

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado  
somente a partir de  
16 /08/2028.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

Investigação dos mecanismos moleculares da regeneração tecidual em *zebrafish*  
(*Danio rerio*)

**BEATRIZ JACINTO ALVES PEREIRA**

**BOTUCATU - SP**

**2024**



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

Investigação dos mecanismos moleculares da regeneração tecidual em *zebrafish*  
(*Danio rerio*)

**Candidato: Beatriz Jacinto Alves Pereira**

**Orientador: Danillo Pinhal**

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

**BOTUCATU - SP**

**2024**

P436i

Pereira, Beatriz Jacinto Alves

Investigação dos mecanismos moleculares da regeneração tecidual em zebrafish (*Danio rerio*) / Beatriz Jacinto Alves Pereira. -- Botucatu, 2024

179 p. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu  
Orientador: Danillo Pinhal

1. Sequenciamento de nucleotídeo. 2. Regeneração óssea. 3. Proteína 9 associada à CRISPR. 4. Peixe-zebra. I. Título.

**ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BEATRIZ JACINTO ALVES PEREIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.**

Aos 16 dias do mês de agosto do ano de 2024, às 14:00 horas, no(a) Sala da Pós-Graduação, Central de Aulas IBB, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BEATRIZ JACINTO ALVES PEREIRA, intitulada **Investigação dos mecanismos moleculares da regeneração tecidual em zebrafish (Danio rerio)**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. DANILLO PINHAL (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, Profa. Dra. VANESSA PAES DA CRUZ (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia funcional e estrutural/ setor morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. IGOR SCHNEIDER (Participação Virtual) do(a) Departamento de Ciências Biológicas (Department of Biological Sciences) / LOUISIANA STATE UNIVERSITY, Prof. Dr. BRUNO OLIVEIRA DA SILVA DURAN (Participação por Parecer Circunstanciado) do(a) Departamento de Histologia, Embriologia e Biologia Celular / Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Goiás (UFG), Prof. Dr. RODRIGO EGYDIO BARRETO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: \_\_ APROVADA \_\_. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. DANILLO PINHAL

*Aos jovens cientistas de hoje e de amanhã,  
aos trabalhadores que sustentam nossa  
nação e a todo aquele que não teve o  
privilégio de pisar em uma universidade,  
dedico.*

*Que possamos continuar lutando e  
sonhando com um Brasil que se orgulha da  
sua ciência, um futuro com mais  
oportunidades e com o conhecimento das  
universidades saindo de seus muros,  
chegando **a todos**.*

## **Agradecimentos:**

*“Há oitenta e seis anos eu tenho sido o seu servo, e ele nunca me faltou. Como blasfemarei contra o meu rei que me salvou?”. Policarpo de Esmirna*

Agradecer a bondade de Deus parece clichê e, honestamente, seria uma resposta pequena ao tanto que tenho recebido. Durante todos esses anos senti seu cuidado, graça e misericórdia sobre mim. Sou grata por todo o caminho percorrido e socorro alcançado. Ao Senhor do meu coração, agradeço.

*“Em criança ensinaram-me o que era certo, mas não me ensinaram a corrigir meu gênio.” Mr. Darcy, por Jane Austen em ‘Orgulho e Preconceito’*

*“Lembre-se de quem você é.” Mufasa em ‘O rei leão’*

Ao meu marido que continua sendo meu maior incentivador, companheiro de aventuras e parceiro de sonhos, obrigada por aguentar meus lamentos e lágrimas, por cuidar e amar tanto! Não poderia ser mais grata por sua vida, meu amor eterno.

Aos meus pais, Rose e Valdir, por me ensinarem o caminho, guiar minha jornada, pelo seu sacrifício diário ao educar e sustentar duas crianças nos anos 2000, por me permitirem sonhar e ensinar a lutar apesar dos apesares. Em tudo sou eterna devedora de vocês. Ao meu irmão Guilherme pela amizade, amor, por me impulsionar a ser alguém melhor todos os dias, por todo seu carinho e torcida. Cada degrau que subi, subi com e por vocês. Amo vocês.

Aos meus sogros Lu e Dinei, muito obrigada por me acolherem e serem tão cuidadosos comigo. Obrigada por todo incentivo e carinho. Amo vocês.

*“Amizade não é uma recompensa das nossas escolhas e bom gosto em encontrar um ao outro. Amigos são instrumentos pelos quais Deus revela para cada um de nós a beleza de todos os outros.” C. S. Lewis em ‘Os quatro amores’*

Aos amados Eder, Paty, Plínio e Débora, obrigada pela amizade, por pastorearem meu coração, me aproximarem de Jesus, apontarem minhas fraquezas e serem minha riqueza e fortaleza. Obrigada por terem fé em mim mesmo me conhecendo tão de perto.

A minha família de coração, Juninho, Ivania, Catarina e Aurora, sou eternamente grata por todo o carinho, sabedoria compartilhada e por me ensinarem a ser família. Me faltam palavras para expressar tudo que vocês significam em minha vida, mas saibam que eu não seria a mesma sem vocês. Obrigada por me amarem e me permitirem amar vocês.

Aos amigos Ozéias, Cibele, Rebeca e Bruninho, obrigada por abrilhantarem minha caminhada com sua amizade, pelas risadas, conversas, companheirismo e incentivo. Vocês são irmãos amados, família estendida e parte de mim.

Aos amigos da ABC<sup>2</sup>, em especial Nanny, Matheus e Pamella, obrigada pela amizade, por me ensinarem a dialogar com minha fé, me incentivarem na minha acadêmica e orarem por mim.

A querida Talita, obrigada por sua amizade, incentivo, parceria, cafés superfaturados, comidas gostosas, e principalmente por ser um exemplo de cientista e ser humano. Ainda acredito que o mundo precisa de mais Talitas. Obrigada por sua coragem, por tantas outras coisas que não conseguirei expressar aqui. Estendo meu agradecimento também ao Takinha por me suportar, pela parceria, ética e colaboração ao longo da minha caminhada no mestrado e doutorado. Vocês são muito especiais e serei eternamente grata por tê-los em minha vida.

A amiga Jordana, obrigada pela amizade, fofocas e por me agraciar com seu brilhantismo, entusiasmo e inteligência nesse projeto. Você é uma inspiração para mim, minha amiga e eu não poderia estar mais feliz em ter você como colaboradora nesse projeto. Xor, que você continue voando alto e sendo um exemplo para os jovens cientistas que cruzam seu caminho.

Ao meu trio favorito de toda Botucatu, Natinha, Luri e Arthur, obrigada pela companhia diária, pelos socorros, por aceitarem minha ajuda e por serem meus amigos. Vocês tornaram meus dias mais leves, divertidos e me incentivaram a chegar até aqui. Espero poder continuar torcendo por vocês todos os dias. Nati, obrigada por seu coração leve e simples, por ser uma amiga fantástica, compartilhar leituras e sempre estar tão presente e prestativa. Luri, obrigada por sua paciência e incentivo, por me desafiar a ser cada vez melhor, por compartilhar cafés e música pop, e por ser essa amiga encorajadora ao longo de todos esses anos. Arthurzinho, obrigada por me permitir te orientar mesmo com minhas falhas, por sua parceria, pelas conversas



profundas sobre música, cinema arte e política, obrigada por ser um amigo que ouve, pondera e acolhe. Vocês fazem do LGEM o melhor laboratório do mundo.

A queridíssima amiga Amanda, agradeço por ser a mente brilhante que me apresentou a esse projeto, por sempre me socorrer em cima da hora, por compartilhar conhecimento e sabedoria, pela colaboração nesse trabalho e principalmente por cuidar de mim. Estendo meu agradecimento a Fer e ao Crianço por serem acolhedores, cuidarem de mim e por serem amigos. Vocês são uma família muito especial e serei eternamente grata pela vida de vocês.

