

Trabalho de Conclusão de Curso

**Seleção de braços e *arm switching* de microRNAs:
uma revisão sistemática**

LEANDRO DE BRITO GONÇALVES

Botucatu-SP
Novembro de 2023

LEANDRO DE BRITO GONÇALVES

Seleção de braços e *arm switching* de microRNAs: uma revisão sistemática

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista “UNESP” - Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em ciências biológicas.

Orientador: Prof. Danillo Pinhal

BOTUCATU
2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Gonçalves, Leandro de Brito.

Seleção de braços e *arm switching* de microRNAs : uma
revisão sistemática / Leandro de Brito Gonçalves. - Botucatu,
2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Danillo Pinhal

Capes: 20204000

1. Genética. 2. MicroRNAs. 3. Regulação da Expressão
Gênica.

Palavras-chave: *Arm Switching*; Genética; MicroRNAs;
Regulação.

Leandro de Brito Gonçalves

Seleção de braços e *arm switching* de microRNAs: uma revisão sistemática

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Botucatu, para obtenção do título de bacharel em ciências biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Danilo Pinhal

Avaliadores:

Prof. Dr. Danilo Pinhal

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Campus Botucatu

Dr. Pedro Gabriel Nachtigall

Botucatu, _____ de _____ de _____.

Dedicatória

Para todos os familiares e amigos que me
acompanharam e que cuidaram de mim
no momento em que mais precisei.

Resumo

GONÇALVES, Leandro de Brito. **Seleção de braços e arm switching de microRNAs: uma revisão sistemática**. 2023. 47 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Instituto de biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2023.

MicroRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas que regulam a expressão de genes pós-transcricionalmente em organismos multicelulares, reprimindo a expressão de mRNAs alvos. Esses pequenos RNAs de aproximadamente 22 nt têm a capacidade de reconhecer o RNA mensageiro alvo, por complementaridade de bases. Uma região chave do miRNA chamada de região 'seed' reconhece especialmente a região 3'UTR do mRNA alvo e, junto ao RISC (*RNA-Induced silencing complex*) protagonizado pela enzima argonauta (AGO), reprime o alvo influenciando a expressão fenotípica do organismo. A depender dos processos a que é submetido durante sua biogênese, o precursor *hairpin* de um miRNA tem um de seus braços selecionados preferencialmente pelo RISC. Cada um destes braços possui sequências distintas, inclusive, uma região 'seed' determinante para identificação de repertório de mRNAs alvos por complementaridade. *Arm switching* é um fenômeno de troca da prevalência de braços de microRNAs de um mesmo precursor em resposta à mudança contextual celular através de um conjunto mecanismos que interagem entre eles. Este trabalho tem como objetivo mostrar o atual estado da arte do conhecimento sobre os processos moleculares e fatores biológicos que levam a mudança de braços de miRNA (i.e., *arm switching*) em animais. No presente estudo, os processos foram categorizados em fatores intrínsecos e extrínsecos devido às propriedades químicas dos miRNAs.

Palavras-chave: genética animal, microRNA, arm switching, regulação genética, seleção de braços, estabilidade termodinâmica, biogênese.

Abstract

GONÇALVES, Leandro de Brito. **Arm selection and microRNAs arm switching: a systematic review.** 2023. 47 f. Undergraduate Thesis (Bachelor Degree in Biological Sciences) - Institute of biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2023.

MicroRNAs (miRNAs) are small molecules that regulate gene expression post-transcriptionally in multicellular organisms by repressing the expression of target mRNAs. These small RNAs of approximately 22 nt can pair with a target messenger RNA (mRNA), due to base complementarity. A key region of the miRNA called the 'seed' primarily pair with 3' UTR of target mRNA and, together with the RISC (RNA-induced silencing complex) carried out by the enzyme Argonaute (AGO), represses the target, influencing the phenotypic expression of the organism. Depending on the processes to which it is subjected during its biogenesis, the hairpin precursor of a miRNA has one of its arms preferentially selected by the RISC. Each of these arms has distinct sequences, including the 'seed' region for identifying a repertoire of target mRNAs through complementarity. Arm switching is defined as the inversion of the prevalence of one microRNA arm from the one of the same precursor in response to cellular contextual change through a set of mechanisms that interact between them. This work aims to show the current state of the art of knowledge about the molecular processes and biological factors that lead to the change of miRNA arms (i.e., arm switching) in animals. In the present study, the processes were categorized into intrinsic and extrinsic factors due to the chemical properties of miRNAs.

Key words: animal genetics, microRNA, arm switching, gene regulation, arm selection, thermodynamic stability, biogenesis

Sumário

- 1. Introdução ao problema abordado**
- 2. Justificativa e objetivos**
- 3. Biogênese canônica de miRNAs em metazoários**
- 4. Mecanismos de seleção de braços de miRNAs maduros funcionais**
- 5. Seleção alternativa de braços de miRNAs ou “arm switching”**
- 6. Fatores de seleção de braço e arm switching**
 - 6.1 Intrínsecos ao dsRNA
 - 6.1.1 Estabilidade termodinâmica relativa dos terminais 5’do pre-miRNA
 - 6.1.2 Mal-pareamento central no duplex.
 - 6.1.3 Exposição do fosfato 5’ e identidade do nucleotídeo 5’ terminal
 - 6.1.4 Twin-drive model: modelo de acionamento duplo
 - 6.2 Extrínsecos ao dsRNA
 - 6.2.1 Clivagem diferencial das terminações
 - 6.2.2 Adição pós-transcricional de cauda à terminação do miRNA (miRNA tailing)
 - 6.4 Inibição competitiva de miRNAs por outros RNAs do transcriptoma
 - 6.5 Duplicação de genes de miRNAs.
- 7.Considerações Finais**
- 8. Metodologia de busca**

1. Introdução ao problema abordado

Desde sua descoberta em 1993 em estudos sobre o desenvolvimento de helmintos, os microRNAs (miRNAs) foram encontrados em diversos grupos eucariotos, inclusive em humanos (Bartel 2018; Berezikov 2011). Essas pequenas, porém abundantes moléculas, representam de uma nova camada do complexo sistema de regulação gênica e fisiológica, por onde mecanismos adaptativos e evolutivos atuam. Desde então, foram feitas diversas descobertas sobre as funções regulatórias de RNA, incluindo aspectos de sua estrutura, biogênese, pareamento, vias biológicas que participam e como a seleção natural atua sobre elas.

Os miRNAs, bem como outros transcritos não-codificantes de proteínas, são reconhecidos como elementos fundamentais na regulação de mecanismos biológicos diversos, incluindo ontogênese, diferenciação celular, regeneração, e em diversas doenças, especialmente no câncer. Por estes motivos, um crescente corpo de estudos com interesse nos princípios de função, regulação e evolução de miRNAs se estabeleceu nas duas últimas décadas e continua a crescer.

Os miRNAs são pequenas moléculas não codificantes (~22nt) que contém uma sequência determinante na porção 5' chamada região *seed* (2-8 nt) que canonicamente age junto a um complexo silenciador no reconhecimento de sítios complementares (*microRNA recognition elements*; MREs) na porção 3'UTR dos transcritos de RNAs mensageiros (mRNAs) alvo. O pareamento simples de "Watson e Crick" entre miRNA-mRNA pode levar à inibição da transcrição com o bloqueio da tradução ou a degradação da molécula alvo. Como cada família de miRNA é determinada pela identidade de bases da região *seed*, pressupõe-se possuir um repertório de mRNAs alvo comuns. Assim, cada família de miRNA usualmente está associada à regulação de processos biológicos específicos.

De modo geral, os genes de miRNA são transcritos pela maquinaria das células e, em seguida, processados pelas enzimas Drosha e Dicer, resultando em um duplex de RNA. Cada fita deste duplex de RNA é denominada como o "braço" do miRNA. Após, este duplex é incorporado ao complexo protéico de silenciamento induzido por RNA (RISC) que possui uma enzima da família Argonauta (AGO) como molécula principal. Com este acoplamento, ocorrem mecanismos que levam ao *strand selection* (seleção preferencial de um dos braços

de miRNA), o qual terá atividade funcional, enquanto o outro é prontamente degradado. Em RISCs distintos, diferentes braços de um mesmo precursor de miRNA (pre-miRNA) podem ser preferencialmente selecionados.

Estudos que quantificam a expressão de miRNAs mostram que os braços complementares de um mesmo pre-miRNA normalmente se acumulam nas células em quantidades constantes e assimétricas, indicando que a seleção de braços é enviesada a uma proporção de abundância relativa entre os braços de um mesmo precursor (Ro et al., 2007; Landgraf et al., 2007; Bartel 2018). Ainda, estudos comparativos mostram que a seleção de braços de miRNAs pode variar entre tipos de tecidos, entre fases de desenvolvimento e até mesmo entre espécies. Isto indica que a fase de seleção de braços de miRNA é um processo direcionado e coordenado por variáveis ainda não totalmente conhecidas. Esta diferença na preferência seletiva implica na flutuação da abundância de transcritos de miRNAs funcionalmente ativos acoplados aos complexos RISC, no que parece ser um mecanismo positivamente selecionado ao longo da evolução por viabilizar melhores respostas adaptativas frente às mudanças de contexto celular, tecidual ou do organismo no ambiente. Desta forma, havendo a seleção diferencial de braços temos por vezes a mudança na abundância relativa entre os transcritos funcionais de miRNA que é denominada "*arm switching*" (Figura 1). Este evento é reconhecido como um processo ativo de otimização e auto-regulação funcional das células que atua de forma rápida e localizada sobre o conjunto de miRNAs expressos (miRNoma). Logo, o *arm switching* parece ter se fixado em diferentes táxons como um mecanismo celular adaptativo, no qual processos de modulação de fenótipo favorecem respostas adaptativas do organismo. Além disso, a ocorrência de *arm switching* parece estar associada a doenças e desordens, tornando-o um potencial biomarcador, de modo que seu mapeamento pode oferecer *insights* para o desenvolvimento de novas biotecnologias na área da saúde.

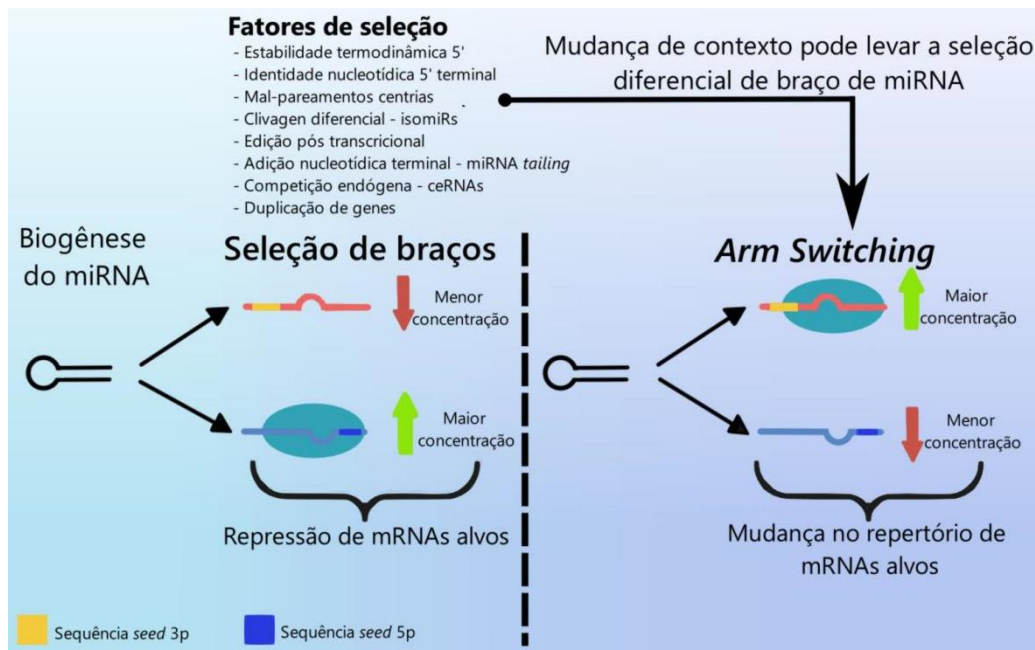


Figura 1 | *Arm switching* são eventos de mudança do braço preferencialmente selecionado de um miRNA precursor o que presumidamente leva a uma mudança do repertório de mRNAs alvos. Diversos fatores revisados neste trabalho podem determinar a seleção de braço de miRNA podem levar ao *arm switching*.

Fonte: Imagem elaborada pelo autor

2. Justificativa e objetivos

Apesar da centralidade dos eventos de *arm switching* de miRNAs e do crescente corpo de evidências acerca de seu impacto funcional e evolutivo, permanecem ainda abertas diversas lacunas no conhecimento sobre este fenômeno, especialmente no que diz respeito às variáveis que o governam. O objetivo deste trabalho de conclusão de curso é fornecer uma revisão sistemática do atual estado da arte sobre os mecanismos de seleção de braços e *arm switching*, discutindo aspectos causais, os processos biológicos subjacentes, importância biológica e evolutiva bem como propor uma discussão sobre o tema e trazer perspectivas futuras sobre os processos biológicos e temas abordados.

3. Biogênese canônica de miRNAs em metazoários

O processo de biogênese de miRNAs já foi amplamente estudada e hoje conta com uma robusta literatura, incluindo diversos artigos de revisão (Ha e Kim, 2014, Bartel 2018,

Gebert e MacRae 2019; Figura 2). Durante a biogênese, os genes de miRNA são transcritos pela enzima RNA polimerase II (Figura 2a). Cerca de 15% dos miRNAs são classificados como miRtrons seus genes estão contidos em introns de outros genes e são codificados junto a eles e processados independentemente da enzima Drosha (Salim et al., 2022; Berezikov 2011). O transcrito inicial é chamado de pri-miRNA (microRNA primário), passará por várias etapas de processamento até se formar uma fita de miRNA madura biologicamente funcional. O pri-miRNA tipicamente apresenta uma estrutura secundária em forma de *hairpin* ou *stem loop* com uma região de dupla fita, *stem*, de aproximadamente 33-39 pb conectadas por um *loop* em fita simples e flanqueada por uma cap 5' e uma cauda poli(A) 3' (Figura 2b) (Han et al., 2006; Ha e Kim, 2014; Kwon et al., 2016). Ainda no núcleo, em metazoários, ocorre o processamento inicial pelo complexo microprocessador, composto pela enzima conservada em animais Drosha e pela coenzima *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8; homóloga a Pasha de *Drosophila melanogaster* e PASH-1 em *Caenorhabditis elegans*) (Figura 2b). O complexo Drosha-DGCR8 exibe atividade endorribonucleolítica típica de RNases III reconhecendo o pri-miRNA e clivando-o aproximadamente na posição de 11 pb posterior a junção basal, removendo as regiões flanqueadoras e parte da dupla fita deixando saliências de 2 nt nas terminações 3' expondo fosfato 5'. Essas saliências têm um papel crucial no reconhecimento de miRNAs, devido à assimetria termodinâmica resultante de sua estrutura. (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Nicholson et al., 2014). O produto formado nessa etapa é o pre-miRNA (microRNA precursor) que mantém a estrutura *stem loop* com cerca de 65-70 nt (figura 2c) (Know et al., 2016). A Exportina (XPO5) junto a RAN-GTP (*RAS-related Nuclear protein-GTPase*) exportam o pre-miRNA ao citoplasma (Figura 2c) (Kim et al., 2016; Clancy et al., 2019). Uma vez no citoplasma, o pre-miRNA é reconhecido pela enzima Dicer, outra enzima da família RNase III. Existem diversos homólogos de Dicer amplamente distribuídos em eucariotos, cada um desempenhando uma variedade de funções. A Dicer é conhecida como uma "régua molecular" porque é capaz de realizar clivagens com base na contagem de nucleotídeos. As saliências do pré-miRNA geradas pela Drosha são reconhecidas pelo domínio PAZ (PIWI-Argonaute-ZWILLE) da Dicer (Figura 3a). Em vertebrados, a Dicer opera junto a outras duas proteínas parálogas auxiliares de reconhecimento de dsRNA (dsRBP), a TRBP (*transactivation response element RNA-binding protein*) e PACT (*protein activator of PKR*). A Dicer realiza a clivagem do pré-miRNA próximo à região *loop*, com base na contagem de nucleotídeos a partir das saliências (Figura 2d). Existem duas maneiras de

medir o ponto de clivagem. No caso em que a porção 5' é mais estável, o pre-miRNA se acomoda no sítio de reconhecimento 3' no domínio PAZ da Dicer. A contagem é feita a partir da parte 3' (*3'-counting rule*), e a clivagem ocorre entre 21-25 nt do ponto de medição, dependendo da isoforma da Dicer. Em certos casos, quando a extremidade 5' do pre-miRNA é relativamente instável devido ao mal-pareamento, o miRNA é ajustado no sítio de reconhecimento de no domínio plataforma, alterando a contagem de nucleotídeos, e a clivagem ocorre a 22 nt a partir da terminação 5' (*5'-counting rule*) (Figura 2a) (Kim et al., 2020). Essas clivagens diferenciais podem levar à geração de variantes de miRNAs chamados isomiRs. (revisado por Dhanoa et al., 2019; Nielsen, Goodall e Bracken 2012).

