

ASPECTOS EVOLUTIVOS DO *SPLICING* ALTERNATIVO

Barbara Mizumo Tomotani

Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, USP
Recebido 13out09 / Aceito 14jan10 / Publicação inicial 15abr10
babi.mt@gmail.com

Resumo. Os eucariotos apresentam mecanismos muito refinados para o controle de sua expressão gênica, dentre eles, o *splicing* alternativo. Este mecanismo, abundante entre estes organismos, possibilita a geração de diferentes proteínas a partir de um único gene. Esta revisão pretende mostrar como as características do *splicing* alternativo podem torná-lo uma ferramenta interessante em estudos com enfoque evolutivo, em questões envolvendo tanto o surgimento do mecanismo quanto sua atuação na diversificação dos seres vivos.

Palavras-chave. *Splicing* alternativo, exons, EST, diversidade.

EVOLUTIONARY ASPECTS OF THE ALTERNATIVE SPLICING

Abstract. The eukaryotes present intricate mechanisms to control gene expression, as alternative splicing. This mechanism is abundant in these organisms and permits the production of different proteins from a single precursor. This revision intends to show how alternative splicing can be an interesting tool in studies of evolution, comprising how the mechanism appeared and how it acts in the diversification of organisms.

Keywords. Alternative splicing, exons, EST, diversity.

Introdução

O controle da expressão gênica dos eucariotos é muito refinado e complexo. Em um organismo multicelular praticamente todas as células diferenciadas possuem o mesmo potencial de expressão. Entretanto, o mecanismo de regulação gênica permite que a expressão seja seletiva e, assim, células carregando informações idênticas podem apresentar características distintas. Por exemplo, o processamento alternativo de precursores de RNAs mensageiros (mRNA) é capaz de gerar diferentes mRNAs maduros, dependendo do tipo de célula, local e função (Herbert e Rich, 1999; Alberts e col., 2002; Sharp, 2009).

O *splicing* é um tipo de processamento de RNA no qual as seqüências denominadas *introns* são removidas, enquanto as seqüências remanescentes (*exons*) são unidas formando um RNA maduro, que pode ser mensageiro ou não-codificante. Esta é uma forma de regulação importante, pois contribui, após o evento de transcrição, para o controle da expressão dos genes (Burge e col., 1999; Liu e col., 2005).

Pode-se considerar o *splicing* de um pré-RNA como um evento probabilístico no qual seqüências desse transcrito têm probabilidade que varia de 0 a 1 de uma seqüência de *splicing* participar da definição do *intron*. Esta característica oferece grandes oportunidades para a geração de diversidade, uma vez que essas variações podem acontecer em seqüências codificantes desse transcrito (Abril e col., 2005).

No processamento conhecido por *splicing* alternativo, diferentes *exons* de um mesmo pré-RNA podem ser utilizados na produção de diferentes RNAs maduros, e assim gerar proteínas distintas a partir de um único gene, caso essas variações encontrem-se em regiões

codificantes. Dessa forma, o *splicing* alternativo pode levar a um grande aumento na diversidade de proteínas. Sua ocorrência permite que informações específicas de um único gene se modifiquem dependendo de sinais do ambiente, gerando transcritos maduros distintos, e conferindo assim uma maior plasticidade à expressão gênica (Lareau e col., 2004; Sharp, 2009).

Existem cinco tipos principais de *splicing* alternativo (Figura 1): *exon skipping* (uso alternativo de *exon*), *alternative 5' splice sites* (sítios doadores [5'] alternativos), *alternative 3' splice sites* (sítios aceptores [3'] alternativos), *intron retention* (retenção de *intron*) e *mutually exclusive exons* (*exons* mutuamente excludentes). Além da possibilidade de ocorrer *splicing* alternativo nas seqüências iniciadoras e finalizadoras da transcrição (Ast, 2004; Blencowe, 2006).

Acreditava-se que a ocorrência desse evento seria muito restrita, porém atualmente se reconhece a alta freqüência e importância desse mecanismo: estima-se que, em humanos a proporção de genes de sofre *splicing* alternativo pode chegar a mais de 90% (Boue e col., 2003; Ast, 2004; Lareau e col., 2004; Wang e col., 2008). As características do *splicing* alternativo, bem como sua abundância entre os organismos, o tornam interessante para estudos com enfoque evolutivo. Como tal mecanismo poderia ter surgido? Quais seriam as diferenças encontradas em grupos distintos? Como o *splicing* alternativo atuaria na geração da diversidade biológica e especiação? Existem diversos modelos explicativos, mas tais questões ainda encontram-se em aberto.

