

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EVOLUÇÃO DA 3’UTR DO GENE SPARC E SUA REGULAÇÃO
POR MIRNAS: IMPLICAÇÕES NA CAPACIDADE
REGENERATIVA

FERNANDO YUJI SASE

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

S252e

Sase, Fernando Yuji

Evolução da 3'UTR do gene SPARC e sua regulação por miRNAs: :
Implicações na capacidade regenerativa / Fernando Yuji Sase. --
Botucatu, 2025

20 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências, Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

1. MicroRNAs. 2. Genética Evolucionária. 3. Regeneração Óssea.
4. Bioinformática. 5. Biologia Computacional. I. Título.

Fernando Yuji Sase

EVOLUÇÃO DA 3'UTR DO GENE SPARC E SUA REGULAÇÃO POR MIRNAS

Implicações na capacidade regenerativa

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.

Local, 08 de dezembro de 2025.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
DANILLO PINHAL
Data: 17/12/2025 16:37:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Associado Danilo Pinhal
Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia – Setor de Genética



Documento assinado digitalmente
MARCEL RODRIGUES FERREIRA
Data: 18/12/2025 09:12:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Marcel Rodrigues Ferreira
Departamento de Patologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as decisões que tomei, por permitir que seguisse meus sonhos e estarem sempre ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Danilo Pinhal por me permitir seguir com esta linha de pesquisa e por todo conhecimento que obtive, que me permitiu trilhar este caminho, além de a todo pessoal do laboratório de genômica e evolução molecular (LGEM) por me auxiliarem durante todo este projeto.

Agradeço a CNPq pela bolsa PIBIC de iniciação científica (Edital 8/2024 - PIBIC/17073) pelo auxílio acadêmico e financeiro, que me permitiu a realização deste trabalho.

E por fim, agradeço a todas as pessoas incríveis que conheci e as amigas que obtive ao longo da minha jornada acadêmica durante a graduação, principalmente a todos os moradores e ex-moradores da república Põe na Mão de Deus que me acompanharam nestes 4 anos.

SUMÁRIO

1.	Introdução	5
2.	Metodologia	6
2.1.	Critérios da coleta de dados	6
2.2.	Poliadenilação alternativa	7
2.3.	Predição de sítios de ligação de miRNAs	7
2.4.	Sequência e posição dos MREs	8
3.	Resultados	10
3.1.	Influência da poliadenilação alternativa na regulação gênica	10
3.2.	Perfil dos miRNAs e suas interações com o gene <i>SPARC</i>	11
3.3.	Conservação e distribuição relativa dos MREs	14
4.	Discussão	16
5.	Conclusão	17
6.	Referências Bibliográficas	18

RESUMO

O gene *SPARC* codifica uma proteína da matriz extracelular essencial para a osteogênese, mas seus mecanismos regulatórios no contexto de regeneração óssea divergente entre vertebrados permanece pouco clara, sendo a regulação pós-transcricional via microRNAs (miRNAs) que se ligam à região 3'UTR uma das principais teorias para o mesmo. Este estudo buscou investigar como a evolução da 3'UTR do gene *SPARC* e sua regulação por miRNAs se correlacionam com a capacidade regenerativa através de uma abordagem *in silico*, envolvendo sequências do gene de 7 animais modelo para estudos evolutivos e regenerativos, identificando possíveis eventos de poliadenilação alternativa (APA) e predição de miRNAs alvo e sítios alvo de elementos de resposta a miRNAs (MREs). Foi possível observar ao final que há ausência de eventos de encurtamento via APA dos transcritos, além de identificação de um total de 881 interações miRNA:3'UTR, compartilhados entre 289 miRNAs distintos, na qual embora não haja diferença significativa na força de ligação das interações entre as espécies capazes e não capazes de regeneração, houve uma elevação na densidade, conservação e localização apical dos MREs em espécies não regenerativas. Em suma, este estudo demonstrou como a evolução das interações miRNA:3'UTR impactaram na capacidade regenerativa epimórfica dos vertebrados.

Palavras-chave: microRNAs; genética evolucionária; regeneração óssea; bioinformática; biologia computacional

1. INTRODUÇÃO

A regeneração é o processo de reconstrução tecidual após lesão ou perda de parte do corpo, ela ocorre em diferentes níveis, produzindo estruturas de similaridade variável ao órgão original (Bely; Nyberg, 2010; Elchaninov; Sukhikh; Fatkhudinov, 2021). Ela pode ser dividida entre morfolática, compreendendo a remodelagem de tecido e células já presentes no local da lesão, enquanto a epimórfica é representada pela formação de um blastema – uma massa de células desdiferenciadas que a partir da migração e proliferação celular do local lesionado, leva a formação do órgão faltante.

A epimorfose, o processo de regeneração epimórfica, é presente em múltiplos animais de diferentes táxons como o peixe *Oryzias latipes*, capaz de recuperar nadadeiras mesmo na fase adulta (Katogi et al., 2004); anfíbios como *Xenopus tropicalis*, que se regeneram apenas na fase larval (Brockes, 1997; Beck; Izpisúa; Christen, 2009); lagartos como *Anolis carolinensis*, que mantêm reconstrução da cauda (Alibardi, 2010); e mamíferos como o camundongo que forma estruturas similares a um blastema após amputação da falange terminal em diferentes estágios de vida (Seifert; Muneoka, 2018). Apesar da presença ubíqua e processos moleculares e morfológicos semelhantes durante a regeneração dentro de salamandras, répteis e peixes, é notável a grande amplitude da capacidade regenerativa entre os vertebrados (Darnet et al., 2019).

Existem diferentes teorias sobre a origem das células do blastema (Daponte, Tylzanowski e Forlino, 2021), mas estudos em animais-modelo, como nas nadadeiras caudais de zebrafish, têm identificado mecanismos moleculares centrais para a formação do blastema, envolvendo a desdiferenciação, proliferação e migração de osteoblastos maduros, posteriormente havendo a morfogênese e calcificação óssea do colágeno, processo induzido pela expressão do gene *SPARC* (que codifica a proteína secretada ácida e rica em cisteína) por células progenitoras ósseas e osteoblastos maduros, sendo fundamental para formação do blastema e sua função (Valenti et al., 2020). O mesmo apresenta elevada conservação da sequência de aminoácidos e sintenia entre os vertebrados (Rottlant et al., 2008), o que portanto, faz com que a divergência na capacidade regenerativa possivelmente resida em regiões não-codificantes que controlam sua expressão.