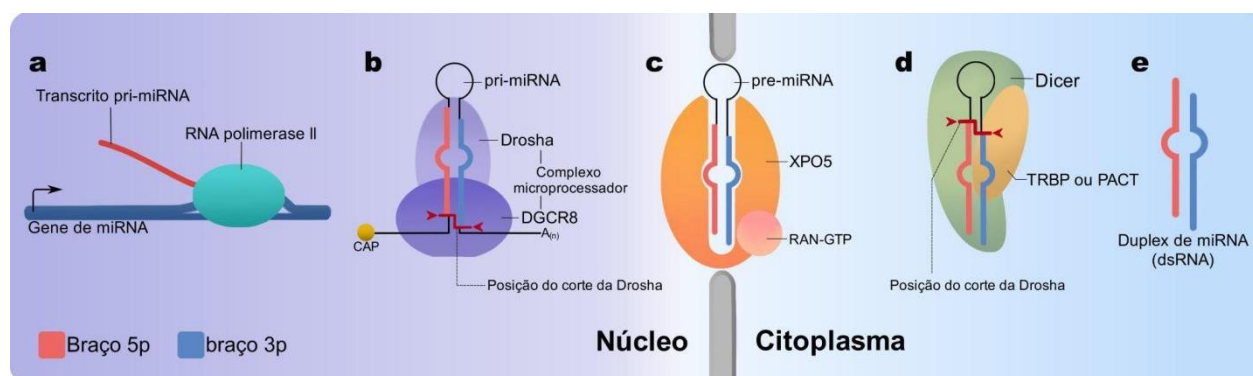


Figura 2 | Biogênese de miRNAs. (a) a transcrição do gene de miRNA é feita RNA polimerase II. (b) logo o transcrito primário pri-miRNA é incorporado ao complexo microprocessador composto pela Drosha e DGCR8 que cliva o pri-miRNA a 11 nt de sua junção basal representado pela linha e setas em vermelho. (c) A molécula resultante é o pre-miRNA e esta é exportada ao citoplasma pelas XPO5 com associação com a RAN-GTP. (d) No citoplasma, o complexo formado pela Dicer, TRBP e/ou PACT em humanos que promovem a clivagem na região *loop* do pré-miRNA. A Dicer é reconhecida por ser uma “régua molecular” por ser capaz de contar 22 nt para sua clivagem. (e) Forma-se um duplex de braços de miRNA ao qual será incorporado o RISC. Fonte: Imagem elaborada pelo autor

O produto da clivagem realizada pela Dicer tipicamente resulta em uma molécula de dsRNA com aproximadamente 22 nt pareados. Este duplex apresenta saliências de 2 nt em cada uma dos terminais 3' (Figura 2e). MiRNAs de um mesmo precursor são chamados de fitas complementares e cada uma dessas fitas ganha a denominação de ‘braço’. A princípio, o braço que normalmente encontrado em amostras biológicas era chamado de braço ou fita guia ou simplesmente miR enquanto seu complementar era chamado braço ou fita passageira ou miR* (Bartel 2018, Guo e Lu 2010). Atualmente, esta é uma nomenclatura em desuso e recomenda-se o uso dos sufixos -5p ou -3p (Medley et al., 2020) que se referem a

duplex durante a incorporação ao RISC. O domínio PAZ reconhece as terminações 3'. Os resíduos na interface entre os domínios MID e PIWI correspondem a uma região de reconhecimento de nucleotídeos 5'. Em humanos, o domínio PIWI da Ago2 tem atividade endoribonucleolítica conhecida como “*slicer*” (Liu et al., 2004; Willkomm et al., 2022; Mallick et al., 2019).

O RISC seleciona preferencialmente apenas um dos braços do duplex por um processo específico que na literatura pode ser referido com os termos *strand selection*, *asymmetric selection* ou *arm-sorting* (Okamura et al., 2009; Hu et al., 2009; Marco et al., 2012; Suzuki et al., 2015; Kim et al., 2020; Medley et al., 2021). Os braços de um mesmo precursor tendem a se acumular em razões desproporcionais e em taxas significativamente constantes. Esse fenômeno é relevante para determinar o padrão de silenciamento mediado pelo complexo miRISC, o qual influenciará vias biológicas e fenótipos específicos.

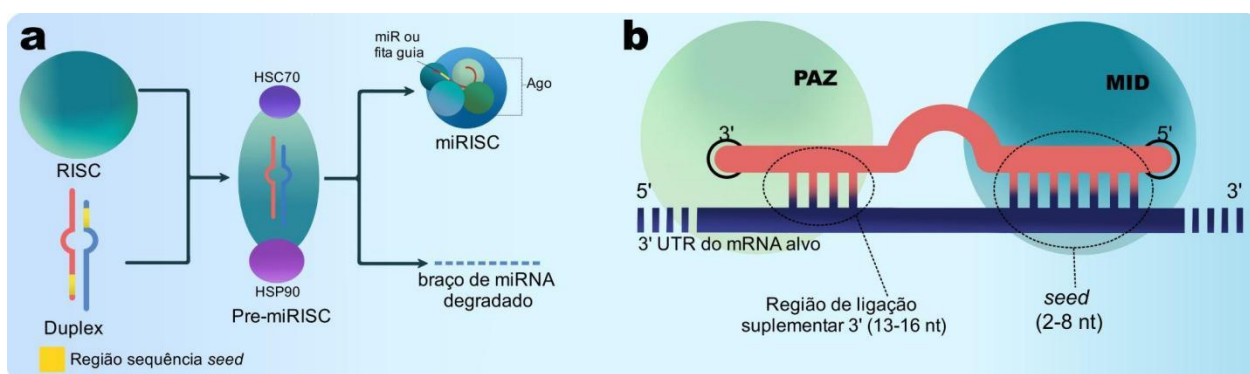


Figura 4 | Incorporação do duplex ao RISC e interação miRNA-mRNA alvo. **(a)** O RISC incorpora o duplex de miRNA (pré-miRISC) com a assistência das Chaperonas HSP90 e HSC70 com a alteração do formato da Ago. Após a ejeção da fita passageira, essa é prontamente degradada e há a formação do miRISC que será atuante. **(b)** O reconhecimento dos alvos pelo miRISC ocorre pela identificação da região 3'UTR de mRNAs por meio de MREs como a região complementar 3' (13-16 nt) mas principalmente pela região *seed* (2-8 nt). Fonte: imagem elaborada pelo autor

No miRISC, a sequência incorporada servirá como referencial que se ligará por complementaridade de bases ao mRNA alvo, comumente à região 3'UTR (3' *untranslated region*) deste. Os nucleotídeos de posição 2-7 na porção 5' correspondem ao *motif* crítico para o reconhecimento dos mRNAs alvo chamado *seed* (Figura 4b). Uma família de miRNAs perfaz um conjunto de transcritos cuja região *seed* é idêntica e, portanto, pressupõe-se que reconheçam um repertório equivalente de mRNAs alvos (Pasquinelli, 2012). Ainda, outras

formas de reconhecimento de MREs (miRNAs *recognition sites*) são conhecidas (Marco 2014). Apesar de mais raras, demonstram ter um papel fisiologicamente importante. Um pareamento complementar entre os nucleotídeos 11-20 próximos à terminação 3' do miRNA maduro foi identificado como funcionalmente relevante, ainda que o pareamento da região *seed* tenha sido insuficiente (Figura 4b) (Broughton, 2016). Além disso, o repertório de alvos de miRNAs pode flutuar em casos em que as regiões centrais de miRNA identificam regiões flangeadoras das *seed* ou diferentes MREs. Novas classes de elementos de reconhecimento em regiões codificantes estão sendo reportadas e propostas (Zhang et al., 2018). Estes elementos de reconhecimento não seguem o padrão canônico de pareamento com a região *seed* e demonstram ser relevantes uma vez que há indícios de impactar diferencialmente nos mecanismos regulatórios (Seok et al., 2016; Chipman e Pasquinelli 2019)

Uma vez identificado o mRNA alvo, a Ago e outras proteínas do miRISC são responsáveis pela atividade catalítica. Em animais, diversos processos controlam a população de mRNAs, como a repressão da tradução, desestabilização e, mais raramente, degradação do alvo.

4. Mecanismos de seleção de braços de miRNAs maduros funcionais

Strand selection ou seleção de braços é o processo da biogênese pelo qual uma das fitas do mesmo pre-miRNA é selecionada de forma não aleatória pelo RISC para ser incorporada. A prevalência e abundância de braços de miRNAs têm impacto direto na expressão de fenótipos, uma vez que a mudança do braço de miRNA incorporado ao RISC resulta em uma alteração nos alvos afetados. Conforme mencionado anteriormente, apenas uma das fitas do duplex se torna biologicamente funcional.

Ao sequenciar miRNAs, observa-se que eles se acumulam nos tecidos seguindo determinados padrões de concentração de um dos braços em relação ao seu complementar, gerando uma relação de abundância relativa 5p/3p. Em moscas, a incorporação de miRNAs ocorre facilmente à Ago1 devido a alterações nas posições 9-10 do duplex. Porém, é possível ocorrer a incorporação do duplex à Ago2 através do RISC-*Loading complex* (RLC) composto pela Dicer (Dcr-2) e uma enzima acompanhante R2D2 (Czech et al., 2009; Förstemann et al., 2007; Tomari, Du e Zamore 2007). Em *C. elegans* a incorporação ocorre pela ação da família ALG (*Argonaute like Genes*) (Aalto et al., 2018).

Em mamíferos, todos os quatro membros da família ArgonAUTa podem incorporar miRNAs com preferência a duplex com mal-pareamentos internos, nas posições nucleotídicas de 8-11 (Su et al., 2009, Okamura et al., 2009). Apesar das diferenças que distinguem cada membro da família argonauta, não existe diferença evidente destas proteínas em mamíferos quando se trata da atividade de incorporação de miRNAs (Suzuki et al., 2015).

Os mecanismos que determinam a seleção de braços ainda não são totalmente esclarecidos, mas as principais evidências sugerem que a determinação de qual fita é preferencialmente selecionada é conduzida principalmente por propriedades termodinâmicas do duplex de RNA e das enzimas envolvidas na biogênese. É consenso que as duas propriedades que melhor explicam a seleção de braços são: (I) a estabilidade termodinâmica da porção 5' e (II) a identidade dos nucleotídeos 5'. Estas propriedades termodinâmicas contribuem simultaneamente, e, dentro desta abordagem, são descritas duas formas de ejeção do braço passageiro (aquele que terá curta duração no miRISC e será prontamente degradado). A primeira forma é *slicer*-independente e *slicer*-dependente. (Suzuki et al., 2015).

Porém, recentemente tem sido observado casos onde a prevalência de um braço de miRNA não segue, necessariamente, as regras supracitadas, deixando a sugestão de que outros fatores e propriedades podem também influenciar na seleção de braços. Por exemplo, em alguns casos, miRNAs maduros previamente estabelecidos como sendo fita guia, seja pela expressão prevalente ou pelas propriedades termodinâmicas mencionadas, não foram aqueles predominantemente expressos quando em diferentes contextos celulares. Ro e colaboradores (2007) analisaram as sequências de miRNAs humanos disponíveis no banco de dados miRBase (Maio de 2007, Griffiths-Jones et al., 2006) e verificaram que 75% destes miRNAs (57 de 76 pares) não seguiram a seleção de braços conforme o esperado pela regra termodinâmica. Ainda, neste mesmo trabalho, encontraram 32 pares expressos em outras espécies que também não seguiram essa regra. Medley e colaboradores (2020) fizeram outra análise considerando também a identidade do nucleotídeo 5' e concluíram que essas duas regras por si só não determinam a seleção de braços. Ao analisar dados do miRBase (Versão 22.1, Kozomara et al., 2019) de *C. elegans*, *D. melanogaster* e *H. sapiens* constataram que mais da metade das seleções de braços de miRNAs não são explicados por nenhuma dessas propriedades conjuntamente, e entre 17 e 25% não são explicados por nenhuma dessas propriedades separadamente. Ainda, há casos, como o do mir-34 humano, ao qual suas anotações são de funções distintas para

cada um dos braços, mas são expressos em razões 5p/3p significativamente equivalentes em certos tecidos (Córdova-Rivas et al., 2019, Feng et al., 2019), dificultando, assim, determinar qual das fitas é a guia. A razão entre as fitas 5p/3p não é fixa e oscila dependendo do contexto (Hu et al., 2009; Ro et al., 2007). Levando em conta estas evidências, o padrão contexto-dependente da razão de braços de miRNA é frequentemente denominada uso de braços (*arm usage* - padrão ou perfil de expressão de braços em determinados contextos) e demonstra que o viés de seleção de braços não é inalterável (Marco et al., 2010, 2012; Griffith-Jones et al., 2011).

Não só o padrão de uso de braços pode variar entre tecidos, o padrão de abundância relativa entre os braços também flutua entre tecidos (Ro et al., 2007; Landgraf et al., 2007; Cloonan et al., 2011; Gong et al., 2014; Pundhir e Gorodikin, 2015; Ludwig et al., 2016; Nong et al., 2020), ao longo dos estágios de desenvolvimento (Jagadeeswaran et al., 2010; Sayed e Abdellatif, 2011; Glazov et al., 2015; Pinhal et al., 2018; Oliveira et al., 2022), entre machos e fêmeas em uma mesma espécie (Bizuyehu et al., 2012; Guo et al., 2016; Pinhal et al., 2016) e em resposta às condições ambientais abióticas (Simone et al., 2009; Nallamshetty, Chan e Loscalzo, 2013; Yan et al., 2015; Zhang et al., 2021) e bióticas (Chen, Zhou e Li, 2018; Croston et al., 2018; Weidner et al., 2022) ou entre diferentes estados fisiológicos e de saúde (Sayed e Abdellatif, 2011; Brites e Fernandes, 2015; Quintanilha et al., 2017; Menezes, Balzeau e Hagan, 2018; Çakmak e Demir, 2020; Ribeiro et al., 2022). Além disso, o padrão de uso de braços pode ser interespecificamente inconstante, ou seja, ao se comparar o perfil de expressão de miRNAs em tecidos homólogos é possível encontrar variações na expressão relativa das fitas 5p/3p de miRNAs específicos (de Wit et al., 2009; Hu et al., 2009; Marco et al., 2010; Griffiths-Jones, 2011; Mehrabadi et al., 2013; Biryukova, Ye e Levashina, 2014; Saad et al., 2015; Leite et al., 2016; Qu et al., 2020; Nong et al., 2021). Isto é tido como um fator que está envolvido com a variabilidade de fenótipos da biodiversidade eucariótica.

Todos estes achados indicam que existe uma mecanismo ativo de modulação do perfil de expressão de miRNAs a depender do contexto denominado *arm switching*. Este fenômeno biológico emergente surge como um potencial fator relacionado à adaptação dos organismos ao desempenhar um meio de modulação de fenótipos. Portanto, a identificação dos fatores e propriedades determinantes que influenciam a seleção do braço e o seu uso nos diferentes contextos é de essencial importância para a compreensão do mecanismo em questão.