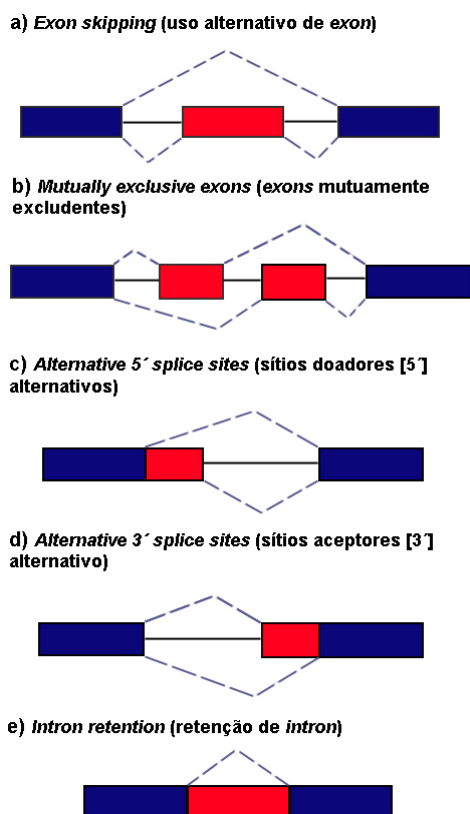


Figura 1 - Os cinco tipos principais de *splicing* alternativo. *Exons* constitutivos em azul e alternativos em vermelho, linhas tracejadas representam as possíveis combinações de *exons* (modificado de Ast, 2004).

Modelos para o surgimento do *splicing* alternativo

Existem vários modelos que propõem como o *splicing* alternativo poderia ter surgido, mas ainda não se chegou a um consenso sobre qual deles seria o mais provável.

Um dos mecanismos propostos para a evolução do *splicing* alternativo seria pela inserção de um novo *exon* em um gene existente ou pela duplicação de um *exon* dentro de um mesmo gene. Segundo Letunic e colaboradores (2002), no caso das duplicações em tandem, os dois *exons* poderiam levar à formação de produtos não funcionais caso ambos fossem incorporados ao mRNA maduro e, dessa forma, haveria a pressão de seleção para a regulação do mecanismo de *splicing*, levando ao *splicing* alternativo do tipo *mutually exclusive exons* (Figura 1b). Também seria possível a geração de novas proteínas funcionais pela inserção de novas seqüências, que poderiam, inclusive, ser originadas de *introns*. Dessa forma, a evolução de novas seqüências que codificam proteínas poderia ocorrer a partir de seqüências que previamente não eram codificantes, podendo ser este um mecanismo importante de evolução do genoma de um eucarioto (Letunic e col., 2002; Kondrashov e Koonin, 2003)

Outro mecanismo sugerido seria a formação de *exons* a partir de *introns*. A existência em

grandes proporções de elementos de transposição, apresentando inclusão relativamente recente, sugere que tais elementos contribuíram significativamente para a criação de novos *exons* ao longo da evolução (Ast, 2004; Xing e Lee, 2006; Kim e col., 2007a; Lev-Maor e col, 2007). Segundo Zhang e Chasin (2006), muitos *exons* novos seriam criados a partir de *introns* e poderiam ser eliminados por prejudicarem a função dos genes originais. Entretanto, a eliminação desses seria amenizada por dois processos: os *exons* novos formariam uma minoria dos transcritos ou seriam preferencialmente localizados em UTRs (do inglês, *untranslated region*, ou região não traduzida), deixando a proteína intacta. Segundo esse modelo, posteriormente esses *exons* seriam incorporados na região codificante e poderiam se tornar vantajosos.

Ast (2004) propõe um modelo para o aparecimento do *splicing* alternativo baseado na modificação de *exons* constitutivos (*exons* encontrados em cada transcrito de um gene) em *exons* alternativos (*exons* ausentes em pelo menos um dos transcritos que possa contê-lo). Nesse modelo, o sinal de sítio de *splicing* ancestral sofreria um acúmulo de mutações que fariam com que esse sítio passasse a ser sub-otimizado, permitindo a sua utilização também em *splicing* alternativo. Apesar de terem características próprias, *exons* constitutivos e alternativos apresentam um alto grau de similaridade, indicando que os constitutivos podem se tornar alternativos (em grande parte por *exon skipping*) ao longo da evolução. Assim, o autor afirma que o *splicing* alternativo provavelmente evoluiu devido a uma combinação de mutações no sítio de *splicing* que gerou um reconhecimento menos eficiente pela maquinaria de *splicing*, levando a mais eventos de *exon skipping*. Os outros tipos de *splicing* alternativo (5' e 3' *splice sites*; Figura 1c e 1d) poderiam consistir em uma adaptação específica do mecanismo, sendo um subgrupo da forma de *splicing* por *exon skipping*.