As amigas do departamento Steh e Bea, obrigada pela companhia nos almoços, pelas conversas, apoio e pela parceria nas disciplinas.

As minhas amigas da escola Dinah de Moraes e Seixas, Vivian, Ana, Isa e Tati, obrigada por tornarem o ambiente de trabalho tão leve, divertido e por me apoiarem nessa caminhada.

Aos queridos ICs Victor e Maria Clara, agradeço a parceria nesse projeto, por me acompanharem nas coletas e aceitarem minha orientação. Obrigada por me permitirem aprender e ensinar com vocês.

Aos meus alunos, obrigada por me desafiarem a dar meu melhor todos os dias e a lutar por uma educação mais justa no ensino básico e mais humana no ensino superior.

Ao meu querido orientador, Prof Dr. Danillo Pinhal, obrigada por me receber no seu laboratório apesar das minhas falhas, por me incentivar a enfrentar novos desafios ao longo da jornada acadêmica, por insistir mesmo quando eu desistia, pela oportunidade de aprender técnicas incríveis, ter as primeiras experiências em uma sala de aula da graduação, por sua paciência comigo ao longo desses oito anos de orientação. Obrigada pelo suporte, orientação, experiência e por me oferecer a oportunidade de estudar regeneração junto de uma equipe tão incrível quanto a do LGEM.

Agradeço aos demais colegas do LGEM que fizeram parte do desenvolvimento desse projeto, em especial o Dr. Luiz “Chokito” Bovolenta que tanto colaborou comigo nas análises de bioinformática e teve paciência para me ensinar.

As equipes dos laboratórios do prof. Dr. Luis Fernando Fernandes Marins da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do prof. Dr. Vinicius Farias Campos da Universidade Federal de Pelotas, obrigada por me receberem em seus laboratórios e

pelas amostras dos peixes da linhagem mutante F0104. Agradeço aos prestativos alunos Me. Jade Riet e Dr. Leandro Nunes pela prestatividade ao longo dessa parceria e aos técnicos Tony e Bruna por todo o trabalho desempenhado nas coletas.

As professoras Dra. Adriane Wasko e Dra. Maria Isabel Cano, obrigada por me incentivarem na carreira científica e pelo suporte no desenvolvimento de disciplinas da graduação e de divulgação científica. Vocês são exemplo e inspiração para mim.

Aos funcionários da seção técnica de pós-graduação pelo esclarecimento de dúvidas, pela paciência e prestatividade.

Ao conselho do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) agradeço pelo apoio em todos os desafios, aos funcionários do e ao Departamento de Ciências Químicas e Biológicas – setor genética, ao Instituto de Biociências de Botucatu e à UNESP, obrigada pela infraestrutura cedida para a realização deste projeto e pelos anos de instrução.

Agradeço também às agências FAPESP e FAPERGS, pelo financiamento desse projeto sob o processo 2019/15494-5 e ao CNPq pela bolsa de doutorado.

Muito obrigada a todos que participaram deste projeto de maneira direta e indireta.

*“O temor do senhor é fonte de  
sabedoria” Provérbios 9.10*

*“Grandes são as obras do SENHOR,  
Dignas de estudo para quem as ama”.*

*Salmos 111.2*

*“Long story short, I survived”*

*Taylor Swift*

## Resumo:

A regeneração epimórfica é um fenômeno biológico fascinante no qual partes do corpo perdidas são reconstruídas por meio da formação de um blastema, recapitulando eventos do desenvolvimento. Apesar do conhecimento sobre a participação de migração, desdiferenciação e proliferação de células ósseas nesse processo, muitos dos mecanismos moleculares subjacentes permanecem desconhecidos. Para investigar isso, o zebrafish (*Danio rerio*), conhecido por sua notável capacidade de regenerar nadadeiras, tem sido amplamente utilizado como organismo modelo. Além disso, o papel dos miRNAs, que ajustam a expressão gênica em diversos processos biológicos, na desdiferenciação celular é pouco compreendido. Neste trabalho utilizamos duas abordagens para contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares subjacentes à regulação da regeneração tecidual da nadadeira caudal no modelo zebrafish. No primeiro capítulo apresentamos a abordagem da edição gênica por CRISPR/cas9 para gerar linhagens mutantes com knockout dos genes *sp7* e *runx2a*. Das linhagens geradas, apenas quatro linhagens de *runx2a* apresentaram potencial de alteração nas proteínas correspondentes. As mutações da linhagem *sp7* não estão localizadas em regiões codificantes do gene. Adicionados a esses mutantes, selecionamos também peixes com Superexpressão do gene *gh* e realizamos testes de regeneração. A partir da medição da área regenerada 72 horas após a amputação da nadadeira caudal, pudemos constatar que apenas os mutantes *sp7*- apresentaram crescimento menor com diferença estatística significativa quando comparados com peixes do tipo selvagem. com os conhecimentos. No segundo capítulo apresentamos nossa abordagem mais abrangente em busca de genes e miRNAs que pudessem regular os eventos moleculares da regeneração. Para isso, realizamos a amputação da nadadeira caudal e coletamos tecidos de 50 zebrafish, subdivididos em 6 grupos experimentais: 0, 12, 24, 36, 48, 72 horas pós-amputação (hpa). Essas amostras foram subdivididas e utilizadas para o sequenciamento em larga escala de mRNAs dos períodos 0, 12, 24, 48 e 72 hpa. A partir dos dados de RNA-seq, verificamos uma similaridade entre as amostras coletadas em 48 e 72 hpa, de maneira que a comparação entre esses grupos retornou menor número de elementos diferencialmente expressos, enquanto grupos mais distintos como 12 e 0 hpa apresentaram um quantitativo superior de elementos diferencialmente expressos. O enriquecimento funcional dos elementos

diferencialmente expressos apontou um grande número de bioprocessos acontecendo durante a regeneração, incluindo processos ligados ao desenvolvimento ósseo e embrionário, apontando para a possibilidade da regeneração recapitular eventos da ontogênese. Dentre esses termos enriquecidos identificamos genes conhecidos por seu envolvimento em vias de regeneração como *runx1* e *wnt*. Quanto ao sequenciamento profundo de miRNAs, o DESeq2 foi utilizado para análise de expressão diferencial (DE), com significância definida em valor *p* ajustado  $<0,05$  e um  $\log_2$  fold change  $>2$  ou  $<-2$ . Nossa análise produziu 116.446.596 leituras de pré-miRNA. Comparando os diferentes grupos com o controle em 0 hpa, identificamos vários miRNAs DE em cada ponto de tempo. Notavelmente, sete miRNAs (*dre-miR-21-3p*, *dre-miR-21-5p*, *dre-miR-21-3p-2*, *dre-miR-21-5p-2*, *dre-miR-21-3p-3*, *dre-miR-29-5p-3* e um novo miRNA *dre-miR-n10856-3p*) foram consistentemente DE em todos os grupos, sugerindo sua potencial importância no processo de desdiferenciação celular. Investigação adicional revelou que 74 miRNAs foram DE às 12 hpa, com apenas 17 sendo compartilhados com outros pontos de tempo, enquanto 57 miRNAs foram exclusivamente DE às 12 hpa. Esse achado sugere a presença de eventos moleculares significativos regulados especificamente nessa fase inicial de regeneração, muitos relacionados à desdiferenciação. À medida que avançamos para as fases posteriores da regeneração, com aumento da proliferação celular às 48 e 72 hpa, o número de miRNAs DE diminuiu, com seis miRNAs compartilhados entre esses momentos. Ao final, identificamos potenciais alvos regulados pelos miRNAs DE e usamos enriquecimento funcional para descobrir processos envolvidos na regeneração epimórfica na nadadeira caudal de zebrafish. Embora nossos resultados não sejam conclusivos ainda, estes apontam para a complexidade envolvida no processo de regeneração óssea, com miRNAs regulando diversos alvos com a mesma função 3 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 os genes estudados.

