

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

IMPACTO DA EDIÇÃO DE RUNX2A NA REGENERAÇÃO DE
ZEBRAFISH: ANÁLISE FUNCIONAL E DE REGULAÇÃO POR
MIRNAS

MARIA CLARA TAMASCIA DE CASTRO
PROF. ASSOC. DANILLO PINHAL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para
obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

BOTUCATU – SP
2025

C355i	Castro, Maria Clara Tamascia Impacto da edição de runx2a na regeneração de zebrafish: análises funcional e de regulação por miRNAs / Maria Clara Tamascia Castro. -- Botucatu, 2025 28 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu Orientador: Danillo Pinhal Coorientadora: Beatriz Jacinto Alves Pereira 1. Genética animal. 2. RNAs não-codificantes. 3. Regeneração. I. Título.
-------	---

MARIA CLARA TAMASCIA DE CASTRO

**IMPACTO DA EDIÇÃO DE RUNX2A NA REGENERAÇÃO DE
ZEBRAFISH: ANÁLISE FUNCIONAL E DE REGULAÇÃO POR
MIRNAS**

Trabalho de Conclusão de Curso,
apresentado a Universidade Estadual
Paulista, como parte das exigências para
a obtenção do título de Bacharel, do curso
de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 09 de Dezembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danillo Pinhal
Professor Associado – Departamento de Ciências Químicas e Biológicas –
IBB/UNESP

Prof. Dr. Beatriz Cristina Dias de Oliveira
Doutora em Genética pela UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço meus pais, que sempre foram minha base, sempre me apoiaram incondicionalmente, sempre se demonstraram presentes, em dias bons e ruins, sempre sonharam com o melhor para mim, e, acima de tudo, sempre respeitaram minha individualidade. Vocês são os melhores pais que alguém poderia sonhar em ter, obrigada por tudo. Eu jamais poderia ter sonhado esse sonho sem vocês.

Agradeço também toda a minha família, minhas avós, meus tios, meus primos, e principalmente a Carol, minha irmã, que me ensinou tanto sobre a vida adulta. É tão bom saber que eu posso contar com você sempre, e para sempre.

Além da família que me foi presenteada, sou muito grata à família que eu escolhi aqui em Botucatu, as meninas da República Gritaria – vocês foram minha casa longe de casa por todos estes anos, sou muito grata por todas as conversas, todas as diversões, e tudo que vocês me ensinaram sobre a vida e, principalmente, sobre mim mesma. Conviver com vocês me ensina cada dia a ser mais eu.

Agradeço também às minhas amigas de outras vidas: Bárbara, Isadora, e Iolanda. Apesar de longe, vocês sempre estiveram presentes e com certeza eu não teria conseguido sem vocês. Quando me falta chão, eu sempre sei para onde olhar. Seria impossível expressar em palavras o tanto que eu sou grata à vocês.

Também agradeço meus orientadores, Prof. Danilo e Bia, pelo apoio, compreensão, e confiança que me foram dados nos últimos anos.

Por último, não poderia deixar de agradecer a minha psicóloga, Bia, que me ajudou a lidar com todas as dificuldades da graduação com um pouco mais de leveza.

Agradecimento à Facility de multiusuários de Zebrafish, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que contribuiu na geração dos animais geneticamente editados utilizados no presente estudo.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido por meio do Processo nº 2024/07320-5 e a reitoria da UNESP pelo apoio essencial para o desenvolvimento desse trabalho.

RESUMO

A regeneração de estruturas perdidas é um fenômeno raro entre vertebrados, porém altamente eficiente em peixes teleósteos como o zebrafish (*Danio rerio*), que se destaca como modelo experimental devido à sua elevada capacidade regenerativa, genoma bem caracterizado e ampla disponibilidade de ferramentas moleculares. A regeneração da nadadeira caudal ocorre por mecanismo epimórfico, caracterizado pela formação do blastema, uma massa de células progenitoras responsável pela restauração tecidual. Neste trabalho, investigou-se o impacto da redução funcional do gene *runx2a* sobre a regeneração da nadadeira caudal, uma vez que esse gene codifica um fator de transcrição essencial para a diferenciação osteoblástica e formação óssea. Animais heterozigotos para *runx2a* obtidos por edição gênica via CRISPR/Cas9 foram utilizados, uma vez que mutantes homozigotos não sobreviveram ao desenvolvimento embrionário, reforçando a essencialidade do gene. Peixes selvagens ($n = 5$) e mutantes heterozigotos ($n = 4$) foram submetidos à amputação padronizada da nadadeira caudal e avaliados em 72 horas pós-amputação (72 hpa). A área regenerada foi mensurada morfometricamente em milímetros quadrados (mm^2) e a expressão relativa dos microRNAs miR-203a-3p e miR-17-a1-3p foi avaliada por qPCR, empregando controle endógeno previamente validado. Devido à inviabilidade dos mutantes homozigotos e à baixa quantidade de tecido regenerado por indivíduo, foi realizado pooling de RNA por grupo, e os dados foram analisados de forma descritiva. A análise morfológica demonstrou áreas regeneradas semelhantes entre os grupos selvagem ($6,1 \text{ mm}^2$) e mutante ($5,6 \text{ mm}^2$), indicando manutenção da capacidade regenerativa inicial mesmo sob redução funcional de *runx2a*. Em contraste, ambos os microRNAs apresentaram superexpressão no grupo mutante, sugerindo envolvimento de mecanismos regulatórios compensatórios. A análise in silico por TargetScanFish (v6.2) identificou sítios de ligação para esses miRNAs na 3'UTR de *runx2a* e indicou possível participação do gene paralog *runx2b*, frequentemente associado à redundância funcional em teleósteos, além de apontar associação com processos ontológicos de morfogênese de estrutura anatômica e diferenciação celular. Em conjunto, os resultados reforçam a essencialidade de *runx2a* para o desenvolvimento embrionário e indicam que a regeneração inicial da nadadeira pode ser mantida por mecanismos regulatórios mediados por microRNAs, evidenciando a elevada plasticidade molecular do sistema regenerativo do zebrafish diante de perturbações genéticas em genes centrais do desenvolvimento.

