

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO
Curso de Biomedicina

LUCAS RODRIGUES DE MELLO

**BIOGÊNESE DOS MICRORNAS E SEU PAPEL NO CONTROLE DA
EXPRESSÃO GÊNICA**

São Paulo

2016

LUCAS RODRIGUES DE MELLO

**BIOGÊNESE DOS MICRORNAS E SEU PAPEL NO CONTROLE DA
EXPRESSÃO GÊNICA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de biomedicina do
Centro Universitário São Camilo, orientado
pela Prof^a. Dr^a. Luciana Pugliese, como
requisito parcial para obtenção do título
bacharel em biomedicina.

São Paulo

2016

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Mello, Lucas Rodrigues de
Biogenese dos microRNAs e seu papel no controle da expressão
genica / Lucas Rodrigues de Mello. -- São Paulo : Centro Universitário
São Camilo, 2016.
46 p.

Orientação de Luciana Pugliese da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro
Universitário São Camilo, 2016.

1. Biogênese 2. Biologia molecular 3. Expressão gênica 4. MicroRNAs
I. Silva, Luciana Pugliese da II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 574.8

LUCAS RODRIGUES DE MELLO

**BIOGÊNESE DOS MICRORNAS E SEU PAPEL NO CONTROLE DA
EXPRESSÃO GÊNICA**

São Paulo, 30 de Maio de 2016

Professor Orientador (Dr^a. Luciana Pugliese da Silva)

Professor Examinador (Dr^a. Sandra Castro Poppe)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a meus pais, por terem me dado uma boa base e todo o incentivo necessário para meu ingresso na vida acadêmica.

Gostaria de agradecer a meus professores; em especial as professoras Samara Urban e Ana Yara pelos desafios durante o curso, Michelangelo Juvenale por estar sempre disposto a conversar e discutir com os alunos sobre os mais variados temas, Juliana Bianchi por ser uma ótima coordenadora de estágio, e a minha querida orientadora, Luciana Pugliese, por ter tido a paciência e disponibilidade para me orientar.

E também a meus amigos e colegas de sala, Tiago Obeid, Renata Yamada, Wendel Santos, Barbara Guimarães, Barbara Behr, Barbara Lechado, Natalia Baraldi, Alessandra Mayumi, Daniela Flosi e Camila Bueno. Meus amigos que apesar de não terem estudado comigo, certamente marcaram minha vida; Vinícios Gomes, minha cara senpai, Barbara Hamaguchi, a eterna discípula de Samara, Marina, e a todos os ilustres integrantes do grupo “Os caras da SC”.

Também gostaria de agradecer ao Dr. Diego Mazzotti e a todos os integrantes do laboratório molecular core, além é claro de seus alunos. Também a Dr^a Lia Bitencourt e a Dr^a Fabíola Galhardo por me acolherem em seu laboratório.

MELLO, Lucas Rodrigues de. Biogênese dos microRNAs e seu papel no controle da expressão gênica. 2016. 44 f. TCC (Graduação) - Curso de Biomedicina, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

Em 1993, foi descoberto o primeiro microRNA (miRNA), Lin4, em nematódeos *Caenorhabditis elegans*. Isso revolucionou o campo da biologia molecular ao apresentar um modelo de repressão pós-transcricional, em que os RNAs mensageiros teriam sua tradução inibida por estes pequenos RNAs endógenos na maioria dos organismos superiores (plantas, fungos e animais). Desde então, os mecanismos pelos quais os miRNAs atuam são estudados, hoje estima-se que um terço de todos os genes humanos tenham sua expressão controlada por miRNAs. Além disso, foram descobertos novos mecanismos e redes de interações envolvendo estes pequenos RNAs, desde a capacidade que estes têm de controlar a própria expressão por mecanismos de feedback negativo, até o fato de estarem sendo transportados através do meio extracelular dentro de vesículas, que ao serem internalizados pelas células próximas, propõem um modelo de regulação parácrino da expressão gênica. É consenso que os miRNAs irão mudar o modo como as ciências biológicas entendem o controle da expressão gênica, porém, por ser uma área recente da biologia molecular, existe pouco material didático disponível sobre estes mecanismos sendo principalmente encontrados em artigos científicos que não em língua portuguesa.

Palavras-chave: Biogênese. Biologia molecular. Expressão gênica. MicroRNAs.

MELLO, Lucas Rodrigues. Biogenesis of microRNAs and their role in the control of gene expression. 2016. 44 f. TCC (Graduation) - Biomedicine Course, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, 2016.

In 1993, it was discovered the first microRNA (miRNA), Lin4 in *Caenorhabditis elegans* nematodes. It revolutionized the field of molecular biology to present a model of post-transcriptional repression, in which the RNAs have their translation inhibited by these small endogenous RNAs in superior organisms (plants, fungi and animals). Since then, the mechanisms by which miRNAs act are studied thoroughly, today it is estimated that one third of all human genes have their expression controlled by miRNAs. Moreover, were discovered new mechanisms and networks of interactions involving these small RNAs, from the ability that they have to control their own expression by negative feedback mechanisms, to the fact that they are being transported through the extracellular medium in vesicles, which the be internalized by cells near propose a model of paracrine regulation of gene expression. The consensus is that miRNAs will change the way biological sciences understand the control of gene transcription, however, to be a new area of molecular biology, there is little educational material available on these mechanisms are primarily found in papers.

Key words: Biogenesis. Molecular biology. Gene expression. MicroRNAs.

Lista de Siglas

ADARS	<i>Adenosine deaminases that act on RNA</i>
AGO	Proteína Argonauta
DICER	Hormônio Folículo Estimulante
DGCR8	<i>DiGeorge critical region 8</i>
Da	Dalton
dsRBD	<i>Double-stranded RNA binding domain</i>
GW182	<i>Glycine-tryptophan protein of 182 kDa</i>
MiRNA	Micro-RNA
Pol-II	RNA polimerase II
Pol-III	RNA polimerase III
Pri-miRNA	<i>primary-microRNA</i>
RISC	<i>RNA inducing silence complex</i>
RNA _m	RNA mensageiro
RNPs	<i>RNA-Binding Protein</i>
SiRNAs	<i>Small interference RNA</i>
TARBP	<i>The human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein</i>
TRN6A	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6 A</i>
XPO5	Exportina-5

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de Siglas

1INTRODUÇÃO.....	09
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos gerais.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3 METODOLOGIA.....	12
4 DESENVOLVIMENTO.....	13
4.1 Localização dos genes de MiRNAs.....	13
4.2 Pri-miRNAs.....	15
4.3 Complexo microprocessador.....	16
4.3.1 Drosha e DCGR8.....	16
4.3.2 Proteínas acessórias ao complexo microprocessador.....	18
4.4 Vias não-canônicas de miRNAs.....	19
4.4.1 Mirtrons.....	19
4.4.2 SnoRNA atuando como microRNA.....	20
4.5 Exportação de miRNAs para o citoplasma.....	21
4.6 Complexo RISC.....	22
4.6.1 DICER.....	22
4.6.2 Proteínas TRBP.....	25
4.6.3 Argonauta.....	25
4.6.3.1 Subfamílias das proteínas argounatas.....	26
4.6.4 Formação do complexo RISC.....	26
4.6.5 Proteína GW182.....	28
4.6.6 Degradação de RNAs mensageiros.....	29
4.7 Transporte entre células por vesículas extracelulares.....	30
4.7.1 Funcionamento das microvesículas.....	30

4.8 MiRNA*	32
4.9 Regulação pós-transcricional dos miRNAs e outros fatores	33
4.9.1 Fatores de ativação e repressão pós-transcricional	33
4.9.2 Região <i>loop</i> terminal	34
4.9.3 Mecanismos de controle via <i>feedback</i> negativo	34
4.9.4 Regulação pós-transcricional da DGCR8	34
4.9.5 Edição de miRNAs	35
4.9.6 Manutenção de miRNAs	35
4.9.7 MiRNAs como biomarcadores	37

5 Conclusão

REFÊRENCIAS

1 INTRODUÇÃO

Em 1993 Lee et al. (1993) identificaram o primeiro miRNA (microRNA), Lin-4, proveniente do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, levantando novas possibilidades envolvendo os fatores pós-transcricionais na regulação gênica por meio da interferência de pequenos RNAs não-codificantes na tradução de proteínas. MiRNAs são pequenas sequências não-codificantes de RNA que geralmente apresentam 18 a 25 nucleotídeos de comprimento (BUENO; DE CASTRO; MALUMBRES, 2008). Estes pequenos RNAs tem um importante papel na repressão da transcrição gênica, uma vez que possuem a capacidade de reprimir a transcrição ou mesmo clivar sequências alvo de RNAs mensageiros (mRNA) no citoplasma da célula (BARTEL, 2009). Existem outras moléculas que podem impedir a tradução proteica que recebem o nome de *short-interference* RNA (siRNA) (ALBERTS et al., 2010). A principal diferença entre estas moléculas e os miRNAs é sua origem; siRNAs são de origem exógena, podendo ser provenientes de vírus (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009), transposons e material genético exógeno em geral (FILIPOWICZ, 2005; MALONE; HANNON, 2005). SiRNAs possuem a capacidade de se acoplar a sequências de RNA e promover sua clivagem (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Os miRNAs e siRNAs compartilham muitas semelhanças com relação a seus mecanismos. Primeiro, fitas duplas de RNA, seja ele endógeno como no caso de miRNAs ou exógeno no caso de siRNAs, são clivadas em pequenas sequências simples fita com cerca de 20 nucleotídeos pela DICER, uma proteína presente no citoplasma das células de eucariotos (TIJSTERMAN; PLASTERK, 2004). Em seguida é formado o complexo proteico RISC, que consiste em uma fita simples de RNA, proveniente da clivagem pela DICER, associada a outras proteínas, como a Argonauta (AGO) e a própria DICER (BARTEL, 2004). O complexo RISC irá se ligar ao mRNA alvo por meio da complementariedade entre a fita simples de RNA presente no complexo e a sequência alvo (BUENO; DE CASTRO; MALUMBRES, 2008). Em animais, miRNAs na maior parte das vezes apenas impedem a transcrição da fita de RNA pelos ribossomos e essa fita será degradada por RNases presentes no citoplasma. Os siRNAs e alguns miRNAs promovem a destruição do mRNA por clivagem através da proteína AGO-2 (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). O complexo RISC apresenta alta especificidade por seus alvos, sendo necessário por volta de 19 nucleotídeos complementares ao RNA de interferência para que o

complexo RISC se ligue ao mRNA, embora isto possa variar de acordo com o miRNA (LEWIS et al., 2003).

Estima-se que um terço de todos os genes tenham sua expressão controlada por miRNAs ou seja, por volta de 5300 genes (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005). MiRNAs possuem um papel muito importante na proliferação celular, regulação da apoptose e tumorigênese. Diminuição da expressão de certos microRNAs como os da família Let-7 podem levar a proliferação celular descontrolada e desenvolvimento de tumores, uma vez que estes miRNAs controlam a transcrição de proto-oncogenes impedindo que o RNA mensageiro destes seja traduzido em proteínas e desencadeie qualquer tipo de resposta. Em contrapartida, foi observado um aumento na expressão de certos miRNAs em determinadas neoplasias como linfoma por células B, uma vez que estes miRNAs podem interferir na transcrição de fatores pró-apoptóticos como E2F1 (HWANG; MENDELL, 2006).