**Palavras-chave:** RNA-seq, regeneração óssea, CRISPR/cas9, zebrafish

## Abstract:

Epimorphic regeneration is a fascinating biological phenomenon in which lost body parts are reconstructed through the formation of a blastema, recapitulating developmental events. Despite the knowledge of the involvement of migration, dedifferentiation, and proliferation of bone cells in this process, many of the underlying molecular mechanisms remain unknown. To investigate this, zebrafish (*Danio rerio*), known for its remarkable ability to regenerate fins, has been extensively used as a model organism. Additionally, the role of miRNAs, which fine-tune gene expression in various biological processes, in cell dedifferentiation is poorly understood. In this work, we used two approaches to contribute to the understanding of the molecular mechanisms underlying the regulation of tissue regeneration in the caudal fin of the zebrafish model. In the first chapter, we present the gene-editing approach using CRISPR/Cas9 to generate mutant lineages with knockouts of the *sp7* and *runx2a* genes. Of the generated lineages, only four *runx2a* lineages showed potential for alteration in the corresponding proteins. The mutations in the *sp7* lineages are not located in coding regions of the gene. In addition to these mutants, we also selected fish with overexpression of the *gh* gene and conducted regeneration tests. Based on the measurement of the regenerated area 72 hours after amputation of the caudal fin, we found that only the *sp7*- mutants showed statistically significant reduced growth when compared to wild-type fish. In the second chapter, we present our more comprehensive approach in search of genes and miRNAs that could regulate the molecular events of regeneration. For this, we performed caudal fin amputation and collected tissues from 50 zebrafish, subdivided into 6 experimental groups: 0, 12, 24, 36, 48, 72 hours post-amputation (hpa). These samples were subdivided and used for large-scale mRNA and miRNA sequencing at 0, 12, 24, 48, and 72 hpa. From the RNA-seq data, we observed a similarity between the samples collected at 48 and 72 hpa, so that the comparison between these groups returned fewer differentially expressed elements, while more distinct groups such as 12 and 0 hpa showed a greater number of differentially expressed elements. The functional enrichment of differentially expressed elements pointed to a large number of bioprocesses occurring during regeneration, including processes related to bone and embryonic development, suggesting the possibility of regeneration recapitulating ontogeny events. Among these enriched terms, we identified genes known for their involvement in regeneration

pathways such as *runx1* and *wnt*. For deep miRNA sequencing, DESeq2 was used for differential expression (DE) analysis, with significance defined at p adjusted value  $<0.05$  and a log2 fold change  $>2$  or  $<-2$ . Our analysis produced 116,446,596 pre-miRNA reads. Comparing the different groups with the control at 0 hpa, we identified several DE miRNAs at each time point. Notably, seven miRNAs (*dre-miR-21-3p*, *dre-miR-21-5p*, *dre-miR-21-3p-2*, *dre-miR-21-5p-2*, *dre-miR-21-3p-3*, *dre-miR-29-5p-3*, and a novel miRNA *dre-miR-n10856-3p*) were consistently DE in all groups, suggesting their potential importance in the cell dedifferentiation process. Further investigation revealed that 74 miRNAs were DE at 12 hpa, with only 17 shared with other time points, while 57 miRNAs were exclusively DE at 12 hpa. This finding suggests the presence of significant molecular events regulated specifically at this early stage of regeneration, many related to dedifferentiation. As we move into the later stages of regeneration, with increased cell proliferation at 48 and 72 hpa, the number of DE miRNAs decreases, with six miRNAs shared between these time points. In the end, we identified potential targets regulated by DE miRNAs and used functional enrichment to uncover processes involved in epimorphic regeneration in the zebrafish caudal fin. Although our results are not yet conclusive, they point to the complexity involved in the bone regeneration process, with miRNAs regulating multiple targets with the same biological function, as well as other forms of regulation not only by miRNAs but also through interaction between bone development genes, such as the interaction between the studied genes.

**Keywords:** RNA-seq, bone regeneration, CRISPR/cas9, zebrafish



## Lista de Figuras

|                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Distribuição filogenética da regeneração.....                                                                                  | 2  |
| Figura 2: Esqueleto da nadadeira caudal de zebrafish e secção transversal.....                                                           | 5  |
| Figura 3: Processo de regeneração da nadadeira caudal de zebrafish.....                                                                  | 6  |
| Figura 4: Via canônica da biogênese de microRNAs.....                                                                                    | 11 |
| Figura 5: Gráfico da expressão relativa dos genes do desenvolvimento ósseo.....                                                          | 15 |
| Figura 6: Gráfico da expressão relativa dos miRNAs.....                                                                                  | 16 |
| Figura 7: Gráfico da expressão relativa dos miRNAs.....                                                                                  | 16 |
| Figura 8: Expressão relativa das duas cópias de runx2 e seus miRNAs associados.....                                                      | 17 |
| Figura 9: Esquema da ponta distal da regeneração de raio ósseo da nadadeira em corte longitudinal.....                                   | 18 |
| Figura 10: Esquema de coleta de Nornberg e colaboradores para investigação de regeneração em linhagem transgênica gh+. ....              | 25 |
| Figura 11: Workflow do delineamento experimental do capítulo1.....                                                                       | 27 |
| Figura 12: Reprodução e obtenção de embriões de zebrafish.....                                                                           | 29 |
| Figura 13: Microinjeção em embriões de zebrafish.....                                                                                    | 31 |
| Figura 14: Ensaios de regeneração.....                                                                                                   | 34 |
| Figura 15: Alinhamento de aminoácido e predição de estrutura secundária da proteína.....                                                 | 37 |
| Figura 16: Predição dos modelos proteicos dos mutantes para o gene runx2a de Danio rerio. ....                                           | 38 |
| Figura 17: Gráficos com comparação da média da área regenerada.....                                                                      | 41 |
| Figura 18: Delineamento resumido das etapas do capítulo dois.....                                                                        | 48 |
| Figura 19: Esquema de coleta das amostras de fragmentos de nadadeiras de zebrafish durante a regeneração.....                            | 49 |
| Figura 20: Heatmap do teste de matriz de distâncias dos valores de expressão de mRNAs. ....                                              | 54 |
| Figura 21: Gráfico de PCA das amostras de mRNA.....                                                                                      | 54 |
| Figura 22: Gráfico com a quantidade de termos do enriquecimento funcional encontrados entre os elementos diferencialmente expressos..... | 56 |
| Figura 23: Principal Component Analysis (PCA) das amostras de microRNAs.....                                                             | 58 |
| Figura 24: Gráfico de venn dos elementos diferencialmente expressos.....                                                                 | 60 |
| Figura 25: heatmap com miRNAs diferencialmente expressos.....                                                                            | 61 |