Um dos principais mecanismos para regulação pós-transcricional ocorre na região 3' não traduzida (3'UTR) dos mRNAs, através de eventos de poliadenilação alternativa (APA). A APA permite a geração de isoformas de mRNA com diferentes comprimentos de 3'UTR a

partir de um único gene. O encurtamento da 3'UTR via APA é frequentemente utilizado por células proliferativas para eliminar sítios de repressão, aumentando a estabilidade e tradução do mRNA, enquanto o alongamento tende a aumentar a regulação negativa (Mayr, 2016; Mittleman et al., 2020).

Perfis de expressão gênica ao longo do processo regenerativo de um dado tecido sugerem uma regulação transcricional estágio- e tecido-específica, orquestrada por microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes de cerca de 22 nucleotídeos, que têm como alvo as regiões não traduzidas 3' (3'UTR) de seus alvos de mRNA. São considerados altamente conservados na filogenia animal e possuem grande importância como reguladores finos da expressão gênica durante a regeneração, sua expressão variada sugere papel importante em diversos estágios do processo de regeneração (Yin et al., 2008). Além disso o comprimento da 3'UTR está fortemente correlacionado com o tamanho do genoma entre as espécies e com a complexidade metabólica dos organismos (Chen; Wang, 2012; Mayr, 2017), portanto, mudanças no tamanho dessa região podem ter influência considerável no fenótipo dos organismos, como a regeneração entre diferentes espécies.

Nesse contexto, compreender a evolução dos mecanismos moleculares dos miRNAs relacionados à 3'UTR do *SPARC* pode elucidar a evolução do programa genético de regeneração epimórfica entre diferentes linhagens de vertebrados, levando a novas possibilidades em campos emergentes, como a medicina regenerativa e a bioengenharia de tecidos.

2. METODOLOGIA

2.1 Critérios da coleta de dados

Primeiramente, foram selecionadas as sequências ortólogas do gene *SPARC* a partir das ferramentas Genomicus v106.01 (Nguyen, 2020) e InParanoidDB 9 (Sonnhammer; Östlund, 2014) de 7 animais modelo para estudos evolutivos e regenerativos, todas com capacidades regenerativas distintas, compreendendo o *Danio rerio*; *Latimeria chalumnae*; *Xenopus tropicalis*; *Anolis carolinensis*; *Gallus gallus*; *Mus musculus*; e *Homo sapiens* (Stern, 2005; Alibardi, 2009; Beck; Izpisua; Christen, 2009; Amemiya et al., 2013; Nogueira et al, 2016; Seifert; Muneoka, 2018; Marques; Lupi; Mercader, 2019). Os critérios utilizados foram semelhança de 1-para-1 para o Genomicus e mínimo de 0.950 para o Inparalog score. Os ortólogos selecionados tiveram suas sequências completas de DNA e mRNA funcionais, bem como as regiões codificantes e 3'UTR baixadas separadamente dos bancos de dados UCSC e NCBI GenBank em formato Fasta, BED12 e GFF. As sequências e anotações gênicas foram

extraídas das respectivas montagens de genoma de referência, conforme detalhado na **Tabela 1**.

As espécies foram agrupadas com base em sua capacidade regenerativa, com um Grupo Regenerativo (R) composto por *D. rerio*; *L. chalumnae*; *X. tropicalis*; e *A. carolinensis* e Grupo Não Regenerativo (N) composto por *G. gallus*; *M. musculus*; e *H. sapiens*. Embora a capacidade regenerativa do celacanto (*L. chalumnae*) seja pouco documentada e considerada limitada, ele foi incluído no grupo R devido sua representação filogenética da linhagem Sarcopterygii ancestral.

2.2 Poliadenilação alternativa

Inicialmente para determinar o impacto de diferentes isoformas da 3'UTR dos mRNAs em contextos regenerativos diferentes, foi realizada uma predição de potenciais sítios de poliadenilação alternativa (APAs), utilizando a ferramenta DaPars2 (Li et al., 2021; Feng et al., 2018), que infere o uso de APA por comparar amostras de RNA-seq. Os dados foram coletados do banco de dados NCBI SRA (Sequence Read Archive) em formato Fastq e convertidos em formato BAM e BAI pela biblioteca SRA-tools, posteriormente se utilizando a biblioteca STAR 2.7.11b (Dobin, et al., 2012) para indexação e alinhamento das sequências de RNA-seq para um genoma de referência atualizado (**Tabela 1**), os procedimentos utilizados foram disponibilizados pelo autor (<https://github.com/alexdobin/STAR>). Apenas sequências “paired end” de amostras de osso/cartilagem/blastema homólogos das formas adultas e de desenvolvimento dos animais de estudo foram coletadas (**Tabela 2**), totalizando um conjunto de 12 isoformas de mRNA do gene *SPARC*, correspondentes aos transcritos validados e funcionais obtidos dos bancos de dados supracitados. Para o software DaPars2, utilizou-se três diferentes thresholds (1; 5; e 10), para predição de potenciais sítios de maior e menor confiabilidade, considerando apenas valores significativos de $\Delta PDUI \geq 0.3$ (Índice de Porcentagem de Uso de Sítios de PolyA Distais) e valor de $p \leq 0.05$.

2.3 Predição de Sítios de Ligação de miRNAs

Para avaliar o papel e evolução dos miRNAs na regeneração, sequências maduras do miRNoma bruto para as presentes espécies do estudo foram baixadas dos bancos de dados MirGeneDB 3.0 (Clarke et al., 2024) e MiRDB 6.0 (Chen; Wang, 2020). Ao invés de selecionar previamente miRNAs com interações já confirmadas pela literatura, optou-se por utilizar o conjunto completo de sequências maduras como *input* para a predição *de novo*, permitindo que os algoritmos de predição, detalhados a seguir, identificassem adequadamente as potenciais interações miRNA:3'UTR.

