCCGTGGCGCTGTCTGAGA  | ..(((((((..((( <b>(</b> ..))))))..}).))..}} | 15 | 20 | 0.224000 |
| dre-miR-7132-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[3056,3076] | -13.80 | AAACTTTGCACTCACTCTTCA    | TGAGGAGTTTAGAGCAAGTAAA   | ....((((((..((( <b>(</b> ))))))))..}).}}    | 15 | 21 | 0.277000 |
| dre-miR-23b-5p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | target from/to=[3523,3542] | -15.70 | TTTTCAGTACACAAGAACTT     | GGGTTCTGGCGTGCTGATT      | ...(((((((..((( <b>(</b> ))))))..}).)))}}   | 15 | 20 | 0.201000 |



| Resultado da predição de miRNAs candidatos a regulação de <i>sp7</i> pela ferramenta miRANDA |                    |                    |     |         |         |        |           |      |         |         |                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|-----|---------|---------|--------|-----------|------|---------|---------|----------------------------------|
| >dre-miR-183-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -8.45   | 2 9    | 331 351   | 7    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-183-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -8.45   | 140.00 | -8.45     | 109  | 21      | 4043    | 331                              |
| >dre-miR-192                                                                                 | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -13.18  | 2 16   | 2722 2741 | 14   | 78.57%  | 78.57%  |                                  |
| >>dre-miR-192                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -13.18  | 145.00 | -13.18    | 127  | 21      | 4043    | 2722                             |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 151.00  | -11.50  | 2 16   | 869 890   | 14   | 71.43%  | 85.71%  |                                  |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 143.00  | -9.68   | 2 21   | 269 291   | 20   | 55.00%  | 75.00%  |                                  |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 143.00  | -9.68   | 2 21   | 1469 1491 | 20   | 55.00%  | 75.00%  |                                  |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 143.00  | -13.97  | 2 16   | 2075 2096 | 14   | 64.29%  | 78.57%  |                                  |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 142.00  | -9.68   | 2 16   | 756 778   | 15   | 60.00%  | 86.67%  |                                  |
| >dre-miR-203a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 142.00  | -9.68   | 2 16   | 1962 1984 | 15   | 60.00%  | 86.67%  |                                  |
| >>dre-miR-203a-3p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 864.00  | -64.19  | 151.00 | -13.97    | 181  | 22      | 4043    | 869 269 1469 2075 756 1962       |
| >dre-let-7c-3p                                                                               | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -9.94   | 2 21   | 2955 2974 | 19   | 63.16%  | 73.68%  |                                  |
| >>dre-let-7c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -9.94   | 145.00 | -9.94     | 433  | 22      | 4043    | 2955                             |
| >dre-let-7d-3p                                                                               | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -9.94   | 2 21   | 2955 2974 | 19   | 63.16%  | 73.68%  |                                  |
| >>dre-let-7d-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 145.00  | -9.94   | 145.00 | -9.94     | 451  | 22      | 4043    | 2955                             |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -11.57  | 2 13   | 2535 2557 | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -13.95  | 2 11   | 462 484   | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -13.79  | 2 11   | 623 645   | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -13.79  | 2 11   | 1336 1358 | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -13.95  | 2 11   | 1664 1686 | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -13.73  | 2 11   | 1829 1851 | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >dre-miR-16c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 150.00  | -12.74  | 2 11   | 2454 2476 | 9    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-16c-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 1052.00 | -93.52  | 152.00 | -13.95    | 658  | 23      | 4043    | 2535 462 623 1336 1664 1829 2454 |
| >dre-miR-17a-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -15.19  | 2 9    | 307 328   | 7    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-17a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -15.19  | 140.00 | -15.19    | 676  | 22      | 4043    | 307                              |
| >dre-miR-17a-2-3p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -13.72  | 2 9    | 306 328   | 7    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-17a-2-3p                                                                           | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -13.72  | 140.00 | -13.72    | 685  | 23      | 4043    | 306                              |