5. Seleção alternativa de braços de miRNAs ou “*arm switching*”

Há pouco mais de uma década acreditava-se que a fita de miRNA dita como ‘passageira’ seria descartada e imediatamente degradada. Entretanto, com o incremento do sequenciamento de alta performance, foi possível detectar a presença de fitas passageiras nos tecidos em quantidades reduzidas, mas, ainda sim, em níveis fisiológicos funcionais (Ro et al 2007; Okamura et al., 2008; Guo e Lu 2010). Similar às ‘fitas guias’, as fitas passageiras podem originar sequências maduras e funcionais (Ro et al., 2007). Uma evidência pode ser constatada pela conservação das sequências das fitas ‘passageiras’. Caso estas fossem inócuas, não seria esperada conservação de bases além dos terminais (Okamura et al., 2008; Yang et al., 2015). Isso se opõe às primeiras concepções que davam pouca importância às fitas passageiras, visto que essas eram raramente detectadas em amostras biológicas. Atualmente, entende-se que a capacidade regulatória dos miRNAs se dá não somente pela ação da fita preferencialmente selecionada mas, sim, pelo conjunto de fitas complementares e a abundância relativa dos braços 5p/3p no tecido em determinado contexto (Okamura et al., 2008; Huang et al., 2014). Desde então, a comunidade científica identificou uma variedade de eventos de *arm switching* em diversos organismos e tecidos (Tabela 1).

Tabela 1. Eventos de *arm switching* encontrados

Tipo de <i>arm switching</i>	Organismos comparados	Tecidos comparados	Contextos biológico anotados	Origem das sequências analisadas	Referência
Desenvolvimento	<i>G.gal</i>	Embrião	Embriões (5, 7 e 9 dias)	<i>in vivo</i>	Glazov et al., 2008
Desenvolvimento	<i>B. mor</i>	-	Larva, pré-pupa, pupa e adulto	<i>In vivo</i>	Jagadeeswaran et al., 2010
Desenvolvimento; Interspecífico; intertecidual	<i>T.tri</i> , <i>C.rot</i> , <i>I.sca</i> , <i>D.pul</i> , <i>T.cas</i> , <i>D.mel</i> , <i>H.mel</i> e <i>A.aeg</i> (Arthropoda)	Músculo pata (<i>T.tri</i> e <i>C.rot</i>)	Intertecidual e Desenvolvimento (<i>T.tri</i> vs. <i>C.rot</i>); Interspecífico (Todos os organismos)	<i>in vivo</i> (<i>T.tri</i> e <i>C.rot</i>); Demais organismos: miRGeneDB	Nong et al., 2021 (Material suplementar)

Desenvolvimento; Intersexual	<i>O.nil</i>	Coração (fêmea), cérebro (macho e fêmea), gônadas (macho e fêmea), Músculos esqueléticos branco e vermelho (macho e fêmea), olhos e fígado	Desenvolvimento: Embriões vs. adultos;	<i>in vivo</i>	Pinhal et al., 2018
Desenvolvimento; Intertecidual; Intersexual	<i>D.rer</i>	Ovário, testículos, olho, coração, cérebro, intestino, fígado e embriões	Desenv.: (2.5 horas pós-fertilização-hpf), esfera (4hpf), escudo (6hpf) e 24hpf	Banco de dados (NCBI SRA)	Olivera et al., 2022
Estado de saúde	<i>H.sap</i>	Diversos tipos de células cancerígenas e células de tecido adjacente (normal)	Câncer	Banco de dados(TCGA). <i>in vivo</i>	Chen et al., 2018
Estado de saúde; Intertecidual	<i>H.sap; M.mus e R.nov</i>	256 bibliotecas de sRNA de 26 órgãos e diversas linhagens celulares	Tecidos; adulto e embriões; normal, e tumorais	<i>in vivo</i>	Landgraf et al., 2007
Estados de saúde	<i>H.sap</i>	Células L-02 (hepatócitos normais) e HepG2 (hepatoma)	Câncer	Retirados de outros trabalhos	Guo et al., 2014
Interespecífico	<i>D.mel, T.cas, C.ele, C.tel, H.sap, C. int, B.flo e N.vec</i> (Eumetazoa)	-	Adulto; normal	<i>In vitro</i> (<i>T.cas, D. mel</i>); Retirados de outros trabalhos	Griffith-Jones et al., 2010
Interespecífico	<i>C.ele, C.bri e C.rem</i> (Nematoda)	-	Normal; Estágios misto de desenvolvimento	<i>in vivo</i>	de Wit et al., 2009 (Material suplementar)
Interespecífico	<i>T.cas, D.mel, B.mor</i> (Insecta)	-	Embriões de 0-5 dias (<i>T.cas</i>)	<i>in vivo</i> (<i>T.cas</i>); Retirado de outros trabalhos (<i>B.mori</i>)	Marco et al., 2010
Interespecífico	<i>T.cas, D.mel, B.mor e S.Fru</i> (Insecta)	Linhagens celulares Sf9 (<i>S. fru</i>)	Cultura de células (<i>S.fru</i>)	<i>in vitro</i> (<i>S.fru</i>); Banco de dados (miRBase; <i>D.mel e T.cas</i>)	Mehrabadi et al., 2013
Interespecífico	<i>P.tep, T.cas e D.mel</i> (Arthropoda)	Embriões	Normal; Estágios 1-10 (<i>P.tep</i>)	<i>in vivo</i> (<i>P.tep</i>) e Banco de dados (miRBase; <i>D.mel e T.cas</i>)	Leite et al., 2016
Interespecífico	<i>H.hol, T.cor, D.mel e T.cas</i> (Arthropoda)	-	Adulto; normal (<i>H.hos e T.cor</i>)	<i>in vivo</i> ; Retirados de outros trabalhos	Qu et al., 2020 (supplementary text)

Interespecífico	<i>B.ter</i> e <i>A.mel</i> (Insecta; Diptera)	-	Larvas; fêmeas; normal	<i>In vivo</i> (<i>B.ter</i>); <i>Dataset</i> (miRBase; <i>A.mellifera</i>)	Saad et al, 2015
Interespecífico; Resposta ambiental	<i>A.gam</i> , <i>A.aeg</i> e <i>D.mel</i> (Insecta; Diptera)	-	Adultos; alimentação (<i>A.gam</i> : açúcar vs. sangue)	<i>In vivo</i> ; <i>Dataset</i> (miRBase)	Biryukova et al 2014
Intersexual	<i>H.hip</i>	Cérebro e gônadas	Maturação sexual	<i>in vivo</i>	Bizuayehu et al., 2012
Intersexual	<i>H. sap</i>	354 <i>datasets</i> de tecidos humanos	Gênero: macho e fêmea; tecidos normais e tumorais	<i>Dataset</i> (NCI- TCGA)	Guo et al., 2016
Intertecidual	<i>S.Mal</i>	Ropálio vs. tentáculos	Adulto (medusa); normal	<i>in vivo</i>	Nong et al., 2020
Intertecidual	<i>M.Mus</i>	Estômago vs. Baço	Normal	<i>In vivo</i>	Ro et al., 2007
Intertecidual	<i>H.sap</i>	61 tecidos humanos	-	<i>in vivo</i>	Ludwig et al., 2016
Intertecidual	<i>H.sap</i> e <i>M.mus</i>	15 tecidos de <i>M.mus</i> e 9 linhagens celulares de <i>H.sap</i>		<i>in vivo</i> ; <i>in vitro</i>	Kim et al., 2020
Intertecidual	<i>H. sap</i>	Cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, ovário, placenta, baço, estômago e timo	Normal;	<i>in vitro</i> ; <i>Dataset</i> (NCBI SRA)	Cloonan et al., 2011
Intertecidual	<i>H.sap</i>	410 sRNA <i>datasets</i> divididos em 15 tecidos e linhagens celulares	Normal e doente	<i>Dataset</i> (NCBI SRA)	Gong et al., 2014
Intertecidual	<i>H.sap</i>	Sangue; cérebro; mama; cérvice; epitélio; células tronco embrionárias; fígado; pulmão; pele	Linhagens celulares	<i>Dataset</i> (NCBI GEO)	Pundhir e Gorodkin, 2015

Estudos que identificaram eventos de *arm switching* de miRNAs encontrados nesta revisão. *A.aeg* = *Aedes Aegypti*; *A.gam* = *Anopheles gambiae*; *A.mel* = *Apis mellifera*; *A.mal* = *Sanderia malayensis*; *B.flo* = *Branchiostoma floridae*; *B.mor* = *Bombyx mori*; *B.ter* = *Bombus terrestris*; *C.bri* = *Caenorhabditis briggsae*; *C.ele* = *Caenorhabditis elegans*; *C.int* = *Ciona intestinalis*; *C.ram* = *Caenorhabditis remanei*; *C.rot* = *Carcinoscorpius rotundicauda*; *C.tel* = *Capitella teleta*; *D.mel* = *Drosophila melanogaster*; *D.pul* = *Daphnia pulex*; *D.rer* = *Danio rerio*; *G.gal* = *Gallus gallus*; *H.hip* = *Hippoglossus hippoglossus*; *H.hol* = *Helicorthis holstii*; *H.mel* = *Heliconius melpomene*; *H.sap* = *Homo sapiens*; *I.sca* = *Ixodes scapularis*; *M.mus* = *Mus musculus*; *N.vec* = *Nematostella vectensis*; *O.nil* = *Oreochromis niloticus*; *P.tep* = *Parasteatoda tepidariorum*; *R.nov* = *Rattus norvegicus*; *S.fru* = *Spodoptera frugiperda*; *T.cas* = *Tribolium castaneum*; *T.cor* = *Trigoniulus corallinus*; *T.tri* = *Tachypleus tridentatus*.

As evidências de que a variação do padrão de uso de braços em resposta ao contexto indicam que a seleção de braços é orientada por processos que ativamente

modificam a abundância dos miRNAs em um mecanismo de alternância responsiva da seleção de braços. Quando este mecanismo leva à inversão total da preferência de seleção do RISC e consequente mudança da prevalência entre braços 5p e 3p de mesmo precursor, o fenômeno é chamado *arm switching* (Liu et al., 2008; De Wit et al., 2009; Marco et al., 2010; Griffith-Jones et al., 2011; Berezikov 2011). Apesar de permanecer pouco estudado, eventos de *arm switching* demonstram ter profunda importância na adaptação e diversificação de novas funções em eucariotos, contribuindo para o ajuste fino da regulação de fenótipos e processos adaptativos.

O impacto do *arm switching* na biologia de organismos se deve ao fato de que os braços de miRNAs estão pareados antisenso no duplex, e por este motivo, as regiões *seed* e outras MREs não coincidem (Figura 4a). A mudança na sequência incorporada ao RISC altera o repertório de mRNAs alvos afetados e, conseqüentemente, leva à repressão de um conjunto diferente de genes que pode levar a alterações fenotípicas (Li et al., 2012b; Kim et al., 2020). Dada a atividade dicotômica da seleção de braços (i.e., seleção da fita 5p ou 3p pelo complexo RISC), eventos de *arm switching* implicam na supressão da atividade regulatória de determinadas vias e funções biológicas em prol da amplificação de outras. Isto permite supor uma relação de demandas conflitantes (*trade off*) existente entre as fitas complementares com base em suas funções associadas. Por exemplo, a alteração das taxas de miR-155 em humanos ocorre de acordo com a ativação de células dendríticas plasmocitóides e os braços do miR-155 possuem efeitos antagônicos ao que se refere à produção de interferons sendo que a fita antes reconhecida como passageira, miR-155-3p, tem seus níveis de expressão aumentados quando há estimulação do ligante TLR7 de células dendríticas plasmocitóides (pDCs), enquanto miR-155-5p é reduzido (Zhou et al., 2010, Alivernini et al., 2018, Dawson e Piccinini 2022). O incremento de uma função biológica ao custo da supressão de outra função, marcada pela diminuição da expressão relativa de um dos braços de miRNA, pode trazer vantagens adaptativas (de Wit et al 2009; Griffiths-Jones et al.,2011). Desta forma, *arm switching* evoluiu como um mecanismo endógeno que provoca a mudança no perfil de expressão predominantemente funcional interferindo no repertório de mRNAs alvos e vias biológicas e convertendo as funções celulares ativas. No entanto, os processos que sustentam a resposta contexto-dependente dos miRNAs ainda não são completamente esclarecidos.

O *arm switching* se caracteriza, portanto, como um fenômeno de natureza referencial, ou seja, sua detecção só é possível por meio de uma análise comparativa do

perfil de expressão de miRNAs em diferentes contextos biológicos. Por isso, o *arm switching* pode ser classificado como (i) intraespecífico ou parálogo quando ocorre expressão diferencial em contextos distintos dentro de uma espécie ou indivíduo, e (ii) interespecífico ou ortólogo quando ocorre expressão diferencial entre tecidos homólogos de espécies diferentes.

Espécies filogeneticamente próximas tendem a apresentar semelhança quanto à composição de genes de miRNAs no genoma e, menos frequentemente, quanto ao perfil de expressão de miRNAs, e esta semelhança vai sendo perdida quando considera-se espécies mais distantes filogeneticamente. Levando isto em consideração, Griffiths-Jones e colaboradores sugeriram em seu trabalho em 2011 que a expressão modulável de miRNAs é um mecanismo a partir do qual novos fenótipos em diferentes espécies podem surgir e se manter pela ação da seleção natural. Contudo, atualmente, não existem dados precisos sobre a frequência com que determinado *arm switching* ocorre, embora algumas estimativas tenham sido feitas. No caso Kim e colaboradores (2020), utilizando dados AQ-seq de 15 tecidos de camundongo e 9 linhagens celulares humanas, identificaram 13% (com desvio $\sigma < 3\%$) dos miRNAs com variação na taxa de prevalência dos braços. Entre *D. melanogaster* e *Tribolium castaneum*, a taxa de *arm switching* encontrada foi de 11% (Marco et al., 2010). Esses dados sugerem que nem todo miRNA complementar está sujeito a *arm switching*. Diante dessa perspectiva, *arm switching* fornece uma forma adicional de diversificação de miRNAs e suas funções biológicas, representando mais uma camada por onde a evolução pode agir, uma vez que as duas fitas de miRNA competem pela incorporação no RISC e possuem, a princípio, alvos com funções biológicas diferentes, sendo assim, passíveis de pressão seletiva. Desta forma, compreender os fatores de seleção de braços de miRNA pode elucidar como ocorrem, quais os fatores que os regem e deduzir o impacto destes processos na biologia dos organismos e como processos evolutivos atuam por meio da regulação via miRNAs. Atualmente, alguns fatores e variáveis que têm influência discutida na determinação do *arm switching* serão descritos a seguir.

6. Fatores de seleção de braço e *arm switching*

6.1 Intrínsecos ao dsRNA

6.1.1 Estabilidade termodinâmica relativa dos terminais 5' do pre-miRNA

Os primeiros estudos sobre o viés na seleção de braços buscavam entender esse fenômeno nas moléculas de RNAi (*RNA interference*). Propriedades intrínsecas dos miRNAs, mais especificamente do precursor, são determinantes para o desenovelamento do duplex e sua incorporação ao miRISC. Em 2003, dois trabalhos, realizados por Khvorova e colaboradores e Schwarz e colaboradores, chegaram em conclusões semelhantes ao investigar as propriedades físico-químicas que levam a uma fita do duplex ser integrada ao complexo de silenciamento de mRNAs (i.e., fita guia) e a outra fita ser descartada (i.e., fita passageira). Ambos descobriram indícios de que a terminação 5' com menor estabilidade termodinâmica relativa do duplex (ou seja, com ligações de hidrogênio menos estáveis) é mais presente na fita guia. Em outras palavras, a fita com menor estabilidade termodinâmica relativa na terminação 5' interage melhor e é selecionada pela Ago. Um único *mismatch* nos quatro primeiros nucleotídeos da terminação 5' seria suficiente para determinar qual seria a fita guia. A explicação proposta é que esta ligação relativamente mais fraca dentro do duplex favorece a interação da fita menos instável com as enzimas do complexo RISC.