Palavras-chave: **regeneração epimórfica, edição genômica, RNAs não-codificantes, modelo animal**

ABSTRACT

The regeneration of lost structures is a rare phenomenon among vertebrates, but highly efficient in teleost fish such as the zebrafish (*Danio rerio*), which stands out as an experimental model due to its high regenerative capacity, well-characterized genome, and wide availability of molecular tools. Caudal fin regeneration occurs through an epimorphic mechanism, characterized by the formation of the blastema, a mass of progenitor cells responsible for tissue restoration. In this study, we investigated the impact of the functional reduction of the *runx2a* gene on caudal fin regeneration, as this gene encodes a transcription factor essential for osteoblast differentiation and bone formation. Heterozygous *runx2a* animals obtained via CRISPR/Cas9 gene editing were used, since homozygous mutants did not survive embryonic development, reinforcing the gene's essentiality. Wild-type ($n = 5$) and heterozygous mutant ($n = 4$) fish underwent standardized caudal fin amputation and were evaluated at 72 hours post-amputation (72 hpa). The regenerated area was measured morphometrically in square millimeters (mm^2), and the relative expression of microRNAs miR-203a-3p and miR-17-a1-3p was evaluated by qPCR, using a previously validated endogenous control. Due to the inviability of homozygous mutants and the low amount of regenerated tissue per individual, RNA pooling was performed per group, and data were analyzed descriptively. Morphological analysis demonstrated similar regenerated areas between the wild-type (6.1 mm^2) and mutant (5.6 mm^2) groups, indicating the maintenance of initial regenerative capacity even under functional reduction of *runx2a*. In contrast, both microRNAs showed overexpression in the mutant group, suggesting the involvement of compensatory regulatory mechanisms. In silico analysis using TargetScanFish (v6.2) identified binding sites for these miRNAs in the 3'UTR of *runx2a* and indicated possible participation of the paralogous gene *runx2b*, frequently associated with functional redundancy in teleosts, in addition to pointing to an association with ontological processes of anatomical structure morphogenesis and cellular differentiation. Together, the results reinforce the essentiality of *runx2a* for embryonic development and indicate that initial fin regeneration can be maintained by microRNA-mediated regulatory mechanisms, highlighting the high molecular plasticity of the zebrafish regenerative system in the face of genetic perturbations in core developmental genes.

Sumário

1	Introdução.....	7
1.1	Regeneração Epimórfica	7
1.2	Zebrafish como animal modelo para estudos de regeneração.....	7
1.3	Papel regulatório e envolvimento dos miRNAs	9
2	Objetivos.....	11
2.1	Objetivos Específicos	11
3	Metodologia	12
3.1	Peixes e condições de manutenção	12
3.2	Ensaio de Regeneração e Coleta de Amostras	12
3.3	Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA.....	13
3.4	Expressão relativa de miRNAs	14
3.5	Predição bioinformática de alvos	15
3.6	Análise morfológica da área regenerada	15
4	Resultados.....	16
5	Discussão	18
6	Conclusão.....	21
7	Referências bibliográficas	22

1 Introdução

1.1 Regeneração Epimórfica

A regeneração de membros ou partes perdidas do corpo é um tópico que vem despertando o interesse da comunidade científica há centenas de anos, desde os estudos de Abraham Trembley, publicados em 1744. A regeneração pode ser definida como a substituição de uma parte do corpo perdida por injúria traumática (amputação ou autotomia) (Bely e Nyberg, 2010). Recentemente, à luz de novas ferramentas genéticas e moleculares, esse interesse tem sido reacendido. Diferenças no potencial regenerativo observadas entre espécies fascinam os seres humanos pois os mamíferos apresentam uma capacidade extremamente reduzida de regenerar apêndices e órgãos, com apenas algumas exceções: alguns mamíferos jovens podem regenerar a ponta dos dedos (Borgens, 1982) e os cervos perdem e crescem novamente seus chifres continuamente (Kierdorf e Price, 2009).

Por sua vez, outros vertebrados, como anfíbios (Brockers, 1997; Brockers e Kumar, 2005) e peixes teleósteos (Sánchez-Alvarado e Tsonis, 2006) apresentam notável capacidade de regenerar estruturas complexas, incluindo órgãos internos e membros inteiros. A principal diferença é que esses animais, ao sofrerem injúrias em determinadas partes do corpo, são capazes de formar o blastema: um conjunto de células tronco mesenquimais que se forma na região da amputação.

O estudo dessa estrutura, que define a chamada regeneração epimórfica, é de extremo interesse para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à regeneração, e fornece novas perspectivas para elucidar as causas das limitações à regeneração em mamíferos.

Dessa forma, ao estudar esse ramo da biologia experimental, espera-se contribuir para avanços no desenvolvimento da medicina regenerativa, que poderia auxiliar milhões de pessoas futuramente, principalmente no ramo das amputações. No Brasil, apenas no ano de 2023 foram realizadas mais de 40 mil amputações de membros (SIH/SUS, 2024).

1.2 Zebrafish como animal modelo para estudos de regeneração

Nesse contexto, o peixe teleósteo zebrafish (*Danio rerio*), conhecido popularmente como “paulistinha”, nativo de águas fluviais na Ásia, tem sido amplamente utilizado como animal modelo para regeneração epimórfica, devido à sua incrível capacidade de regenerar órgãos e tecidos, como o coração (Poss et al., 2002b), tecido nervoso (Becker e Becker, 2008; Reimer et al., 2008), retina (Rajaram et al., 2014a,b) e também nadadeiras (Poss et al., 2003).