Dada a ausência de anotações gênicas experimentalmente validadas para algumas espécies do estudo, em razão de escassez de informações sobre interações miRNA:*SPARC* e limitações de outros modelos de predição de alvos de miRNA, optou-se por utilizar a ferramenta miRanda 3.3a (Enright et al., 2003; Peterson et al., 2014), em virtude de sua capacidade de inferir potenciais sítios de ligação de miRNA em quaisquer organismos através da complementaridade de sequência e na estabilidade termodinâmica das interação por energia livre de Gibbs (ΔG). Para predição mais acurada, foi utilizado threshold de 140 para a métrica “binding score” e -10 kCal/mol para a de “energia livre” em um conjunto total de 12 isoformas de mRNA do gene *SPARC*. correspondentes aos transcritos validados e funcionais obtidos dos bancos de dados supracitados.

Os dados obtidos pelo miRanda 3.3a foram padronizados e comparados através de diagramas de Venn, gerados pelo software Van de Peer Lab (<https://www.vandeppeerlab.org/>) para melhor visualização de miRNAs em comum entre os animais modelo e posteriormente avaliar a correlação entre os valores de *score* e energia livre de ligação com a capacidade regenerativa dos mesmos, além de avaliar sua conservação entre valores intra-grupais e entre grupos, utilizando do agrupamento entre R e N.

2.4 Conservação e distribuição dos MREs

Para investigar a história evolutiva dos MREs da 3'UTR do gene *SPARC*, foi realizado alinhamento das sequências dos mesmos de acordo com a 3'UTR do maior transcrito do gene *SPARC* de cada animal, realizado através do software MAFFT v7 (Katoh; Rozewicki; Yamada, 2017; Kuraku et al., 2013), utilizando o argumento L-INS-i (Recomendado para sequências menores, que requerem maior precisão). A partir das sequências alinhadas foi atribuído um valor de Entropia de Shannon para cada MRE conservado, método utilizado para mensurar a variabilidade de alinhamentos múltiplos sem viés de composição, na qual valores mais próximos a zero representam maior conservação (Schneider; Stephens, 1990; Valdar, 2002). Inicialmente foi avaliado se houve variação do número e tipo de conservação de MREs por espécie, posteriormente realizando o Teste de Mann-Whitney para verificar diferenças na qualidade da conservação entre grupos R e N.

Em seguida foi avaliado se houve viés evolutivo quanto a localização dos MREs ao longo da 3'UTR, na qual foi atribuído para cada MRE ao longo da 3'UTR do maior transcrito de cada espécie, devido o diferente comprimento de cada 3'UTR entre as espécies, o tamanho das 3'UTRs de cada espécie foi padronizado de 0 (Início da 3'UTR) e 1 (Fim da 3'UTR), a partir da distribuição obtida, foi comparada a diferença entre a distribuição entre os grupos pelo teste de Mann-Whitney U e o teste de Kolmogorov-Smirnov, adicionalmente realizando

o teste de correlação de Spearman para averiguar a correlacionar a posição média dos sítios com a capacidade regenerativa das espécies.

Todo o processamento de dados foi realizado em espaço do google colab, devido seu fácil acesso e alta capacidade de processamento para grandes volumes de dados via servidores online, utilizando principalmente as bibliotecas gratuitas Pandas, NumPy e Statsmodels em linguagem Python. Posteriormente, houve a montagem e visualização de gráficos através das bibliotecas Matplotlib, Seaborn e Circos.

Tabela 1. Genoma utilizado como referência e sua versão respectiva nas nomenclaturas do NCBI e UCSC.

Espécie	ID Genoma NCBI	ID Genoma UCSC
<i>Homo sapiens</i>	GCF_000001405.40	GRCh38/hg38
<i>Mus musculus</i>	GCF_000001635.27	GRCm39/mm39
<i>Gallus gallus</i>	GCF_016699485.2	GRCg6a/galGal6
<i>Anolis carolinensis</i>	GCF_035594765.1	AnoCar2.0/anoCar2
<i>Xenopus tropicalis</i>	GCF_000004195.4	UCB_Xtro_10.0/xenTro10
<i>Latimeria chalumnae</i>	GCF_037176945.1	latCha1
<i>Danio rerio</i>	GCF_000002035.6	GRCz11/danRer11

Tabela 2. Tipo e número de amostras selecionadas pelo SRA NCBI, de acordo com os critérios utilizados que expressam o gene *SPARC* em conjunto com o ID do projeto de pesquisa na qual as mesmas foram coletadas.

Espécie	Número do projeto	Número de amostras	Tecido das amostras
<i>Homo sapiens</i>	PRJNA1200288	14	Medula óssea de adulto
<i>Mus musculus</i>	PRJNA577830	12	Células dos membros axiais com 12.5 semanas
<i>Gallus gallus</i>	PRJEB6782	24	Metade do osso da tíbia de galinhas legorne com 70 semanas de vida

<i>Anolis carolinensis</i>	PRJNA545124	18	Ferida sem cicatriz de cauda se curando
<i>Xenopus tropicalis</i>	PRJNA1021677	8	Células mesenquimais e osteoblastos da calvária lesionada de girinos
<i>Latimeria chalumnae</i>	PRJDB1984	10	Barbatana peitoral e caudal
<i>Danio rerio</i>	PRJNA358533	12	Regiões proximais, mediais e distais da barbatana caudal

3. RESULTADOS

3.1. Influência da Poliadenilação Alternativa na regulação gênica

A investigação do gene SPARC pelo DaPars2, utilizando os 3 thresholds demonstrou que, para a maioria das 98 amostras de RNA-seq analisadas (**Tabela 2**), houve ausência quase total de eventos APA detectáveis, representado pelos valores Δ PDUI válidos baixos ou nulos. Como detalhado na **Tabela 3**, para a vasta maioria das espécies o algoritmo não identificou múltiplos sítios de poliadenilação para calcular o índice PDUI. Apenas três grupos amostrais isolados (em *M. musculus*, *X. tropicalis* e *D. rerio*) apresentaram valores válidos, porém com uma variação média (Δ PDUI) extremamente baixa (entre 0,05 e 0,13), inferior aos limiares geralmente considerados biologicamente relevantes (Δ PDUI > 0,3).