| >dre-miR-19a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 170.00  | -15.06  | 2 20   | 1211 1234 | 20   | 80.00%  | 85.00%  |                                  |
| >dre-miR-19a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 159.00  | -10.90  | 2 21   | 2578 2600 | 20   | 70.00%  | 80.00%  |                                  |
| >>dre-miR-19a-5p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 329.00  | -25.96  | 170.00 | -15.06    | 748  | 22      | 4043    | 1211 2578                        |
| >dre-miR-19a-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 154.00  | -16.57  | 2 22   | 3041 3067 | 25   | 68.00%  | 72.00%  |                                  |
| >>dre-miR-19a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 154.00  | -16.57  | 154.00 | -16.57    | 757  | 23      | 4043    | 3041                             |
| >dre-miR-19b-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -13.28  | 2 22   | 3041 3067 | 24   | 62.50%  | 70.83%  |                                  |
| >>dre-miR-19b-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -13.28  | 152.00 | -13.28    | 775  | 23      | 4043    | 3041                             |
| >dre-miR-19c-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -13.09  | 2 22   | 3041 3067 | 24   | 62.50%  | 70.83%  |                                  |
| >>dre-miR-19c-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -13.09  | 152.00 | -13.09    | 793  | 23      | 4043    | 3041                             |
| >dre-miR-19d-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 144.00  | -12.92  | 2 22   | 3041 3067 | 24   | 58.33%  | 66.67%  |                                  |
| >>dre-miR-19d-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 144.00  | -12.92  | 144.00 | -12.92    | 811  | 23      | 4043    | 3041                             |
| >dre-miR-20a-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 142.00  | -14.54  | 2 20   | 308 328   | 19   | 73.68%  | 73.68%  |                                  |
| >>dre-miR-20a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 142.00  | -14.54  | 142.00 | -14.54    | 829  | 22      | 4043    | 308                              |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 154.00  | -10.34  | 2 15   | 657 678   | 13   | 84.62%  | 84.62%  |                                  |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 154.00  | -10.34  | 2 15   | 1370 1391 | 13   | 84.62%  | 84.62%  |                                  |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 149.00  | -11.37  | 2 16   | 3410 3433 | 16   | 81.25%  | 81.25%  |                                  |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 148.00  | -11.89  | 2 17   | 170 191   | 15   | 73.33%  | 73.33%  |                                  |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 146.00  | -9.58   | 2 15   | 2749 2770 | 13   | 76.92%  | 76.92%  |                                  |
| >dre-miR-27c-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 146.00  | -10.18  | 2 15   | 3221 3242 | 13   | 76.92%  | 76.92%  |                                  |
| >>dre-miR-27c-5p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 897.00  | -63.70  | 154.00 | -11.89    | 1018 | 22      | 4043    | 657 1370 3410 170 2749 3221      |
| >dre-miR-29b                                                                                 | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 151.00  | -23.58  | 2 21   | 17 39     | 20   | 65.00%  | 75.00%  |                                  |
| >>dre-miR-29b                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 151.00  | -23.58  | 151.00 | -23.58    | 1054 | 22      | 4043    | 17                               |
| >dre-miR-29a                                                                                 | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 147.00  | -18.87  | 2 21   | 17 39     | 20   | 60.00%  | 75.00%  |                                  |
| >>dre-miR-29a                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 147.00  | -18.87  | 147.00 | -18.87    | 1063 | 22      | 4043    | 17                               |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -17.99  | 2 22   | 2737 2760 | 21   | 66.67%  | 76.19%  |                                  |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -15.78  | 2 13   | 646 668   | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -15.78  | 2 13   | 1359 1381 | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -15.78  | 2 13   | 2477 2499 | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -15.78  | 2 13   | 2823 2845 | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >dre-miR-92a-5p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 149.00  | -16.32  | 2 22   | 1853 1874 | 21   | 66.67%  | 76.19%  |                                  |