Além disso, há uma gama ampla de ferramentas genéticas para seu estudo, como painéis de mutagênese, técnicas de transgênese e knockdown bem desenvolvidas, ferramentas de manipulação genética eficientes, potencialidade de imageamento em tempo real (Chen e Ekker, 2004; Gemberling et al., 2013; Poss, 2010, Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996, Higashijima et al., 1997; Nasevicius e Ekker, 2000) e genoma sequenciado, com alta semelhança com o genoma humano, já que aproximadamente 70% dos genes humanos apresentam um gene ortólogo em zebrafish (Howe et al., 2013). Esses animais também são de baixo custo, fácil manutenção e se desenvolvem rapidamente.

A nadadeira caudal, em especial, é um ótimo modelo para observar a regeneração, pois apresenta fácil observação e manipulação, devido ao seu tamanho, e o estudo de seu crescimento não requer reagentes ou equipamentos específicos. (Rolland-Lagan et al., 2012).

A nadadeira caudal de zebrafish é um apêndice formado por osteoblastos e fibroblastos, composto por raios cilíndricos segmentados, produzidos e revestidos externamente por osteoblastos, não há tecido esquelético endocondral, apresentando origem dermal. (Gemberling et al., 2013; Mondes et al., 1982; Becerra et al., 1983; Santamaria e Becerra, 1991; Geraudie e Singer, 1992).

Após sofrer injúria, ocorre regeneração do tipo epimórfica, ou seja, com formação de blastema, e reconstituição de tecido complexo com múltiplos tipos celulares. O blastema é uma massa de células heterogêneas, progenitoras e proliferativas e é fundamental para a regeneração de membros em salamandras e nadadeiras em peixes teleósteos. Algumas horas após a amputação, uma camada epitelial fina cobre a ferida, que acumula camadas adicionais nas próximas 12 a 18 horas, por processos de migração celular. A amputação causa desdiferenciação de osteoblastos maduros, que migram para o local da amputação, e isso demonstra a

plasticidade óssea. Entretanto, esses osteoblastos, ao se rediferenciarem em aproximadamente 2 dias após a amputação, não se tornam outros tipos celulares, mantendo a restrição da linhagem.

Entre 18 e 24 horas após a amputação, ocorre a formação do blastema, por processos de migração e proliferação. Esse processo envolve alto controle do crescimento e reprogramação celular em tecidos adultos, seguidos pela diferenciação e padronização, que levam à restauração apenas das partes perdidas, (Poss et al., 2003; Akimenko et al., 2003; Knopf et al., 2011) e se inicia em torno de 48 a 72 hpa. Observa-se que o pico do crescimento ocorre por volta de 72 hpa, quando o blastema já está formado e a regeneração entra no último estágio: o crescimento regenerativo, que terminará quando a nadadeira estiver morfológica e funcionalmente idêntica à original, em torno de 20 dias (em média) após a amputação (Lee et al., 2005; Schebesta et al., 2006).

1.3 Papel regulatório e envolvimento dos miRNAs

Para analisar os mecanismos genéticos envolvidos em todas as etapas desse processo, é possível investigar alguns genes alvos, expressos em células ósseas e que potencialmente atuam na regeneração. Dentre estes, destaca-se o gene *runx2a*, um fator de transcrição essencial para a proliferação de células progenitoras de osteoblastos, já que ele regula os fatores de crescimento de fibroblastos 2 e 3 (*fgf2* e *fgf3*) (Kawane et al, 2019), além de regular o marcador tardio de osteoblastos *bglap*, relacionado à mineralização óssea (Chen et al, 2019), e aumentar a expressão de *fgf3* em células mesenquimais, o que também é essencial para a desdiferenciação das células ósseas (Rashid et al, 2014).

Segundo Nakashima e colaboradores (2002), a formação óssea em ratos ocorre da seguinte maneira: sob a ação fundamental de *runx2*, os progenitores de osteoblastos se diferenciam em pré-osteoblastos que dependem da ação de *sp7* para tornarem-se osteoblastos maduros, que expressam genes marcadores característicos de osteoblastos.

Assim, considerando-se o papel fundamental de *runx2a* na função regenerativa, torna-se relevante investigar a ação dos microRNAs (miRNAs) que o alvejam durante o processo de regeneração, uma vez que os perfis de expressão gênica diferencial ao

longo da regeneração e entre diferentes tecidos regenerativos sugerem uma regulação gênica específica de estágio e tecido.

Os miRNAs foram descobertos na década de 1990 em estudos sobre o desenvolvimento larval de *C. elegans* (Lee et al., 1993; Reinhart et al., 2000), mas apenas posteriormente esses pequenos RNAs foram reconhecidos como uma nova classe de moléculas de RNAs não codificantes (ncRNAs) (Lee; Ambros, 2001). Diversos trabalhos já demonstraram o envolvimento dos miRNAs na determinação do destino celular, na manutenção dos estados diferenciados das células (Ivey; Srivastava, 2010; Guo et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Oliveira-Mateos et al., 2019). Os miRNAs também foram identificados como importantes reguladores da expressão gênica durante a regeneração da nadadeira caudal de zebrafish. Comparando os perfis de expressão dos 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, em contraste com os 51 miRNAs com expressão aumentada e 14 com expressão diminuída identificados durante a formação do blastema. Estes achados sugerem que os miRNAs estão envolvidos em funções específicas por estágio durante o processo de regeneração.