|                                                        |           |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 26: Redes de interação miRNAs-genes.....</b> | <b>63</b> |
| <b>Figura 27: Linha do tempo da regeneração.....</b>   | <b>65</b> |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Desenho do molde de DNA para produção dos sgRNAs para os genes sp7 e runx2a no zebrafish.....                      | <b>29</b> |
| <b>Tabela 2.</b> Primers selecionados para amplificar por PCR o genoma do zebrafish no éxon ao qual foi direcionada a variante..... | <b>33</b> |
| <b>Tabela 3.</b> Número de injeções e teste de eficiência dos sgRNA para o gene sp7 .....                                           | <b>35</b> |
| <b>Tabela 4.</b> Número de injeções e teste de eficiência dos sgRNA para o gene runx2a.....                                         | <b>36</b> |
| <b>Tabela 5.</b> Deleções no gene sp7 geradas em F0 e F1.....                                                                       | <b>36</b> |
| <b>Tabela 6.</b> Deleções no gene runx2a geradas em F0 e F1.....                                                                    | <b>37</b> |
| <b>Tabela 7.</b> Deleções no gene runx2a geradas em F0 e F1.....                                                                    | <b>39</b> |
| <b>Tabela 8.</b> Área em mm <sup>2</sup> do tecido regenerado na nadadeira caudal após 24 e 72hpa.....                              | <b>40</b> |
| <b>Tabela 9.</b> Área em mm <sup>2</sup> do tecido regenerado na nadadeira caudal após 72hpa.....                                   | <b>40</b> |
| <b>Tabela 10.</b> Número de reads absolutas obtidas após filtragens com mirDeep2.....                                               | <b>57</b> |
| <b>Tabela 11.</b> Quantidade de elementos diferencialmente expressos encontrados em cada comparação par a par realizada.....        | <b>59</b> |

## Sumário

|                                                                                |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                             | 1         |
| 1.1 Regeneração em vertebrados.....                                            | 1         |
| 1.2 Regeneração em teleósteos.....                                             | 2         |
| 1.3 Zebrafish como modelo de estudo em regeneração.....                        | 3         |
| 1.4 Regeneração da nadadeira caudal.....                                       | 5         |
| 1.5 Formação do blastema e sua regulação gênica.....                           | 7         |
| 1.6 Ação regulatória de miRNAs.....                                            | 9         |
| 1.7 miRNAs na regeneração.....                                                 | 12        |
| 1.8 Resultados prévios.....                                                    | 14        |
| 2. HIPÓTESES, OBJETIVO GERAL E INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS.....                   | 20        |
| <b>3. CAPÍTULO 1.....</b>                                                      | <b>22</b> |
| 3.1 Introdução.....                                                            | 22        |
| 3.1.1 A regeneração recapitula o desenvolvimento.....                          | 22        |
| 3.1.2 Uso de linhagens transgênicas de zebrafish no estudo da regeneração..... | 24        |
| 3.2 Objetivos .....                                                            | 26        |
| 3.2.1 Objetivo geral.....                                                      | 26        |
| 3.2.2 Objetivo específico .....                                                | 26        |
| <b>3.3 Material e Métodos.....</b>                                             | <b>26</b> |
| 3.3.1 Delineamento experimental.....                                           | 26        |
| 3.3.2 Condição e manutenção dos peixes.....                                    | 27        |
| 3.3.3 Procedimentos específicos.....                                           | 28        |
| 3.3.3.1 Obtenção de embriões para experimentos de edição gênica.....           | 28        |
| 3.3.3.2 Desenho e produção de sgRNAs para edição com CRISPR/Cas9.....          | 29        |
| 3.3.3.3 Produção do mRNA da enzima Cas9.....                                   | 30        |
| 3.3.3.4 Injeção da construção em embriões de zebrafish.....                    | 30        |
| 3.3.3.5 Genotipagem dos indivíduos editados.....                               | 31        |
| 3.3.3.6 Produção da F1.....                                                    | 32        |
| 3.3.3.7 Análises <i>in silico</i> da genotipagem.....                          | 33        |
| 3.3.3.8 Ensaios de regeneração e medição da área regenerada.....               | 33        |
| <b>3.4 Resultados.....</b>                                                     | <b>35</b> |

|           |                                                                   |           |
|-----------|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.4.1     | Edição de embriões de zebrafish.....                              | 35        |
| 3.4.2     | Análises da genotipagem.....                                      | 36        |
| 3.4.3     | Ensaio e taxa de regeneração.....                                 | 39        |
| 3.5       | <b>Discussão.....</b>                                             | <b>41</b> |
| 3.5.1.    | Mutantes gerados por CRISPR.....                                  | 41        |
| 3.5.2     | Avaliação regenerativa em mutantes da linhagem <i>gh+</i> .....   | 45        |
| <b>4</b>  | <b>Capítulo 2.....</b>                                            | <b>47</b> |
| 4.1       | Introdução .....                                                  | 47        |
| 4.2       | Objetivos.....                                                    | 47        |
| 4.2.1     | Objetivo geral.....                                               | 47        |
| 4.2.2     | Objetivos específicos.....                                        | 48        |
| 4.2       | Materiais e Métodos.....                                          | 48        |
| 4.3.1     | Delineamento experimental.....                                    | 48        |
| 4.3.2     | Procedimentos específicos.....                                    | 49        |
| 4.3.2.1   | Ensaio de regeneração e coleta de amostras.....                   | 49        |
| 4.3.2.2   | Tratamento de amostras e Sequenciamento de mRNAs e MicroRNAs..... | 50        |
| 4.3.2.3   | Análise do microRNoma.....                                        | 50        |
| 4.3.2.4   | Análise do transcriptoma.....                                     | 52        |
| 4.3.2.5   | Predição bioinformática de alvos.....                             | 53        |
| 4.4       | Resultados.....                                                   | 53        |
| 4.4.1     | Resultados das análises do Transcriptoma.....                     | 53        |
| 4.4.2     | Resultados das análises do miRNoma.....                           | 57        |
| 4.4       | Discussão.....                                                    | 63        |
| <b>5.</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                  | <b>66</b> |
| <b>6.</b> | <b>BIBLIOGRAFIA.....</b>                                          | <b>68</b> |
| <b>7.</b> | <b>MATERIAL SUPLEMENTAR.....</b>                                  | <b>78</b> |
| <b>8.</b> | <b>ANEXOS.....</b>                                                | <b>79</b> |
| 8.1       | Experimentos paralisados.....                                     | 79        |
| 8.2       | Atividades extracurriculares.....                                 | 81        |

## 1. INTRODUÇÃO

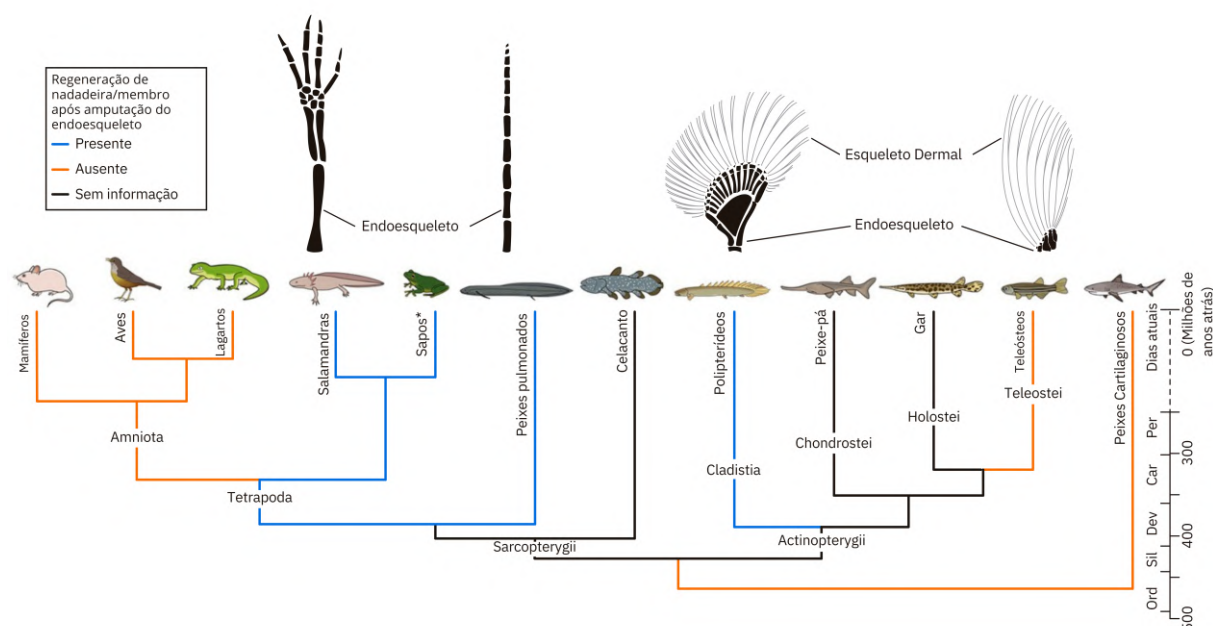
### 1.1 Regeneração em vertebrados.