Apesar de causarem a degradação e/ou clivagem da fita de mRNA, o complexo RISC não é degradado junto do RNA e pode ser atuar reprimindo a tradução de RNAm mais de uma vez (ALBERTS et al., 2010), por desta forma o mecanismo de regulação gênica por RNAs de interferência é muito eficiente no controle da expressão de seus genes alvo. Atualmente, os siRNAs estão sendo utilizados para o tratamento de doenças, uma vez que muitas condições fisiopatológicas têm como fator um aumento na disponibilidade de certas proteínas, seria possível tratá-las ao diminuir a expressão destas proteínas a níveis considerados aceitáveis, como por exemplo o uso de siRNAs para a diminuição da produção de VEGF no tratamento de tumores sólidos (LARES; ROSSI; OUELLET, 2010).

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão dos mecanismos pelos quais os microRNAs controlam a expressão gênica, bem como outros fatores relevantes para a biogênese destes pequenos RNAs não codificantes.

2.1 Objetivos gerais

- Descrever os mecanismos envolvidos na biogênese dos microRNAs.
- Descrever os mecanismos pelos quais os miRNAs atuam como repressores da tradução.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar os genes que codificam microRNAs.
- Processamento dos pri-miRNAs pelo complexo microprocessador
- Funcionamento da Drosha e DCGR8
- Processamento dos pri-miRNAs em pré-miRNAs pela DICER
- Funcionamentos da DICER, TRBP e outras proteínas do complexo RISC
- Ação do complexo RISC na repressão de RNAs mensageiros
- Funcionamento das proteínas da família Argonauta
- Transporte do miRNAs por meio de vesículas extracelulares

3 METODOLOGIA

Foi feito um levantamento bibliográfico por meio de pesquisas em livros na biblioteca Pe. Inocente Radrizzani localizada no Centro Universitário São Camilo, campus Ipiranga e busca em bases de dados como PubMed e NCBI. Também foi feito uso da ferramenta Google acadêmico. As palavras-chave utilizadas foram; microRNA, miRNA, câncer, *cell proliferation*, DICER, DCGR8, *miRNAs in blood*, *exosomes*, *micro-vesicles*, AGO protein, GW182, TRBP, *non-coding RNAs*, *miRNAs as biomarkers*.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Localização dos genes de miRNAs

Os miRNAs são transcritos a partir de sequências não codificantes presentes no genoma (ALBERTS et al., 2010). Os genes responsáveis por servir de molde para os miRNAs podem ser classificados como intergênicos ou intrônicos de acordo com sua localização. Os miRNAs intergênicos estão localizados em sequências não codificantes encontradas entre genes conhecidos, algumas destas sequências as quais antes não eram atribuídas funções, hoje são consideradas como genes que dão origem a alguns miRNAs e possuem regiões promotoras próprias (LIN; MILLER; YING, 2006). Os íntrons, sequências localizadas entre os éxons dos genes e que são removidas durante o *splicing* alternativo (ALBERTS et al., 2010), também podem ser transcritos em miRNAs. Estes miRNAs intrônicos geralmente obedecem a mesma taxa de expressão dos genes codificantes aos quais são transcritos (RODRIGUEZ et al., 2004) e podem ser transcritos inteiros de um único íntron ou serem reorganizados a partir de *splicing* de um ou mais íntrons (OKAMURA et al., 2007).

Figura 1 – Exemplo de genes de miRNA



Figura 1: Representação de um gene que origina um miRNA intergênico. Este gene está localizado em uma região não codificante e possui e região promotora própria. Porém, existem íntrons que podem dar origem a miRNAs após serem processados, miRNAs que tem sua origem de íntrons são chamados de miRNAs intrônicos.

Fonte: (Arquivo Próprio, 2016)

Ramalingam et al. (2014) encontraram evidências diretas de que os miRNAs intrônicos podem ter regiões promotoras próprias e independentes do gene hospedeiro. É comum que os miRNAs estejam organizados na forma de *clusters*

policistrônicos, sendo expressos em conjunto (TRUSCOTT; ISLAM; FROLOV, 2015), por exemplo, o *cluster* miR-17-92, que contém 7 miRNAs e está localizado no terceiro íntron do gene C13orf25 no *locus* 13q31.3 (HAYASHITA et al., 2005). Em humanos, os genes que codificam miRNAs são geralmente encontrados de maneira isolada (BARTELL, 2004; LIN; MILLER; YING, 2006), porém isto ainda não é um consenso, uma vez que há evidências de que até 40% destes genes podem estar organizados em *clusters* (ALTUVIA et al., 2005). Estão representados na figura 2, diferentes configurações dos genes para miRNAs.

Figura 2 – Diferentes configurações entre genes monocitrônicos, dicitrônicos e clusters policitrônicos

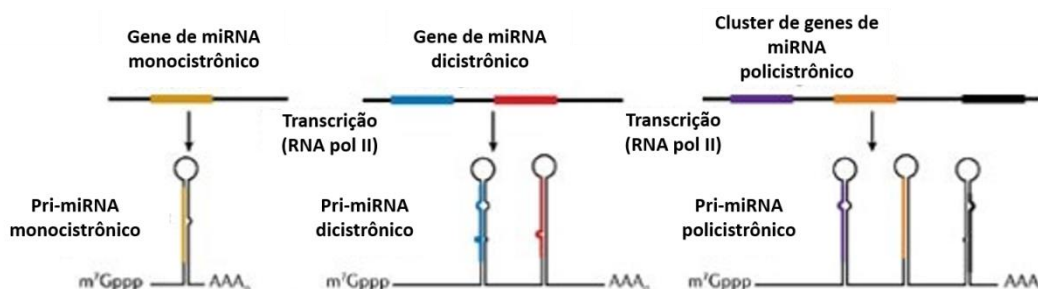


Figura 2: Genes monocitrônicos dão origem a um único miRNA, dicitrônicos a dois e policitrônicos a três ou mais. Um único pri-miRNA pode dar origem a vários miRNAs diferentes após o processamento.

Fonte: Modificado de (SALMOW et al., 2006)

Uma característica interessante é que os genes que codificam miRNAs são evolutivamente bem conservados entre as espécies, como por exemplo o gene *Let-7* (*letal-7*) encontrado em nematódeos, que codifica um miRNA de aproximadamente 22 bases de comprimento, sendo que, RNAs homólogos a este posteriormente foram identificados em moscas *Drosophila*, humanos e outros organismos (LAGOS-QUINTANA et al., 2001).

Cada linhagem celular apresenta um perfil de expressão diferenciado quanto a seus miRNAs. MiRNAs de um mesmo *cluster* possuem funções e taxas de expressão diferentes de outros miRNAs presentes no mesmo *cluster* (CHOUDHURY; MICHLEWSKI, 2012). Outro fator importante está relacionado a expressão de determinados miRNAs somente durante estágios de desenvolvimento

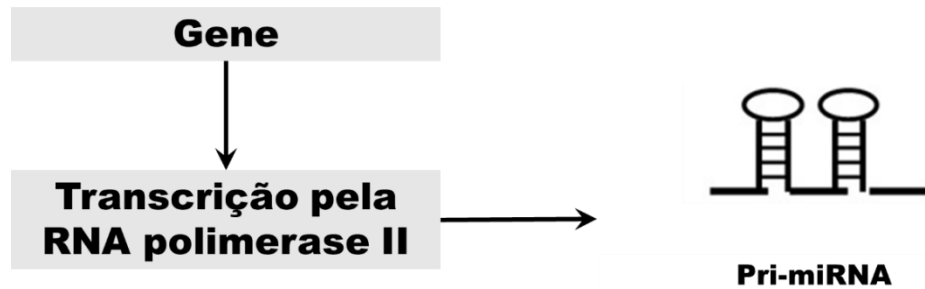
embrionário ou em ciclos específicos, como por exemplo, alguns miRNAs são expressos para regular o crescimento embrionário (KROL, 2010).

4.2 Pri-miRNAs

Os miRNAs não são transcritos diretamente como pequenos fragmentos. Estes são transcritos primeiramente em pri-miRNAs (*primary-microRNA*), estruturas de fita única que podem ter vários kilobases de comprimento e, devido a seu tamanho, apresentam a forma de *hairpin loop*, pois duas regiões da mesma sequência geram pares de base entre si, formando uma dupla-hélice incompleta, que se assemelha a um grampo de cabelo (KIM, 2005; ALBERTS et al., 2010).

A primeira teoria sobre a transcrição dos miRNAs e siRNAs foi de que estes RNAs seriam transcritos pela pol-III (RNA polimerase III) (LEE et al., 2004), uma proteína conhecida pela transcrição de pequenos RNAs, tais como os RNAs transportadores (tRNAs) por exemplo (ALBERTS et al., 2010). Porém, esta teoria foi descartada devido a várias inconsistências entre o funcionamento da enzima RNA polimerase III e as características apresentadas pelos pri-miRNAs, as estruturas que são processadas em miRNAs. Primeiro, os pri-miRNAs podem chegar a extensão de vários kilobases, algo que não combina com outros produtos desta enzima, algumas sequências ainda possuem mais de 4 resíduos de uridinas em sequência que terminariam a transcrição pela pol-III, muitos miRNAs também são expressados em diferentes taxas durante a vida do indivíduo, indícios que combinam com o padrão de funcionamento da pol-II mas não com a pol-III. Também foi observada a presença de CAP, uma estrutura na extremidade 5' que permite ao RNAm ser reconhecido pelo ribossomo e impede que seja degradado por exonucleases, além da cauda poli-A, outra estrutura que confere proteção contra degradação, e indícios de *splicing*. A presença destas estruturas reforça a hipótese de que a enzima responsável pela transcrição dos pri-miRNAs seria a RNA polimerase II (LEE et al., 2002), como representado pela figura 3. O pri-miRNA ainda não é funcional, por isso necessita de mais etapas de processamento antes de exercer sua função (ALBERTS et al., 2010; GOODALL et al., 2013; KIM, 2005; LEE et al., 2004).

Figura 3 – Esquema da transcrição do pri-miRNA pela RNA polimerase II



Fonte: (Arquivo próprio, 2016)

Uma exceção à regra seria que Borchert et al. (2006) encontraram indícios de que alguns miRNAs podem ser transcritos pela RNA polimerase-III.

4.3 Complexo microprocessador

4.3.1 Drosha e DCGR8

Ainda dentro do núcleo, o pri-miRNA é processado pela Drosha, uma família de proteínas RNase III (Ribonuclease III), subclasse II de cerca de 650 kDa cada (HAN et al., 2004). A família Drosha é necessária para o processamento dos miRNAs, tendo o papel de clivar as longas fitas de pri-miRNAs em pré-miRNAs (FILIPOWICZ, 2005), em fitas menores em forma de *hairpin loop* com cerca de 60 a 90 bases de comprimento (GOODALL et al., 2013).

A proteína Drosha possui dois domínios RIIIDs (*RNase-III domain*), domínios característicos deste tipo de RNase, e um domínio dsRBD (*Double-stranded RNA binding domain*), região responsável por fixar a proteína ao RNA dupla-hélice (HAN et al., 2005).

Para que o processamento do pri-miRNA pela Drosha seja eficiente, é importante que o pri-miRNA possua um *loop* terminal com ao menos 10 nucleotídeos. Além disso, as regiões flangeadoras, sequências que são contínuas ao miRNA mas que serão retiradas durante o processamento, devem ser um pouco mais extensas do que o miRNA final (ZENG; CULLEN, 2005). Chen et al. (2004) chegaram à conclusão de que são necessários cerca de 40 nucleotídeos entre a sequência do miRNA final e início do *loop* terminal (figura 5).