Especificamente, o miR-17-a1-3p foi descrito como um fator importante na diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas por meio da função regulatória sobre os genes RUNX2, sp7, bglap e spp1 — conhecidos marcadores da diferenciação osteogênica (Zhang et al., 2011). Além disso, foi verificado que a redução da expressão de miR-203 correlaciona-se negativamente com a expressão de *lef1*, um marcador de regeneração inicial (Poss et al., 2000a), sendo observado que sua inibição experimental resulta em aumento notável no crescimento da nadadeira.

O miR-203 também 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 culturas celulares de *Homo sapiens* (Laxman et al., 2017).

Em dados ainda não publicados do grupo de pesquisa, observamos que estes miRNAs alvejam e podem interferir ou ter sua expressão modulada pela regulação exercida sobre o gene *runx2a*.

2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar o impacto da edição do gene *runx2a* na habilidade de regeneração da nadadeira caudal em zebrafish.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar se os níveis de expressão dos microRNAs miR-203a e miR-17-a1 (especificamente suas isoformas 3p), candidatos à regulação do gene editado, apresentam diferenças significativa entre zebrafish mutantes e selvagens.
- Comparar a habilidade de regeneração da nadadeira caudal entre peixes mutantes e selvagens após amputação controlada.
- Discutir os resultados obtidos em relação ao impacto da edição gênica no gene *runx2a* na regeneração da nadadeira caudal em zebrafish, incluindo suas implicações para a compreensão dos mecanismos de regeneração tecidual em vertebrados.
- Avaliar a essencialidade do gene *runx2a* a partir da viabilidade e mortalidade observada nos embriões editados por CRISPR/Cas9.

3 Metodologia

3.1 Peixes e condições de manutenção

Para a execução do projeto, foram utilizados zebrafish adultos selvagens e mutantes heterozigotos (i.e, somente um alelo funcional) para *runx2a*, obtidos durante o desenvolvimento do projeto FAPESP-FAPERGS (2019/15494-5) recentemente concluído.

Os mutantes foram gerados na Facility de Multiusuários de Zebrafish da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela técnica de CRISPR/Cas9.

Foram gerados também mutantes homozigotos, mas nenhum deles sobreviveu, mostrando a essencialidade do gene estudado. As mutações foram confirmadas por sequenciamento Sanger, revelando indels no exon alvo e indicando mutações frameshift com forte redução funcional. Os animais que sobreviveram foram genotipados e verificou-se que eram todos heterozigotos.

Todos os peixes (n=9) foram mantidos no biotério de peixes da Genética (DCQB) em sistema de criação de zebrafish automatizado, plataforma ZebTec (Tecniplast, Itália) em aquários de 3,5 ou 8 litros, com densidade de 5 a 10 peixes por litro, sob temperatura 28° C, pH $\approx$ 7.0, amônia < 0.02 ppm, nitrito < 2.0 mg/L e aeração constante. O

fotoperíodo foi de 12 horas de ciclo claro (09:00 às 21:00h). Trocas parciais de água (10% da água do sistema) foram realizadas diariamente e o nível restabelecido com água de osmose reversa. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (45-55% de proteína bruta), em quantidade equivalente a 5% do peso vivo.

3.2 Ensaios de Regeneração e Coleta de Amostras

Para os ensaios de regeneração e para a coleta das amostras, foram utilizados 9 indivíduos adultos do biotério.

Para análise diferencial da expressão gênica, foram utilizados peixes editados por CRISPR/Cas9, heterozigotos para o gene *runx2a* (n=4) e selvagens (n=5).

Todos os animais foram anestesiados com tricafina (ms-222; 150mg/L) e tiveram a nadadeira caudal amputada a 2 mm do corpo, sendo a amostra coletada 72 h após amputação. As amostras foram imediatamente imersas em nitrogênio líquido e armazenadas em biofreezer (-80 °C).

Devido ao volume reduzido de tecido regenerado obtido por indivíduo, as amostras foram combinadas dentro de cada grupo experimental, resultando em dois conjuntos finais de RNA (pool mutante e pool selvagem). Essa abordagem permitiu alcançar quantidade e qualidade adequadas de material para as análises moleculares subsequentes.



Figura 1: Nadadeira caudal de zebrafish; intacta (a), imediatamente após o corte, evidenciando a distância de 2 mm do corpo do animal (b), e 72 horas após a amputação (c).

3.3 Extração, quantificação e análise da qualidade do RNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o método de extração orgânica com TRIzol® (ThermoFischer Scientific), de acordo com o manual do fabricante.

Para quantificação (em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e análise de contaminação do RNA total, foram avaliadas as razões de absorbância A260/280 nm e A230/280 nm no equipamento NanoDrop 1000 (Thermo-Scientific), indicando possíveis contaminações por proteínas fenol, respectivamente. Além disso, a integridade do RNA isolado foi checada utilizando-se gel de agarose a 1%.

Para eliminar eventual contaminação por DNA genômico, o RNA total foi purificado utilizando-se DNase I (ThermoFisher), seguindo o protocolo do fabricante. Após esse procedimento, o RNA foi estocado a -80 °C até seu uso nas etapas subsequentes.

3.4 Expressão relativa de miRNAs

Para a transcrição reversa dos miRNAs foi utilizado o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher Scientific, EUA), em conjunto com ensaios TaqMan® específicos para miR-203a-3p, miR-17-a1-3p e U6, utilizado como controle endógeno. Esse sistema permite a transcrição reversa apenas de miRNAs maduros e não é afetado pela contaminação com DNA genômico (Chen et al., 2007), garantindo especificidade na detecção.

A escolha destes miRNAs foi feita com base em um projeto anterior, utilizando uma estratégia otimizada de seleção de alvos desenvolvida em nosso laboratório (Oliveira et al., 2017).