| >>dre-miR-92a-5p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 913.00  | -97.43  | 156.00 | -17.99    | 1144 | 23      | 4043    | 2737 646 1359 2477 2823 1853     |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 160.00  | -19.13  | 2 22   | 2737 2760 | 21   | 71.43%  | 76.19%  |                                  |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -17.11  | 2 21   | 646 668   | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                                  |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -17.11  | 2 21   | 1359 1381 | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                                  |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -17.11  | 2 21   | 2477 2499 | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                                  |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -17.11  | 2 21   | 2823 2845 | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                                  |
| >dre-miR-92a-2-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 151.00  | -19.15  | 2 22   | 1853 1874 | 20   | 65.00%  | 75.00%  |                                  |
| >>dre-miR-92a-2-5p                                                                           | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 935.00  | -106.72 | 160.00 | -19.15    | 1162 | 23      | 4043    | 2737 646 1359 2477 2823 1853     |
| >dre-miR-96-3p                                                                               | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -11.08  | 2 19   | 2315 2335 | 17   | 70.59%  | 88.24%  |                                  |
| >>dre-miR-96-3p                                                                              | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -11.08  | 156.00 | -11.08    | 1207 | 22      | 4043    | 2315                             |
| >dre-miR-103                                                                                 | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -16.01  | 2 22   | 488 511   | 21   | 71.43%  | 71.43%  |                                  |
| >>dre-miR-103                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -16.01  | 156.00 | -16.01    | 1270 | 23      | 4043    | 488                              |
| >dre-miR-107a-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -15.98  | 2 22   | 488 511   | 21   | 71.43%  | 71.43%  |                                  |
| >>dre-miR-107a-3p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 156.00  | -15.98  | 156.00 | -15.98    | 1288 | 23      | 4043    | 488                              |
| >dre-miR-125b-1-3p                                                                           | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -13.74  | 2 9    | 2292 2313 | 7    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-125b-1-3p                                                                          | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -13.74  | 140.00 | -13.74    | 1360 | 22      | 4043    | 2292                             |
| >dre-miR-125b-2-3p                                                                           | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 155.00  | -19.63  | 2 12   | 2741 2761 | 10   | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-125b-2-3p                                                                          | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 155.00  | -19.63  | 155.00 | -19.63    | 1369 | 21      | 4043    | 2741                             |
| >dre-miR-125c-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 147.00  | -23.55  | 2 19   | 949 968   | 17   | 64.71%  | 82.35%  |                                  |
| >dre-miR-125c-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 147.00  | -23.55  | 2 19   | 2155 2174 | 17   | 64.71%  | 82.35%  |                                  |
| >>dre-miR-125c-3p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 294.00  | -47.10  | 147.00 | -23.55    | 1396 | 22      | 4043    | 949 2155                         |
| >dre-miR-126a-5p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 153.00  | -4.18   | 2 18   | 1926 1946 | 16   | 75.00%  | 75.00%  |                                  |
| >>dre-miR-126a-5p                                                                            | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 153.00  | -4.18   | 153.00 | -4.18     | 1405 | 21      | 4043    | 1926                             |
| >dre-miR-130a                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -10.23  | 2 13   | 3047 3068 | 11   | 90.91%  | 90.91%  |                                  |
| >>dre-miR-130a                                                                               | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 152.00  | -10.23  | 152.00 | -10.23    | 1468 | 22      | 4043    | 3047                             |
| >dre-miR-130b                                                                                | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -8.38   | 2 9    | 3047 3068 | 7    | 100.00% | 100.00% |                                  |
| >>dre-miR-130b                                                                               | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 140.00  | -8.38   | 140.00 | -8.38     | 1477 | 22      | 4043    | 3047                             |