A proteína Drosha necessita de outra proteína para que ocorra ligação a dupla-hélice de RNA, a ribonucleoproteína de ligação DCGR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8 gene*) (figura 4). Esta proteína possui um domínio dsRBD e é responsável por ancorar a dupla-fita de RNA à Drosha, garantindo que a distância entre o que será uma das pontas do miRNA maduro e as regiões flanqueadoras seja respeitada e o pré-miRNA seja clivado nas regiões corretas. Essa distância é de exatamente 11 pares de base, o que equivale a uma volta de RNA dupla-hélice (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Figura 4 – Biogênese dos miRNAs

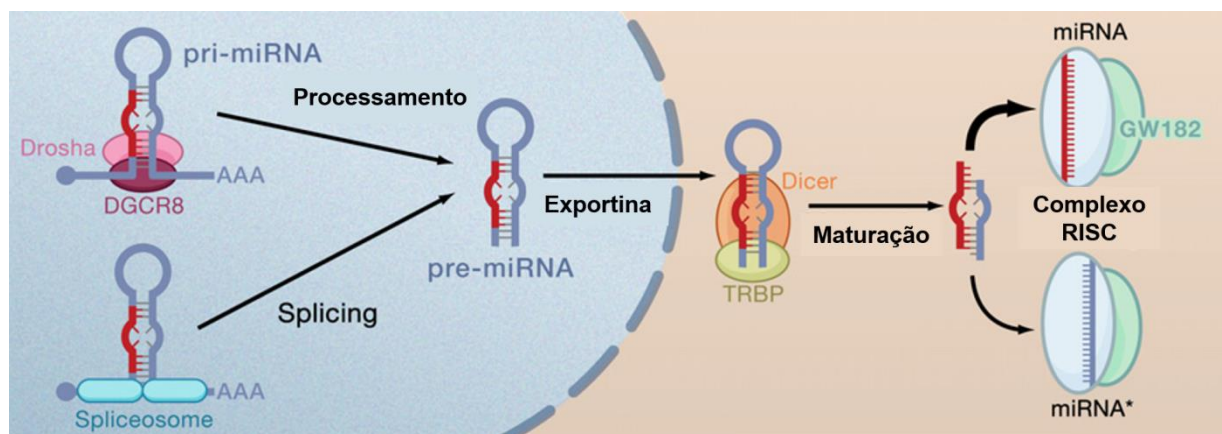


Figura 4: Esquema que resume a biogênese dos miRNAs, desde de o processamento do pri-miRNA pela proteína Drosha, até a incorporação do miRNA maduro no complexo RISC.

Fonte: modificado de (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009)

A posição da clivagem realizada feita pela Drosha em sua extremidade, e posteriormente também pela DICER, determina a identidade das pontas 5' e 3' do miRNA, influenciando diretamente em sua sequência *seed*, que é definida como a sequência de nucleotídeos 2 a 8 da fita de miRNA responsável pelo pareamento com o RNA alvo. Na figura 5 está representado um pri-miRNA/pré-miRNA e as regiões onde ocorrerão clivagens ao longo do processamento. Alterações, especialmente na extremidade 5', são muito importantes para definir a função do miRNA e com quais alvos ele irá interagir (KROL, 2019; OKAMURA; CHUNG; LAI, 2008).

Gregory et al. (2004) comprovaram que a maturação do miRNA não ocorre com apenas uma dessas proteínas, necessitando das duas para que um miRNA funcional fosse gerado.

Figura 5 – Esquema da configuração de um pri-miRNA/pré-miRNA, e sítios de clivagem das proteínas Drosha e DICER

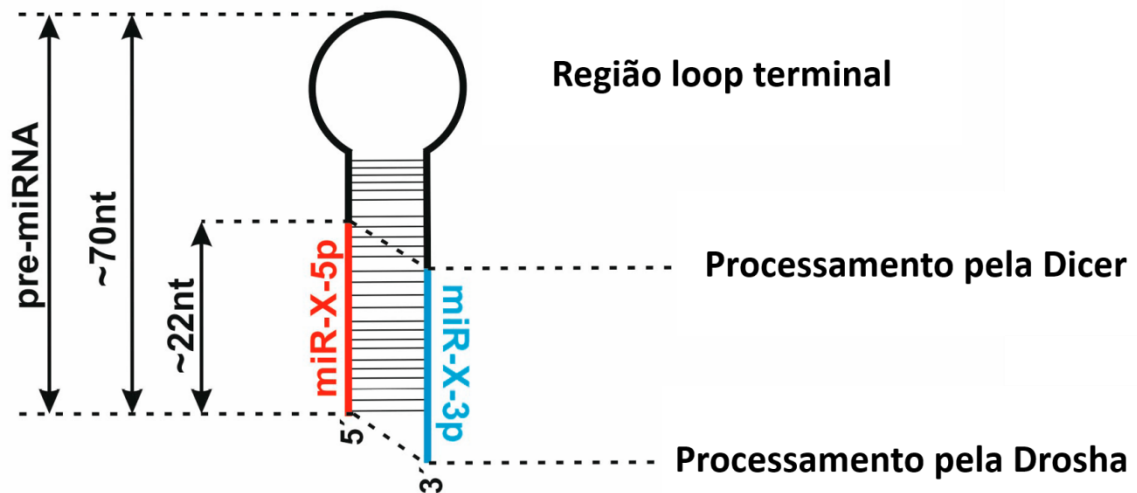


Figura 5: Exemplo de um pré-miRNA logo após clivagem pela Drosha, a nomenclatura Mir, seguida do braço, 5p para 5' e 3p para 3', e X seria a nomenclatura própria. Na extremidade 3' está a ponta abrupta com dois nucleotídeos não pareados, sinal característico de cortes feitos pela Drosha e DICER.

FONTE: modificado de (GAMA-CARVALHO; ANDRADE; BRÁS-ROSÁRIO, 2014)

4.3.2 Proteínas acessórias ao complexo microprocessador

Nos últimos anos, ocorreu a identificação de uma ampla variedade de proteínas que atuam como inibidoras e/ou ativadoras da expressão de miRNAs ao interagir com o complexo microprocessador, especialmente a Drosha e DICER. Geralmente, cada miRNA possui regulação por uma proteína específica (KROL, 2010). Um exemplo são as proteínas LIN28/LIN28b, que regulam o miRNA Let-7; apesar da presença de pri-let-7 em células indiferenciadas, a proteína LIN-28 atua tanto sobre Drosha quanto DICER ao reprimir o processamento deste miRNA ao ponto dos níveis de *let-7* serem muito baixos ou ausentes no citoplasma (VISWANATHAN; DALEY, 2010). Este tipo de controle é muito importante para

homeostase, uma vez que o Let-7 está relacionado ao desenvolvimento embrionário e à maturação de células tronco mesenquimais em adultos, promovendo a diferenciação celular. É observada a presença de Let-7 em células maduras dos tecidos, mas não nas células progenitoras (BOYERINAS et al., 2010).

Apesar das proteínas Drosha e DGCR8 serem os principais componentes do complexo microprocessador, é necessária a associação da Drosha com pelo menos 20 outras proteínas para que ocorra a clivagem do RNA, como por exemplo, as helicases p68 e p70. Embora ainda restem algumas dúvidas quanto a sua exata função no complexo microprocessador, estas são necessárias para o processamento de uma série de miRNAs diferentes, o que não ocorre caso os genes destas helicases sofram deleção (DAVID et al., 2010).

4.4 Vias não-canônicas de miRNAs

A principal via em que o miRNA é transcrito na forma de pri-miRNA, clivado em pré-miRNA pelo complexo microprocessador para seguir ao citoplasma é denominada via canônica dos miRNAs (CARTHEW; SOTENHEIMER, 2009) e é a mais estudada. Porém, existe uma via alternativa, a qual foi descoberta por meio de tecnologias de sequenciamento, em que o miRNA não necessita do complexo microprocessador para ser clivado em pré-miRNA, apenas do *splicing*. Essa via recebe o nome de via não-canônica. Os miRNAs gerados a partir desta via são chamados de Mirtrons (junção de miRNA com Intron) (GOODALL et al., 2013).

4.4.1 Mirtrons

O *splicing* é o processo no qual os íntrons de um gene são removidos e os éxons são reorganizados de acordo com o RNAm a ser gerado, sendo realizado por um complexo ribonucleoproteico chamado spliceossomo, exclusivo das células de eucariotos (ALBERTS, 2010).

Por meio de estudos computacionais, acredita-se que cerca de 10% dos miRNAs em vertebrados e em invertebrados são transcritos como mirtrons, o que significa que são miRNAs independentes do complexo microprocessador (OKAMURA; CHUNG; LAI, 2008).

Durante o *splicing*, o spliceossomo remove íntrons de mRNAs imaturos (WAHL; WILL; LÜHRMANN, 2009) na forma de um laço contendo uma incomum ligação fosfodiéster 2' 5'. A teoria atual em que o mirtron é formado como um laço, e posteriormente tem sua ligação 2' 5' quebrada pela proteína Dbr1, ainda não é um consenso, embora tenha sido demonstrado que a deleção da proteína Dbr1 é fatal em eucariotos devido a perda do controle pós-transcricional exercido por pequenos RNAs em geral (MONTEMAYOR et al., 2014). Um exemplo de como ocorre o processo de *splicing* está demonstrado na figura 6.

Tanto mirtrons quanto miRNAs clássicos formam pré-miRNAs em forma de *hairpin* que seguirão pela mesma via de processamento em miRNAs funcionais (MARCO; NINOVA; GRIFFITHS-JONES, 2013).

Figura 6 – *Splicing*

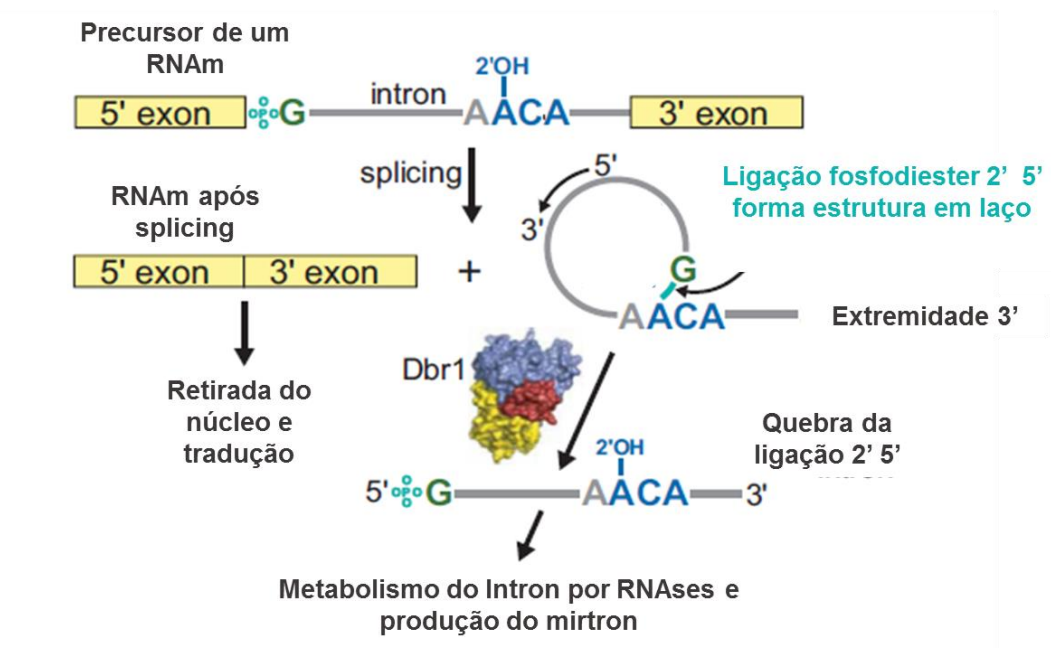


Figura 6: O íntron é retirado do transcrito durante o processo de *splicing*, os éxons permanecem para serem traduzidos. O íntron na forma de laço será reconhecido pela proteína Dbr1, que irá clivar a ligação 2' 5' e desdobrá-lo para formar um pré-miRNA semelhante a um pré-miRNA gerado a partir da via canônica.