O miR-203a é descrito como regulador essencial da regeneração de apêndices em zebrafish, atuando de forma negativa sobre a via Wnt/Lef1 e influenciando o crescimento da nadadeira. Quando sua expressão é reduzida, observa-se aumento da expressão de *lef1* e supercrescimento da nadadeira, indicando que níveis adequados de miR-203a são necessários para o controle fino da regeneração.

Em ensaios regenerativos, foi observado que a injeção de miR-203a leva à diminuição da expressão de genes envolvidos na via Wnt e à redução do crescimento da nadadeira, reforçando seu papel como modulador negativo de fatores positivos para o funcionamento correto da regeneração.

Já o miR-17-a1 está relacionado à diferenciação osteoblástica, atuando sobre genes como *runx2*, *sp7*, *bglap* e *spp1*, todos associados à formação e mineralização óssea. A redução da expressão deste miRNA está associada a atraso da mineralização da matriz extracelular.

Em humanos, o miR-17-a1 é importante para a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e tem sido implicado em processos de proliferação celular e tumorigênese quando desregulado, havendo relatos de superexpressão deste miRNA em células cancerígenas (Mestdagh et al., 2010).

A amplificação dos miRNAs foi realizada em termociclador StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems), em volume final de 10 µL por reação, seguindo as condições recomendadas pelo fabricante. As reações foram conduzidas em duplicata

técnica, considerando que o RNA de cada grupo experimental foi obtido a partir de pools de tecido regenerado. A expressão relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5 Predição bioinformática de alvos

Utilizando-se a ferramenta TargetScan Fish (https://www.targetscan.org/fish_62/), foi realizada uma análise dos genes alvejados pelos miRNAs selecionados para este estudo (miR-203a-3p e miR-17-a1-3p). Além disso, utilizamos dados de transcriptoma gerados pelo nosso grupo de pesquisa para análise de enriquecimento funcional, observando os termos diferencialmente expressos (upregulated e downregulated) entre os períodos 0 e 72 hpa, para estimar as funções exercidas pelos termos diferencialmente expressos dentro das três categorias convencionais de anotação funcional: Função Molecular, Processos Biológicos e Componentes Celulares.

Assim, foi possível relacionar a ação dos miRNAs selecionados com os termos do enriquecimento funcional. Dessa análise, observou-se que dentre os termos diferencialmente expressos no período, apenas dois termos estavam relacionados aos genes alvejados pelos miRNAs analisados (miR-203a e miR-17-a1 – ambos significativamente superexpressos no grupo mutante). Esses termos se referiam aos processos biológicos de diferenciação celular e morfogênese de estrutura anatômica.

3.6 Análise morfológica da área regenerada

A capacidade regenerativa dos animais foi avaliada comparativamente entre os grupos mutante e controle no período de 72 horas após a amputação, verificando-se a capacidade de reconstituição da estrutura. As imagens foram capturadas utilizando-se um estereomicroscópio Zeiss Discovery V8 acoplado a câmera, e a área de blastema regenerada foi analisada no software image J v1.54i (Schneider et al., 2012), no qual a região regenerada (delimitada a partir do ponto de amputação) foi mensurada individualmente para cada animal dos grupos mutante e selvagem, possibilitando a comparação descritiva da extensão regenerada em 72 hpa.

4 Resultados

A análise da área de nadadeira (blastema) regenerada em 72 horas após a amputação demonstrou que não foram observadas diferenças marcantes entre os grupos selvagem e mutante, com o grupo selvagem apresentando área regenerada média de 6,1 mm², e o grupo mutante de 5,6 mm². Os valores refletem a tendência geral da regeneração em cada grupo. Os dados da área de tecido regenerada nos dois grupos estão representados na Figura 2.

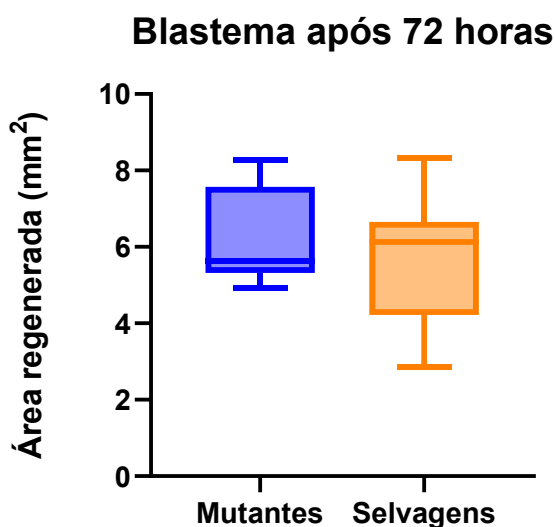


Figura 2: Área de nadadeira caudal regenerada no período de 72 horas após amputação, em cada grupo.

Ao analisar a expressão relativa dos miRNAs avaliados, comparando os grupos mutante e selvagem, observou-se que ambos os miRNAs estavam superexpressos no grupo mutante, com a expressão do miR-17 aumentada em aproximadamente 3,6 vezes e a expressão do miR-203^a aumentada em cerca de 4,3 vezes. Estes dados estão expostos na Figura 3. Observa-se também que os níveis desses miRNAs no grupo selvagem mantiveram-se estáveis ou ligeiramente reduzidos no mesmo intervalo.