| >dre-miR-130c-3p                                                                             | ENSDARG00000019516 | ENSDART00000128793 | sp7 | 144.00  | -7.50   | 2 13   | 3047 3068 | 11   | 81.82%  | 81.82%  |                                  |
| >>dre-miR                                                                                    |                    |                    |     |         |         |        |           |      |         |         |                                  |

|                   |                                           |        |        |        |           |      |         |         |                         |
|-------------------|-------------------------------------------|--------|--------|--------|-----------|------|---------|---------|-------------------------|
| >dre-miR-338      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 148.00 | -16.37 | 2 21   | 985 1006  | 19   | 57.89%  | 73.68%  |                         |
| >dre-miR-338      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 148.00 | -14.59 | 2 21   | 2191 2212 | 19   | 57.89%  | 73.68%  |                         |
| >>dre-miR-338     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 296.00 | -30.96 | 148.00 | -16.37    | 2161 | 22      | 4043    | 985 2191                |
| >dre-miR-454a     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 147.00 | -11.54 | 2 21   | 3045 3068 | 21   | 61.90%  | 71.43%  |                         |
| >>dre-miR-454a    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 147.00 | -11.54 | 147.00 | -11.54    | 2206 | 22      | 4043    | 3045                    |
| >dre-miR-454b     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 151.00 | -11.75 | 2 21   | 3045 3068 | 21   | 61.90%  | 76.19%  |                         |
| >>dre-miR-454b    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 151.00 | -11.75 | 151.00 | -11.75    | 2215 | 22      | 4043    | 3045                    |
| >dre-miR-460-5p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 150.00 | -13.51 | 2 11   | 2661 2682 | 9    | 100.00% | 100.00% |                         |
| >>dre-miR-460-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 150.00 | -13.51 | 150.00 | -13.51    | 2413 | 22      | 4043    | 2661                    |
| >dre-miR-727-5p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 147.00 | -9.51  | 2 12   | 967 988   | 10   | 90.00%  | 90.00%  |                         |
| >dre-miR-727-5p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 142.00 | -9.51  | 2 11   | 2173 2194 | 9    | 88.89%  | 88.89%  |                         |
| >>dre-miR-727-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 289.00 | -19.02 | 147.00 | -9.51     | 2629 | 22      | 4043    | 967 2173                |
| >dre-miR-729      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 156.00 | -15.18 | 2 18   | 862 886   | 17   | 76.47%  | 82.35%  |                         |
| >>dre-miR-729     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 156.00 | -15.18 | 156.00 | -15.18    | 2656 | 24      | 4043    | 862                     |
| >dre-miR-731      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 172.00 | -26.18 | 2 21   | 178 201   | 19   | 73.68%  | 89.47%  |                         |
| >dre-miR-731      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 168.00 | -21.26 | 2 21   | 1378 1401 | 19   | 73.68%  | 84.21%  |                         |
| >dre-miR-731      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 168.00 | -22.08 | 2 23   | 1872 1894 | 21   | 71.43%  | 85.71%  |                         |
| >>dre-miR-731     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 508.00 | -69.52 | 172.00 | -26.18    | 2692 | 24      | 4043    | 178 1378 1872           |
| >dre-miR-734      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 160.00 | -20.28 | 2 13   | 2666 2688 | 11   | 100.00% | 100.00% |                         |
| >>dre-miR-734     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 160.00 | -20.28 | 160.00 | -20.28    | 2728 | 23      | 4043    | 2666                    |
| >dre-miR-737-5p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 151.00 | -5.03  | 2 19   | 2860 2878 | 17   | 70.59%  | 82.35%  |                         |
| >>dre-miR-737-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 151.00 | -5.03  | 151.00 | -5.03     | 2764 | 21      | 4043    | 2860                    |
| >dre-miR-737-3p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 147.00 | -4.71  | 2 20   | 3734 3751 | 18   | 72.22%  | 72.22%  |                         |
| >>dre-miR-737-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 147.00 | -4.71  | 147.00 | -4.71     | 2773 | 21      | 4043    | 3734                    |
| >dre-miR-740      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 165.00 | -13.55 | 2 18   | 2931 2952 | 16   | 81.25%  | 87.50%  |                         |
| >dre-miR-740      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 159.00 | -15.20 | 2 21   | 959 981   | 20   | 70.00%  | 80.00%  |                         |
| >dre-miR-740      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 153.00 | -9.92  | 2 21   | 2770 2789 | 19   | 68.42%  | 78.95%  |                         |