Tabela 3. Taxa de variação dos PDUIs encontrados pelo DaPars2, a maioria das amostras demonstrou variação baixa ou nula para todos os thresholds utilizados.

Espécie	Tamanho médio das 3'UTR (nt)	Transcritos com PDUIs válidos	Média da variação	Observação
<i>Homo sapiens</i>	2475	0	0	Inexistente
<i>Mus musculus</i>	1426	1	0,13	Baixa variação
<i>Gallus gallus</i>	1155	0	0	Inexistente
<i>Anolis carolinensis</i>	682	0	0	Inexistente

<i>Xenopus tropicalis</i>	774	1	0,11	Baixa variação
<i>Latimeria chalumnae</i>	1226	0	0	Inexistente
<i>Danio rerio</i>	745	1	0,05	Baixa variação

3.2. Perfil dos miRNAs e suas interações com o gene *SPARC*

A partir da biblioteca miRanda 3.3a, foi identificado um total de 881 interações miRNA:3'UTR, distribuídos por um total de 12 transcritos e 289 miRNAs, dos quais 253 são exclusivos à espécie encontrada, 59 presentes apenas em espécies regenerativas (R), 223 presentes apenas em não regenerativas (N) e 28 presentes em espécies tanto do grupo R quanto do N (**Tabela 4**). A exclusividade e compartilhamento dos miRNAs está representada na **Figura 2 e 3**.

Tabela 4. Número de miRNAs e interações encontradas para cada homólogo do gene *SPARC*.

Homólogo do Runx2	Isoformas curadas	Nº Total de interações	Total de miRNAs	Total de miRNAs exclusivos
<i>Homo sapiens</i>	3	524	175	135
<i>Mus musculus</i>	2	136	68	39
<i>Gallus gallus</i>	1	52	52	26
<i>Anolis carolinensis</i>	1	16	16	9
<i>Xenopus tropicalis</i>	1	17	14	7
<i>Latimeria chalumnae</i>	2	44	22	9
<i>Danio rerio</i>	2	92	46	28

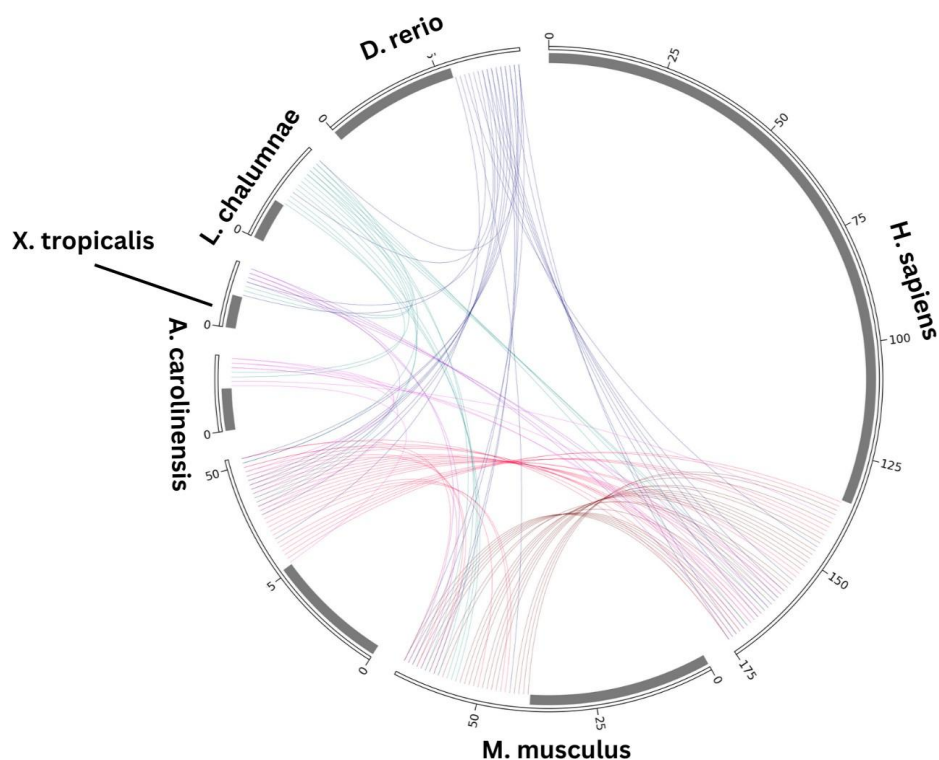


Figura 2. Circos plot de todos os miRNAs compartilhados entre cada espécie, miRNAs exclusivos daquela espécie estão em cinza.