A incorporação do duplex e a posterior ejeção da fita passageira são processos com consumo de ATP, enquanto a liberação da fita passageira é livre de gasto de energia. O modelo da “borracha elástica” (*Rubber band model*) enuncia que, para a incorporação do duplex ao RISC, as chaperonas Hsc70/Hsp90 alteram a conformação da Ago, com gasto de energia que é transferida à enzima, permitindo assim a incorporação do duplex (Kawamata e Tomari 2010). Neste momento, o complexo é denominado de pre-miRISC, pois é uma estrutura temporária que contém as duas fitas de miRNA no duplex. A tensão na molécula é logo liberada fazendo com que a Ago retornasse a sua conformação mais estável e, consequentemente, ejetando a fita com menor força de ligação com a Ago de maneira ATP-independente. Essa proposta está de acordo com a ideia de que a fita guia teria maior afinidade de ligação com os domínios de ligação de fosfato na interface MID e PIWI da Ago. Essa diferença de afinidade termodinâmica entre as fitas com a Ago, somada à mudança de conformação da Ago de mais instável para menos estável, resultaria na ejeção da fita passageira. Uma das críticas a este modelo é que a Ago ou o complexo RISC não podem “armazenar energia potencial devido às suas propriedades estruturais”. Em vista as críticas, os autores propuseram um novo modelo revisado chamado de “modelo do declive de energia” (*energy slope model*) (Kobayashi e Tomari 2016). Neste modelo, a conformação do

RISC é modificada pelas chaperonas Hsc70/Hsp90, com gasto de ATP, a uma forma instável mas que permite a inserção do duplex (Figura 3-a). Em outras palavras, as chaperonas consomem ATP e diminuem a energia de ativação do RISC em vez de transferir energia ao complexo. A ejeção da fita passageira seria explicada pela ação catalítica do domínio Terminal-N da Ago, responsável por romper as ligações de nitrogênio do duplex a partir da extremidade 3' da fita guia, como mencionado, com menor estabilidade energética. Neste ponto, o desenovelamento do duplex é iniciado lentamente por mal-pareamentos na região *seed* ou na região de ligação suplementar 3'. Porém, substituições em aminoácidos únicos nos domínios MID e PIWI de ALG-1 em modelos de *C. elegans* promoveram a seleção diferencial reversa para alguns miRNAs (Chatterjee et al., 2011).

6.1.2 Mal-pareamento central no duplex

Mal-pareamentos ou *mismatches* em duplexes de miRNA são comuns (Kawamata et al., 2009) e estão diretamente relacionados à estabilidade termodinâmica devido às ligações de hidrogênio entre as fitas pareadas. Mal-pareamentos centrais são um pré-requisito para a incorporação de duplexes de miRNA em Ago1 de *D. melanogaster*; no entanto, isso pode ser restrito a uma espécie ou grupo devido às preferências de elencamento de RNAi entre dme-Ago1 e dme-Ago2. O mesmo ocorre com ALG-1 e ALG-2 em *C. elegans*. A inserção de mismatches na posição 12-15 da "fita guia" facilita o desenovelamento e leva à "*Inverted asymmetry selection*" pela Ago1 de moscas (Kawamata et al., 2009). Okamura et al., em 2009, sugerem que em dme-Ago1 seleciona o chamado "miR" enquanto a Ago2, restrita a siRNAs exógenos, está relacionada à geração dos então chamados "miR*". Ambas atuam em paralelo na produção do braço de miRNA em resposta ao contexto. No entanto, ao que se sabe, esses achados não foram reproduzidos.

O mecanismo de ordenação de RNAi é menos rigoroso em humanos e outros mamíferos. Mal-pareamentos são importantes para a ejeção de fitas em Ago com atividade catalítica '*slicer*' reduzida ou inexistente. Foram realizados experimentos que demonstraram que a inserção de mal-pareamentos nas posições centrais ou complementares 3' da fita guia promoveu a etapa de seleção de braços ou o desenovelamento (aumento da produção da fita guia) (Okamura et al., 2009; Kawamata et al. 2009; Czech et al., 2009; Yoda et al., 2010). Esses resultados sugerem que, pelo menos em parte, a estabilidade do duplex como um todo não é uma variável utilizada pela Ago para a seleção da fita, mas sim a estabilidade e a

identidade da terminação 5' (Hu et al., 2009). A estabilidade termodinâmica no centro do duplex é importante, mas aparentemente é menos importante do que outras características (Zinovyeva et al., 2015). No entanto, além de não existir um sistema aparente de ordenação de siRNAs para os 4 membros da família Ago de humanos e mamíferos, os mal-pareamentos centrais não mostram ter efeito aparente na seleção de braços neste grupo. No entanto, *mismatches* nas regiões *seed* (2-8nt) e complementar 3' (12-15nt) facilitam o desenovelamento para Ago1, 3 e 4, que são deficientes em atividades catalíticas (Domínio N).

6.1.3 Exposição do fosfato 5' e identidade do nucleotídeo 5' terminal

Tipicamente, as RNases III clivam moléculas de dupla fita, resultando em saliências de 2 nt na região 3', o que expõe grupos hidroxila nessa região e grupos fosfato na terminação 5' (Nicholson, 2014). O domínio MID da enzima Ago é responsável pelo reconhecimento da porção fosfatada da terminação 5' da fita guia, sendo considerado um pré-requisito para a interação miRNA-RISC. Em experimentos *in vitro*, bloquear a fosforilação na terminação 5' da fita guia de dsRNAs artificiais resulta na incorporação da fita passageira ao RISC, apesar da assimetria termodinâmica contrastante causada por mal-pareamentos engenheirados artificialmente (Kawamata, Yoda e Tomari, 2011). Além disso, o domínio MID da Ago2 apresenta preferências a formar ligações com terminais U ou A na terminação 5'. Consistentemente, as fitas guia apresentam um viés de uracila nas suas terminações 5' enquanto que na fita passageira tem o viés de citosina na 5' (Hu et al., 2009; Frank et al., 2010; Seitz, Tushir e Zamore 2011). Ainda, o início das fitas menos expressas apresenta um excesso de pirimidinas (U e C). Isso indica que diferentes fatores podem estar associados com a escolha da fita em miRNAs distintos. Alterações específicas na proteína ALG em estado selvagem que levam a mudanças na seletividade das fitas têm impactos mais proeminentes do que a deleção total de seu gene, o que indica o grau de impacto de *arm switching* no organismo (Zinovyeva et al., 2014 e 2015). Porém, estes achados podem representar um sistema de ordenação de preferência da identidade da fita guia, descrito como modelo de hierarquização do duplex (*duplex sorting model*), que poderia compensar a inversão indevida de braços (Figura 4) (Czech et al., 2009; Seitz, Tushir e Zamor 2011; Zinovyeva et al., 2015). Porém, isolar a variável de identidade 5' de miRNAs das demais como a estabilidade termodinâmica e a diversidade de parálogos de Ago dificulta em

identificar a real preferência nucleotídica do domínio MID. Contudo, ao que se entende, a Ago teria maior afinidade em estabelecer ligação, e portanto selecionar as fitas com nucleotídeos com identidade 5' U ou A, nesta ordem, em detrimento de C e G, também nesta ordem (Mi et al., 2008; Frank et al., 2010, Seitz, Tushir e Zamor 2011; Kim et al 2020). Experimentos realizados por Okamura et al., em 2009 conseguiram inverter a seleção de braços (*arm switching*) pela Ago1 de moscas mudando o nucleotídeo 5' para U na "miR*". Interessantemente, Young e colaboradores (2022) publicaram um artigo mostrando que foi possível inverter a preferência de *seleção de braços* de 3p para 5p do miR-140 exclusivo de condrócitos, o que chamaram de *stoichiometric reversion* (inversão estequiométrica). Este evento foi induzido por mutações no último nucleotídeo 5' da fita 5p (passageira) de C ➔ U e das fitas 3p (guias) de UA ➔ CG, seguindo os padrões de ordenação mencionados. Estes achados confirmam, ao menos em parte, os preceitos do "*duplex sorting model*"

6.1.4 Twin-drive model: modelo de acionamento duplo

Suzuki e colaboradores, em 2015, propuseram o que chamaram de modelo de "acionamento duplo" (*Twin-drive model*) para explicar como coexistem a regra da assimetria termodinâmica terminal e a regra da identidade dos nucleotídeos 5'. Neste modelo, o domínio MID da Ago é composto por dois sensores ou sítios de reconhecimento: um para a identificação do fosfato no esqueleto da molécula (*G drive*) e um capaz de identificar o nucleotídeo (*N drive*) (Figura 4). O sítio de reconhecimento do fosfato seria capaz de reconhecer a estabilidade termodinâmica da fita. Em experimentos que testaram esta hipótese, proteínas mutantes nestes resíduos em Ago2 demonstraram redução na razão 5p/3p de miRNAs testados. Os autores apontaram ainda que este modelo descreve como a assimetria termodinâmica relativa sozinha não explica os mecanismos de seleção de braços e que processos não passivos contribuem para a seleção da fita.

Interessantemente, Hu e colaboradores em 2009 que buscavam avaliar os determinantes da seleção de braços em humanos, analisaram 895 miRNAs com diferença de expressão entre os braços de até 1:10. Nesse estudo foram detectados que 103 miRNAs (11,5%) não apresentaram nenhuma das propriedades termodinâmicas e de identidade para explicar a seleção dos braços. No entanto, à medida que a relação de abundância foi

aumentada (máx. 1:1000), outras características relacionadas à identidade dos nucleotídeos 5' se tornam gradualmente mais determinantes. No trabalho de Suzuki et al. 2015, foi realizado um experimento semelhante, no qual elencaram quais nucleobases que mais contribuem para a seleção de braços. Esses resultados, juntamente com o fato de que ambas as fitas do precursor podem gerar um miRNA funcional, sugerem que a principal força seletiva é a estabilidade termodinâmica relativa entre as terminações 5' do duplex. No entanto, isso não é um fator determinante ou isolado e mecanismos de flexibilização da seleção de braços atuam para otimizar a resposta fisiológica do organismo.

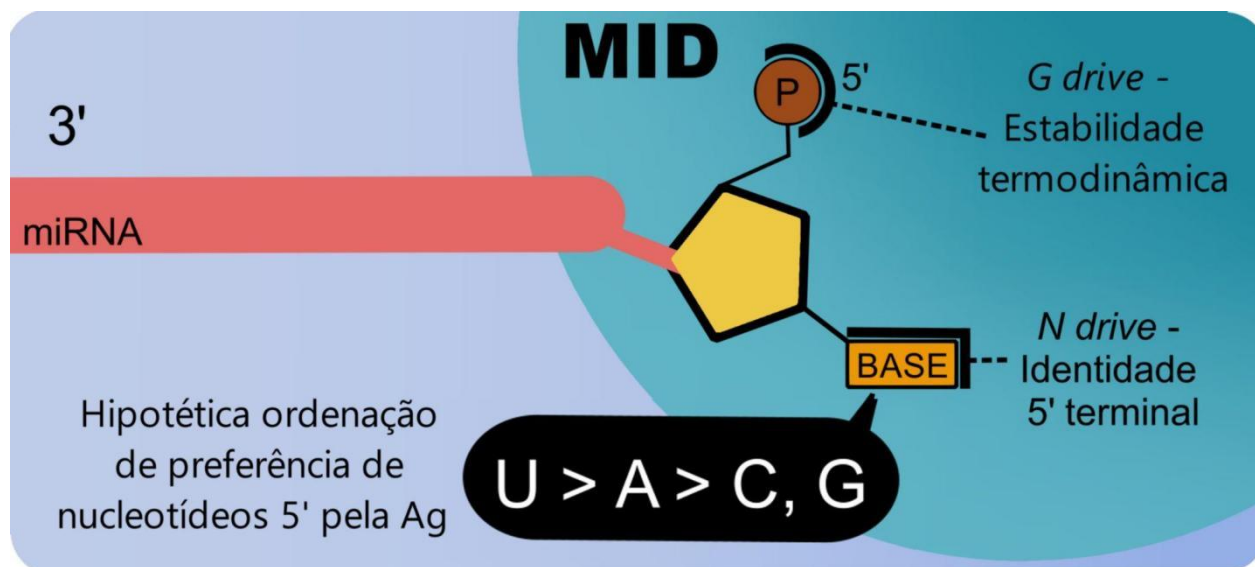


Figura 4 | Twin drive model: Este modelo foi elaborado para explicar a coexistência das regras da estabilidade termodinâmica e da identidade terminal 5' na seleção de braços. O Domínio MID da Ago teria sensores capazes de reconhecer a estabilidade do duplex através do esqueleto fosfato, representado no círculo “P”, e sensores que identificariam a identidade nucleotídica da terminação 5'. Ainda, o sistema de ordenação de bases as quais a Ago teria maior afinidade $U > A > C$ e G . Fonte: Imagem elaborada pelo autor.

6.2 Extrínsecos ao dsRNA

6.2.1 Clivagem diferencial das terminações

Considerando que a seleção de braços adequada depende das propriedades das terminações das moléculas de miRNA, a clivagem precisa das fitas se torna um tópico de importância. Por vezes, as enzimas responsáveis Drosha e Dicer nem sempre produzem cortes constantes, o que ocasionalmente leva à alteração do produto final e da interação global com a maquinaria de repressão de mRNAs. Estas alterações têm sido observadas como relevantes nos processos biológicos. A identidade de um miRNA maduro pode variar a partir de uma mutação (indel e substituição) de uma simples base em sua sequência. Nesse cenário, onde variantes de miRNA são produzidas a partir de um mesmo gene, formam-se isoformas de miRNAs, também conhecidas como isomiRs (Neilsen, Goodall e Bracken 2012; Dhanoa et al., 2019). (Figura 4).

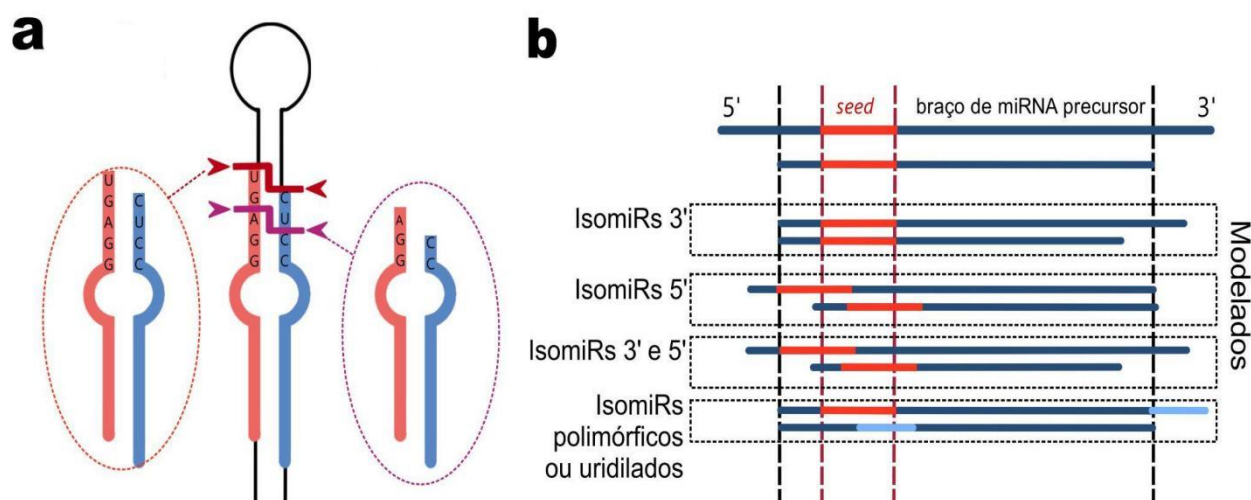


Figura 5 | IsomiRs (a) A clivagem diferencial, representada pelas setas em vermelho e rosa, podem causar alteração no tamanho e sequência nucleotídica de miRNAs. Estas variantes são chamadas isomiRs. (b) Esquema mostra a formação de diferentes tipos de isomiRs separados em modelados e não modelados. Nesta imagem também é possível identificar o deslocamento da região *seed* (*seed shifting*) devido à clivagem diferencial. Fonte: imagem elaborada pelo autor.