Fonte: modificado de (MONTEMAYOR et al., 2014)

4.4.2 SnoRNA atuando como microRNA

Existe um snoRNA (*small nucleolar RNA*) denominado ACA45 que é transcrito diretamente em forma de *hairpin loop* devido ao fato de ser um RNA fita simples curto. O *hairpin* é em seguida clivado pela DICER, e pode ser associado a AGO para reprimir RNAm endógeno da mesma forma que um miRNA. Apesar de não ser um miRNA por não sofrer o mesmo processamento, o snoRNA ACA45 possui os mesmos mecanismos de ação que um miRNA (CARTHEW; SOTENHEIMER, 2009).

4.5 Exportação de miRNAs para o citoplasma

O pré-miRNA precisa ser exportado para o citoplasma para continuar com o processamento, sendo transportado por intermédio da exportina XPO-5 (exportina-5) (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009). A XPO-5 funciona como um carreador de RNAs que necessita do cofator Ran-GTP para que ocorra ligação com a carga (YI et al., 2003). Após a formação do complexo RNA - exportina - Ran-GTP, este será transportado a favor do gradiente, uma vez que as concentrações de Ran-GTP são muito maiores dentro do núcleo do que no citoplasma. Após a passagem, ocorrerá liberação da carga no citoplasma por hidrólise da Ran-GTP em Ran-GDP (BORCHERT; LANIER; DAVIDSON, 2006) como representado na figura 7.

A exportina 5 é essencial para o funcionamento do ciclo celular. Iwasaki et al. (2013) realizaram experimentos com células XPO5 *knockout* e confirmaram a diminuição global dos níveis de miRNAs, juntamente com a rápida progressão da tumorigênese, devido a perda do controle pós-transcricional exercido pelos miRNAs.

A XPO5 reconhece pré-miRNAs clivados pela Drosha por meio da presença da extremidade protuberante 3' com dois nucleotídeos não pareados característica dos miRNAs (MURCHISON; HANNON, 2004).

Figura 7 – Ciclo da proteína RAN

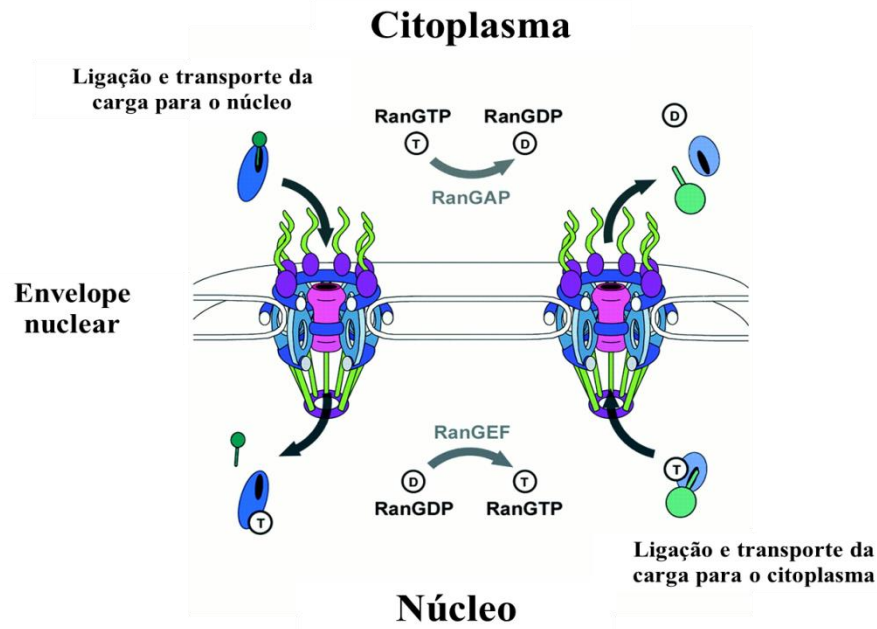


Figura 7: Ciclo da proteína Ran. A proteína Ran liga-se a carga a ser transportada por importinas e exportinas, proteínas responsáveis pelo transporte de pequenos RNAs entre outros produtos através do envelope nuclear.

Fonte: Modificado de (ROUT; AITCHISON, 2001)

4.6 Complexo RISC

O complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*) é um complexo ribonucleoproteico formado por diversas proteínas. É por meio deste complexo que os miRNAs tem seu processamento finalizado e induzem a repressão de RNAm (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

4.6.1 DICER

Após serem exportados do núcleo para o citoplasma, os pré-miRNAs irão continuar o processo de maturação, sendo que a próxima etapa dessa via consiste na clivagem pela DICER, uma Ribonuclease III (HAN, 2004) presente em eucariotos. Em *Drosophila*, por exemplo, são as proteínas Dcr1 e Dcr2, enquanto que em humanos o papel de clivar RNAs fita dupla em pequenos RNAs é exercido pela

DICER (TIJSTERMAN; PLASTERK, 2004). A proteína DICER possui vários domínios ao longo de sua estrutura; da extremidade amino-terminal para carboxi-terminal, há um domínio DEXD/H ATPase, um domínio DUF283 que ainda não possui função conhecida, um domínio PAZ, dois domínios RNase III em *tandem*, e um domínio de ligação dsRBD (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009; TWORAK, 2016). Curiosamente, diferente de outras proteínas dessa família encontradas em outros organismos, que são dependentes de domínios ATPase para que a clivagem de RNAs ocorra, a DICER humana é capaz de clivar RNAs mesmo na ausência de ATP (ZHANG et al., 2002).

Até o momento, foi observada uma única exceção à regra de que os miRNAs devem ser processados pela DICER (GODDAL, 2013); o mir-415, um miRNA que é processado em pré-miRNA pela Drosha, porém é diretamente clivado pela proteína AGO2 em sua região 3' terminal, retirada por esta ao invés da DICER, concluindo seu processamento em um miRNA funcional para que este exerça sua função regulatória ao clivar RNAs alvos em conjunto com a proteína AGO2 (YANG et al., 2010).

Assim, como a Drosha é dependente da proteína de ligação DGCR8, a proteína DICER por si só não tem a capacidade de acoplar à dupla fita de RNA. Para isso é necessária a proteína de ligação chamada TRBP (*Transactivation-responsive RNA Binding Protein*) (KROL, 2010). Enquanto a proteína Drosha é responsável por definir as regiões onde o pri-miRNA será clivado, e consequentemente a extremidade 5' do miRNA, a DICER possui papel semelhante quanto à extremidade 3' ao clivar o pré-miRNA. Considerando o fato de que alguns pri-miRNAs podem originar dois miRNAs funcionais diferentes, quando tanto o miRNA quanto o miRNA* são funcionais, neste caso, a Drosha acaba por definir a extremidade 5' de um e 3' do outro ao clivar o pri-miRNA, assim como a DICER irá definir as extremidades restantes ao clivar o pré-miRNA. Um exemplo de onde ocorrerão as clivagens para a maturação do miRNA está demonstrado na figura 5 (GAMA-CARVALHO; ANDRADE; BRÁS-ROSÁRIO, 2014).

A DICER pode clivar em qualquer ponto de um RNA, desde que este apresente estrutura dupla fita (um *hairpin*, por exemplo), porém ela possui maior afinidade pelas regiões terminais como representado na figura 8. O fato de Drosha e DICER possuírem pontos de corte específicos e os miRNAs serem transcritos a partir de genes, faz com que estes geralmente apresentem terminações bem

definidas e com pouca variação, característica que não é observada em RNAs de interferência (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Figura 8 – Mecanismos de ação da DICER

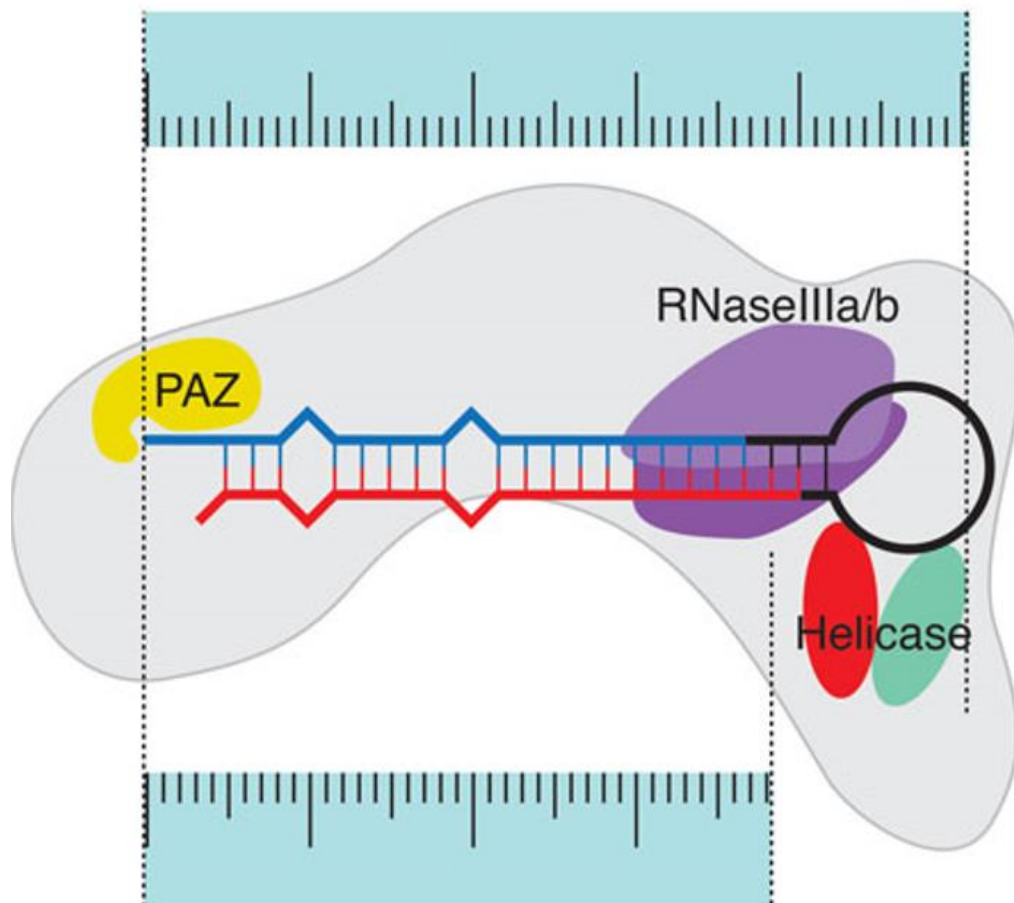


Figura 8: Estas proteínas obedecem duas regras básicas, a primeira é determinar a distância entre a ponta 3' e a região loop terminal, a segunda é em relação a clivagem, a DICER cliva as regiões flangeadoras do pri-miRNA nos dois lados da região loop terminal com base em uma distância fixa de cerca de 20 nucleotídeos da ponta 3' da região loop terminal.

Fonte: modificado de (TUTSUMI, 2011)

Após identificar as extremidades, ocorre clivagem no comprimento de aproximadamente duas voltas de RNA dupla hélice (11 pares de base cada) a partir do término destas sequências, isto é, nas duas regiões flangeadoras ao *loop* terminal, removendo esta região. Ao fim do processo, a estrutura que anteriormente estava na forma de um *hairpin*, dá origem a uma dupla fita de RNA com aproximadamente 20 a 22 nucleotídeos cada. Uma destas fitas será o miRNA

funcional, enquanto a outra provavelmente será degradada (BARTEL, 2004; CARTHEW; SONTHEIMER, 2009)

4.6.2 Proteínas TRBP

Apesar de apresentar domínios dsRBD, assim como a Drosha, a atividade da DICER é dependente de proteínas especializadas em se ligar a RNAs dupla fita. Em humanos existe uma TRBP específica que se liga à DICER para clivagem do pré-miRNA, e posteriormente, ligação no complexo RISC, a TARBP2. Já foi confirmado que o complexo RISC não pode ser formado na ausência desta proteína (CHENDRIMADA et al., 2005).