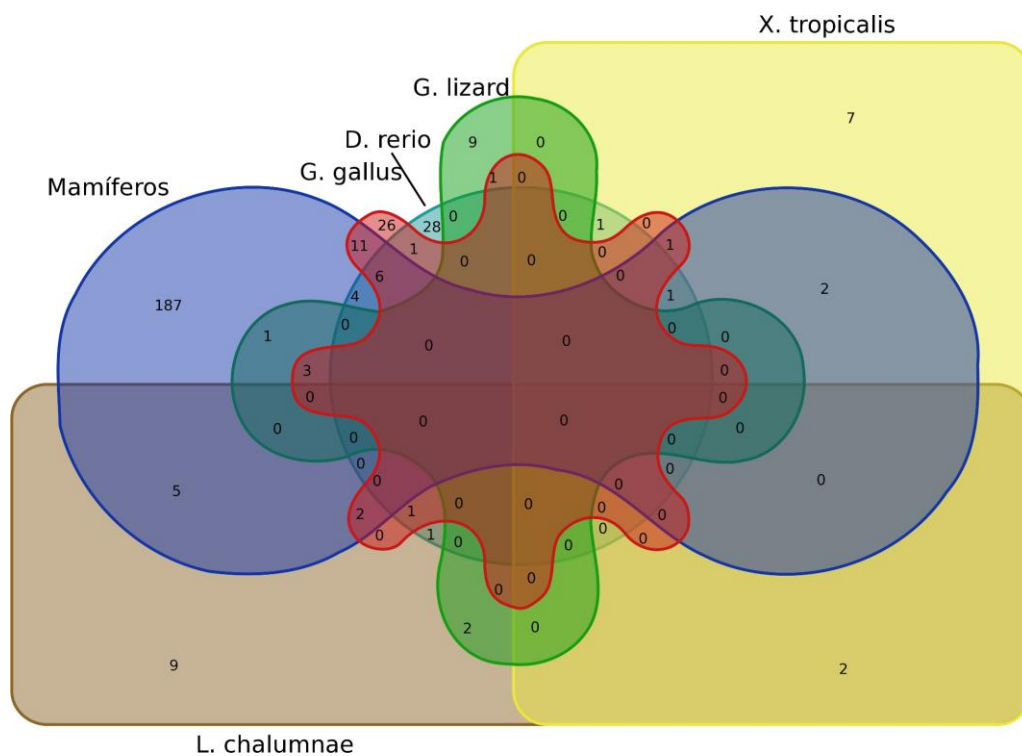
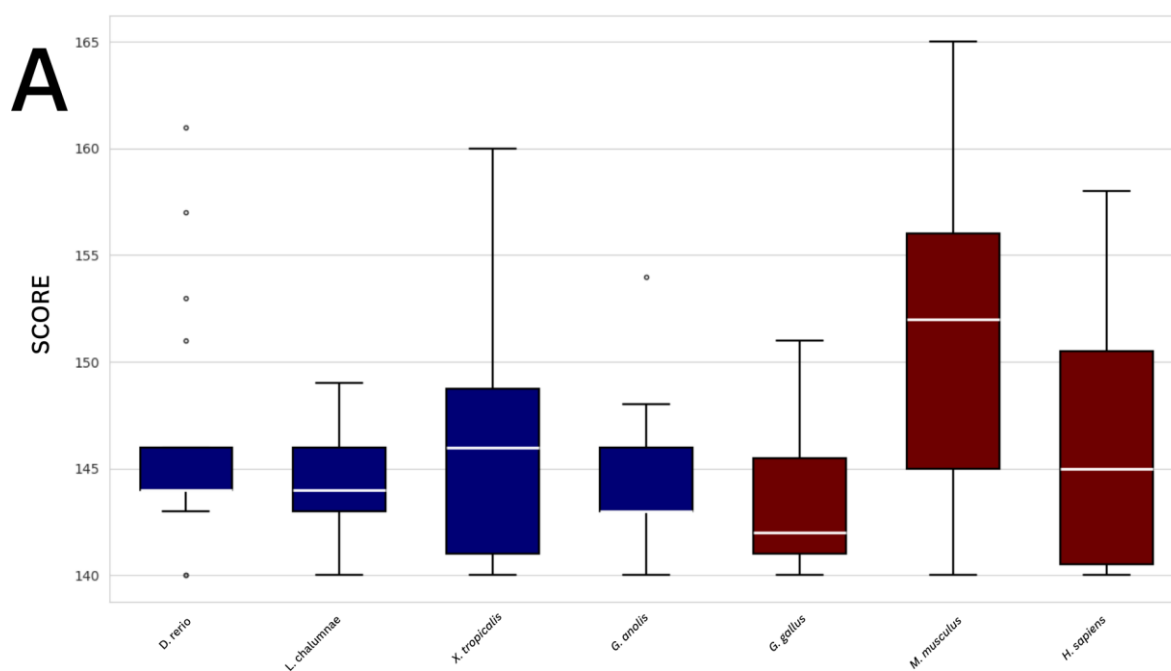


Figura 3. Gráfico de Venn representando a totalidade de miRNAs exclusivos e compartilhados entre 6 grupos, representando diferentes táxons dos vertebrados: Mamíferos (*Homo sapiens* e *Mus musculus*); *G. gallus*; *A. carolinensis*; *X. tropicalis*; *L. chalumnae*; e *D. rerio*.

Com base nos valores de score e energia livre de Gibbs (ΔG) obtidos, a comparação pelo teste de Mann-Whitney U entre os grupos Regenerativo (R) e Não-Regenerativo (N), não revelou diferenças estatisticamente significativas para as distribuições de *score* ($p = 0,848$) ou de energia ($p = 0,978$), indicando que os parâmetros de interação miRNA:3'UTR não diferem entre os dois grupos analisados. Entretanto, ao avaliar a divergência interna das espécies de cada grupo pelo teste de Kruskal-Wallis, o grupo R apresentou homogeneidade nas distribuições tanto para *score* ($p = 0,696$) quanto para energia ($p = 0,672$). Por outro lado, o grupo N exibiu uma diferença estatisticamente significativa nos valores de *score* ($p < 0,00109$). A análise post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni para o *score* do grupo N revelou que essa diferença é causada pela espécie *H. sapiens*, que se divergiu significativamente de *G. gallus* ($p = 0,0007$) e *M. musculus* ($p = 0,027$), enquanto os dois respectivamente não possuíram diferença significativa entre si ($p = 0,639$). Para a energia no grupo N, foi observado uma considerável tendência à diferença ($p = 0,0502$), porém ainda estatisticamente não significativa (**Figura 4**).