IsomiRs são variantes de miRNAs (isoformas) canonicamente anotados contendo tamanhos heterogêneos e/ou variação na sequência (Figura 4b). Expressões variadas de isomiRs são detectadas em diferentes contextos biológicos. Já foi catalogada uma notável diversidade de isomiRs, não apenas entre tipos celulares e tecidos, mas também entre espécies, o que evidencia sua importância funcional (Fernandez-Valverde et al. 2010; Berezikov 2011; Guo et al., 2016; Kim et al., 2020; Bofill-de Ros, Yang e Gu, 2020). Esta diversidade de isomiRs está intrinsecamente ligada à regulação de processos envolvendo os miRNAs, a identificação de alvos e a modulação ou disfunção de expressão de alvos celulares.

No caso dos isomiRs produzidos durante a biogênese pela clivagem imprecisa da Dicer ou Drosha, o deslocamento do pri-miRNA ou pré-miRNA nestas RNases são as principais causas de clivagem diferencial. Apesar disso, a ação de exorribonucleases (como Nbr e exossoma) também podem ocasionar a formação de miRNAs pelo encurtamento de suas terminações. De forma inversa, no processo denominado *RNA tailing*, polimerases adicionam monômeros adenina (poliadenilação) ou uracila (uridilação) ao terminal 3' formando policaudas e alongando a fita. A depender destas características, chama-se o

isomiR de isomiRs 5' ou isomiRs 3' de acordo com a terminação na qual ocorreu a modificação, e ainda, isomiR 5'+3' quando há modificação nas duas terminações. Estes isomiRs correspondem à sequência do gene parental e por isso são chamados de modelados. IsomiRs não-modelados ou polimórficos são mais raros (<1%) e dependem de edições nucleotídicas pós-transcricionais, normalmente, realizados pelas enzimas ADAR, mencionada adiante (Dhanoa et al., 2019; Warnefors et al., 2014; Neilsen, Goodall e Bracken 2012; Bofill-de Ros, Yang e Gu, 2020)

IsomiRs 5' apresentam deslocamento do início da sequência e, consequentemente, altera o início da sequência seed (Figura 4-b) (Tan et al., 2014; Tan e Dibb 2015; Bofill-de Ros, Yang e Gu, 2020). Este fenômeno é conhecido como *seed shifting* (Berezikov 2011; Tan et al., 2014). Quando isso acontece, se espera que haja impacto no funcionamento celular devido a alteração do repertório de alvos. Contudo, isomiRs 5' são mais raros que os isomiRs 3' e isto se deve a uma provável pressão negativa sob estas variantes de forma a favorecer a manutenção e estabilidade celular (Guo et al., 2014). Contudo, a seleção natural podem selecionar conjuntos de isomiRs com base no *seed shifting* fazendo com que aos poucos um braço se torne dominante em relação a sua contraparte, e isto pode ser identificado em diferentes espécies com grau de parentesco variado (Tan 2014; Berezikov 2011; Marco et al., 2010). Variantes isomiRs 3' são mais facilmente detectadas em sequenciamentos e também em maior variedade. Essas também possuem importância na modulação biológica uma vez que alterando-se o tamanho da sequência ou as saliências nas terminação de um miRNA, ou ainda, a identidade do nucleotídeo terminal, há possibilidade de afetar tanto a estabilidade termodinâmica relativa quanto a identidade das terminações do miRNA. Visando esclarecer esta questão, Lee e Doudna (2012) realizaram experimentos usando duas isoformas do miR-200 derivadas da clivagem da Dicer ou da Dicer associada à sua enzima TRBP ao qual tinham 1 nt a mais de tamanho (1 nt a mais no terminal 3' para o braço 5p e 1 nt a mais no terminal 5' para o braço 3p) e verificaram que houve aumento da taxa 5p/3p na isoforma gerada pelo processo com Dicer apenas. Isto indica que a formação de isomiRs pode alterar a seletividade de cada um dos braços ao RISC e induzir o *arm switching*. O mesmo grupo de pesquisa reproduziu os achados em 2015 e verificaram que 13 % dos duplex de miRNAs analisados tiveram divergência na seleção de braços na ausência da TRBP e PACT (Wilson et al., 2015). Há relatos de que a enzima Dicer é dispensável para a seleção assimétrica do RISC, como evidenciado previamente (Noland e Doudna, 2013). Para miRNAs cuja identidade nucleotídica terminal

seja desfavorável (G) e possua mal-pareamentos nas regiões terminais e centrais, a presença do complexo Dicer/PACT ou TRBP pode ser necessária, a depender da estrutura secundária do duplex. A Ago2 humana, no caso destes experimentos, pôde sozinha selecionar a fita guia, porém as atuações da Dicer, TRBP e PACT foram também necessárias para direcionar a seleção da fita, ao que foi chamado pelos autores de *RISC-loading checkpoint*.

Assim como ocorre com a nomenclatura de miRNAs, a isoforma normalmente anotada como canônica não é, por regra, a forma dominante (Guo et al., 2013). Os processos de formação de isomiRs compartilham similaridades com a mudança contextual do perfil de expressão de miRNAs, uma vez que integram os mecanismos de flexibilização epigenética da expressão de fenótipos. No contexto da seleção de braços, isomiRs demonstram ter papel importante na incorporação e seleção da fita pelo RISC.

Nesse contexto, Guo e colaboradores (2014) usaram dados de perfis de expressão para comparação dos níveis de expressão de diferentes isomiRs e identificaram padrões de expressão entre braços e entre isoformas constantes em diferentes amostras. Esses autores notaram que pressões funcionais, especialmente em quadros de patologia, relacionam-se a alterações nesses padrões de enriquecimento. Isto indica, mais uma vez, que a diversificação da expressão de isomiRs não é aleatória. Os autores atribuem o fenômeno de *arm switching* a esta modulação dos perfis de expressão entre diferentes isomiRs. Dessa forma, a capacidade dos organismos produzirem diferentes isomiRs e a alternância de dominância entre estas variantes ou entre os conjuntos de variantes do braço complementar são um recurso adicional que influencia no *arm switching*. Sendo assim, é possível afirmar que os modos de clivagem diferencial ou de indução de isomiRs e a seleção diferencial de fitas se entrelaçam como artifícios que podem favorecer a plasticidade de expressão de fenótipos. No entanto, é necessário melhor esclarecimento para compreensão mais aprofundada sobre como esses fenômenos interagem, a forma e o grau dessa interação, e quais são os elementos subjacentes que ditam suas regras.

6.2.2 Adição pós-transcricional de cauda à terminação do miRNA (*miRNA tailing*)

A estrutura terminal de um RNA é importante definir para sua finalidade e viabilidade. Um dos artifícios de formação de isomiRs é a adição pós-transcricional de nucleotídeos, formando isomiRs não modelados, conforme mencionado. Diversas classes de RNAs, incluindo os miRNAs, têm nucleotídeos adicionados pós transcricionalmente por enzimas nucleotidiltransferases (TENTs) (revisado por Warkocki et al., 2018) (Figura 6a). Este mecanismo, conhecido como RNA tailing, é o mais comum e conservado em eucariotos (Revisado por: Liudkovska e Dziembowski, 2020; Menezes, Balzeau e Hagan, 2018) e consiste na polimerização terminal de RNAs, principalmente nas terminações 3', para sua marcação para a consequente degradação por enzimas ribonucleolíticas (por exemplo, a Dis3L2, Figura 6c).

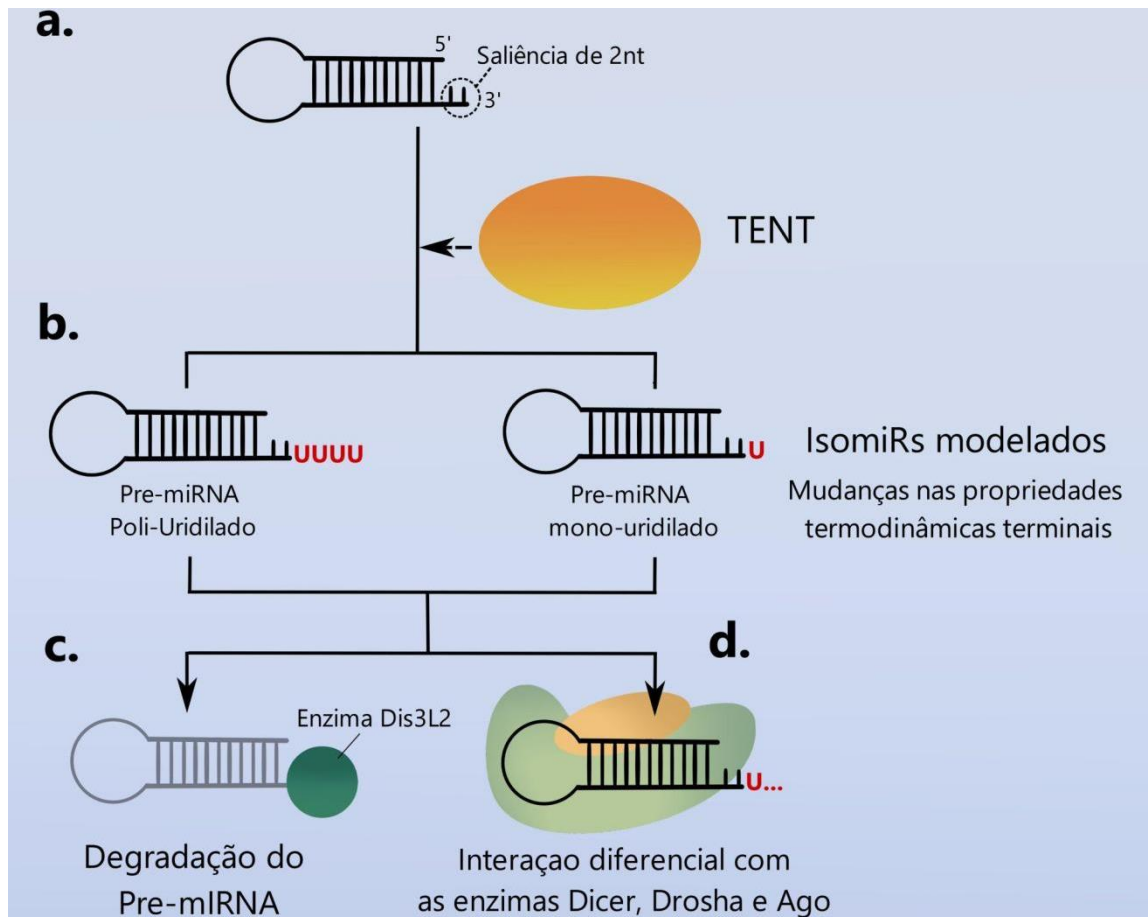


Figura 6. | Processo de miRNA *tailing*. (a) o precursor do miRNA sofre a adição de nucleotídeos uridina nas terminações 3' (uridilação) via TENT (enzimas nucleotidiltransferases), (b) a depender de quantos nucleotídeos forem inseridos, formam-se isomiRS modelados. Existem duas principais finalidades (c) a marcação do precursor e miRNA e sua posterior degradação ou (d) um interação

diferencial com as enzimas Drosha, Dicer e Ago devido às modificações termodinâmicas terminais. Fonte: imagem elaborada pelo autor

Com o implemento de novas tecnologias, o conhecimento sobre os processos biológicos relacionados a este mecanismo vem sendo diversificado. Por exemplo, em pre-miRNAs, a uridilação nos terminais 3', por meio das enzimas terminal uridiltransferase ou poli(U) transferase (TUTases), com especial enfoque em TUT4 e TUT7, resulta na formação de isomiRs modelados (Newman et al., 2011; DeAlmeida et al. 2017; Menezes, Balzeau e Hagan, 2018, Liudkovska e Dziembowski, 2020, Bofill-de Ros, Yang e Gu, 2020) (Figura 6b).

Contudo, outras funções biológicas estão sendo associadas à uridilação de miRNAs. Por exemplo, a modificação do terminal 3' de miRNAs. A extremidade 3' é um condicionante importante para a determinação de um miRNA. A clivagem do pri-miRNA realizada pela Drosha resulta majoritariamente em pre-miRNAs com 2 nt de saliência na posição 3' (grupo 1 de miRNAs) (Heo et al., 2012). O subsequente reconhecimento pela Dicer no citoplasma requisita a presença dessa saliência. Porém, caso a clivagem da Drosha resulte em uma saliência terminal 3' de 1 nt (grupo 2 de miRNAs) pode ocasionar o não reconhecimento por parte da Dicer. Porém, a correção de miRNAs do grupo 2 por uridilação do pré-miRNA já foi amplamente descrita. Utilizando-se como modelo o pré-let-7, foi mostrado que TUT4/7 promovem uridilação variável regulando positiva e negativamente o miRNA, a depender do momento celular (Thornton et al., 2012; Heo et al., 2012; Chang et al., 2013).

A alteração do tamanho dos precursores devido à uridilação impacta na estabilidade termodinâmica do terminal (Figura 6d). Diante disso, surge a pergunta se a uridilação pode ser um processo que leva ao *arm switching*. Para investigar esta questão, em 2020, Kim e colaboradores realizaram experimentos usando como o modelo o miR-324 conservado em mamíferos e que apresenta *arm switching* intertecidual. Os braços do miR-324 possuem funções biológicas distintas e possivelmente antagônicas em mamíferos, onde o miR-324-3p é superexpresso na progressão de carcinomas. Junto a isto, observou-se que a concentração de TUT4/7 são relativamente baixos nos tecidos, mas aumentam em glioblastomas. Os experimentos deste trabalho revelaram que a mono/oligo-uridilação na porção 3' do pre-miR-324 leva ao reposicionamento e interação diferencial com os diferentes domínios da Dicer, levando ao *arm switching*. A uridilação do pre-miR-324 provoca o alongamento da fita, fazendo com que a interação com os domínios PAZ e

plataforma da Dicer, responsáveis pelo reconhecimento da terminação 5', se torne menos eficiente. Nesta situação, o domínio dsRBD (*dsRNA binding domain*) da Dicer é capaz de melhor posicionar o pre-miRNA na enzima e este reposicionamento causa o deslocamento da posição da “régua molecular”, alterando o ponto inicial de contagem de nucleotídeos e na consequente alteração no sítio de corte do pré-miRNA, (Figura 4a, Figura 6d). Ou seja, a expressão de TUT4/7 altera a seleção de braços e induz o *arm switching*, induzindo formação de tumores. Como mencionado anteriormente, a clivagem diferencial faz com que o dsRNA assuma propriedades intrínsecas distintas que podem promover o *arm switching*. Além disso, neste caso, apesar da modificação inicial ser a uridilação 3' do precursor, pode haver a formação de um isomiR modelado de mesma região *seed* que suas variações.

Desta forma, se as propriedades terminais do pré-miRNA são modificadas pela formação de isomiRs, a seleção de braços é diretamente impactada pelos mecanismos de formação de isomiRs. TUTases são expressas de forma diferencial nos tecidos ou durante o desenvolvimento. Ainda, são mais expressas em alguns quadros de câncer e outras desordens, como foi descrito (Kim et al., 2020; Tsai et al., 2016; Zhi et al., 2017; Menezes, Balzeau e Hagan, 2018; Li et al., 2012a). Com as evidências de que as TUTases, em especial TUT4 e TUT7, adicionam nucleotídeos aos miRNAs, a Dicer pode ser ajustada para a formação de diferentes isomiRs. Com este mesmo recurso, o *RNA tailing* controla a razão 5p/3p e eventualmente induz *arm switching* de maneira contexto-específica. *Arm switching* é robustamente regido por fatores extrínsecos às moléculas, mostrando que existe um complexo de processos na arquitetura celular que agem sobre este fenômeno. As relações diretas dos recursos que envolvem a produção de TENTs para modulação da expressão de miRNAs merece ser mais estudada. Além disso, é válido reconhecer a importância das etapas subsequentes de integração do duplex com o RISC dentro dessa dinâmica.