Melo et al. (2009) observaram que os níveis da proteína TRBP estão diminuídos em certos tipos de carcinoma, devido à uma mutação do tipo *frameshift* que inibiu a expressão desta proteína, diminuindo em cerca de 90% a produção de miRNAs nas células neoplásicas. Enquanto nas células normais, não-neoplásicas, foram observados altos níveis de TARBP2 e, conseqüentemente, produção normal de miRNAs. Este estudo reforçou a hipótese de que determinados miRNAs agem suprimindo oncogenes e que sua diminuição está associada a risco maior de câncer.

4.6.3 Argonauta

Pequenos RNAs não-codificantes, como micro-RNAs, possuem a capacidade de silenciar genes ao se ligar de maneira seletiva aos RNAs mensageiros e impedir sua tradução de diferentes maneiras (MALLONE; HANNON, 2009). Este mecanismo só é possível pela existência de uma família de proteínas com um papel essencial no reconhecimento e ligação do complexo RISC ao RNAm alvo, a família das Argonautas, ou apenas proteínas AGO (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

Proteínas da família Argonauta são encontradas em uma ampla variedade de organismos. Plantas por exemplo, também apresentam um controle de expressão gênica por pequenos RNAs e são muito utilizadas como modelos de estudo para siRNAs e miRNAs (YANG, 2007).

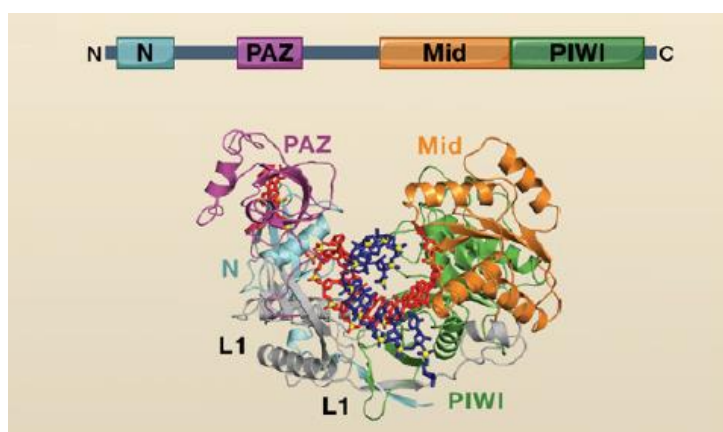
Atualmente foram identificadas 8 proteínas AGO em mamíferos, sendo que no ser humano foram encontrados genes para quatro proteínas AGO diferentes; os genes para AGO1; AGO3 e AGO4 humanas estão localizados no cromossomo 1,

enquanto o gene que codifica AGO2 está localizado no cromossomo 8. Estas proteínas recebem a abreviação AGO ou PIWI (subfamília restrita a vermes) de acordo com sua subfamília (HOCK; MEISTER, 2008).

4.6.3.1 Subfamílias das proteínas argonautas

As proteínas da subfamília AGO têm a capacidade de se ligar aos RNAs clivados pelas RNases III (BERNSTEIN et al., 2001), devido à presença de domínios PAZ (*Piwi-Argonaute-Zwille*) que se ligam a extremidades 3' com dois nucleotídeos não pareados e permitem que a proteína se ligue a fitas de RNA (HOCK; MEISTER, 2008).

Figura 9 – Domínios e estrutura da proteína AGO



Fonte: Modificado de (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009)

Existem também domínios PIWI, como observado na figura 9, que possuem afinidade por RNAs digeridos pela enzima RNase H, a qual sugere-se possuir atividade de endonuclease em mamíferos (PARKER; ROE; BARFORD, 2004).

4.6.4 Formação do complexo RISC

As proteínas mencionadas anteriormente; DICER, TRBP, argonauta e várias outras proteínas acessórias como helicases, RNases e RNPs (*RNA-Binding Protein*) fazem parte da formação do complexo RISC (BARTEL, 2004, KROL, 2010). A proteína TRBP irá auxiliar na transferência da fita de miRNA processada pela DICER para que esta seja acoplada a proteína AGO (CHENDRIMADA et al., 2005).

Geralmente a proteína AGO possui maior afinidade pela fita com a ponta 5' menos estável, enquanto a fita adjacente, miRNA* ou *passenger* geralmente é descartada (KIM, 2005).

Após o processamento o miRNA geralmente possui complementariedade e se liga à região 3' UTR, uma região localizada pouco antes do códon de parada que atualmente é associada ao controle pós-transcricional por miRNAs (KROL, 2010).

Muitos miRNAs não tem sequências *seed* perfeitamente complementares ao alvo, acredita-se que sequências com alta complementariedade levem a degradação do RNAm alvo, enquanto sequências com mais bases não pareadas acarretam apenas a repressão do RNAm alvo (GOODALL et al., 2013) (figura 10).

Figura 10 – Complexo RISC

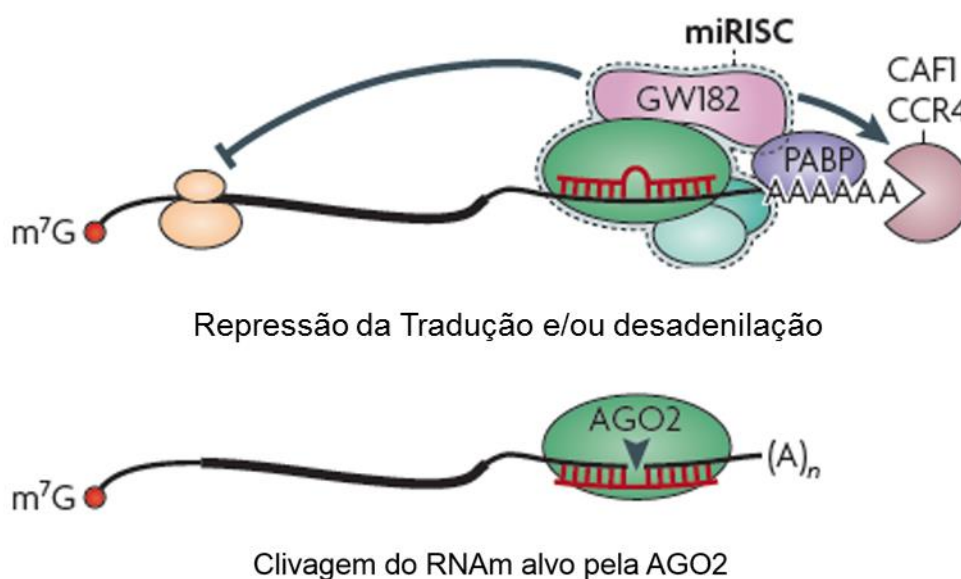


Figura 10: O complexo RISC pode impedir que o RNAm seja traduzido em proteínas ao bloquear a ação dos ribossomos e/ou iniciar um processo de desadenilação de sua cauda de poli-A, permitindo que este seja degradado por RNases endógenas. Quando o complexo RISC inclui a AGO2, que possui ação de endonuclease e cliva o RNAm, os fragmentos de RNAm são degradados após a clivagem.

Fonte: Modificado de (KROL, 2010)

Apesar das proteínas AGO1 a AGO4 serem co-expressas na maioria das linhagens celulares (MEISTER et al., 2004), é dada especial atenção a AGO2, por

ser a única proteína AGO com capacidade de agir como ribonuclease ao se associar a miRNAs em mamíferos (CARTHEW; SONTHEIMER, 2009).

O complexo RISC irá reprimir a tradução das fitas de RNAm alvo, seja por desadenilação, a remoção de adeninas da cauda de poli-A levando a degradação da fita, ou simplesmente por obstrução mecânica, impedindo que o ribossomo traduza esta fita e consequentemente esta seja degradada por RNases endógenas (figura 10) (KROL, 2010).

4.6.5 Proteína GW182

Para que o complexo RISC exerça a função de desadenilação/repressão, as quatro proteínas da família AGO devem interagir com proteínas GW182 (*glycine-tryptophan protein of 182 kDa*) através da região N-terminal destas proteínas. Foram identificadas três proteínas desta família em humanos, TNRC6A/GW182, TNRC6B e TNRC6C, as quais são proteínas parálogas com funções redundantes (EULALIO; TRITSCHLER; IZAURRALDE, 2009). À GW182 também é atribuída a função de sequestrar o RNAm e o complexo RISC para a formação de corpos P, estruturas relacionadas a degradação de RNAs no citoplasma, onde outras proteínas como DCP1; DCP2, Ccr4-Caf1 (exemplo na figura 11) entre outras, são responsáveis pelo processo de desadenilação de poliaA deste RNA e retirada do CAP, levando à degradação do RNAm. Sem a ação da GW182 não ocorreria a repressão destes RNAs mensageiros pelo RISC (BEHM-ANSMANT et al., 2006; NISHI et al., 2013).

Figura 11 – Proteína GW182

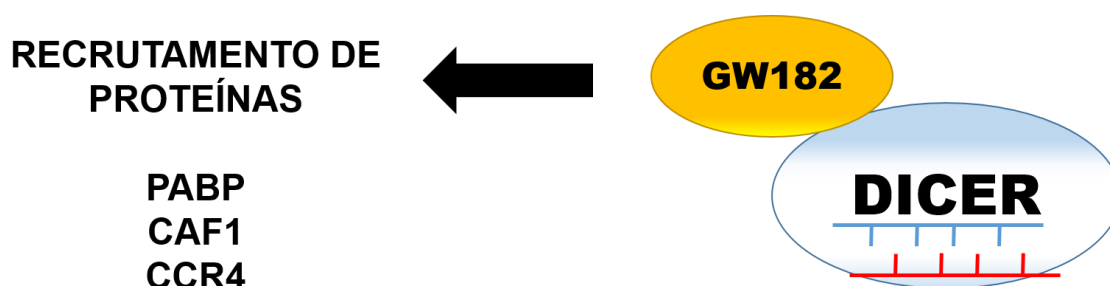


Figura 11: A proteína TRBP/GW182 é responsável por recrutar inúmeras outras proteínas que fazem parte do complexo RISC e participam da repressão da tradução/desadenilação.

Fonte: (Arquivo Próprio)

4.6.7 Degradação de RNAs mensageiros

Após o acoplamento do complexo RISC à fita de RNAm alvo, a proteína GW182 sinaliza para proteínas como Dcp1 e Dcp2 resultando em retirada do CAP, e outras enzimas como Ccr4:NOT, por exemplo, para a degradação da cauda de poli-A por meio de desadenilação (NISHI et al., 2013).

No citoplasma da célula, existem aglomerados de RNAs (marcados para degradação) que aparecem como pequenas granulações, esses aglomerados recebem o nome de corpos P, e são o destino final da maioria das fitas de RNA marcadas para serem degradadas, não apenas dos alvos de miRNAs (PARKER; SHETH, 2007).

Um exemplo da variedade de proteínas associadas à degradação do complexo RISC junto do RNAm alvo está representado na figura 12.