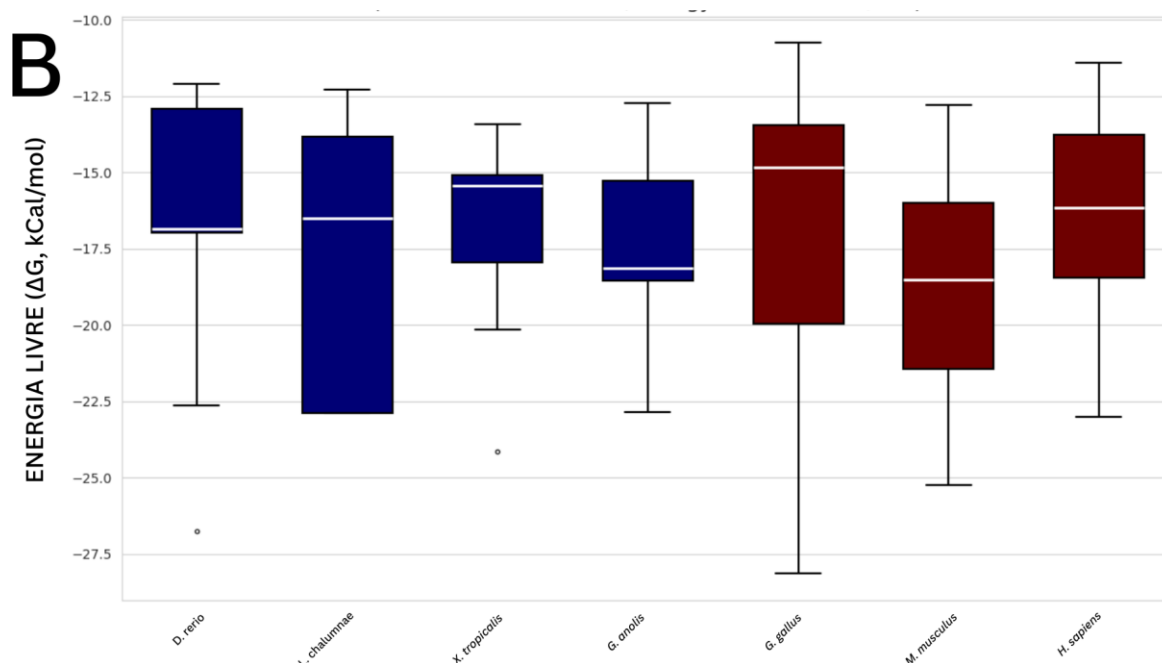


Figura 4. Box plot dos valores de *score* (A) e energia livre (B) para cada espécie, divididas entre os grupos R (Azul) e N (Vermelho). Os quais apresentam para o grupo N o *score* uma diferença estatística ($p < 0,00109$) e para a energia livre uma diferença quase estatisticamente significativa ($p = 0,0502$).

3.3. Conservação e posição relativa dos MREs

Os resultados da biblioteca miRanda revelaram também a localização e sequência dos MREs, sendo posteriormente alinhadas utilizando o software MAFFT e a entropia de shannon calculada para cada MRE conservado. Com isso obteve-se uma distribuição dos MREs predominante no grupo N ($n = 11$; $H = 0,044 \pm 0,072$) se comparadas às do grupo R ($n = 6$; $H = 0,139 \pm 0,115$) e àquelas encontradas em ambos os grupos ($n = 27$; $H = 0,135 \pm 0,154$). Além disso, a proporção de sítios com maior nível de conservação foi consideravelmente maior no grupo N (72,7%) se comparada aos 33,3% do grupo R e 48,15% do grupo misto (Figura 5).

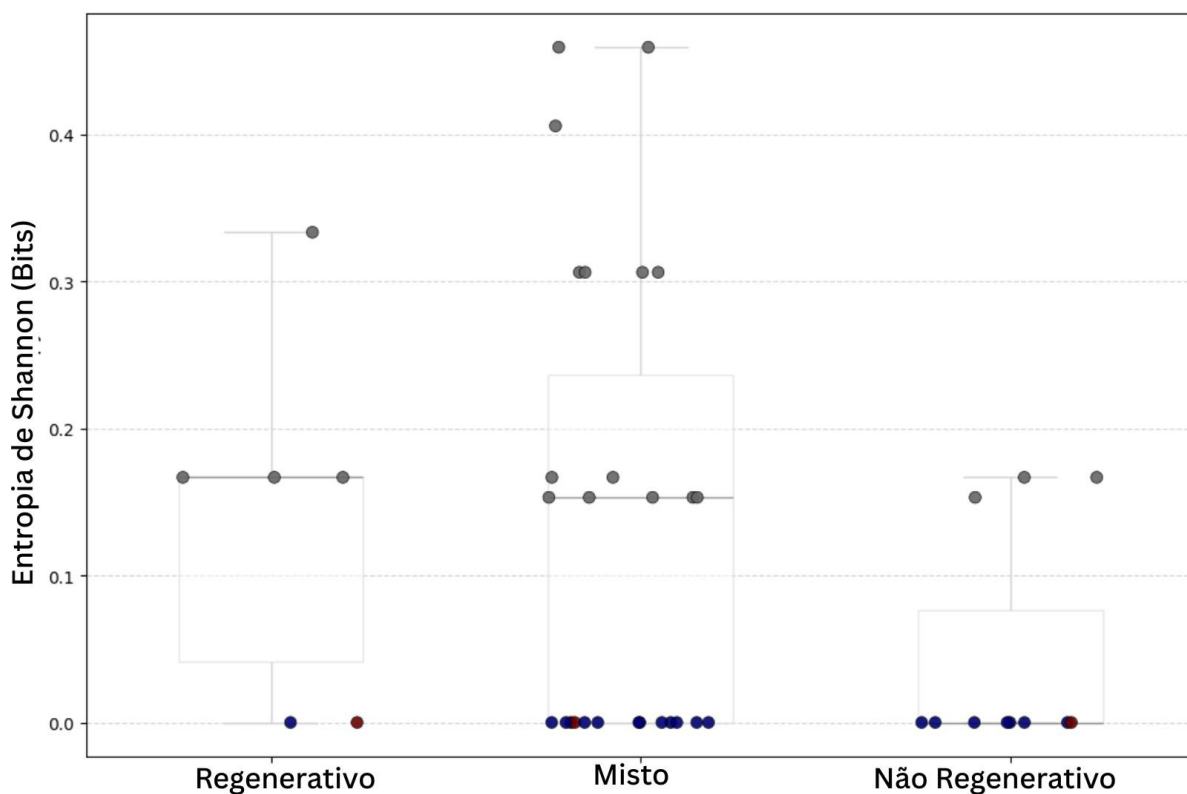


Figura 5. Dot plot da entropia de Shannon de todos os MREs conservados para cada grupo, os pontos foram organizados de acordo com o tipo de conservação encontrada na sequência dos MREs (Cinza = Conservação imperfeita; Vermelho = Sequência *seed* 6mer conservada; Azul = Sequência *seed* 7mer conservada).