A regeneração é um fenômeno que intriga cientistas e filósofos há séculos (PRESTES, 2007). Inicialmente identificada como estratégia de reprodução em gastrópodes e lesmas por naturalistas do século XVIII (CAROZZI, 1985), a capacidade que alguns organismos vivos detêm de reconstruir partes de seu corpo que foram perdidas seja por injúrias (BORGES, 1982; ITEN; BRYANT, 1973), autotomia (RAMSAY et al., 2001; VITT, 1981) ou processos de muda (SKINNER, 1962), é conhecida desde a Antiguidade (PRESTES, 2007).

A habilidade de regenerar varia amplamente dentro do reino animal (BELY; NYBERG, 2010). Dentre os vertebrados, anfíbios urodelos são notórios por sua capacidade de reconstruir caudas, membros, mandíbulas, retinas, extensas partes do coração, cérebro e outras estruturas (BROCKES; KUMAR, 2002; ENDO et al., 2007). Peixes teleósteos também apresentam um significativo poder de regeneração, substituindo nadadeiras, coluna vertebral, tecido nervoso, retina e coração (ALVARADO; 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 (ALIBARDI, 2009). Em aves é reportada a ausência de regeneração de estruturas (BELY; NYBERG, 2010), embora haja potencial regenerativo para restaurar células sensoriais ciliadas após trauma (RYALS; RUBEL, 1988).

Mamíferos, por sua vez, renovam constantemente certos tipos celulares (e.g.: células hematopoiéticas, epitélio intestinal e pele) e podem restaurar alguns tecidos como músculos, sistema nervoso periférico e o fígado, além de estruturas como pontas dos dedos e chifres (ALVARADO; TSONIS, 2006). Entretanto, estudos recentes têm apontado para limitações na regeneração de ponta de dígitos de camundongos, demonstrando que a capacidade de regenerar diminui com lesões repetidas (DOLAN et al., 2022) e que este modelo não consegue regenerar ossos da falange do dígito (SENSIATE; MARQUES-SOUZA, 2019), dificultando os estudos de regeneração epimórfica neste grupo.

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. Adaptado de Darnet et al.(2019).

## 1.2 Regeneração em teleósteos.

Os peixes teleósteos, ou teleósteos, representam a maior infraclasse de peixes ósseos, englobando aproximadamente 96% de todas as espécies de peixes vivos atualmente. Eles são caracterizados por suas mandíbulas móveis e a presença de um esqueleto ósseo bem desenvolvido, em contraste com os peixes cartilagosos, como tubarões e raias. Os teleósteos exibem uma notável diversidade morfológica e ecológica, adaptando-se a uma ampla variedade de ambientes aquáticos, desde rios e lagos de água doce até os oceanos profundos (NELSON et al., 2016). A evolução dos teleósteos é marcada por várias inovações anatômicas e fisiológicas que contribuíram para seu sucesso evolutivo, incluindo a modificação da bexiga natatória

para melhorar a flutuabilidade e a capacidade de nadar eficientemente (HELFMAN et al., 2009). A diversidade e a adaptabilidade dos teleósteos tornam-nos modelos ideais para estudos em biologia evolutiva, ecologia e biologia do desenvolvimento (BETANCUR-R et al., 2017).

Os peixes teleósteos exibem uma capacidade notável de regenerar vários tecidos e órgãos, incluindo as nadadeiras, o coração, e a medula espinhal. Um peixe teleósteo que apresenta notável capacidade regenerativa é o peixe caveira mexicano (*Astyanax mexicanus*). Em sua forma de superfície, este peixe possui a habilidade de regenerar nadadeiras, enquanto a forma de caverna mostra uma capacidade reduzida, proporcionando um modelo interessante para estudos comparativos de regeneração (STOCKDALE et al., 2018). O peixinho (*Fundulus heteroclitus*) também é conhecido por sua capacidade de regenerar nadadeiras, mandíbula e escamas, sendo estudado desde o século passado (MORRILL JR, 1906). Dentro deste grupo, o zebrafish (*Danio rerio*), tem se destacado como um modelo de estudo devido à sua notável capacidade de regeneração (GEMBERLING et al., 2013).

### 1.3 Zebrafish como modelo de estudo em regeneração.

O teleósteo *zebrafish*, 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; EISEN, 2002; SCHIER; GIRALDEZ, 2006) que utilizam o *zebrafish* em seus protocolos experimentais têm avançado de modo significativo na produção de conhecimento, incluindo as pesquisas voltadas ao estudo dos mecanismos de regeneração (GEMBERLING et al., 2013).

Com alto potencial regenerativo, o *zebrafish* mostrou-se capaz de reconstruir vários tecidos e estruturas danificados, incluindo o coração (POSS; WILSON; KEATING, 2002), o tecido nervoso (BECKER et al., 1997; REIMER et al., 2008), a retina (RAJARAM et al., 2014a, 2014b) e as nadadeiras (POSS; KEATING; NECHIPORUK, 2003).

O *zebrafish* tem cada vez mais se tornado um importante modelo para compreendermos o desenvolvimento do sistema esquelético. Com a popularização das novas tecnologias de edição como CRISPR/cas9 e sequenciamento de célula

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É fantástico ver que um fenômeno como a regeneração tem sido estudado pela humanidade há tanto tempo e ainda não chegamos a uma resposta definitiva. Por que exatamente alguns animais regeneram membros e estruturas complexas enquanto outras espécies não? Qual é o botão de ligar e desligar as cascatas moleculares que ativam toda a movimentação celular e preenchem o órgão novo? Não há uma resposta definitiva e, quanto mais estudamos, mais me convenço de que não há um só gene, uma só molécula reguladora, mas toda uma rede dinâmica que envolve diversas e diferentes moléculas.

Quanto aos objetivos dessa tese, creio que conseguimos colaborar com mais um tijolo na construção do conhecimento acerca dos mistérios da arte da regeneração. Em nosso capítulo 1 exploramos as possibilidades de que genes importantes para o desenvolvimento ósseo como *runx2b* e *sp7* pudessem ser importantes para a regeneração da nadadeira caudal do zebrafish, uma vez que a regeneração recapitula eventos do desenvolvimento embrionário e osteogênese. Demonstramos que a perturbação do *sp7* realmente afetou o crescimento do novo membro, mesmo que nossas mutações não tenham afetado regiões codificantes do gene. Já o *runx2b*, onde realmente conseguimos alterar a codificação da proteína não resultou em deficiências para a regeneração. Embora nossos resultados não sejam conclusivos, novas análises estão em andamento para testar as novas hipóteses, como a verificação da expressão desses genes por qPCR ao longo da regeneração para verificarmos se o *runx2a* está compensando sua cópia silenciada ou se há uma compensação de dose.