Figura 12 – Degradação do RNA mensageiro em corpos P após pareamento com complexo RISC

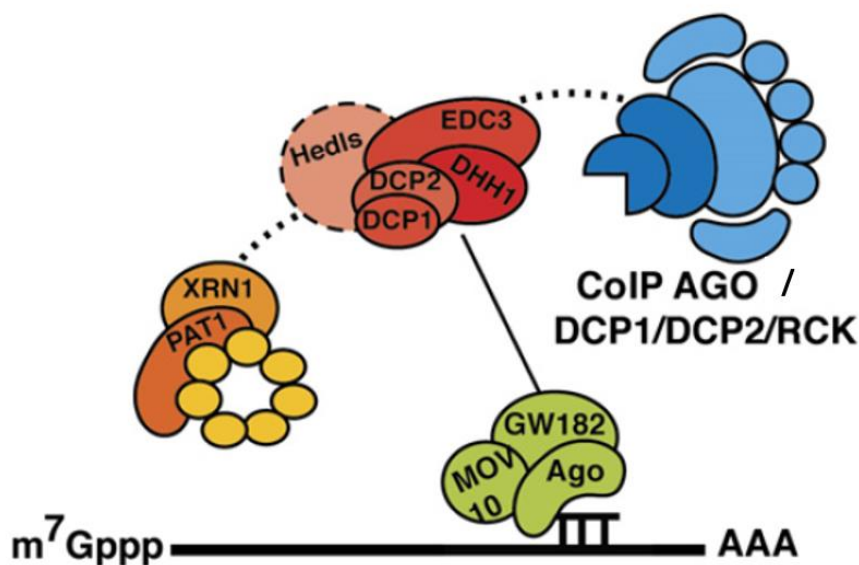


Figura 12: Ligação da GW182 à DCP1 e DCP2, após isso, inúmeras proteínas são recrutadas para auxiliar na degradação do RNA mensageiro. Embora hoje acredite-se que os miRNAs têm seus alvos degradados em complexos separados, a maquinaria celular utilizada é semelhante.

Fonte: modificado de (PARKER; SHETH, 2007)

Em 2009, Gibbings et al. provaram por meio de testes bioquímicos e de biologia molecular, que os complexos RISC-RNA_m formam vesículas separadas dos outros RNAs a serem degradados em corpos P, os quais foram nomeados corpos GW pela presença de GW182 nestas vesículas.

4.7 Transporte entre células por vesículas extracelulares

Os exossomos e as microvesículas são estruturas produzidas pela maioria das linhagens celulares em mamíferos. Os exossomos são vesículas com cerca de 100 nm derivados de corpos multivesiculares que se fundem à membrana plasmática da célula e sofrem exocitose. Estruturas geralmente maiores que exossomos e originadas diretamente da membrana plasmática são chamadas de microvesículas, podendo chegar a 1 µm. Os mecanismos destas vesículas extracelulares ainda não foram completamente elucidados, além disso, os autores tendem a usar os termos exossomos ou microvesículas para se referir a vesículas extracelulares como um todo, de acordo com a própria preferência, causando certa confusão sobre quando e onde usar determinado termo (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Inicialmente, acreditava-se que os exossomos e microvesículas eram utilizados apenas para o descarte de proteínas desnecessárias do citoplasma para o meio extracelular, porém estudos recentes indicam que a produção de vesículas contendo miRNAs podem ser um meio de sinalização entre células (STOORVOGEL, 2012).

4.7.1 Funcionamento das microvesículas

Em 2012, Montecalvo et al. chegaram à conclusão de que células dendríticas podiam se comunicar umas com as outras por meio de exossomos contendo miRNAs. Os miRNAs encapsulados dentro dos exossomos eram resistentes a RNases, permitindo que estes resistissem a passagem pelo meio extracelular e fossem fagocitados/endocitados pelas células dendríticas onde poderiam exercer seu efeito como reguladores pós-transcricionais.

Esse mecanismo de comunicação também ocorre entre linhagens celulares diferentes. Células do endotélio vascular expostas a um aumento do *shear stress*, o

estresse de cisalhamento que a passagem do sangue causa ao vaso, tem como resposta um aumento do fator de transcrição KLF2 (*Krüppel-like factor 2*); este fator está relacionado com aumento da expressão do *cluster* de miRNAs mir-143 a mir-145. As células do endotélio produzem microvesículas enriquecidas em miRNAs deste *cluster*, que ao serem endocitadas pelas células musculares lisas da túnica média, alteram o fenótipo destas células tornando-as mais resistentes a aterosclerose (HERGENREIDER et al., 2013).

Figura 13 – Formação de exossomos a partir de corpos multivesiculares

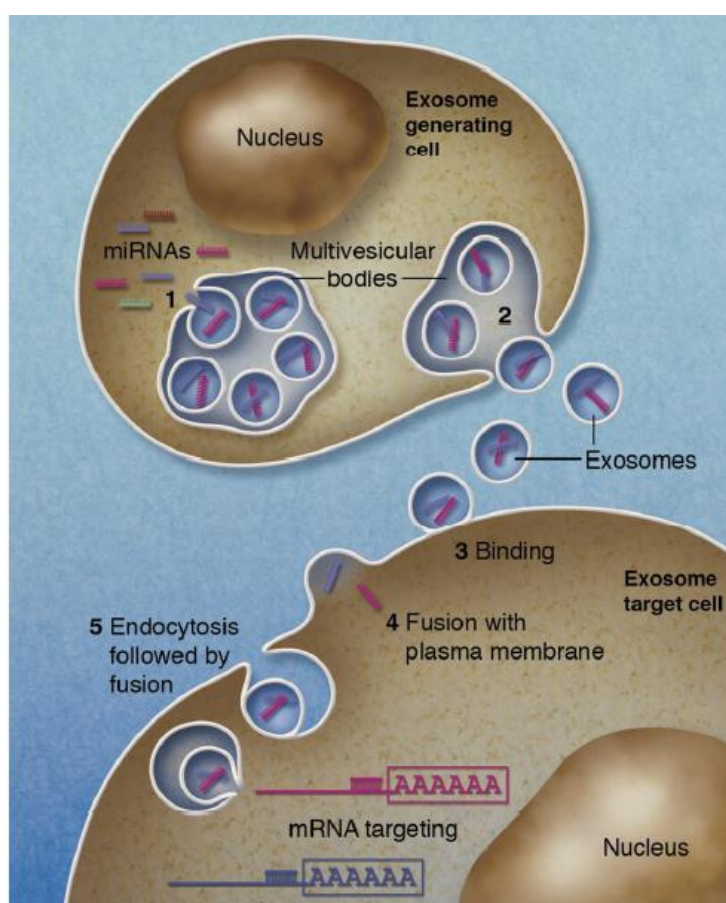


Figura 13: (1) MicroRNAs são seletivamente incorporados dentro de vesículas de corpos multivesiculares. (2) Os corpos multivesiculares se fundem à membrana plasmática e tem seus corpos intraluminais liberados para o espaço extracelular. (3) Exossomos se ligam a membrana plasmática da célula. (4) Ocorre a endocitose dos exossomos pela membrana plasmática, onde ocorre a formação de um compartimento contendo o exossomo. Alguns exossomos recrutados podem se fundir diretamente com a membrana, não necessitando que ocorra endocitose. (5) Endocitose do compartimento e fusão do exossomo com o citoplasma, desse modo o miRNA exossomal é integrado ao citoplasma da célula e o miRNA pode exercer sua função regulatória dentro da célula.

Fonte: Modificado de (STOORVOGEL, 2012)

O processo de formação de vesículas até a liberação das mesmas está representado pelo esquema da figura 13.

Também foi confirmada a existência de miRNAs em corpos apoptóticos, lipoproteínas de alta e baixa densidade, além de outras proteínas ligadoras de RNAs (KOSAKA et al., 2014)

4.8 MiRNA*

Um miRNA* ou *passenger strand miRNA* é o nome dado a fita de miRNA que por ter uma menor afinidade com proteínas do complexo RISC (AGO em especial) não foi acoplada ao complexo RISC e geralmente é degradada (KROL, 2010). Porém, recentemente muitos grupos estão identificando genes que ao serem processados, tanto o miRNA quanto o miRNA* possuem função, às vezes, distintas (GAMA-CARVALHO; ANDRADE; BRÁS-ROSÁRIO, 2014). Um bom exemplo é o miRNA mir-21, um miRNA com um amplo papel na diferenciação celular, regulação do sistema imune, além de estar relacionado com o desenvolvimento de câncer e fibrose em determinados tecidos (KUMARSWAMY; VOLKMANN; THUM, 2011). Bang et al. (2014) provaram que a hipertrofia do tecido cardíaco é influenciada pela ação do miR-21*. Em resposta ao estresse cardiovascular, fibroblastos presentes no tecido cardíaco tendem a produzir maiores quantidades de mir-21, um miRNA conhecido pelo aumento da proliferação e produção de matriz extracelular por estas células, levando a fibrose. Porém, o miR-21*, que antes acreditava-se ser degradado no interior da célula, é transportado por meio de exossomos para os cardiomiócitos (figura 14). Dentro de cardiomiócitos, estes miRNAs* contribuem para que estas células musculares sofram hipertrofia ao diminuírem a tradução de SORBS2 e PDLIM5, proteínas cuja baixa expressão está associada a hipertrofia em cardiopatias.

Figura 14 - Cortes histológicos de tecido cardíaco de ratos

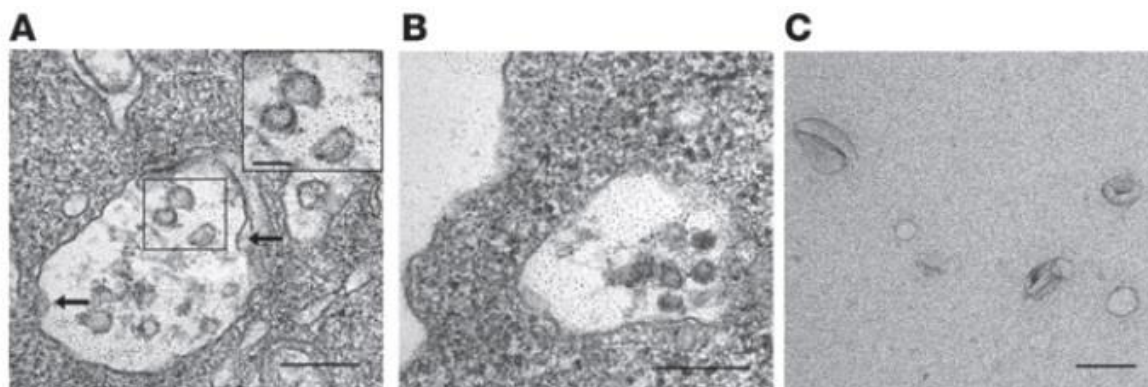


Figura 14: (A e B) Microscopia eletrônica de transmissão de fibroblastos no tecido cardíaco de ratos, barra de 200 nm; (A) Citoplasma apresenta corpos multivesiculares; (B) Fusão dos corpos multivesiculares com a membrana citoplasmática; (C) Exossomos derivados de fibroblastos do tecido cardíaco de ratos, microscopia eletrônica de transmissão, barra de 100 nm. Estes exossomos são transportados para os cardiomiócitos através do meio extracelular no tecido cardíaco.

Fonte: modificado de (BANG et al., 2014)

4.9 Regulação pós-transcricional dos miRNAs e outros fatores

4.9.1 Fatores de ativação e repressão pós-transcricional

Embora sejam conhecidos fatores de transcrição que controlem a produção dos miRNAs (OBERNOSTERER; et al., 2006), existe outro fator que explica a capacidade que alguns miRNAs possuem de serem produzidos em menor ou maior quantidade que os outros RNAs de seu *cluster*, ou genes hospedeiros no caso dos miRNAs intrônicos; isto ocorre pela existência de fatores pós-transcricionais que controlam a produção de miRNAs após a transcrição dos mesmos. Estes fatores podem ser ativadores ou repressores da expressão dos genes de miRNA (KROL, 2010).

Um bom exemplo é a proteína hnRNP A1, que dobra a região loop terminal do pri-miRNA mir-18a e permite que a Drosha o clive com maior eficiência. Este processo aumenta a produção do mir-18a. Existem muitas outras proteínas além desta que auxiliam no controle do processamento de miRNAs (MICHLEWSKI; et al., 2008).