Análises posteriores (Lev-Maor e col., 2007) comparando genes ortólogos (genes homólogos localizados em diferentes espécies que evoluíram a partir de um ancestral comum único) de camundongos e humanos, deram mais suporte à teoria de que, além da inclusão de novos *exons* aos genes existentes, a mudança de *splicing* constitutivo para alternativo também ocorreria por um processo aleatório. Assim, a seleção se daria posteriormente, como no caso das mutações deletérias. Os autores ainda propõem que tal mecanismo seria ancestral e importante nos primeiros estágios da evolução dos eucariotos.

Su e colaboradores (2006) propõem um mecanismo de modificação do *splicing* alternativo associado a eventos de duplicação. Na análise, foram utilizados ESTs (*Expressed Sequence*

Tags) e mRNA humanos, predizendo-se o número de cada produto proteico gerado por *splicing* alternativo e, posteriormente, repetiu-se a análise com outros organismos (camundongo, drosófila e o nematóide *Caenorhabditis elegans*). Nesse estudo, verificou-se que a ocorrência de *splicing* alternativo em genes duplicados tende a ser mais baixa do que de genes de cópia única e que a perda de formas de *splicing* alternativo poderia ocorrer logo após a duplicação gênica. Além disso, notou-se que o *splicing* alternativo poderia diferir entre as duplicatas gênicas. O cenário proposto para a evolução do *splicing* alternativo após a duplicação gênica seria: após a duplicação do gene/genoma, as duas cópias receberiam todas as formas de *splicing* alternativo do parental, porém poderiam começar a apresentar expressão diferencial e, devido à redundância funcional, uma forma poderia se tornar dominante em relação à outra. Tal transição evolutiva poderia ocorrer logo após a duplicação. Em estágios mais tardios, novos eventos de *splicing* alternativo poderiam ser adicionados, aumentando novamente o número de formas alternativas geradas (para mais detalhes, ver Su e col., 2006).

O *splicing* alternativo em diferentes grupos

Com seqüências do genoma e ESTs de diversos organismos disponíveis em bibliotecas gênicas, muitos trabalhos foram realizados focando-se tanto na quantificação do *splicing* alternativo em diferentes grupos quanto no estudo da conservação do mecanismo entre esses grupos. A utilização de ESTs, que são curtas subseqüências de uma seqüência de cDNA (DNA complementar), possibilitou a realização de estudos baseados em bioinformática que diferem bastante dos estudos tradicionais de biologia molecular. Uma vez que os ESTs são derivados de mRNA já processado, eles oferecem uma ampla amostra da diversidade de mRNA. A maior parte dos estudos sobre *splicing* alternativo utilizando bioinformática depende das diferenças entre ESTs de um mesmo gene, como, por exemplo, a presença de grandes inserções ou deleções. Análises posteriores, alinhando as seqüências das ESTs com aquelas obtidas a partir do genoma podem revelar possíveis *exons* e *introns* e, com isso, é possível a detecção das possíveis formas de *splicing* (para mais detalhes, ver Modrek e Lee, 2002).

Diferentes estudos mostraram resultados distintos em relação à quantidade de eventos de *splicing* alternativo que ocorrem em diferentes espécies. Como tais estudos são dependentes das ESTs, a verdadeira variação entre os grupos pode aparecer mascarada pelas diferenças geradas pelo método, dificultando a comparação. Por exemplo, Brett e colaboradores (2002) e Kim e colaboradores (2004), utilizando tratamentos de

dados distintos apresentaram resultados discordantes sobre a taxa de *splicing* alternativo em diferentes eucariotos. Esses estudos, entretanto, utilizaram uma metodologia questionável, pois dependiam da amostragem das ESTs e, portanto, seus resultados poderiam ser devido à amostragem e não às diferenças reais entre os grupos (Harrington e col., 2004) (ver Quadro 1 para maiores detalhes).