6.3 Edição de miRNAs por substituição de nucleotídeos

IsomiRs não-modelados são aqueles que possuem sequências com variações de um único nucleotídeo em relação ao transcrito parental. Isto se deve à edição pós-transcricional do RNA que substitui nucleotídeos das sequências de transcritos. A edição de RNA é um mecanismo de regulação epigenética que vem ganhando maior atenção recentemente. Os principais responsáveis pela edição de dsRNAs são as enzimas ADARs (*Adenosine Deaminases Acting on RNA* - Adenosina Deaminase de Ação em RNAs), uma família de

enzimas altamente conservada em animais (Nishikura 2016). Essas enzimas são capazes de se ligar ao dsRNAs (no caso de miRNAs, o pri-, pre-miRNA e o duplex) e catalisar reações de desaminação, convertendo aminoácidos adenosina para inosina (Edições A→I). Este processo é considerado edição de sequência porque o complexo de tradução interpreta a inosina derivada de adenosina como uma guanina pareada a uma citosina (Nishikura 2016). Ainda, há a família de enzimas APOBECs (*Apolipoprotein B mRNA Editing Enzyme Cytidine Deaminases* - Enzima de edição mRNA Apolipoproteína B Citidina Desaminases) que promovem edições C→U. Porém, existe um grande déficit de estudos sobre a prevalência e implicações desta família de enzimas (Correia de Sousa et al., 2019).

A edição de miRNAs pode envolver diversos processos biológicos e ter significativo impacto na biogênese dessas moléculas. Edições de miRNAs por enzimas ADAR podem levar a mudanças no repertório de alvos, uma vez que a podem acontecer na região *seed*, como observado no miR-455-5p, associado a progressão de melanoma (Shoshan et al., 2015), no caso do miR-376a-5p (Kawahara et al., 2007) ou no caso miR-411, onde a diversidade da região *seed* foi descrito interagir com os mecanismos de clivagem diferencial já descritos. Ainda, edições atuam no enfraquecimento do reconhecimento de MREs, como reportado para miR-376, miR-22 e miR-191 humanos, reduzindo a eficiência de silenciamento destes (Kume et al., 2014).

ADARs possuem, para sua atividade de edição nucleotídica, a capacidade de reconhecer e se ligar em dsRNAs. Assim, estas enzimas acumulam uma diversidade de funções biológicas. Por exemplo, enzimas ADAR podem editar pre-miRNAs de forma a inibir o processamento da Drosha, inviabilizando a biogênese de dsRNAs. Por outro lado, podem formar complexos com a Dicer capazes de quadruplicar a sua velocidade no processamento de miRNAs e também são capazes de promover a incorporação de miRNAs ao RISC (Nishikura 2016; Mingardi et al., 2018). A edição de miRNAs pode alterar a incorporação destes à proteína Ago2 em humanos, por exemplo, no caso de edição do pri-miR-BART6-5p produzido pelo vírus Epstein-Barr em células infectadas, contribuindo para o controle adequado do estágio de latência viral. (Iizasa et al., 2010). Entretanto, como os processos de regulação epigenética se sobrepõem, os miRNAs, como no caso do miR-1 em embriões

de camundongo, podem inversamente regular a expressão das enzimas ADAR através do silenciamento da expressão do mRNA deste (Garcia-Lopez, Hourcade e Mazo, 2013).

Warnefors e colaboradores em seu trabalho de 2014, encontraram evidências de que edições de miRNA sítio-específicas (i.e que ocorrem nas mesmas posições nucleotídicas) são mecanismos evolutivamente conservados, encontrando diversos eventos de edição conservados em mamíferos e entre diferentes grupos de vertebrados, lançando a ideia de que edições de miRNA não são eventos aleatórios, livres de pressão de seleção bem como representa um mecanismo que favorece o aumento da diversidade funcional de miRNAs. Um dado obtido por Kawahara e colaboradores mostra que cerca de 20% dos pri-miRNAs no cérebro humano adultos apresentam edição de miRNAs (Kawahara et al., 2008). Ainda, menos de 5% dos sítios são editados em frequência significativa em miRNAs maduros, mostrando ser um evento raro e sob seleção estabilizante, uma vez que pode levar a disfunção de miRNAs (Alon, et al., 2012). Interessantemente, Versely e colaboradores encontraram que 64% das edições de miRNAs ocorrem na região *seed* da molécula e Warnefors e colaboradores encontraram que 73% das edições encontradas em seu estudo estão na região *seed*. Além disto, Nigita e colaboradores identificaram 83% das edições em regiões *seed* em condição de hipóxia na linhagem celular de adenocarcinoma de mama, indicando que, novamente, edições de miRNA são mecanismos não aleatórios de regulação do repertório de alvos celulares (Vesely et al., 2014, Warnefors et al., 2014; Nigita et al., 2016; Correia de Sousa et al., 2019).

Estes processos podem causar um efeito de mal-pareamento devido a mudanças termodinâmicas na molécula precursora. Desta forma, edições de miRNA podem ser diretamente responsáveis por um mecanismo de flutuação e equilíbrio da assimetria termodinâmica entre as terminações e, portanto, também com a seletividade do RISC (Iizasa et al., 2010; Mingardi et al., 2018). A edição de miRNAs pode influenciar na estabilidade termodinâmica do precursor. Por exemplo, a edição do pri-miR-367a-1 na posição +4, conservadas em diversos tecidos de primatas (Gallego et al., 2017), aumenta a estabilidade da molécula, presumidamente, desfavorecendo a seleção do braço 5p nesta situação. Levando em conta os fatores discutidos aqui que influenciam a seleção das fitas, o aumento da estabilidade em uma terminação favorece a seletividade da outra terminação, assim, aumentando ou reduzindo a razão 5p/3p. A deleção do gene *ADAR1* leva a variação do uso de braços em diversos miRNAs (Cho et al., 2018; Correia de Sousa et al., 2019). Li e colaboradores, em 2018, estabeleceram uma correlação entre os valores de edição em um

índice ao qual chamaram de PMD (*pri- versus mature divergence*) e com isso perceberam uma correspondência entre o nível de edição e a abundância do miRNA maduro. Encontraram que edições em um dos braços promovem a produção do braço complementar a depender do miRNA e da posição de edição. Ainda, a deleção da enzima do gene *ADARB1* em tecido neuronal de ratos causa uma variação significativa na taxa 5p/3p, sugerindo que a edição pode ter influência na indução do *arm switching*.

Edições de miRNAs são um mecanismo de regulação pós-transcricional que atuam conjuntamente com os mecanismos de regulação de miRNAs mas, ao mesmo tempo, os regulam. Apesar da evidente influência que a edição de miRNAs exerce como fator de alteração das propriedades termodinâmicas terminais e da arquitetura dos precursores, há ainda muito a ser pesquisado sobre este mecanismos e suas variáveis.

6.4 Inibição competitiva de miRNAs por outros RNAs do transcriptoma

Sabemos que os processos por trás da repressão de alvos induzida por miRNAs envolvem o reconhecimento e pareamento de bases do miRNA com seus alvos. Assim, por outro lado, é razoável afirmar que RNAs contendo MREs podem ter uma capacidade similar de interferir na concentração de miRNAs e, portanto, na razão 5p/3p destes. A hipótese dos RNAs endógenos competitivos (ceRNAs; Salmena et al., 2011; revisado por Thomson e Dinger, 2016; Lin et al., 2021) propõe que lncRNAs (*long non-coding RNAs*), RNAs circulares (circRNAs), RNAs transcritos de pseudogenes e mRNAs cognatos, teriam, em contrapartida aos miRNAs, a capacidade de regular positivamente genes alvos por meio da inibição competitiva dos miRNAs. As primeiras moléculas que trouxeram este conceito foram chamadas de “esponjas de miRNAs” e eram RNAs artificiais (introduzidos ou transgênicos) que atuam como competidores endógenos que inibem a atividade de miRNAs pelo sequestro destes (Ebert, Neilson e Sharp, 2007; revisado por Panda, 2018). Por meio desta capacidade de sequestro, esponjas de miRNA possuem a capacidade de induzir a degradação de miRNAs específicos. Posteriormente, este processo em que alvos de miRNAs são capazes de desencadear a degradação desses miRNAs foi denominado como TDMD (*Target RNA-Directed MicroRNA Degradation*) (Ameres et al., 2010; revisado por Fuchs Wightman et al., 2018). A possibilidade de diversas moléculas do transcriptoma afetarem a disponibilidade de miRNAs ao atuarem como sequestradoras despertou bastante interesse e, na última década, uma série de estudos buscando entender os efeitos de certos lncRNAs endógenos, artificiais e virais em células sugerem a presença deste efeito de

inibição de miRNAs (Ameres et al., 2010; Cazalla et al., 2010; Memczak et al., 2013; Hansen et al., 2013; Kingston, Blodgett e Bartel, 2022). Esses RNAs competidores, em sua maioria lncRNAs, são oligonucleotídeos complementares antissenso a miRNAs endógenos, por isso são chamados de antagomiRs ou anti-miRs. A hipótese dos ceRNAs postula a competição estequiométrica entre MREs no transcriptoma citoplasmático pelas ligações com os miRNAs. Assim, miRNAs podem parear com uma rede de lncRNAs alvos através de MREs (os ceRNAs) e vice-versa. Deste modo, o transcriptoma seria capaz de estabelecer uma rede de reconhecimento e regulação sinérgica com um ou mais miRNAs alvos. Dessa forma, os antagomiRs podem estabelecer uma arquitetura de ligação diferencial entre os ceRNAs e o miRNA que competiria com a Ago pela formação dessas ligações, assim, reduzindo a disponibilidade estequiométrica de miRNAs e, por consequência, sua atividade regulatória. Como resultado, em cenários de ampla competição de ceRNAs, os demais mRNAs alvos dos miRNAs teriam maior chance de ter sua tradução efetivada.

Contudo, o real efeito dos ceRNAs em induzir TDMD é visto com ceticismo, uma vez que a expressão de um ceRNA constitui apenas uma pequena fração do repertório de alvos. A expressão elevada de um único ceRNA pode ter um efeito reduzido na repressão de miRNAs e possivelmente é fisiologicamente raro. Uma das razões destacadas é a falta de material altamente complementar aos miRNAs nos genomas de metazoários e que a indução de mecanismos envolvendo ceRNAs não induz o alongamento e degradação de miRNAs, algo requisitado para melhor eficiência do TDMD (Fuchs Wightman et al., 2018). Estudos realizados controlando o nível de ceRNAs *in vivo* indicaram que para se identificar algum nível de influência destes na atividade de miRNAs, foi preciso que a concentração miRNA alvo seja equimolar e muito além das concentrações fisiologicamente plausíveis, ao menos para miRNAs expressos em altas concentrações (Denzler et al., 2014; Bosson et al., 2014). Isso se deve ao fato de que os ceRNAs podem estabelecer TDMD apenas por meio do sequestro de miRNAs, sendo a sua concentração o único fator efetivo de influência no alvo. A controvérsia em relação à hipótese de ceRNAs envolve que, se de fato o efeito regulatório de ceRNA for uma força regulatória da expressão de miRNAs, um único alvo representa apenas uma pequena fração do repertório de alvos do miRNA e por tanto não distinguível seu nível de influência. O mecanismo de repressão de miRNAs pelos alvos é um fenômeno emergente do *pool* de transcritos do citoplasma e da conformação da arquitetura de ligação miRNA-alvo. Ainda, experimentos em modelos virais com mutações

ou experimentos com a remoção das MREs de alvos artificiais mostraram que mesmo assim a regulação de miRNA pode ser observada (Park et al., 2007; Denzler et al., 2014).

Esta dinâmica de regulação e degradação do TDMD interfere nos níveis e disponibilidade de de miRNAs. Porém, há algumas sugestões de não ser um efeito emergente transcriptoma citoplasmático total, mas, desencadeado por moléculas de RNA específicas que recrutam a maquinaria celular para a marcação e degradação de miRNAs específicos (Fuchs Wightman et al., 2018; Kingston, Blodgett e Bartel, 2022). Uma complementaridade maior com o miRNA, compreendendo a região 3' do alvo, parece ser um dos requisitos para o TDMD. Ameres e colaboradores perceberam que, em alguns momentos, os miRNAs de *Drosophila* apresentam complementaridade extensiva ao mRNA alvo (Ameres et al., 2010). Quando expostos a miRNAs artificiais com complementaridade extensiva, sua eficiência é reduzida e os miRNAs são desacoplados do RISC ou degradados, no caso da Ago2 (Rüegger e Großhans 2012; Fuchs Wightman et al., 2018). Esta complementaridade estendida é, genericamente, a causa da perda de eficiência da capacidade regulatória dos miRNAs, já que se admite que esta iniciaria mecanismos de sinalização e degradação (por terminal nucleotidiltransferases - TENTs e por ribonucleases, respectivamente, como mencionados no item 5.2.2) ou, ao menos, promove o desacoplamento do miRNA da Ago e sua consequente degradação ocorreria independentemente (Ameres et al., 2010; Baccarini et al., 2011; De la Mata et al., 2015; Han e Mandell, 2022). Portanto, TDMD não se trata da repressão da atividade de miRNAs pela interferência na sua biogênese ou da afinidade da Ago, mas sim, pela disponibilidade de fitas no *pool* transcriptoma citoplasmático. Portanto, pressupõe-se que isso possa interferir no ajuste da razão 5p/3p, não pela concentração destes em si, mas pela razão de braços 5p/3p funcionalmente disponíveis (não sequestrados). Desta forma, TDMD indica que, sem alterar necessariamente a transcrição, interferir na clivagem dos miRNAs precursores ou na a preferência de braços da Ago é possível, em teoria, a ocorrência de *arm switching* apenas pelo sequestro de miRNAs.

Se estas formas de ativação do TDMD acontecem endogenamente, é sugerido que este fenômeno pode acontecer de diversas maneiras e que propriedades termodinâmicas ganham ainda mais centralidade na determinação da fita guia, assim como no sentido canônico de regulação miRNA-alvo. Contudo, recentemente, estas evidências ainda mostraram que lncRNAs homólogos têm função conservada (Bitetti et al., 2018; Kleaveland et al., 2018; Ghini et al., 2018). Por isso, caso os lncRNAs tenham função de TDMD fixada,

a regulação de miRNAs por TDMD pode ser um traço conservado. De fato, há muito o que se considerar sobre o TDMD, uma vez que as causas e processos biológicos envolvidos ainda são bastante incertos e precisam ser melhor investigados.

6.5 Duplicação de genes de miRNAs.

Usualmente, cada braço de miRNA está relacionado a funções biológicas diferentes e muitas vezes independentes em relação ao seu braço complementar. Marco e colaboradores (2012) demonstraram que miRNAs maduros de humanos e moscas com o mesmo precursor têm conjuntos de alvos significativamente diferentes e estão semanticamente associados a processos biológicos distintos. Essa relação de demandas conflitantes (*trade-off*) não implica, necessariamente, que as funções associadas a diferentes perfis de expressão de braços não possam coexistir na infraestrutura celular. Porém, isso ocorre tão somente devido à maquinaria de silenciamento de mRNAs que respondem aos fatores de seleção até então mencionados, os quais tendem a ser semelhantes em genes parálogos (Berzikov 2011).

O processo evolutivo que permitiria a expressão conjunta dos fenótipos associados aos dois braços complementares é a duplicação gênica. De fato, miRNAs parálogos tendem a produzir miRNAs funcionais do mesmo braço (Marco et al., 2010). Apesar disso, o *arm switching* entre miRNAs parálogos, ou seja, quando cada uma das cópias expressam braços diferentes, já foi observado. Por exemplo, em Griffiths-Jones e colaboradores, em 2011, dentre os genes da família mir-100/10 em protostômios, o gene do miR-933 sofreu *arm switching* 5p para 3p, mas houve a conservação da dominância do braço 5p para os outros parálogos nos organismos modelos analisados, exceto em *D. melanogaster*.

No contexto dos genes de miRNA, a duplicação gênica seguida de processos de neofuncionalização ou subfuncionalização, onde esses eventos poderiam causar a redução da pressão da seleção de braços, flexibilizaria o padrão de uso de braços. A neofuncionalização ocorreria em situações onde mutações em uma das cópias ocasionariam uma flutuação da preferência da Ago. Já a duplicação seguida de subfuncionalização poderia influenciar no desequilíbrio estequiométrico da razão pre-miRNA/alvos a favor do pre-miR, permitindo a expressão da fita passageira sem prejuízo aos efeitos regulatórios da fita guia. Isto aponta para a duplicação de genes de miRNA como uma possível fonte de atenuação da dicotomia seletiva da Ago ou, ao menos, contribuiria

para a expressão de diferentes perfis de expressão de braços e isto poderia ocasionar o *arm switching* (Berezikov 2011; Griffiths-Jones et al., 2011; Leite et al., 2016, Marco et al., 2010; De Wit et al., 2009).