| >dre-miR-740      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 146.00 | -6.10  | 2 15   | 3152 3173 | 13   | 69.23%  | 84.62%  |                         |
| >dre-miR-740      | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 140.00 | -10.61 | 2 9    | 1121 1142 | 7    | 100.00% | 100.00% |                         |
| >>dre-miR-740     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 763.00 | -55.38 | 165.00 | -15.20    | 2791 | 22      | 4043    | 2931 959 2770 3152 1121 |
| >dre-miR-107b     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 154.00 | -15.98 | 2 20   | 490 511   | 19   | 73.68%  | 73.68%  |                         |
| >>dre-miR-107b    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 154.00 | -15.98 | 154.00 | -15.98    | 2908 | 21      | 4043    | 490                     |
| >dre-miR-2196     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 140.00 | -14.77 | 2 9    | 3681 3704 | 7    | 100.00% | 100.00% |                         |
| >>dre-miR-2196    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 140.00 | -14.77 | 140.00 | -14.77    | 2935 | 24      | 4043    | 3681                    |
| >dre-miR-126b-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 153.00 | -4.18  | 2 18   | 1926 1946 | 16   | 75.00%  | 75.00%  |                         |
| >>dre-miR-126b-5p | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 153.00 | -4.18  | 153.00 | -4.18     | 2953 | 21      | 4043    | 1926                    |
| >dre-miR-2189     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 168.00 | -20.19 | 2 21   | 1274 1295 | 19   | 73.68%  | 84.21%  |                         |
| >>dre-miR-2189    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 168.00 | -20.19 | 168.00 | -20.19    | 2998 | 22      | 4043    | 1274                    |
| >dre-miR-2192     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 149.00 | -12.93 | 2 19   | 815 837   | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                         |
| >dre-miR-2192     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 149.00 | -13.16 | 2 19   | 1530 1552 | 19   | 68.42%  | 73.68%  |                         |
| >>dre-miR-2192    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 298.00 | -26.09 | 149.00 | -13.16    | 3007 | 21      | 4043    | 815 1530                |
| >dre-miR-2195     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 155.00 | -16.92 | 2 20   | 3482 3502 | 18   | 61.11%  | 83.33%  |                         |
| >>dre-miR-2195    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 155.00 | -16.92 | 155.00 | -16.92    | 3043 | 21      | 4043    | 3482                    |
| >dre-miR-3906     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 158.00 | -11.94 | 2 22   | 3148 3170 | 21   | 71.43%  | 80.95%  |                         |
| >dre-miR-3906     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 157.00 | -11.99 | 2 20   | 2278 2305 | 23   | 73.91%  | 73.91%  |                         |
| >dre-miR-3906     | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 143.00 | -7.35  | 2 13   | 3842 3865 | 12   | 83.33%  | 83.33%  |                         |
| >>dre-miR-3906    | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 458.00 | -31.28 | 158.00 | -11.99    | 3061 | 23      | 4043    | 3148 2278 3842          |
| >dre-miR-7146-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 140.00 | -14.34 | 2 9    | 3021 3042 | 7    | 100.00% | 100.00% |                         |
| >>dre-miR-7146-3p | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 140.00 | -14.34 | 140.00 | -14.34    | 3088 | 22      | 4043    | 3021                    |
| >dre-miR-29b3-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 151.00 | -14.94 | 2 23   | 1899 1922 | 22   | 68.18%  | 72.73%  |                         |
| >dre-miR-29b3-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 150.00 | -15.02 | 2 23   | 1406 1429 | 21   | 61.90%  | 66.67%  |                         |
| >dre-miR-29b3-5p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 144.00 | -14.41 | 2 23   | 697 716   | 21   | 61.90%  | 76.19%  |                         |
| >>dre-miR-29b3-5p | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 445.00 | -44.37 | 151.00 | -15.02    | 3313 | 24      | 4043    | 1899 1406 697           |
| >dre-miR-29b3-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 156.00 | -24.20 | 2 22   | 16 39     | 21   | 66.67%  | 76.19%  |                         |
| >>dre-miR-29b3-3p | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 156.00 | -24.20 | 156.00 | -24.20    | 3322 | 23      | 4043    | 16                      |
| >dre-miR-338-3p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 148.00 | -16.43 | 2 21   | 984 1006  | 19   | 57.89%  | 73.68%  |                         |
| >dre-miR-338-3p   | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 148.00 | -14.65 | 2 21   | 2190 2212 | 19   | 57.89%  | 73.68%  |                         |
| >>dre-miR-338-3p  | ENSDARG00000019516 ENSDART00000128793 sp7 | 296.00 | -31.08 | 148.00 | -16.43    | 3358 | 23      | 4043    | 984 2190                |