Posteriormente, Kim e colaboradores (2007b) conduziram uma nova análise e sugeriram que, utilizando-se amostras aleatórias do EST total, obtém-se um resultado confiável e que o possível efeito de ESTs diferentes (nos quesitos qualidade e métodos de construção) é irrelevante. Entretanto, deve-se ressaltar que, mesmo com a melhoria da análise, a metodologia utilizada ainda não é livre de falhas. Nesse trabalho os autores verificaram que os diferentes eucariotos apresentam freqüências diferentes de *splicing* alternativo, considerando genes de dois mamíferos (homem e camundongo), uma ave (galo doméstico), uma ascídia (*Ciona intestinalis*), um inseto (*Drosophila melanogaster*), um nematóide (*Caenorhabditis elegans*) e uma angiosperma (*Arabidopsis thaliana*). As comparações mostraram que os grupos mais próximos (humanos e roedores) apresentam valores similares na porcentagem de genes que sofrem *splicing* alternativo, sendo que estes variam entre grupos mais distantes. Os autores concluem que as diferentes freqüências de *splicing* alternativo dos vertebrados e invertebrados sugerem que o surgimento da linhagem dos vertebrados foi acompanhado por um aumento no número de genes que sofrem *splicing* alternativo. Porém, a ascídia seria uma exceção, pois mesmo sendo filogeneticamente mais próxima aos vertebrados do que aos invertebrados, ela possui uma freqüência baixa de *splicing* alternativo. Os autores explicam tal diferença afirmando que esse organismo pode não ser um bom representativo do genoma de cordados basais, pois pode ter sofrido uma grande perda de genes e *introns* ao longo de sua evolução. Mas é necessário ressaltar que, como foram analisadas apenas duas espécies de mamíferos e uma de ave, não é possível fazer uma generalização sobre os vertebrados/cordados, e para tal, estudos com outros grupos seriam necessários. Tal característica poderia, por exemplo, consistir em uma convergência entre aves e mamíferos.

Kim e colaboradores (2007b) ainda propõem que, de uma forma geral na evolução dos animais, o *intron retention* seria o tipo mais raro de *splicing* alternativo e o *exon skipping* o mais comum. Segundo o autor uma das possíveis razões seria a presença de *introns* mais longos em mamíferos que poderiam levar a um reconhecimento menos eficiente de *exons* pela maquinaria de *splicing*. Já no caso da

angiosperma *Arabidopsis thaliana*, o tipo de *splicing* com frequência mais alta seria o *intron retention*, que, curiosamente, também é a forma mais comum de *splicing* alternativo em eucariotos unicelulares. Desse modo, o autor sugere que o *intron retention* possa ser uma forma ancestral de *splicing*, ou seja, que surgiu cedo na evolução.

Quadro 1: As metodologias e suas limitações

A grande quantidade de informações fornecidas pela análise de ESTs permitiu a identificação de diversos eventos de *splicing* alternativo. Existem, entretanto, problemas que envolvem desde diferenças de protocolos a erros devido à amostragem de ESTs. Modrek e Lee (2003) citam dois problemas principais: falha em detectar uma forma de *splicing* ou obter um resultado que não corresponde a uma real forma de *splicing*. É importante lembrar que a detecção de formas de *splicing* alternativo por bioinformática depende da detecção de formas diferentes de ESTs. Contudo, se algum evento raro que não o *splicing* alternativo for responsável pela modificação da EST, ele pode ser confundido com um *splicing* alternativo. Apesar dos estudos serem baseados no genoma total, eles podem falhar em detectar certas variantes protéicas como resultado da fragmentação da sequência da EST (Modrek e Lee, 2002; 2003). Também se pode mencionar a baixa sensibilidade na detecção de eventos de *splicing* alternativo em genes com baixa taxa de expressão e a proporção de ESTs totais deslocada para os finais 5' ou 3' dos transcritos devido à forma de obtenção dos mesmos (Johnson e col., 2003; Blencowe, 2006, Ferreira e col., 2007).

A tecnologia de *microarray* é eficiente para análises de expressão gênica em larga escala, sendo apropriada para uma caracterização do perfil de expressão dos diferentes transcritos de um gene. O uso de *microarrays* possibilita a análise simultânea de uma grande quantidade de amostras e mostrou-se um bom candidato para a complementação dos estudos sobre *splicing* alternativo. Esse tipo de análise permite a detecção de eventos de *splicing* alternativo em milhares de genes e já foi utilizado em alguns estudos (Blencowe, 2006, Ferreira e col., 2007). Por exemplo, Johnson e col. (2003), detectaram eventos que a análise de ESTs não foi capaz de detectar, possibilitando assim a descoberta de novas regiões de genes (humanos) que sofrem *splicing* alternativo.