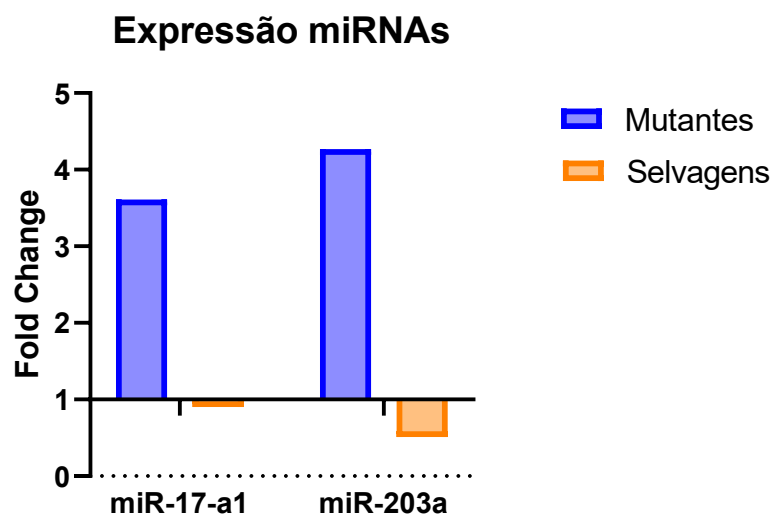


Figura 3: Expressão relativa dos miRNAs analisados, comparando grupos selvagem e mutantes para runx2a

A análise *in silico* confirmou a interação potencial entre os miRNAs avaliados e o gene runx2a, corroborando a relação regulatória sugerida previamente. Além disso, foi possível identificar que os genes alvos desses miRNAs estão associados aos processos biológicos de morfogênese de estrutura anatômica e diferenciação celular. Essa associação reforça o potencial papel funcional desses miRNAs em etapas iniciais da regeneração tecidual.

Os termos de ontologia gênica (GO terms) relacionados aos miRNAs analisados estão apresentados na Tabela 1, evidenciando sua associação com processos biológicos fundamentais para o controle da regeneração epimórfica.

Tabela 1: GO terms diferencialmente expressos no período de 72 hpa que estão relacionados aos miRNAs analisados.

ACESSO	NOME	ONTOLOGIA	DEFINIÇÃO
GO:0009653	Morfogênese de estrutura anatômica	Processo Biológico (BP)	O processo pelo qual estruturas anatômicas são geradas e organizadas; refere-se à criação da forma.
GO:0030154	Diferenciação celular	Processo Biológico (BP)	O processo pelo qual uma célula relativamente não especializada adquire características específicas.

5 Discussão

A regeneração de partes perdidas é um fenômeno curioso e incomum no reino animal, e ao estudar esse processo a nível molecular, busca-se elucidar por que a regeneração é tão rara entre os animais, e quais fatores coordenam esse processo complexo. Nesse contexto, o zebrafish (*Danio rerio*) é um ótimo animal modelo, devido à sua incrível capacidade regenerativa, facilidade de manipulação, ampla gama de ferramentas genéticas disponíveis, além da similaridade com o genoma humano (Chen e Ekker, 2004; Gemberling et al., 2013; Poss, 2010; Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996; Higashijima et al., 1997; Nasevicius e Ekker, 2000).

Para este trabalho, foram utilizados animais geneticamente modificados pela técnica de CRISPR/Cas9, que permite o silenciamento preciso e direcionado, resultando em uma redução parcial da função do gene *runx2a* (apenas um alelo silenciado). Este gene foi escolhido devido ao seu papel fundamental no processo de formação e maturação óssea, já que a nadadeira caudal de zebrafish, o objeto de estudo deste trabalho, é formada predominantemente de tecido ósseo e epitelial (Gemberling et al., 2013; Mondes et al., 1982; Becerra et al., 1983; Santamaria e Becerra, 1991; Geraudie e Singer, 1992).

Diversos estudos correlacionam o gene *runx2a* à regeneração de apêndices em zebrafish, pois sua ação na proliferação de precursores osteoblásticos é fundamental para o desenvolvimento ósseo (Nakashima et al. 2002, Kawane et al, 2019, Chen et al, 2019). Ao editar este gene, cujo papel neste processo já é conhecido, torna-se possível investigar com maior profundidade os mecanismos e a cascata regulatória que regem a regeneração, como a ação dos miRNAs neste processo, e como vias compensatórias podem operar diante da redução funcional de um gene central.

Inicialmente, o silenciamento seria feito nos dois alelos do gene, buscando a completa perda de função. Entretanto, todos os animais homozigotos gerados foram incapazes de se desenvolver, reforçando o papel crucial deste gene na formação óssea. A inviabilidade dos homozigotos reduziu o número de indivíduos disponíveis para análise, direcionando o trabalho para uma abordagem descritiva.

Os animais editados sobreviventes foram genotipados, confirmando que eram heterozigotos para *runx2a*. Entretanto, as análises morfológicas do blastema formado

após 72 horas da amputação demonstraram que não foram observadas diferenças marcantes na área de tecido regenerado, comparando os grupos selvagem e mutante. Este achado sugere que a redução na expressão do gene *runx2a* pode ter sido parcialmente compensada, permitindo a manutenção da taxa e extensão do crescimento regenerativo.

Para investigar o mecanismo por trás dessa manutenção fenotípica, foi analisada a ação dos microRNAs (miRNAs). Estes pequenos RNAs não codificantes são conhecidos por serem moduladores finos da expressão gênica e por seu envolvimento na diferenciação e formação de tecido ósseo, regulando inclusive o *runx2* (Ivey; Srivastava, 2010.; Guo et al., 2011; Ribeiro et al., 2014; Oliveira-Mateos et al., 2019).

Os miRNAs 203a e 17-a1 foram escolhidos pois, segundo dados não publicados do grupo, eles têm potencial para alvejar e poderiam interferir ou ter sua expressão modulada em resposta à modulação de *runx2a*.

Através da ferramenta TargetScan Fish, foram identificados sítios previstos de ligação desses miRNAs à região 3'UTR do *runx2a*. Os resultados de qPCR evidenciaram uma superexpressão de ambos os miRNAs no grupo mutante (miR-17-a1 3,6 vezes e miR-203a 4,3 vezes maiores). Esse aumento expressivo pode refletir uma resposta regulatória ajustada ao estado de heterozigose, contribuindo para a manutenção da homeostase do processo regenerativo.