Contudo, é importante ressaltar que o fator estequiométrico parece ser importante para esse fenômeno. Nos trabalhos realizados por De Leite et al., 2016, e Nong et al., 2021, foram realizados estudos que envolveram análise do genoma em busca de eventos de WGS (*Whole genome duplication* - Duplicação total do genoma) (Pasquier et al., 2017). Apesar de haver a duplicação de genes de miRNA nesses eventos, não se encontra variação significativa no perfil de expressão de miRNAs. Uma possível explicação para isto é que em eventos de duplicação total do genoma ocorre conjuntamente a duplicação dos seus alvos. Isso pode indicar que a duplicação de um gene de miRNA pode ser uma fonte ou possivelmente é um pré-requisito para a ocorrência de *arm switching*, mas, para que aconteça a relação de abundância miRNA/Alvo deve ser desbalanceada (Material suplementar de Peterson et al., 2022).

Em suma, as evidências até o momento sugerem que a duplicação de miRNAs não necessariamente induz o *arm switching* ou tem influência direta no perfil de expressão, mas permite que cada um dos braços de miRNAs associados a funções biológicas distintas possa ser expresso sem competir entre si pela seleção da Ago. Porém, fica evidente que, apesar dos efeitos da duplicação de genes de miRNAs serem razoavelmente bem estudados, principalmente para explicar o surgimento de novos miRNAs, ainda há de se investigar como a duplicação de genes de miRNAs afeta diretamente ocorrência de *arm switching*.

7.Considerações Finais

Compreender os mecanismos de seleção de braços de miRNAs e o *arm switching* é fundamental para elucidar as bases da regulação gênica e fisiológica em organismos eucarióticos. Esses processos fornecem uma nova camada de complexidade para o sistema de regulação biológica, permitindo que as células modulem suas respostas a diferentes contextos biológicos. No presente trabalho, foi realizada uma revisão abrangente e atualizada sobre o estado atual do conhecimento sobre a seleção de braços e *arm switching* de miRNAs.

Ainda há pouca pesquisa sobre eventos de *arm switching* investigando os mais diversos contextos de forma intraespecífica e interespecífica para que possamos entender melhor a evolução do mecanismo de regulação por miRNAs e de *arm switching* como também como isso pôde ter favorecido a evolução biológica dos organismos. Portanto, a investigação acerca dos componentes de miRNA em diferentes grupos biológicos podem elucidar parte do processo evolutivo dos organismos e explicar, ao menos em partes, como se dá o processo de adaptação dos organismos a diferentes ambientes e contextos. Para isso, é importante ter conhecimento sobre a seleção de braços e os processos que o governa. A caracterização da frequência e do impacto funcional desses eventos em diferentes contextos e grupos biológicos é um desafio a ser enfrentado. A integração de abordagens experimentais e computacionais, juntamente com a utilização de novas tecnologias de sequenciamento e análise de dados, pode contribuir para avanços importantes nessa área.

Mesmo que muito tenha sido descoberto sobre a seleção de braços de miRNAs na última década, há desafios significativos a serem superados no que se trata da identificação dos fatores e das variáveis que governam processos de seleção diferencial das fitas, da evolução destes mecanismos e da caracterização destes em diferentes organismos e contextos. Embora se saiba que a estabilidade termodinâmica e a identidade dos nucleotídeos 5' desempenhem papéis importantes, a presente inspeção da literatura mostra que ainda há muito a ser elucidado sobre outros determinantes envolvidos na seleção de braços e na ocorrência de eventos *arm switching* como a regulação de enzimas participantes da biogênese, fatores ambientais que desencadeiam o *arm switching* ou ainda determinantes na estrutura dos precursores. Outro desafio a ser superado é a caracterização do impacto funcional desses eventos em diferentes organismos. Até o momento, pouco foi pesquisado sobre eventos *arm switching* sob a luz de processos evolutivos. Sabemos que não é um processo livre de seleção natural, uma vez que alguns miRNAs e famílias de miRNAs já foram investigado filogeneticamente (Griffiths-Jones et al., 2010). Portanto, presume-se que seja fixado por seleção natural. Há de se dizer que os mecanismos de regulação por meio de RNAs podem ter uma importância para a multicelularidade visto que estes evoluíram independentemente em animais, plantas e fungos (Shabalina e koonin, 2008). Evento de *arm switching* intertecidual foi reportado em cnidário (Nong et al., 2020), indicando que a presença deste mecanismo em metazoários antecede o surgimento dos bilatérios. Além disso, a presença de genes de miRNAs foi

crescente durante a diversificação deste grupo, podendo caracterizar uma vantagem adaptativa. Ademais, como mencionado, a duplicação de genes parece favorecer o controle regulatório através de miRNAs e ser um fator de ocorrência de *arm switching*. Existe uma gama de desafios em relação a tarefa de identificar *arm switching* em diferentes organismos e avaliar o seu impacto biológico, uma vez que é necessário avaliar a expressão de pares de braços de miRNA em vários tecidos, de várias espécies e vários contextos e então comparar, de forma normalizada, o perfil de expressão de forma comparativa. Além disso, uma etapa funcional para identificar os alvos dos miRNAs envolvidos e as vias biológicas afetadas para então mensurar o impacto biológico que estes miRNAs têm na expressão fenotípica (Figura 7).

Para cada grupo de miRNAs irmãos

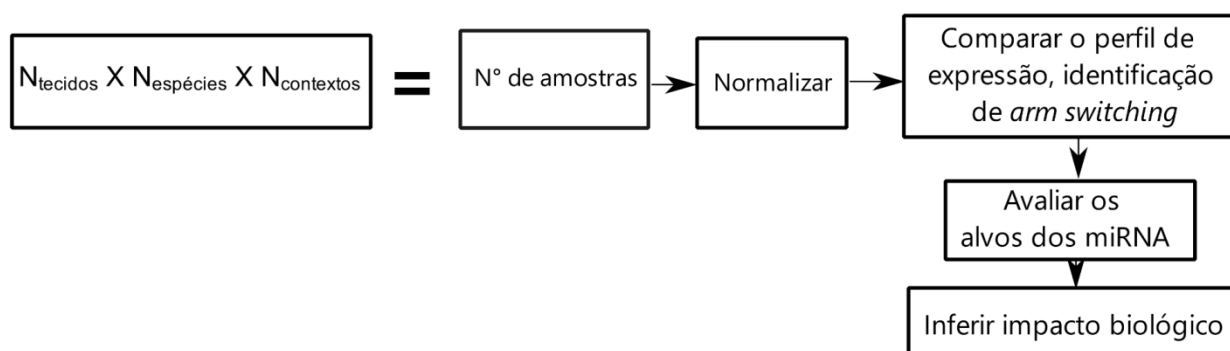


Figura 7. Proposta de metodologia para identificação de novos *arm switching* Fonte: imagem elaborada pelo autor.

Essa revisão representa um esforço significativo no avanço da compreensão desses fenômenos e destaca a importância do estudo da seleção de braços e *arm switching* na regulação gênica e na plasticidade fenotípica dos organismos. Foi possível identificar nesta revisão lacunas no conhecimento atual sobre seleção de miRNAs e a importância de futuras pesquisas para preencher essas lacunas.

As perspectivas futuras para o estudo de miRNAs e dos fatores que modulam a seleção de braços funcionais são promissoras. Compreender a seleção de braços e o *arm switching* abrirá portas para o desenvolvimento de técnicas biotecnológicas bem como para potenciais aplicações terapêuticas e avanços importantes quanto ao entendimento da regulação gênica e seu impacto na evolução dos organismos eucariotos. A continuidade de

pesquisas focadas em elucidar os fatores que impactam na seleção de braços e *arm switching* é essencial para que sejamos capazes de desvendar os mecanismos que regem a regulação gênica e ultimamente, modulam vias e processos biológicos inerentes à vida.

8. Metodologia de busca

Este trabalho foi um esforço para identificar os mecanismos que influenciam a seleção de braços de miRNA e o que pode ocasionar um evento de *arm switching*. Para buscar o corpo de conhecimento que a literatura disponibiliza sobre o assunto, foi realizado busca de artigos científicos nas plataformas Google Scholar e PubMed de artigos desde 2007 quando os primeiros esforços de mapear de miRNAs em organismo em diversos tecido foram publicados (Ro et al., 2007 e Landgraf et al., 2007). Os termos usados para a busca foram - "arm switching", "arm-switching", "ARS" "strand selection", "arm selection", "arm usage", "funcional shift", além da combinação entre termos seguintes termos: "differential ou Alternative" e "expression ou Strand selection ou Arm selection ou Arm usage", combinados com os termos "microRNA" e "miRNA". Os resultados foram filtrados pela leitura do *abstract* e introdução do artigo. Foram aceitos os artigos que:

1. Identificassem ativamente eventos de ARS;
2. Artigos que não necessariamente usasse termos como arm switching, mas, que identificou a expressão diferencial de mirNAs irmãos ou seleção de braços diferencial e
3. Que descrevesse o tecido ou espécie analisados ou contexto que causasse a mudança de braço preferencialmente selecionado.

Adicionalmente, foram inclusos na revisão artigos que só foram conhecidos devido a citações nos artigos que retornaram dos motores de busca.

Ao final, foi avaliado os fatores que induziram a seleção de braço que foi identificado em cada um destes artigos. Assim, os fatores foram classificados como: intrínsecos a molécula de mirna e extrínsecos a molécula de miRNA.

Referências

- AALTO, Antti P. et al. Opposing roles of microRNA Argonautes during *Caenorhabditis elegans* aging. **PLoS genetics**, v. 14, n. 6, p. e1007379, 2018.
- ALIVERNINI, Stefano et al. MicroRNA-155—at the critical interface of innate and adaptive immunity in arthritis. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1932, 2018.
- ALON, Shahar et al. Systematic identification of edited microRNAs in the human brain. **Genome research**, v. 22, n. 8, p. 1533-1540, 2012.
- AMERES, Stefan L. et al., Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1534-1539, 2010.
- BACCARINI, Alessia et al. Kinetic analysis reveals the fate of a microRNA following target regulation in mammalian cells. **Current biology**, v. 21, n. 5, p. 369-376, 2011.
- BARTEL, David P. Metazoan micrornas. **Cell**, v. 173, n. 1, p. 20-51, 2018.
- BEREZIKOV, Eugene. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846-860, 2011.
- BIRYUKOVA, Inna; YE, Tao; LEVASHINA, Elena. Transcriptome-wide analysis of microRNA expression in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-19, 2014.
- BITETTI, Angelo et al. MicroRNA degradation by a conserved target RNA regulates animal behavior. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 3, p. 244-251, 2018.
- BIZUAYEHU, Teshome T. et al. Sex-biased miRNA expression in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) brain and gonads. **Sexual Development**, v. 6, n. 5, p. 257-266, 2012.
- BOFILL-DE ROS, Xavier; YANG, Acong; GU, Shuo. IsomiRs: expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1863, n. 4, p. 194373, 2020.
- BOSSON, Andrew D.; ZAMUDIO, Jesse R.; SHARP, Phillip A. Endogenous miRNA and target concentrations determine susceptibility to potential ceRNA competition. **Molecular cell**, v. 56, n. 3, p. 347-359, 2014.
- BRITES, Dora; FERNANDES, Adelaide. Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 9, p. 476, 2015.
- BROUGHTON, James P. et al. Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. **Molecular cell**, v. 64, n. 2, p. 320-333, 2016.

ÇAKMAK, Hüseyin Altuğ; DEMİR, Mehmet. MicroRNA and cardiovascular diseases. **Balkan medical journal**, v. 37, n. 2, p. 60, 2020.

CAZALLA, Demián; YARIO, Therese; STEITZ, Joan A. Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. **Science**, v. 328, n. 5985, p. 1563-1566, 2010.

CHANG, Hao-Ming et al. A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28–let-7 pathway. **Nature**, v. 497, n. 7448, p. 244-248, 2013.

CHATTERJEE, Saibal et al., Target-mediated protection of endogenous microRNAs in *C. elegans*. **Developmental cell**, v. 20, n. 3, p. 388-396, 2011.

CHIPMAN, Laura B.; PASQUINELLI, Amy E. miRNA targeting: growing beyond the seed. **Trends in genetics**, v. 35, n. 3, p. 215-222, 2019.

CHO, Charles J. et al. Combinatory RNA-sequencing analyses reveal a dual mode of gene regulation by ADAR1 in gastric cancer. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 63, p. 1835-1850, 2018.

CLANCY, James W. et al. An ARF6–Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles. **Nature cell biology**, v. 21, n. 7, p. 856-866, 2019.

CLOONAN, Nicole et al. MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. **Genome biology**, v. 12, n. 12, p. 1-20, 2011.

CÓRDOVA-RIVAS, Sergio et al. 5p and 3p strands of miR-34 family members have differential effects in cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer cells. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 3, p. 545, 2019.

CROSTON, Tara L. et al. MicroRNA regulation of host immune responses following fungal exposure. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 170, 2018.

CORREIA DE SOUSA, Marta et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 24, p. 6249, 2019.

CZECH, Benjamin et al., Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. **Molecular cell**, v. 36, n. 3, p. 445-456, 2009.

DAWSON, Owen; PICCININI, Anna Maria. miR-155-3p: processing by-product or rising star in immunity and cancer?. **Open Biology**, v. 12, n. 5, p. 220070, 2022.

DE ALMEIDA, Caroline et al., RNA uridylation: a key posttranscriptional modification shaping the coding and noncoding transcriptome. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 9, n. 1, p. e1440, 2018.

DE LA MATA, Manuel et al. Potent degradation of neuronal miRNA s induced by highly complementary targets. **EMBO reports**, v. 16, n. 4, p. 500-511, 2015.a

DE WIT, Elzo et al., Repertoire and evolution of miRNA genes in four divergent nematode species. **Genome research**, v. 19, n. 11, p. 2064-2074, 2009.

DENLI, Ahmet M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 231-235, 2004.

DENZLER, Rémy et al., Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. **Molecular cell**, v. 54, n. 5, p. 766-776, 2014.

DHANOA, Jasdeep Kaur et al., Biogenesis and biological implications of isomiRs in mammals-a review. **ExRNA**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2019.

EBERT, Margaret S.; NEILSON, Joel R.; SHARP, Phillip A. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. **Nature methods**, v. 4, n. 9, p. 721-726, 2007.

FENG, Hongxiang et al. MiR- 34b- 3p represses cell proliferation, cell cycle progression and cell apoptosis in non- small- cell lung cancer (NSCLC) by targeting CDK4. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 8, p. 5282-5291, 2019.

FERNANDEZ-VALVERDE, Selene L.; TAFT, Ryan J.; MATTICK, John S. Dynamic isomiR regulation in Drosophila development. **Rna**, v. 16, n. 10, p. 1881-1888, 2010.

FRANK, Filipp; SONENBERG, Nahum; NAGAR, Bhushan. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 818-822, 2010.

FÖRSTEMANN, Klaus et al. Drosophila microRNAs are sorted into functionally distinct argonaute complexes after production by dicer-1. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 287-297, 2007.

FUCHS WIGHTMAN, Federico et al. Target RNAs strike back on microRNAs. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 435, 2018.

GALLEGO, Alicia et al. RNA editing independently occurs at three mir-376a-1 sites and may compromise the stability of the microRNA hairpin. **Gene**, v. 628, p. 109-116, 2017.

GARCÍA-LÓPEZ, Jesús; HOURCADE, Juan de Dios; DEL MAZO, Jesús. Reprogramming of microRNAs by adenosine-to-inosine editing and the selective elimination of edited microRNA precursors in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, p. 5483-5493, 2013.

GEBERT, Luca FR; MACRAE, Ian J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 20, n. 1, p. 21-37, 2019.

GHINI, Francesco et al., Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 2018.