Sobre as análises do transcriptoma, nossos resultados realmente apontaram para uma gama de genes e miRNAs associados ao longo da regeneração, apontando para a complexidade dessa habilidade. Mesmo não tendo finalizado a análise das redes, nossos resultados também permitem que novas pesquisas se desenvolvam para validar as interações propostas.

Nossas hipóteses aceitas também corroboram com o conhecimento já consolidado das etapas e mecanismos celulares da regeneração assim como também com os mecanismos de ação dos miRNAs.



Quanto a hipótese de que o aumento da expressão do gene do hormônio *gh*, nossos dados recusam essa hipótese, de maneira que não identificamos melhora na regeneração entre os mutantes.

Embora nossos resultados não sejam conclusivos ainda, estes apontam para a complexidade envolvida no processo de regeneração óssea, 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 os genes estudados.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- AKIMENKO, M. A. et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics*, 1 fev. 2003.
- ALIBARDI, Lorenzo. Morphological and cellular aspects of tail and limb regeneration in lizards: A model system with implications for tissue regeneration in mammals. 2009.
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* Nature Publishing Group, , 1 ago. 2016.
- ALVARADO, A. S.; TSONIS, P. A. Bridging the regeneration gap: Genetic insights from diverse animal models. *Nature Reviews Genetics*, nov. 2006.
- Azevedo AS, Grotek B, Jacinto A, Weidinger G, Saúde L. The regenerative capacity of the zebrafish caudal fin is not affected by repeated amputations. *PLoS One*. 2011;6(7):e22820. doi: 10.1371/journal.pone.0022820.
- BAKHSHANDEH, B. et al. MicroRNA signature associated with osteogenic lineage commitment. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 7, p. 7569–7581, jul. 2012.
- BANU, S. et al. Understanding the complexity of epimorphic regeneration in zebrafish caudal fin tissue: A transcriptomic and proteomic approach. *Genomics*, v. 114, n. 2, 1 mar. 2022.
- BARROSO-DEL JESUS, A.; LUCENA-AGUILAR, G.; MENENDEZ, P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* Taylor and Francis Inc., , 1 fev. 2009.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function *Cell*. [s.l: s.n.].
- BARTEL, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* Cell Press, , 22 mar. 2018.
- BECERRA, J. et al. Cell and Tissue Research Structure of the tail fin in teleosts *Cell Tissue Res*. [s.l: s.n.].
- BECKER, T. et al. Axonal Regrowth After Spinal Cord Transection in Adult Zebrafish *J Comp Neurol*. [s.l.] Wiley-Liss, Inc, 1997.
- BEIS, D.; STAINIER, D. Y. R. In vivo cell biology: Following the zebrafish trend. *Trends in Cell Biology*, fev. 2006.
- BELY, A. E.; NYBERG, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology and Evolution*, mar. 2010.
- BENSIMON-BRITO, A. et al. Revisiting in vivo staining with alizarin red S - A valuable approach to analyse zebrafish skeletal mineralization during development and regeneration. *BMC Developmental Biology*, v. 16, n. 1, 19 jan. 2016.

- BORGENS, R. B. borgens1982\_mice. *Science*, v. 217, p. 747–750, 1982.
- BROCKES, J. P. Amphibian limb regeneration: Rebuilding a complex structure. *Science*, v. 276, n. 5309, p. 81–87, 4 abr. 1997.
- BROCKES, J. P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002.
- CAO, J.; POSS, K. D. The epicardium as a hub for heart regeneration. *Nature Reviews Cardiology* Nature Publishing Group, , 1 out. 2018.
- CAROZZI, M. Bonnet, Spallanzani, and Voltaire on regeneration of heads in snails : a continuation of the spontaneous generation debate. [s.l: s.n.].
- Cecconi, D., Brandi, J., Manfredi, M. et al. Runx2 stimulates neoangiogenesis through the Runt domain in melanoma. *Sci Rep* 9, 8052 (2019).
- CHANG, N. et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in Zebrafish embryos. *Cell Research*, v. 23, n. 4, p. 465–472, abr. 2013.
- CHEN, C. et al. Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. *Mammalian Genome*, v. 18, n. 5, p. 316–327, maio 2007.
- CHEN, Eleanor; EKKER, Stephen C. Zebrafish as a genomics research model. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 5, n. 5, p. 409-413, 2004.
- CHENDRIMADA, T. P. et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, v. 447, n. 7146, p. 823–828, 14 jun. 2007.
- CHENG, W. et al. Low-dose exposure to triclosan disrupted osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells via BMP/ERK/Smad/Runx-2 signalling pathway. *Food and Chemical Toxicology*, v. 127, p. 1–10, 1 maio 2019.
- CORDES, K. R. et al. MiR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, v. 460, n. 7256, p. 705–710, 6 ago. 2009.
- DARNET, S. et al. Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 116, n. 30, p. 15106–15115, 2019.
- DELAURIER, A. et al. Zebrafish sp7:EGFP: A transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration. *Genesis*, v. 48, n. 8, p. 505–511, ago. 2010.
- DIRCKX, N.; VAN HUL, M.; MAES, C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, set. 2013.

DOLAN, C. P. et al. Epimorphic regeneration of the mouse digit tip is finite. *Stem Cell Research and Therapy*, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

DONG, Z. et al. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9-mediated kif15 mutations accelerate axonal outgrowth during neuronal development and regeneration in zebrafish. *Traffic*, v. 20, n. 1, p. 71–81, 1 jan. 2019.

DOYON, Y. et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology*, v. 26, n. 6, p. 702–708, jun. 2008.

DUAN, L. et al. MiR-16-2\* interferes with WNT5A to regulate osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 51, n. 3, p. 1087–1102, 1 dez. 2018.

DUURSMA, A. M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, v. 14, n. 5, p. 872–877, maio 2008.

EBERT, M. S.; SHARP, P. A. Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *CellElsevier B.V.*, , 27 abr. 2012.

El-Brolosy MA, Stainier DYR. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*. 2017 Jul 13;13(7):e1006780

ELICE, M.; PRESTES, B. Estudos de regeneração animal em Bonnet e Spallanzani. [s.l: s.n.].

ENDO, T. et al. Brain regeneration in anuran amphibians. *Development Growth and Differentiation*, fev. 2007.

FIGUEIREDO, M. DE A. et al. Improving the production of transgenic fish germplines: In vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.sbg.org.br>.

FLORES, M. V. et al. Duplicate zebrafish runx2 orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene Expression Patterns*, v. 4, n. 5, p. 573–581, set. 2004.

Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(7):2275–80.

GARGIOLO, C.; SLACK, J. M. W. Cell lineage tracing during *Xenopus* tail regeneration. *Development*, v. 131, n. 11, p. 2669–2679, jun. 2004.

GEMBERLING, M. et al. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends in Genetics*, nov. 2013.