O miR-203a é um regulador crítico da regeneração, atuando como um "freio" na proliferação celular ao alvejar *Irf1* (marcador de regeneração inicial) e regulando indiretamente a diferenciação de osteoblastos em parte via *Dlx5*. Sua superexpressão no mutante pode representar um ajuste compensatório diante da redução funcional de *runx2a*, contribuindo para equilibrar proliferação e diferenciação, apesar de seu papel clássico como regulador negativo da regeneração (King e Yin, 2016, Thatcher et al., 2008, Poss et al., 2000a).

O miR-17-a1 está associado à diferenciação osteoblástica, e sua superexpressão pode promover a proliferação celular, potencialmente resgatando a osteogênese em células com disfunção em *runx2*. No contexto do mutante heterozigoto, a elevação da expressão do miR-17-a1 pode favorecer a proliferação celular necessária para o

blastema e a diferenciação osteoblástica por meio do alelo *runx2a* funcional, atuando de forma a suavizar a subexpressão do gene (Zheng et al., 2017).

Além disso, a correlação desses miRNAs com os processos biológicos de morfogênese de estrutura anatômica e diferenciação celular reforça seu papel potencial e coordenado no processo da regeneração epimórfica.

Embora o uso de pooling tenha limitado análises estatísticas formais, os resultados de expressão diferencial dos miRNAs em um contexto de edição gênica do *runx2a* fornecem insights importantes sobre a plasticidade regulatória do sistema de regeneração do zebrafish.

6 Conclusão

O estudo da regeneração epimórfica em zebrafish transgênicos possibilitou o aprofundamento do estudo do papel do gene *runx2a* e dos miRNAs que o regulam, tanto durante o desenvolvimento do animal quanto no processo regenerativo. Apesar das limitações decorrentes do número reduzido de animais, foi possível obter novos insights sobre as cascatas regulatórias envolvidas nesse processo tão complexo.

As realizações do projeto demonstraram empiricamente que o gene *runx2a* é essencial para o desenvolvimento embrionário, já que os mutantes homozigotos não sobreviveram até a vida adulta e mesmo os heterozigotos apresentaram alta mortalidade. Apesar de as análises morfológicas não demonstrarem perda significativa na área de blastema regenerada no grupo mutante, a superexpressão dos miRNAs 17-a1 e 203a sugere que o alelo não silenciado do *runx2a* pode ter sofrido uma supercompensação inicial, posteriormente regulada pelos níveis elevados desses miRNAs.

A relação dos miRNAs investigados com processos de diferenciação celular e morfogênese reforça a hipótese de que os miRNAs atuam como mediadores importantes da regeneração epimórfica. Embora o número reduzido de amostras e o *pooling* de tecidos limitem a robustez estatística dos resultados, o trabalho oferece uma base importante para investigações futuras sobre os cascatas regulatórias envolvendo miRNAs durante a regeneração tecidual.

Em conclusão, os achados destacam a importância do *runx2a* como gene essencial para a osteogênese e reforçam a contribuição dos miRNAs como mediadores finos do equilíbrio regenerativo. Estudos complementares com maior amostragem e análises temporais mais detalhadas poderão elucidar melhor os mecanismos moleculares que sustentam a regeneração em vertebrados, contribuindo para o avanço da biologia regenerativa e da medicina translacional.

7 Referências bibliográficas

- AKIMENKO, M.-A. et al. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. **Developmental Dynamics**, v. 226, n. 2, p. 190–201, 22 jan. 2003.
- BECERRA, J. et al. Structure of the tail fin in teleosts. **Cell and Tissue Research**, v. 230, n. 1, mar. 1983.
- BECKER, C. et al. mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 237–243, 2010.
- BECKER, C. G.; BECKER, T. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 26, n. 2-3, p. 71–80, 2008.
- BORGES, R. Mice regrow the tips of their foretoes. **Science**, v. 217, n. 4561, p. 747–750, 20 ago. 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS, Sistema de Informações Hospitalares. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [2024?]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/qiuf.def>. Acesso em: 19 abr. 2024.
- BROCKES, J. P. Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 81–87, 4 abr. 1997.
- BROCKES, J. P. Appendage Regeneration in Adult Vertebrates and Implications for Regenerative Medicine. **Science**, v. 310, n. 5756, p. 1919–1923, 23 dez. 2005.
- BROCKES, J. P.; KUMAR, A. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 8, p. 566–574, ago. 2002.
- 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, 2007.
- CHEN, E.; EKKER, S. C. Zebrafish as a genomics research model. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 5, n. 5, p. 409–413, 2004.

- CHEN. Sp7/osterix positively regulates dlx2b and bglap to affect tooth development and bone mineralization in zebrafish larvae. **Journal of Biosciences**, v. 44, n. 6, 2019.
- DELAURIER, A. et al. Zebrafish β -galactosidase: A transgenic for studying otic vesicle formation, skeletogenesis, and bone regeneration. **Genesis**, v. 48, n. 8, p. 505–511, ago. 2010.
- FAN, J. et al. The Regulatory Role of miRNAs in Zebrafish Fin Regeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 19, p. 10542–10542, 30 set. 2024.
- FLEIGE, S.; PFAFFL, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 126-139, 2006.
- GEMBERLING, M.; BAILEY, T. J.; HYDE, D. R. et al. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 11, p. 611–620, 2013.
- GÉRAUDIE, J.; SINGER, M. The fish fin regenerate. **Monographs in Developmental Biology**, v. 23, p. 62–72, 1992.
- GIACHELLI, C. M.; STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. **Matrix Biology**, v. 19, n. 7, p. 615–622, dez. 2000.
- GUO, L.; ZHAO, R. C.; WU, Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v. 39, n. 6, p. 608-616, 2011.
- HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, abr. 2013.
- IVEY, K. N.; SRIVASTAVA, D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 36-41, 2010.
- KAWANE, T. et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 10 set. 2018.