Já a análise da posição relativa revelou uma tendência dos MREs do grupo N de estarem localizados na porção distal da 3'UTR ($Md = 0,710$; $\bar{x} = 0,686$) se comparada ao grupo R ($Md = 0,627$; $\bar{x} = 0,539$), confirmada pelo teste de Mann-Whitney U ($p = 0,0021$) e teste de Kolmogorov-Smirnov ($p = 0,0009$) que demonstrou distribuições dos sítios distintas entre si. Por fim a correlação de Spearman confirmou uma tendência do deslocamento médio dos sítios na 3'UTR conforme a perda da capacidade regenerativa ($\rho = 0,785$, $p = 0,0208$).

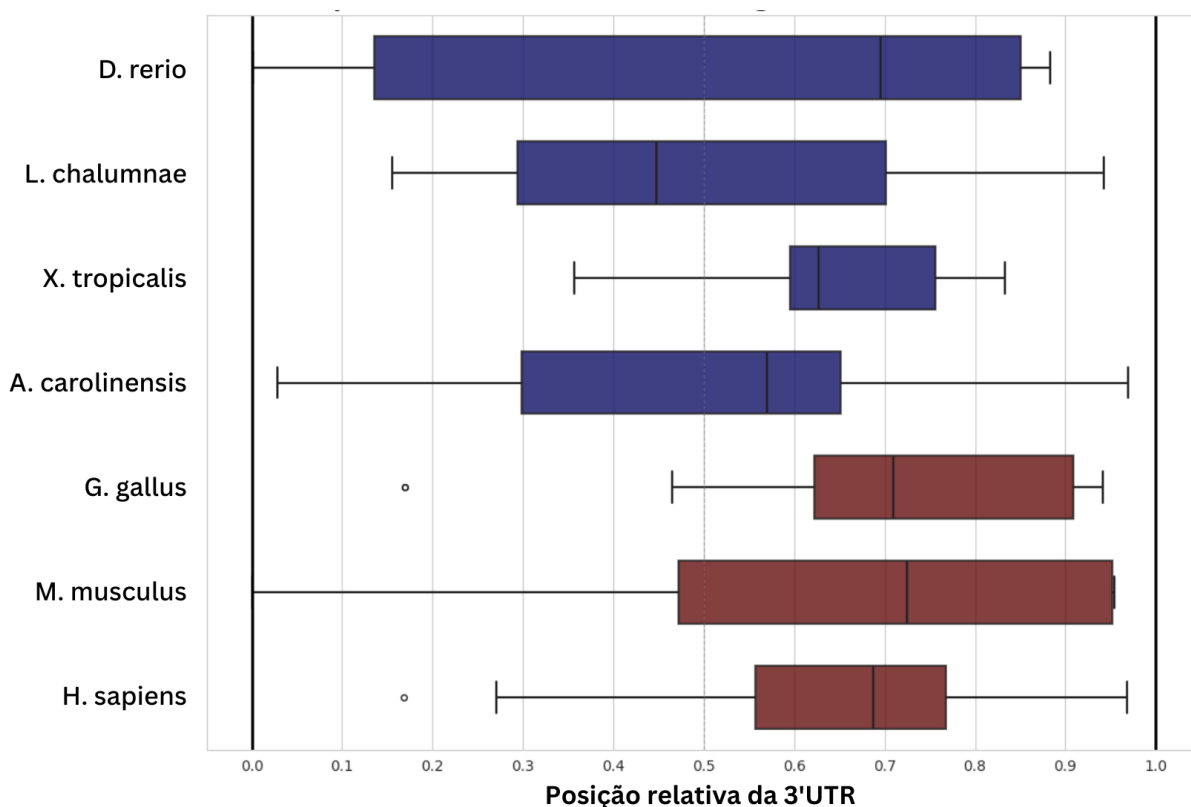


Figura 6. Box plot da posição relativa dos MREs conservados de cada espécie, a posição relativa dos MREs foi padronizada de 0,0 (Início da 3'UTR) para 1,0 (Fim da 3'UTR).

4. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, o presente estudo demonstra que o gene *SPARC* alterou com o passar do tempo certas características, bem como suas interações com miRNAs, que ultimamente impactaram em seu funcionamento e regulação quanto ao processo da regeneração epimórfica em diferentes linhagens animais.

As análises realizadas pelo DaPars2 apontam para primeiramente um manutenção rígida da estrutura da 3'UTR e ausência de eventos de APA no gene *SPARC* na grande maioria dos casos, isto é devido a tendência de genes estruturais e de manutenção (*housekeeping genes*) possuírem menor uso de 3'UTRs variáveis, consequentemente se tornando maiores alvos de regulação por miRNAs pelo acúmulo de sítios de repressão (Mayr, 2017).

Apesar da comparação dos valores de *score* e energia livre de Gibbs não terem demonstrado diferenças significativas entre os grupos, o que revela que não houve uma diferenciação da afinidade nem complementaridade das interações miRNA:3'UTR durante o

processo de perda da capacidade regenerativa. Já os resultados divergentes dos mesmos valores internamente para o grupo de espécies não regenerativas, se deu principalmente pelo perfil do *H. sapiens* ser diferente das outras duas espécies do grupo (*M. musculus* e *G. gallus*), portanto este fato se deu por uma menor pressão evolutiva para manter as forças das interações similares do ser humano, mas não por uma divergência da capacidade regenerativa.

Os dados obtidos quanto à análise da conservação dos MREs demonstram uma grande tendência da formação e manutenção das sequências dos mesmos conforme a perda da capacidade regenerativa, além de uma grande persistência das sequências dos sítios conforme a perda da capacidade regenerativa (**Figura 4**).