4.9.2 Região *loop* terminal

A presença de um *loop* terminal (como anteriormente mostrado na figura 4) durante muito tempo foi tratada como necessária para a clivagem do pri-miRNA pela Drosha (ZENG; CULLEN, 2005; TOMARI; ZAMORE, 2005; CARTHEW; SOTENHEIMER, 2009). Kim et al. (2009) refutaram esse modelo e chegaram à conclusão de que a maturação do miR-16 e de outros miRNAs podem ocorrer mesmo sem a região de *loop* terminal, pois curiosamente, ao testarem um miRNA mutante com um *loop* menor do que o miRNA original, a expressão do miR-16 foi inibida.

Embora o processamento possa ocorrer sem regiões de *loop* terminal, estas são benéficas para um bom funcionamento do processo microprocessador por permitirem a ligação de fatores que regulam a produção de miRNA em um nível pós-transcricional (CHOUDHURY; MICHLEWSKI, 2012).

4.9.3 Mecanismos de controle via *feedback* negativo

É comum que os miRNAs participem em mecanismos de *feedback* negativo, estes podem ser mecanismos de *feedback* negativo unilateral, como ocorre com o fator de transcrição PITX3 que estimula a produção de mir-133b, um repressor da tradução do próprio PITX3 para que a diferenciação de neurônios dopaminérgicos seja controlada. Também existem mecanismos de *feedback* negativo duplo, quando a expressão de um gene estimula a produção de um miRNA, que é responsável por suprimir um determinado RNAm alvo transcrito a partir de um gene diferente. O mais interessante talvez seja o mecanismo de *feedback* negativo recíproco, no qual o miRNA reprime um RNAm alvo e este alvo, caso seja traduzido, também suprime a produção deste miRNA (KROL, 2010), como representado na figura 15.

Figura 15 – Mecanismos de *feedback* dos miRNAs

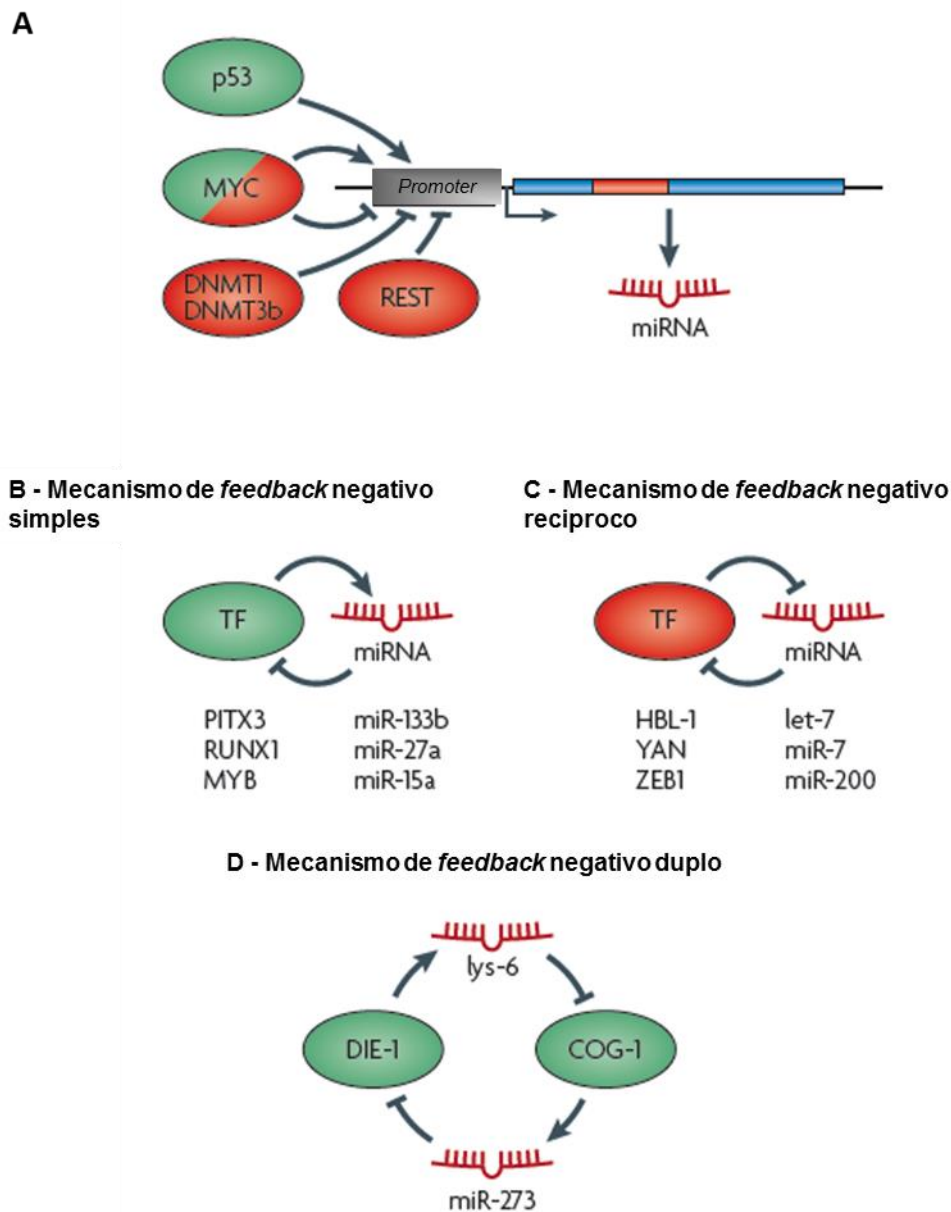


Figura 15: (A) A proteína p53 atua como fator de ativação para alguns miRNAs, MYC pode ser tanto ativador como repressor da transcrição dependendo do grupo de miRNAs observado, enquanto que as proteínas DNMTI/3 e REST são repressoras. (B) Mecanismo de *feedback* negativo simples. (C) mecanismo de *feedback* negativo recíproco. (D) Mecanismo de *feedback* negativo duplo.

Fonte: modificado de (KROL, 2010)

4.9.4 Regulação pós-transcricional da DGCR8

Muitos miRNAs possuem mecanismos de controle por *feedback* negativo, mas talvez o mais interessante seja o fato de a própria Drosha controlar a expressão da proteína DGCR8 ao clivar seu RNAm, indicando a necessidade de que haja um equilíbrio entre as duas para o funcionamento do complexo microprocessador; já foi confirmado que um excesso de DGCR8 inibe a atividade da Drosha, justificando a existência deste mecanismo (GREGORY et al., 2004).

4.9.5 Edição de miRNAs

Muitas enzimas com ação desadenilase atuam na edição de miRNAs, podendo atuar tanto em pri-miRNAs quanto pré-miRNAs, catalisando a conversão de adenosinas em inosinas e modificando tanto a sequência quanto a estrutura desse RNA. Essas alterações podem fazer com que o RNA não seja clivado pela Drosha/DICER, ou mesmo que não seja exportado para fora do núcleo. Esse conjunto de enzimas pode ser referido como ADARS (*Adenosine deaminases that act on RNA*) (KROL, 2010).

4.9.6 Manutenção de miRNAs

Outra enzima com a capacidade de editar miRNAs seria a enzima TUT7 (*Terminal Uridylyl transferase*), responsável pela manutenção de pré-miRNAs. Essa enzima é capaz de restaurar a característica de extremidade protuberante 3' com dois nucleotídeos não pareados presente nos pré-miRNAs, caso ocorra perda de um nucleotídeo nesta terminação. Se o pré-miRNA perdeu os dois nucleotídeos, a enzima irá adicionar a este RNA uma longa cauda de uracilas, isso faz com que o pré-miRNA seja marcado para degradação, desta forma, a enzima faz uma seleção de quais pré-miRNAs podem ser restaurados e quais serão degradados (KIM et al., 2015).

4.9.7 MIRNAS COMO BIOMARCADORES

Os miRNAs não circulam apenas dentro de vesículas, existem também miRNAs circulando pelo sangue, estes também apresentam uma estabilidade incomum mesmo quando circulando pelo sangue em sua forma livre e levando em conta a quantidade de RNAses presentes neste tecido (KOSAKA et al., 2014).

Embora não seja o foco deste trabalho, é impossível não mencionar o fato de que a quantificação destes miRNAs circulantes pode ser utilizada para definir um perfil da expressão de miRNAs do indivíduo, cuja alteração demonstra relação com a tumorigênese, diagnóstico e progressão de neoplasias (MITCHELL et al., 2008). O motivo de usar estes miRNAs no diagnóstico do câncer, se deve pelo fato de sua expressão estar frequentemente desregulada em células tumorais, serem relativamente tecido-específicas e apresentarem incomum estabilidade em tecidos fixados em formol, permitindo sua análise em outros tecidos além do sangue (KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010). Esses miRNAs podem ser quantificados a partir de técnicas de qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-PCR*) e comparados aos resultados anteriores da literatura para um diagnóstico de câncer (KROH et al., 2010).

CONCLUSÃO

Os miRNAs possuem mecanismos distintos dos outros RNAs endógenos quanto a sua biogênese e sua maturação. A maneira sutil, embora eficiente da regulação da expressão gênica por meio de miRNAs é essencial para a sobrevivência do indivíduo, uma vez que já foi demonstrado que sua ausência é incompatível com a vida. O papel dos miRNAs sobre as mais variadas vias, especialmente as relacionadas a proliferação e diferenciação celular, necessita de mais estudos para maior compreensão de como estes miRNAs podem interferir nestas vias, principalmente em relação ao desenvolvimento de neoplasias. Por último, também é necessário estudar a função destes pequenos RNAs como reguladores parácrinos, uma vez que o miRNA produzido dentro de uma célula pode ser transportado para meio extracelular, e em seguida para outras células.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010. 1054p.

ALTUVIA, Yael et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 8, p. 2697-2706, 2005. Disponível em: < <https://nar.oxfordjournals.org/content/33/8/2697.full> >. Acesso em: 19 jan. 2016.

BANG, Claudia et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 2136-2146, 2014. Disponível em: < <http://www.jci.org/articles/view/70577#sd> >. Acesso em: 23 mar. 2016.