- GEURTZEN, K. et al. Mature osteoblasts dedifferentiate in response to traumatic bone injury in the zebrafish fin and skull. *Development (Cambridge)*, v. 141, n. 11, p. 2225–2234, 2014.
- GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Mini review Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization *Matrix Biology*. [s.l: s.n.].
- GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 29, p. 11936–11941, 19 jul. 2011.
- GROTEK, B.; WEHNER, D.; WEIDINGER, G. Notch signaling coordinates cellular proliferation with differentiation during zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge)*, v. 140, n. 7, p. 1412–1423, 1 abr. 2013.
- GRUNWALD, D. J.; EISEN, J. S. Headwaters of the zebrafish — emergence of a new model vertebrate. *Nature Reviews Genetics*, 2002.
- GUO, L.; ZHAO, R. C. H.; WU, Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, jun. 2011.
- HAMADA, M. et al. Evolution of the chordate regeneration blastema: Differential gene expression and conserved role of notch signaling during siphon regeneration in the ascidian *Ciona*. *Developmental Biology*, v. 405, n. 2, p. 304–315, 15 set. 2015.
- HANSEN, T. B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 384–388, 21 mar. 2013.
- HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, v. 447, n. 7148, p. 1130–1134, 28 jun. 2007.
- HENKE, K. et al. Genetically engineered zebrafish as models of skeletal development and regeneration. *Bone*, v. 167, 1 fev. 2023.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.
- HUMPHREYS, D. T. et al. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506482102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506482102)>.
- IOVINE, M. K. Conserved mechanisms regulate outgrowth in zebrafish fins. *Nature Chemical Biology* Nature Publishing Group, , 20 out. 2007.
- ITEN, L. E.; BRYANT, S. V. Forelimb Regeneration from Different Levels of Amputation in the Newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, Rate, and Stages *Wilhelm Roux' Archiv*. [s.l: s.n.].

IVEY, K. N.; SRIVASTAVA, D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. Cell Stem Cell Press, , 2010.

JOHNNIDIS, J. B. et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature, v. 451, n. 7182, p. 1125–1129, 28 fev. 2008.

JOPLING, C. et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. Nature, v. 464, n. 7288, p. 606–609, 25 mar. 2010.

JUDSON, R. L. et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. Nature Biotechnology, v. 27, n. 5, p. 459–461, maio 2009.

KAFRI, R.; BAR-EVEN, A.; PILPEL, Y. Transcription control reprogramming in genetic backup circuits. Nature Genetics, v. 37, n. 3, p. 295–299, 2005.

KAHLER, R. A.; WESTENDORF, J. J. Lymphoid enhancer factor-1 and  $\beta$ -catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. Journal of Biological Chemistry, v. 278, n. 14, p. 11937–11944, 4 abr. 2003.

KATOGLI, R. et al. Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, *Oryzias latipes*. Mechanisms of Development, v. 121, n. 7–8, p. 861–872, jul. 2004.

KAWAKAMI, Y. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. Genes and Development, v. 20, n. 23, p. 3232–3237, 1 dez. 2006.

KEATINGE, M. et al. CRISPR gRNA phenotypic screening in zebrafish reveals pro-regenerative genes in spinal cord injury. PLoS Genetics, v. 17, n. 4, 29 abr. 2021.

KIKUCHI, K. et al. Primary contribution to zebrafish heart regeneration by *gata4*+ cardiomyocytes. Nature, v. 464, n. 7288, p. 601–605, 25 mar. 2010.

KIMMEL, C. B. et al. A mutation that changes cell movement and cell fate in the zebrafish embryo. NATURE, v. 337, p. 358–362, 1989.

KNOFF, F. et al. Bone regenerates via dedifferentiation of osteoblasts in the zebrafish fin. Developmental Cell, v. 20, n. 5, p. 713–724, 17 maio 2011.

KOMORI T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. Cell Tissue Res. 2010 Jan;339(1):189-95. doi: 10.1007/s00441-009-0832-8. Epub 2009 Aug 1. PMID: 19649655.

KOMORI T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. J Cell Biochem. 2002;87(1):1-8. doi: 10.1002/jcb.10276.

KOMORI, T. Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. Journal of Cellular Biochemistry, mar. 2011.

LAKSHMIPATHY, U. et al. MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, v. 16, n. 6, p. 1003–1016, 1 dez. 2007.

LATCHMAN, D. S. INTRODUCTORY OVERVIEW Transcription Factors: An Overview *Int. J. Biochem. Crll Biol.* [s.l: s.n.].

LAW SH, Sargent TD. The serine-threonine protein kinase PAK4 is dispensable in zebrafish: identification of a morpholino-generated pseudophenotype. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e100268

LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, v. 294, n. 5543, p. 862–864, 26 out. 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14* *Cell*. [s.l: s.n.].

LEE, Y. et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, v. 27, p. 4663–467, 2002.

LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.nature.com/nature](http://www.nature.com/nature)>.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 13 out. 2004.

LEE, Y. et al. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. *Development*, v. 132, n. 23, p. 5173–5183, dez. 2005.

LI, M. et al. Regulatory mutations of *mir-48*, a *C. elegans* *let-7* family microRNA, cause developmental timing defects. *Developmental Cell*, v. 9, n. 3, p. 415–422, set. 2005.

LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, , 22 maio 2015.

LIU, G. X. et al. 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 and Molecular Medicine*, v. 50, n. 4, 1 abr. 2018.

LUND, E. et al. Nuclear Export of MicroRNA Precursors *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.sciencemag.org/cgi/content/full/303/5654/92/DC1](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/303/5654/92/DC1)[www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org) SCIENCE>.

LÜNINGSSCHRÖR, P. et al. miR-290 cluster modulates pluripotency by repressing canonical NF-κB signaling. *Stem Cells*, v. 30, n. 4, p. 655–664, abr. 2012.

LYTLE, J. R.; YARIO, T. A.; STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703820104](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703820104)>.

MCJUNKIN K, Mazurek A, Premisrirt PK, Zuber J, Dow LE, Simon J, et al. Reversible suppression of an essential gene in adult mice using transgenic RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(17):7113–8.

MOORE, M. J.; PROUDFOOT, N. J. Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation. *CellElsevier B.V.*, , 20 fev. 2009.

MORRILL JR, C. V. REGENERATION OF CERTAIN STRUCTURES IN FEJNDULUS HETEROCLITUS. [s.l.: s.n.].

MÜNCH, J.; GONZÁLEZ-RAJAL, A.; DE LA POMPA, J. L. Notch regulates blastema proliferation and prevents differentiation during adult zebrafish fin regeneration. *Development (Cambridge)*, v. 140, n. 7, p. 1402–1411, 1 abr. 2013.

NAKASHIMA, K. et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation *Cell*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cell.com/cgi/content/full/108/1/17>>.

NAKATANI, Y.; KAWAKAMI, A.; KUDO, A. Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Development Growth and Differentiation*, fev. 2007.

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

NEO, W. H. et al. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 30, p. 20788–20801, 25 jul. 2014.

NOGUEIRA, A. F. et al. Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. *Nature Communications*, v. 7, 2 nov. 2016.

NORNBERG, B. F. et al. GH indirectly enhances the regeneration of transgenic zebrafish fins through IGF2a and IGF2b. *Transgenic Research*, v. 25, n. 5, p. 743–749, 1 out. 2016.

OLIVEIRA, A. C. et al. Understanding the modus operandi of microRNA regulatory clusters. *Cells*, v. 8, n. 9, 1 set. 2019.

OLSEN, P. H.; AMBROS, V. The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>.



OHNO, Susumu. Evolution by gene duplication. Springer Science & Business Media, 2013.

PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com>.

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

POLEO, G. et al. Cell proliferation and movement during early fin regeneration in zebrafish. Developmental Dynamics, 2001.

PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. CellElsevier B.V., , 20 fev. 2009.

POSS, K. D. et al. Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. Developmental Biology, v. 222, n. 2, p. 347–358, 15 jun. 2000.

POSS, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. Nature Reviews Genetics, 14 out. 2010.

POSS, K. D.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. Tales of regeneration in zebrafish. Developmental Dynamics, 1 fev. 2003.