Além do maior número e manutenção dos sítios, a posição relativa quanto à 3'UTR dos mesmos (**Figura 5**) confirmou que, em espécies não regenerativas existe a maior tendência de concentração dos sítios em regiões mais distais da 3'UTR, em contraste com uma localização mais central nas espécies regenerativas, que está diretamente relacionado a menor efetividade e conservação das interações (Grimson et al., 2007). Portanto, espécies que perderam sua capacidade de regeneração possuíam tanto mais sítios de interação com miRNAs quanto um posicionamento favorável a maior repressão do mRNA.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos do presente estudo, foi possível observar fortes evidências que a perda da capacidade regenerativa relacionada ao gene *SPARC*, se deu principalmente pelo aumento significativo na densidade e na conservação de sítios de ligação de miRNAs na linhagem não-regenerativa, além de uma tendência dos MREs de se concentrar na porção distal da 3'UTR. Entretanto, vale ressaltar que devido à natureza do projeto ser essencialmente *in silico*, houveram limitações quanto à metodologia e disponibilidade de bancos de dados públicos para algumas espécies menos estudadas do projeto.

Em suma, é necessário que novos estudos acerca da validação *in vivo* (ex: edição gênica via CRISPR-Cas9) sejam realizados para averiguar se a deleção ou bloqueio dos sítios na porção final da 3'UTR conservados em animais modelo pode ser capaz de induzir o potencial regenerativo ou alterar disposição das estruturas da matriz extracelular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALIBARDI, L. Ultrastructural features of the process of wound healing after tail and limb amputation in lizard. **Acta Zoologica**, jul. 2009.
- AMEMIYA, C. T. et al. The African coelacanth genome provides insights into tetrapod evolution. **Nature**, v. 496, n. 7445, p. 311–316, 18 abr. 2013.
- BECK, C. W.; IZPISÚA B., J. C.; CHRISTEN, B. Beyond early development: *Xenopus* as an emerging model for the study of regenerative mechanisms. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 6, p. 1226–1248, jun. 2009.
- BELY, A. E.; NYBERG, K. G. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. **Trends in ecology & evolution**, v. 25, n. 3, p. 161–70, 2010.
- BROCKES, J. P. Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 81–87, 4 abr. 1997.
- CHEN, Y.; WANG, X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D127–D131, 8 jan. 2020.
- CLARKE, A. et al. MirGeneDB 3.0: improved taxonomic sampling, uniform nomenclature of novel conserved microRNA families and updated covariance models. **Nucleic Acids Research**, v. 53, n. D1, p. D116–D128, 30 nov. 2024.
- DAPONTE, V.; TYLZANOWSKI, P.; FORLINO, A. Appendage Regeneration in Vertebrates: What Makes This Possible? **Cells**, v. 10, n. 2, p. 242, 27 jan. 2021
- DARNET, S. et al. Deep evolutionary origin of limb and fin regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 30, p. 15106–15115, 3 jul. 2019.
- DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 25 out. 2012.
- ELCHANINOV, A.; SUKHIKH, G.; FATKHUDINOV, T. Evolution of Regeneration in Animals: A Tangled Story. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, 5 mar. 2021.
- ENRIGHT, A. J. et al. **Genome Biology**, v. 5, n. 1, p. R1, 2003.
- FENG, X. et al. TC3A: The Cancer 3' UTR Atlas. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1027–D1030, 4 jan. 2018.
- GRIMSON, A. et al. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. **Molecular Cell**, v. 27, n. 1, p. 91–105, jul. 2007.
- HOFFMAN, Y. et al. 3'UTR Shortening Potentiates MicroRNA-Based Repression of Pro-differentiation Genes in Proliferating Human Cells. **PLOS Genetics**, v. 12, n. 2, p. e1005879, 23 fev. 2016.

- 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.
- KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, 6 set. 2017.
- KURAKU, S. et al. aLeaves facilitates on-demand exploration of metazoan gene family trees on MAFFT sequence alignment server with enhanced interactivity. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W22–W28, 15 maio 2013.
- LI, L. et al. An atlas of alternative polyadenylation quantitative trait loci contributing to complex trait and disease heritability. **Nature Genetics**, v. 53, n. 7, p. 994–1005, 1 jul. 2021.
- MARQUES, I. J.; LUPI, E.; MERCADER, N. Model systems for regeneration: zebrafish. **Development**, v. 146, n. 18, p. dev167692, 15 set. 2019
- MAYR, C. Evolution and Biological Roles of Alternative 3'UTRs. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 227–237, mar. 2016.
- MAYR, C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. **Annual Review of Genetics**, v. 51, n. 1, p. 171–194, 27 nov. 2017
- MITTLEMAN, B. E. et al. Alternative polyadenylation mediates genetic regulation of gene expression. **eLife**, v. 9, 25 jun. 2020.
- NGUYEN, N. T. T. et al. Genomicus in 2022: comparative tools for thousands of genomes and reconstructed ancestors. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D1025–D1031, 18 nov. 2021.
- NOGUEIRA, A. F. et al. Tetrapod limb and sarcopterygian fin regeneration share a core genetic programme. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2 nov. 2016.
- PETERSON, S. M. et al. Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014.
- ROTLLANT, J.; LIU, D.; YAN, Y. L.; POSTLETHWAIT, J. H.; WESTERFIELD, M.; DU, S. J. Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear. **Matrix Biology**, v. 27, n. 6, p. 561-572, jul. 2008.
- SCHNEIDER, T. D.; STEPHENS, R. MICHAEL. Sequence logos: a new way to display consensus sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 20, p. 6097–6100, 1990.

- SEIFERT, A. W.; MUNEOKA, K. The blastema and epimorphic regeneration in mammals. **Developmental Biology**, v. 433, n. 2, p. 190–199, jan. 2018.
- SONNHAMMER, E. L. L.; ÖSTLUND, G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D234–D239, 27 nov. 2014.
- STAVAST, C.; ERKELAND, S. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. **Cells**, v. 8, n. 11, p. 1465, 19 nov. 2019.
- STERN, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, jan. 2005.
- VALDAR, W. S. J. Scoring residue conservation. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 48, n. 2, p. 227–241, 6 jun. 2002.
- VALENTI, M. T.; MARCHETTO, G.; MOTTES, M.; DALLE CARBONARE, L. Zebrafish: A Suitable Tool for the Study of Cell Signaling in Bone. **Cells**, v. 9, n. 8, p. 1911, 17 ago. 2020.
- YIN, V. P. et al. Fgf-dependent depletion of microRNA-133 promotes appendage regeneration in zebrafish. **Genes & Development**, v. 22, n. 6, p. 728–733, 15 mar. 2008.