BARTEL, David P. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438> >. Acesso em: 28 jun. 2015

BARTEL, David P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167326> >. Acesso em: 28 jun. 2015

BERNSTEIN, Emily et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 363-366, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201747> >. Acesso em: 28 jun. 2015

BEHM-ANSMANT, Isabelle et al. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4: NOT deadenylase and DCP1: DCP2 decapping complexes. **Genes & development**, v. 20, n. 14, p. 1885-1898, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1522082/> >. Acesso em: 21 mar. 2016

BOHNSACK, Markus T.; CZAPLINSKI, Kevin; GÖRLICH, DIRK. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 185-191, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14730017> >. Acesso em: 04 fev. 2016

BORCHERT, Glen M.; LANIER, William; DAVIDSON, Beverly L. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 12, p. 1097-1101, 2006. Disponível em: < <http://www.nature.com/nsmb/journal/v13/n12/abs/nsmb1167.html> >. Acesso em: 22 jan. 2016

BOYERINAS, Benjamin et al. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. **Endocrine-related cancer**, v. 17, n. 1, p. F19-F36, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19779035> >. Acesso em: 11 fev. 2016

BUENO, María José; DE CASTRO, Ignacio Pérez; MALUMBRES, Marcos. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. **Cell Cycle**, v. 7, n. 20, p. 3143-3148, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18843198>>. Acesso em: 19 jan. 2016

CARMELL, Michelle A. et al. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. **Genes & development**, v. 16, n. 21, p. 2733-2742, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12414724> >. Acesso em: 22 jun. 2015

CARTHEW, Richard W.; SONTHEIMER, Erik J. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 642-655, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2675692/> >. Acesso em: 22 jun. 2015

CHEN, Chang-Zheng et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, v. 303, n. 5654, p. 83-86, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657504> >. Acesso em: 19 jan. 2016

CHENDRIMADA, Thimmaiah P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740-744, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15973356>>. Acesso em: 22 fev. 2016

CHOUDHURY, NilaRoy; MICHLEWSKI, Gracjan. Terminal loop-mediated control of microRNA biogenesis. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 4, p. 789, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22817735> >. Acesso em: 22 fev. 2016

DAVIS, Brandi N. et al. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. **Molecular cell**, v. 39, n. 3, p. 373-384, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705240> >. Acesso em: 18 fev. 2016

EULALIO, Ana; TRITSCHLER, Felix; IZAURRALDE, Elisa. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. **RNA** v. 15, n. 8, p. 1433-1442, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714752/> >. Acesso em: 14 mar. 2016

FILIPOWICZ, Witold. RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. **Cell**, v. 122, n. 1, p. 17-20, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009129> >. Acesso em: 19 jan. 2016

GAMA-CARVALHO, Margarida; ANDRADE, Jorge; BRÁS-ROSÁRIO, Luis. Regulation of cardiac cell fate by microRNAs: implications for heart regeneration. **Cells**, v. 3, n. 4, p. 996-1026, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25358052> >. Acesso em: 18 jan. 2016

GIBBINGS, Derrick J. et al. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. **Nature cell biology**, v. 11,

n. 9, p. 1143-1149, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684575>>. Acesso em: 01 abr. 2016

GREGORY, Richard I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-240, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531877> >. Acesso em: 23 fev. 2016

GOODALL, Emily F. et al. Neuronal dark matter: the emerging role of microRNAs in neurodegeneration. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 7, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24133413> >. Acesso em: 18 jan. 2016

HAN, Jinju et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & development**, v. 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15574589> >. Acesso em: 18 jan. 2016

HAYASHITA, Yoji et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. **Cancer research**, v. 65, n. 21, p. 9628-9632, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16266980> >. Acesso em: 19 jan. 2016

HERGENREIDER, Eduard et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. **Nature cell biology**, v. 14, n. 3, p. 249-256, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22327366> >. Acesso em: 01 abr. 2016

HÖCK, Julia; MEISTER, Gunter. The Argonaute protein family. **Genome Biology**, v. 9, n. 2, p. 210, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304383> >. Acesso em: 28 jun. 2015

HWANG, H-w; MENDELL, Jt. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **British Journal of Cancer**. UK, p. 776-780. out. 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495913> >. Acesso em: 28 jun. 2015

IWASAKI, Yuka W. et al. Global microRNA elevation by inducible Exportin 5 regulates cell cycle entry. **RNA**, v. 19, n. 4, p. 490-497, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23431327> >. Acesso em: 04 fev. 2016

KIM, Boseon et al. TUT7 controls the fate of precursor microRNAs by using three different uridylation mechanisms. **The EMBO journal**, p. e201590931, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25979828> >. Acesso em: 21 mar. 2016

KIM, V. Narry. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, p. 376-385, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15852042> >. Acesso em: 19 jan. 2016

KOSAKA, Nobuyoshi; IGUCHI, Haruhisa; OCHIYA, Takahiro. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. **Cancer science**, v. 101, n. 10, p. 2087-2092, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20624164> >. Acesso em: 22 mar. 2016

KOSAKA, Nobuyoshi et al. Trash or Treasure: extracellular microRNAs and cell-to-cell communication. **The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids**, p. 37, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763217/>>. Acesso em: 22 mar. 2016

KROH, Evan M. et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). **Methods**, v. 50, n. 4, p. 298-301, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20146939/>>. Acesso em: 24 mar. 2016

KROL, Jacek et al. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597, 2010. Disponível em: < <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n9/abs/nrg2843.html>> Acesso em: 28 jan. 2016

KUMARSWAMY, Regalla; VOLKMANN, Ingo; THUM, Thomas. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. **RNA biology**, v. 8, n. 5, p. 706-713, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3256347/>> Acesso em: 22 mar. 2016

LAGOS-QUINTANA, Mariana et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853-858, 2001. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679670> > Acesso em: 19 jan. 2016

LARES, Monica R.; ROSSI, John J.; OUELLET, Dominique L. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 11, p. 570-579, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20833440> > Acesso em: 19 jan. 2016

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621> > Acesso em: 15 fev. 2016

LEE, Yoontae et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524334/> > Acesso em: 19 jan. 2016

LEE, Yoontae et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO journal**, v. 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12198168> > Acesso em: 28 jun. 2015

LEWIS, Benjamin P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-798, 2003. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697198> > Acesso em: 28 jun. 2015

LEWIS, Benjamin P.; BURGE, Christopher B.; BARTEL, David P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are

microRNA targets. **cell**, v. 120, n. 1, p. 15-20, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15652477> > Acesso em: 28 jun. 2015

LIN, Shi-Lung; MILLER, Joseph D.; YING, Shao-Yao. Intronic microRNA (miRNA). **BioMed Research International**, v. 2, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1559912/>> Acesso em: 19 jan. 2016

MALONE, Colin D.; HANNON, Gregory J. Small RNAs as guardians of the genome. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 656-668, 2009. Disponível em: < [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(09\)00127-5](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(09)00127-5) > Acesso em: 28 jun 2015

MARCO, Antonio; NINOVA, Maria; GRIFFITHS-JONES, Sam. Multiple products from microRNA transcripts. **Biochemical Society transactions**, v. 41, n. 4, p. 850-854, 2013. Disponível em: < <http://www.biochemsoctrans.org/content/ppbiost/41/4/850.full.pdf> > Acesso em: 18 jan. 2016

MEISTER, Gunter et al. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. **Molecular cell**, v. 15, n. 2, p. 185-197, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260970> > Acesso em: 18 jan. 2016

MELO, Sonia A. et al. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. **Nature genetics**, v. 41, n. 3, p. 365-370, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219043> > Acesso em: 22 fev. 2016

MICHLEWSKI, Gracjan et al. Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops. **Molecular cell**, v. 32, n. 3, p. 383-393, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995836> > Acesso em: 19 fev. 2016

MITCHELL, Patrick S. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10513-10518, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995836>> Acesso em: 01 abr. 2016

MONTECALVO, Angela et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 756-766, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22031862> > Acesso em: 01 abr. 2016

MONTEMAYOR, Eric J. et al. Structural basis of lariat RNA recognition by the intron debranching enzyme Dbr1. **Nucleic acids research**, p.725, 2014. Disponível em: < <http://nar.oxfordjournals.org/content/early/2014/08/12/nar.gku725.full>> Acesso em: 02 fev. 2016

MOREL, Jean-Benoit et al. Fertile hypomorphic ARGONAUTE (ago1) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. **The Plant Cell**, v. 14, n. 3, p. 629-639, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910010> > Acesso em: 27 jun. 2015

NISHI, Kenji et al. Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus. **RNA**, v. 19, n. 1, p. 17-35, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23150874> > Acesso em: 14 fev, 2016

OBERNOSTERER, Gregor et al. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. **RNA**, v. 12, n. 7, p. 1161-1167, 2006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16738409> > Acesso em: 27 jun. 2015

OKAMURA, Katsutomo et al. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. **Cell**, v. 130, n. 1, p. 89-100, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599402> > Acesso em: 02 fev. 2016

OKAMURA, Katsutomo; CHUNG, Wei-Jen; LAI, Eric C. The long and short of inverted repeat genes in animals: microRNAs, mirtrons and hairpin RNAs. **Cell Cycle**, v. 7, n. 18, p. 2840-2845, 2008. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769156> > Acesso em: 02 fev. 2016

PARKER, Roy; SHETH, Ujwal. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Molecular cell**, v. 25, n. 5, p. 635-646, 2007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349952> > Acesso em: 02 fev. 2016

RAMALINGAM, Pradeep et al. Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. **RNA** v. 20, n. 1, p. 76-87, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24226766> > Acesso em: 02 fev. 2016

RAPOSO, Graça; STOORVOGEL, Willem. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of cell biology**, v. 200, n. 4, p. 373-383, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23420871> > Acesso em: 24 mar. 2016

RODRIGUEZ, Antony et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome research**, v. 14, n. 10a, p. 1902-1910, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364901> > Acesso em: 02 fev. 2016

ROUT, Michael P.; AITCHISON, John D. The nuclear pore complex as a transport machine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 20, p. 16593-16596, 2001. Disponível em: < <http://www.jbc.org/content/276/20/16593.full> > Acesso em: 14 fev. 2016

STOORVOGEL, Willem. Functional transfer of microRNA by exosomes. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 646-648, 2012. Disponível em: < <http://www.bloodjournal.org/content/119/3/646?sso-checked=true> > Acesso em: 24 mar. 2016

TIJSTERMAN, Marcel; PLASTERK, Ronald HA. Dicers at RISC: the mechanism of RNAi. **Cell**, v. 117, n. 1, p. 1-3, 2004. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404002934> > Acesso em: 28 jun. 2015

TWORAK, Aleksander et al. Six *Medicago truncatula* Dicer-like protein genes are expressed in plant cells and upregulated in nodules. **Plant Cell Reports**, p. 1-10, 2016. Disponível em: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s00299-016-1936-8> > Acesso em: 19 jan. 2016

TOMARI, Yukihide; ZAMORE, Phillip D. MicroRNA biogenesis: Drosha can't cut it without a partner. **Current Biology**, v. 15, n. 2, p. R61-R64, 2005. Disponível em: < [http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822\(04\)01040-1](http://www.cell.com/current-biology/abstract/S0960-9822(04)01040-1) > Acesso em: 19 jan. 2016

TRUSCOTT, Mary; ISLAM, Abul BMMK; FROLOV, Maxim V. Novel regulation and functional interaction of polycistronic miRNAs. **RNA**, 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26554028> > Acesso em: 02 fev. 2016

TSUTSUMI, Akihisa et al. Recognition of the pre-miRNA structure by *Drosophila* Dicer-1. **Nature structural & molecular biology**, v. 18, n. 10, p. 1153-1158, 2011. Disponível em: < <http://www.nature.com/nsmb/journal/v18/n10/full/nsmb.2125.html> > Acesso em: 18 jan. 2016

VISWANATHAN, Srinivas R.; DALEY, George Q. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. **Cell**, v. 140, n. 4, p. 445-449, 2010. Disponível em: < [http://www.cell.com/abstract/S0092-8674\(10\)00122-4](http://www.cell.com/abstract/S0092-8674(10)00122-4) > Acesso em: 19 jan. 2016

WAHL, Markus C.; WILL, Cindy L.; LÜHRMANN, Reinhard. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 701-718, 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239890> > Acesso em: 02 fev. 2016

WEN, Jiayu et al. Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. **PLoS Comput Biol**, v. 11, n. 9, p. e1004441, 2015. Disponível em: < <http://journals.plos.org/ploscompbiol/article?id=10.1371/journal.pcbi.1004441> > Acesso em: 02 fev. 2016

YANG, Jr-Shiuan et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 34, p. 15163-15168, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20699384> > Acesso em: 03 mar. 2016

YANG, Tongwen; XUE, Lingui; AN, Lizhe. Functional diversity of miRNA in plants. **Plant Science**, v. 172, n. 3, p. 423-432, 2007. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945206002986> > Acesso em: 05 mar. 2016

YI, Rui et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & development**, v. 17, n. 24, p. 3011-3016, 2003. Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305252/> > Acesso em: 14 fev. 2016

ZENG, Yan; CULLEN, Bryan R. Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27595-27603, 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932881> > Acesso em: 19 fev. 2016

ZHANG, Haidi et al. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. **The EMBO journal**, v. 21, n. 21, p. 5875-5885, 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC131079/> > Acesso em: 24 fev. 2016