POSS, K. D.; SHEN, J.; KEATING, M. T. Induction of *lef1* During Zebrafish Fin Regeneration. 2000.

POSS, K. D.; WILSON, L. G.; KEATING, M. T. Heart Regeneration in Zebrafish. Science, v. 298, n. 5601, p. 2188–2190, 13 dez. 2002.

RAJARAM, K. et al. Dynamic miRNA Expression Patterns During Retinal Regeneration in Zebrafish: Reduced Dicer or miRNA Expression Suppresses Proliferation of Müller Glia-Derived Neuronal Progenitor Cells. DEVELOPMENTAL DYNAMICS, p. 1591–1605, 2014a.

RAJARAM, K. et al. MiR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult zebrafish retina regeneration. Developmental Biology, v. 392, n. 2, p. 393–403, 15 ago. 2014b.

RAMSAY, K. et al. Damage, autotomy and arm regeneration in starfish caught by towed demersal @shing gears. [s.l: s.n.].

RASHID, H. et al. Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes. Connective Tissue Research. Anais...Informa Healthcare, 2014.

REDDIEN, P. W.; SÁNCHEZ ALVARADO, A. Fundamentals of planarian regeneration. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2004.

REIMER, M. M. et al. Motor neuron regeneration in adult zebrafish. *Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 34, p. 8510–8516, 20 ago. 2008.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 403, p. 901–906, 2000.

RIBEIRO, A. O. et al. MicroRNAs: Modulators of Cell Identity, and their Applications in Tissue Engineering. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.shutterstock.com>.

RIBEIRO, A. O. et al. MicroRNA roles in regeneration: Multiple lessons from zebrafish. *Developmental Dynamics* John Wiley and Sons Inc, , 1 abr. 2022.

ROSSI A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Holper S, Kruger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature*. 2015;524(7564):230–3.

RYALS, B. M.; RUBEL, E. W. Hair Cell Regeneration After Acoustic Trauma in Adult Coturnix Quail Assoc. Rcs. Otolaryngol. Abstr. [s.l.] Springer-Verlag, 1988. Disponível em: <www.sciencemag.org>.

SANTAMARIA, J. A. et al. Incorporation of Bromodeoxyuridine in Regenerating Fin Tissue of the Goldfish THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY. [s.l: s.n.].

SANTOS-RUIZ, L. et al. Cell proliferation during blastema formation in the regenerating teleost fin. *Developmental Dynamics*, v. 223, n. 2, p. 262–272, 2002.

SCHIER, A. F.; GIRALDEZ, A. J. MicroRNA Function and Mechanism: Insights from Zebra Fish. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006. v. 71

SENSIATE, L. A.; MARQUES-SOUZA, H. Bone growth as the main determinant of mouse digit tip regeneration after amputation. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

SINGH, S. P.; HOLDWAY, J. E.; POSS, K. D. Regeneration of Amputated Zebrafish Fin Rays from De Novo Osteoblasts. *Developmental Cell*, v. 22, n. 4, p. 879–886, 17 abr. 2012.

SKINNER, D. M. The Structure and Metabolism of a Crustacean Integumentary Tissue during a Molt Cycle Bulletin. [s.l: s.n.].

SMITH, A. et al. Inhibition of BMP signaling during zebrafish fin regeneration disrupts fin growth and scleroblast differentiation and function. *Developmental Biology*, v. 299, n. 2, p. 438–454, 15 nov. 2006.

SOUSA, S. et al. Differentiated skeletal cells contribute to blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development*, v. 138, n. 18, p. 3897–3905, 15 set. 2011.

SRIRUSSAMEE, K. et al. Direct electrical stimulation enhances osteogenesis by inducing Bmp2 and Spp1 expressions from macrophages and preosteoblasts. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 116, n. 12, p. 3421–3432, 1 dez. 2019.

- STATON, A. A.; GIRALDEZ, A. J. Use of target protector morpholinos to analyze the physiological roles of specific miRNA-mRNA pairs in vivo. *Nature Protocols*, v. 6, n. 12, p. 2035–2049, dez. 2011.
- STEWART, S.; STANKUNAS, K. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. *Developmental Biology*, v. 365, n. 2, p. 339–349, 15 maio 2012.
- STOCKDALE, W. T. et al. Heart Regeneration in the Mexican Cavefish. *Cell Reports*, v. 25, n. 8, p. 1997–2007.e7, 20 nov. 2018.
- TANAKA, E. M.; REDDIEN, P. W. The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Developmental Cell*, 19 jul. 2011.
- TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*, v. 455, n. 7216, p. 1124–1128, 23 out. 2008.
- THATCHER, E. J. et al. Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org/cgi/content/full/](http://www.pnas.org/cgi/content/full/)>.
- TU, S.; JOHNSON, S. L. Fate restriction in the growing and regenerating zebrafish fin. *Developmental Cell*, v. 20, n. 5, p. 725–732, 17 maio 2011.
- UEMOTO, T.; ABE, G.; TAMURA, K. Regrowth of zebrafish caudal fin regeneration is determined by the amputated length. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1931–1934, 21 dez. 2007.
- VEJNAR, C. E. et al. Optimized CRISPR-Cas9 system for genome editing in zebrafish. *Cold Spring Harbor Protocols*, v. 2016, n. 10, p. 856–870, 1 out. 2016.
- VITT, L. J. Tail Autotomy and Regeneration in the Tropical Skink, *Mabuya heathi* Source: *Journal of Herpetology*. [s.l.: s.n.].
- WADE, S. L. et al. MiRNA-Mediated Regulation of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Controls Pluripotency and Endodermal Differentiation in Human ESCs. *Stem Cells*, v. 33, n. 10, p. 2925–2935, 1 out. 2015.
- WANG, Y. et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature Genetics*, v. 40, n. 12, p. 1478–1483, dez. 2008.
- WHITEHEAD, G. G. et al. fgf20 Is Essential for Initiating Zebrafish Fin Regeneration. *Science*, v. 310, n. 5756, p. 1957–1960, 23 dez. 2005.

- WINTER, J., Jung, S., Keller, S. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228–234 (2009).
- XU, N. et al. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, v. 137, n. 4, p. 647–658, 15 maio 2009.
- YAMAMOTO S, Jaiswal M, Charng WL, Gambin T, Karaca E, Mirzaa G, et al. A drosophila genetic resource of mutants to study mechanisms underlying human genetic diseases. *Cell*. 2014;159(1):200–14.
- YAN, Y.-L. et al. A zebrafish sox9 gene required for cartilage morphogenesis. [s.l.: s.n.].
- YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, v. 17, n. 24, p. 3011–3016, 15 dez. 2003.
- YIN, V. P. et al. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. *Genes and Development*, v. 22, n. 6, p. 728–733, 15 mar. 2008.
- Yoshida K, Kawakami K, Abe G, Tamura K. Zebrafish can regenerate endoskeleton in larval pectoral fin but the regenerative ability declines. *Dev Biol*. 2020 Jul 15;463(2):110-123.
- ZHANG, J. F. et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA Biology*, v. 8, n. 5, 2011.

## 7. Material suplementar

O Material suplementar pode ser acessado através do link

<[https://drive.google.com/drive/folders/1fPrw8kuRobIHvYRHviZXbHJyLiYazwvl-?usp=drive\\_link](https://drive.google.com/drive/folders/1fPrw8kuRobIHvYRHviZXbHJyLiYazwvl-?usp=drive_link)>

Qualquer problema com acesso, favor solicitar ao e-mail da autora: [beatriz.ja.pereira@unesp.br](mailto:beatriz.ja.pereira@unesp.br)