KIERDORF, U.; LI, C.; PRICE, J. S. Improbable appendages: Deer antler renewal as a unique case of mammalian regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 5, p. 535–542, jul. 2009.

KING, B. L.; YIN, V. P. A Conserved MicroRNA Regulatory Circuit Is Differentially Controlled during Limb/Appendage Regeneration. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0157106, 29 jun. 2016.

KNOPF, F. et al. Bone Regenerates via Dedifferentiation of Osteoblasts in the Zebrafish Fin. **Developmental Cell**, v. 20, n. 5, p. 713–724, maio 2011.

LAXMAN, N. et al. miR-203 and miR-320 Regulate Bone Morphogenetic Protein-2-Induced Osteoblast Differentiation by Targeting Distal-Less Homeobox 5 (Dlx5). **Genes**, v. 8, n. 1, p. 4, 23 dez. 2016.

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**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.

LEE, Y. Fgf signaling instructs position-dependent growth rate during zebrafish fin regeneration. **Development**, v. 132, n. 23, p. 5173–5183, 1 dez. 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MESTDAGH, P. et al. The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF β -pathway in neuroblastoma. **Molecular Cell**, v. 40, n. 5, p. 762–773, 10 dez. 2010.

MONTES, G. S. et al. Fine structure and histochemistry of the tail fin ray in teleosts. **Histochemistry**, v. 75, n. 3, p. 363–376, set. 1982.

NAKASHIMA, K. et al. The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17–29, jan. 2002.

NARUMANCHI, S. et al. Inhibition of let-7c Regulates Cardiac Regeneration after Cryoinjury in Adult Zebrafish. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 6, n. 2, p. 16, 4 abr. 2019.

OLIVEIRA-MATEOS, C.; SÁNCHEZ-CASTILLO, A.; GUIL, S. Noncoding RNAs as Regulators of Gene Expression in Pluripotency and Differentiation. In: OLIVEIRA-MATEOS, C.; SÁNCHEZ-CASTILLO, A.; GUIL, S. **Epigenetics and Regeneration**. [s.l.]: Elsevier, 2019. p. 73–105.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e45, 1 maio 2001.

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

POSS, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 10, p. 710–722, 2010.

POSS, K. D. Heart Regeneration in Zebrafish. **Science**, v. 298, n. 5601, p. 2188–2190, 13 dez. 2002.

POSS, K. D.; KEATING, M. T.; NECHIPORUK, A. Tales of regeneration in zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 226, n. 2, p. 202–210, 29 jan. 2003.

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

RASHID, H. et al. Sp7 and Runx2 molecular complex synergistically regulate expression of target genes. **Connective Tissue Research**, v. 55, n. sup1, p. 83–87, 15 ago. 2014.

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, n. 6772, p. 901–906, fev. 2000.

RIBEIRO, A. O. et al. MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering. **Microna**, v. 3, n. 1, p. 45-53, 2014.

ROLLAND-LAGAN, A.-G. et al. Morphogen-based simulation model of ray growth and joint patterning during fin development and regeneration. **Development**, v. 139, n. 6, p. 1188–1197, 8 fev. 2012.

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

SANTAMARÍA, J. A.; BECERRA, J. Tail fin regeneration in teleosts: cell-extracellular matrix interaction in blastemal differentiation. **Journal of Anatomy**, v. 176, p. 9–21, 1 jun. 1991.

SCHEBESTA, M. et al. Transcriptional Profiling of Caudal Fin Regeneration in Zebrafish. **The Scientific World Journal**, v. 6, p. 38–54, 2006.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 28 jun. 2012.

SEHRING, I.; WEIDINGER, G. Zebrafish Fin: Complex Molecular Interactions and Cellular Mechanisms Guiding Regeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, p. a040758, 14 out. 2021.

SHANNON, P. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 1 nov. 2003.

SHEN, G.-Y. et al. *Let-7f-5p* regulates *TGFBR1* in glucocorticoid-inhibited osteoblast differentiation and ameliorates glucocorticoid-induced bone loss. **International Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 10, p. 2182–2197, 1 jan. 2019.

STEWART, S.; STANKUNAS, K. Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration. **Developmental Biology**, v. 365, n. 2, p. 339–349, maio 2012.

TU, B. et al. miR-203 inhibits the traumatic heterotopic ossification by targeting Runx2. **Cell Death and Disease**, v. 7, n. 10, p. e2436–e2436, 27 out. 2016.

VALENTI, M. T. et al. Zebrafish: A Suitable Tool for the Study of Cell Signaling in Bone. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1911, 17 ago. 2020.

WANG, C. et al. Biological Functions of \$Let-7e-5p\$ in Promoting the Differentiation of \$MC3T3-E1\$ Cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 8 set. 2021.

WEI, J. et al. \$let-7\$ Enhances Osteogenesis and Bone Formation While Repressing Adipogenesis of Human Stromal/Mesenchymal Stem Cells by Regulating \$HMGA2\$. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 13, p. 1452–1463, 1 jul. 2014.

ZFIN. **Publication: Thatcher et al., 2008**. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-PUB-081121-22>. Acesso em: 26 ago. 2025.

ZFIN. **Publication: Zhang et al., 2011**. Disponível em: <https://zfin.org/ZDB-PUB-110816-23>. Acesso em: 26 ago. 2025.

ZHENG, L. et al. Runx2/DICER/miRNA Pathway in Regulating Osteogenesis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 1, p. 182–191, jan. 2017.