GLAZOV, Evgeny A. et al., A microRNA catalog of the developing chicken embryo identified by a deep sequencing approach. **Genome research**, v. 18, n. 6, p. 957-964, 2008.

GONG, Jing et al. Comprehensive analysis of human small RNA sequencing data provides insights into expression profiles and miRNA editing. **RNA biology**, v. 11, n. 11, p. 1375-1385, 2014.

GREGORY, Richard I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235-240, 2004.

GRIFFITH-JONES, Sam et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_1, p. D140-D144, 2006.

GRIFFITHS- JONES, Sam et al., MicroRNA evolution by arm switching. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 172-177, 2011.

GUO, Li; LU, Zuhong. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule?. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11387, 2010.

GUO, Li et al., Close association between paralogous multiple isomiRs and paralogous/orthologues miRNA sequences implicates dominant sequence selection across various animal species. **Gene**, v. 527, n. 2, p. 624-629, 2013.

GUO, Li et al., Selected isomiR expression profiles via arm switching?. **Gene**, v. 533, n. 1, p. 149-155, 2014.

GUO, Li; CHEN, Feng. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. **Gene**, v. 544, n. 1, p. 1-7, 2014.

GUO, Li et al. A comprehensive analysis of miRNA/isomiR expression with gender difference. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0154955, 2016.

HA, Minju; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509-524, 2014.

HAN, Jinju et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *cell*, v. 125, n. 5, p. 887-901, 2006.

HAN, Jaeil; MENDELL, Joshua T. MicroRNA turnover: a tale of tailing, trimming, and targets. **Trends in biochemical sciences**, 2022.

HANSEN, Thomas B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 384-388, 2013.

HEO, Inha et al., Mono-uridylation of pre-microRNA as a key step in the biogenesis of group II let-7 microRNAs. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 521-532, 2012.

HU, Hai Yang et al. Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2009.

HUANG, Chiu-Jung et al. Frequent co-expression of miRNA-5p and-3p species and cross-targeting in induced pluripotent stem cells. **International journal of medical sciences**, v. 11, n. 8, p. 824, 2014.

IIZASA, Hisashi et al., Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their Dicer targeting and consequently affects viral latency. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 43, p. 33358-33370, 2010.

JAGADEESWARAN, Guru et al. Deep sequencing of small RNA libraries reveals dynamic regulation of conserved and novel microRNAs and microRNA-stars during silkworm development. **BMC genomics**, v. 11, p. 1-18, 2010.

KAWAHARA, Yukio et al. Frequency and fate of microRNA editing in human brain. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 16, p. 5270-5280, 2008.

KAWAMATA, Tomoko; SEITZ, Hervé; TOMARI, Yukihide. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. **Nature structural & molecular biology**, v. 16, n. 9, p. 953-960, 2009.

KAWAMATA, Tomoko; TOMARI, Yukihide. Making risc. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 7, p. 368-376, 2010.

KAWAMATA, Tomoko; YODA, Mayuko; TOMARI, Yukihide. Multilayer checkpoints for microRNA authenticity during RISC assembly. **EMBO reports**, v. 12, n. 9, p. 944-949, 2011.

KAWAHARA, Yukio et al. Redirection of silencing targets by adenosine-to-inosine editing of miRNAs. **Science**, v. 315, n. 5815, p. 1137-1140, 2007.

KHVOROVA, Anastasia; REYNOLDS, Angela; JAYASENA, Sumedha D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 209-216, 2003.

KIM, Young-Kook; KIM, Boseon; KIM, V. Narry. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 13, p. E1881-E1889, 2016.

KIM, Haedong et al., A mechanism for microRNA arm switching regulated by uridylation. **Molecular cell**, v. 78, n. 6, p. 1224-1236. e5, 2020.

KINGSTON, Elena R.; BLODGETT, Lianne W.; BARTEL, David P. Endogenous transcripts direct microRNA degradation in *Drosophila*, and this targeted degradation is required for proper embryonic development. **Molecular cell**, v. 82, n. 20, p. 3872-3884. e9, 2022.

KLEAVELAND, Benjamin et al. A network of noncoding regulatory RNAs acts in the mammalian brain. **Cell**, v. 174, n. 2, p. 350-362. e17, 2018.

KOBAYASHI, Hotaka; TOMARI, Yukihide. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 71-81, 2016.

KOZOMARA, Ana; BIRGAOANU, Maria; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D155-D162, 2019.

KUME, Hideaki et al. A-to-I editing in the miRNA seed region regulates target mRNA selection and silencing efficiency. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 15, p. 10050-10060, 2014.

KWON, S. Chul et al. Structure of human DROSHA. **Cell**, v. 164, n. 1-2, p. 81-90, 2016.

LANDGRAF, Pablo et al., A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1401-1414, 2007.

LEE, Ho Young; DOUDNA, Jennifer A. TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro. **Rna**, v. 18, n. 11, 2012.

LEITE, Daniel J. et al. Pervasive microRNA duplication in chelicerates: insights from the embryonic microRNA repertoire of the spider *Parasteatoda tepidariorum*. **Genome biology and evolution**, v. 8, n. 7, p. 2133-2144, 2016.

LI, Sung-Chou et al. miRNA Strand selection and isomiR distribution in gastric cancer. In: **BMC genomics**. BioMed Central, 2012. p. 1-10.

LI, Sung-Chou et al. MicroRNA 3'end nucleotide modification patterns and Strand selection preference in liver tissues. In: **BMC systems biology**. BioMed Central, 2012. p. 1-12.

LIN, Weimin et al. The development and controversy of competitive endogenous RNA hypothesis in non-coding genes. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 476, p. 109-123, 2021.

LIUDKOVSKA, Vladyslava; DZIEMBOWSKI, Andrzej. Functions and mechanisms of RNA tailing by metazoan terminal nucleotidyltransferases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 12, n. 2, p. e1622, 2021.

LIU, Jidong et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, v. 305, n. 5689, p. 1437-1441, 2004.

LUDWIG, Nicole et al. Distribution of miRNA expression across human tissues. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 8, p. 3865-3877, 2016.

MALLICK, Bidyut et al. Understanding the molecular interaction of human argonaute- 2 and miR- 20a complex: A molecular dynamics approach. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 12, p. 19915-19924, 2019.

MARCO, Antonio et al., Functional shifts in insect microRNA evolution. **Genome biology and evolution**, v. 2, p. 686-696, 2010.

MARCO, Antonio et al. MicroRNAs from the same precursor have different targeting properties. **Silence**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2012.

MARCO, Antonio. SeedVicious: Analysis of microRNA target and near-target sites. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195532, 2018.

MEDLEY, Jeffrey C.; PANZADE, Ganesh; ZINOVYEVA, Anna Y. microRNA strand selection: Unwinding the rules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 12, n. 3, p. e1627, 2021.

MEHRABADI, Mohammad; HUSSAIN, Mazhar; ASGARI, Sassan. MicroRNAome of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection. **Journal of General Virology**, v. 94, n. 6, p. 1385-1397, 2013.

MEMCZAK, Sebastian et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 333-338, 2013.

MENEZES, Miriam R.; BALZEAU, Julien; HAGAN, John P. 3' RNA uridylation in epitranscriptomics, gene regulation, and disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 5, p. 61, 2018.

MI, Shijun et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. **Cell**, v. 133, n. 1, p. 116-127, 2008.

MINGARDI, Jessica et al. miRNA editing: new insights into the fast control of gene expression in health and disease. *Molecular neurobiology*, v. 55, p. 7717-7727, 2018.

NALLAMSHETTY, Shriram; CHAN, Stephen Y.; LOSCALZO, Joseph. Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 64, p. 20-30, 2013.

NEILSEN, Corine T.; GOODALL, Gregory J.; BRACKEN, Cameron P. IsomiRs—the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. **Trends in genetics**, v. 28, n. 11, p. 544-549, 2012.

NOLAND, Cameron L.; DOUDNA, Jennifer A. Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways. **Rna**, v. 19, n. 5, p. 639-648, 2013.

NICHOLSON, Allen W. Ribonuclease III mechanisms of double-stranded RNA cleavage. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, n. 1, p. 31-48, 2014.

NIGITA, Giovanni et al. microRNA editing in seed region aligns with cellular changes in hypoxic conditions. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 13, p. 6298-6308, 2016.

NISHIKURA, Kazuko. A-to-I editing of coding and non-coding RNAs by ADARs. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 17, n. 2, p. 83-96, 2016.

NONG, Wenyan et al. Jellyfish genomes reveal distinct homeobox gene clusters and conservation of small RNA processing. **Nature communications**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2020.

NONG, Wenyan et al. Horseshoe crab genomes reveal the evolution of genes and microRNAs after three rounds of whole genome duplication. **Communications biology**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2021.

OKAMURA, Katsutomo et al. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 4, p. 354-363, 2008.

OKAMURA, Katsutomo; LIU, Na; LAI, Eric C. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. **Molecular cell**, v. 36, n. 3, p. 431-444, 2009.

PANDA, Amaresh Chandra. Circular RNAs act as miRNA sponges. **Circular RNAs**, p. 67-79, 2018.

PASQUIER, Jeremy et al. Evolution of gene expression after whole- genome duplication: New insights from the spotted gar genome. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 328, n. 7, p. 709-721, 2017.

PASQUINELLI, Amy E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 271-282, 2012.

PARK, Joseph K. et al. The miRNA pathway intrinsically controls self-renewal of *Drosophila* germline stem cells. *Current Biology*, v. 17, n. 6, p. 533-538, 2007.

PETERSON, Kevin J. et al. MicroRNAs as indicators into the causes and consequences of whole-genome duplication events. *Molecular Biology and Evolution*, v. 39, n. 1, p. msab344, 2022.

PINHAL, Danilo et al., Genome-wide microRNA screening in Nile tilapia reveals pervasive isomiRs' transcription, sex-biased arm switching and increasing complexity of expression throughout development. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2018.

PUNDIR, Sachin; GORODKIN, Jan. Differential and coherent processing patterns from small RNAs. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-16, 2015.

QUINTANILHA, Bruna J. et al. Nutrimiomics: role of microRNAs and nutrition in modulating inflammation and chronic diseases. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1168, 2017.

RIBEIRO, Amanda Oliveira et al. MicroRNA roles in regeneration: Multiple lessons from zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 251, n. 4, p. 556-576, 2022.

RO, Seungil et al., Tissue-dependent paired expression of miRNAs. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 17, p. 5944-5953, 2007.

ROUSH, Sarah; SLACK, Frank J. The let-7 family of microRNAs. **Trends in cell biology**, v. 18, n. 10, p. 505-516, 2008.

RÜEGGER, Stefan; GROßHANS, Helge. MicroRNA turnover: when, how, and why. **Trends in biochemical sciences**, v. 37, n. 10, p. 436-446, 2012.

SADD, Ben M. et al. The genomes of two key bumblebee species with primitive eusocial organization. **Genome biology**, v. 16, n. 1, p. 1-32, 2015.

SALIM, Uzma et al. Biogenesis, characterization, and functions of mirtrons. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v. 13, n. 1, p. e1680, 2022.

SALMENA, Leonardo et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. **cell**, v. 146, n. 3, p. 353-358, 2011.

SAYED, Danish; ABDELLATIF, Maha. MicroRNAs in development and disease. **Physiological reviews**, v. 91, n. 3, p. 827-887, 2011.

SEITZ, Hervé; TUSHIR, Jogender S.; ZAMORE, Phillip D. A 5'-uridine amplifies miRNA/miRNA* asymmetry in Drosophila by promoting RNA-induced silencing complex formation. **Silence**, v. 2, p. 1-10, 2011.

SEOK, Heeyoung et al. MicroRNA target recognition: insights from transcriptome-wide non-canonical interactions. **Molecules and cells**, v. 39, n. 5, p. 375, 2016.

SHABALINA, Svetlana A.; KOONIN, Eugene V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. **Trends in ecology & evolution**, v. 23, n. 10, p. 578-587, 2008.

SHOSHAN, Einav et al. Reduced adenosine-to-inosine miR-455-5p editing promotes melanoma growth and metastasis. **Nature cell biology**, v. 17, n. 3, p. 311-321, 2015.

SIMONE, Nicole L. et al. Ionizing radiation-induced oxidative stress alters miRNA expression. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6377, 2009.

SU, Hong et al. Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. **Genes & development**, v. 23, n. 3, p. 304-317, 2009.

SUZUKI, Hiroshi I. et al., Small-RNA asymmetry is directly driven by mammalian Argonautes. **Nature structural & molecular biology**, v. 22, n. 7, p. 512-521, 2015.

TAN, Geok Chin et al., 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. **Nucleic acids research**, v. 42, n. 14, p. 9424-9435, 2014.

TAN, Geok Chin; DIBB, Nicholas. IsomiRs have functional importance. **Malays J Pathol**, v. 37, n. 2, p. 73-81, 2015.

THOMSON, Daniel W.; DINGER, Marcel E. Endogenous microRNA sponges: evidence and controversy. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2016.

THORNTON, James E. et al. Lin28-mediated control of let-7 microRNA expression by alternative TUTases Zcchc11 (TUT4) and Zcchc6 (TUT7). **Rna**, v. 18, n. 10, p. 1875-1885, 2012.

TOMARI, Yukihide; DU, Tingting; ZAMORE, Phillip D. Sorting of Drosophila small silencing RNAs. **Cell**, v. 130, n. 2, p. 299-308, 2007.

TSAI, Kuo-Wang et al. Strand selection preference of microRNA-193a varies in breast cancer. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

VESELY, Cornelia et al. ADAR2 induces reproducible changes in sequence and abundance of mature microRNAs in the mouse brain. *Nucleic acids research*, v. 42, n. 19, p. 12155-12168, 2014.

WARNEFORS, Maria et al. Conserved microRNA editing in mammalian evolution, development and disease. **Genome biology**, v. 15, n. 6, p. 1-14, 2014.

WILLKOMM, Sarah et al. Single-molecule FRET uncovers hidden conformations and dynamics of human Argonaute 2. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3825, 2022.

YAN, Yan et al. Influence of a high-altitude hypoxic environment on human plasma microRNA profiles. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

YANG, Weidong et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 13-21, 2006.

YANG, Jr-Shiuan et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. **Rna**, v. 17, n. 2, p. 312-326, 2011.

YODA, Mayuko et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 1, p. 17-23, 2010.

YOUNG, Cameron et al. Reversing the miRNA-5p/-3p stoichiometry reveals physiological roles and targets of miR-140 miRNAs. **RNA**, v. 28, n. 6, p. 854-864, 2022.

WARKOCKI, Zbigniew et al. Terminal nucleotidyl transferases (TENTs) in mammalian RNA metabolism. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 373, n. 1762, p. 20180162, 2018.

WEIDNER, Julie et al. Spotlight on microRNAs in allergy and asthma. **Allergy**, v. 76, n. 6, p. 1661-1678, 2021.

WILSON, Ross C. et al. Dicer-TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. **Molecular cell**, v. 57, n. 3, p. 397-407, 2015.

ZHANG, Kai et al. A novel class of microRNA-recognition elements that function only within open reading frames. **Nature structural & molecular biology**, v. 25, n. 11, p. 1019-1027, 2018.

ZHANG, Jihui et al. Molecular mechanism of Chinese alligator (*Alligator sinensis*) adapting to hibernation. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 336, n. 1, p. 32-49, 2021.

ZHI, Tongle et al. EZH2 alteration driven by microRNA-524-5p and microRNA-324-5p promotes cell proliferation and temozolomide resistance in glioma. **Oncotarget**, v. 8, n. 56, p. 96239, 2017.

ZHOU, Haibo et al. miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 116, n. 26, p. 5885-5894, 2010.

ZINOVYEVA, Anna Y. et al. Mutations in conserved residues of the *C. elegans* microRNA Argonaute ALG-1 identify separable functions in ALG-1 miRISC loading and target repression. **PLoS genetics**, v. 10, n. 4, p. e1004286, 2014.

ZINOVYEVA, Anna Y. et al., *Caenorhabditis elegans* ALG-1 antimorphic mutations uncover functions for Argonaute in microRNA guide strand selection and passenger strand disposal. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 38, p. E5271-E5280, 2015.