A partir de seqüências gênicas é possível realizar comparações da conservação do *splicing* alternativo em diferentes grupos como uma ferramenta em estudos de evolução. Uma das formas de estudo da sua conservação utiliza a informação das ESTs de duas espécies para identificar eventos equivalentes de *splicing* alternativo em genes ortólogos, com a ressalva de que, caso as bibliotecas estejam incompletas o método pode subestimar o grau de conservação, como salientado anteriormente. A busca de eventos de *splicing* alternativo em duas espécies consiste em observar os padrões dos *exons* provenientes de genes ortólogos encontrados em bases de dados específicas, comparando-os para inferir a função do *splicing* alternativo na evolução. A conservação de um *exon* é

importante em estudos evolutivos uma vez que, a não ser no caso de homoplasias (similaridade devido a um evento de evolução convergente, ou seja, o aparecimento em linhagens distintas), um *exon* que sofre *splicing* alternativo presente em duas espécies indica que o ancestral comum dessas duas espécies deve também apresentar tal característica e, portanto, seu aparecimento é anterior à divergência das mesmas. Se o *exon* encontra-se no ortólogo de um dos genomas, mas não no outro, poderia indicar um evento de geração ou perda de *exons* (Boue e col., 2003; Modrek e Lee, 2003).

Existem diversos estudos que comparam a conservação do *splicing* alternativo em diferentes organismos. As análises de Modrek e Lee (2003), por exemplo, distinguem uma forma de *splicing* predominante (*major*), de uma forma rara de *splicing* (*minor*). Tal distinção é baseada no número de ESTs encontrados para cada forma de *splicing*. As formas raras são apoiadas por múltiplos ESTs e podem representar diferenças espécie-específicas de *splicing* funcional. Isso poderia indicar uma evidência da flexibilidade dos mecanismos de *splicing* que permitiria a evolução de novas formas funcionais, sugerindo que o *splicing* alternativo tem um papel importante na evolução do genoma ao permitir que novos *exons* evoluam com menos restrições. Os autores argumentam que as formas predominantes de transcritos são mais conservadas do que formas raras, sendo que, no caso de humanos e camundongos, 98% dos *exons*, pertencentes à forma predominante seriam encontrados em ambos genomas (proporção de conservação equivalente àquela dos *exons* constitutivos).

É importante ressaltar que existem valores de conservação distintos encontrados por outros autores, sendo que tais diferenças se devem, em parte, às metodologias utilizadas (Boue e col., 2003; Modrek e Lee, 2003; Lareau e col., 2004; para uma revisão sobre os estudos de conservação, ver Irrina e col., 2009). Além disso, Irrina e colaboradores (2009) afirmam que os vários estudos realizados tentando-se verificar a conservação dos eventos de *splicing* alternativo diferem também nos níveis de conservação considerados, apresentando resultados distintos. Segundo esses autores, a conservação do *splicing* alternativo poderia se dar em três níveis:

1- Genoma (*genome-conservation*): Nesse nível a conservação é dada em termos de presença/ausência de *splicing* alternativo. Caso exista a conservação entre duas espécies A e B, se A apresenta uma seqüência (*exon*, *intron*, grupo de *exons*, etc) que sofre *splicing* alternativo, B apresentará o potencial de gerar transcritos alternativos equivalentes.

2- Evento (*event-conservation*): Se uma seqüência é conservada em relação ao genoma de duas espécies, o *splicing* alternativo pode ou não ser similar entre elas. Se houver conservação

do evento, significa que ambas espécies têm a capacidade de gerar isoformas equivalentes por *splicing* alternativo daquela seqüência.

3- Regulação (*regulation-conservation*): O *splicing* alternativo pode ser regulado em vários níveis: espacial, temporal, quantitativo (relacionado à abundância de determinado transcrito) ou condicional (dependente das condições ambientais). Nos casos em que a regulação é conservada, ocorre regulação similar em relação ao tempo, tecido e/ou quantidade de variantes protéicas geradas por *splicing* alternativo. Assim, duas espécies apresentariam as mesmas variantes de *splicing* expressos no mesmo tecido e/ou na mesma fase da vida, por exemplo.

O presente conhecimento sobre a evolução dos organismos é baseado em uma amostra muito pequena de espécies, mas o cenário está se modificando. Estudos em outros grupos são necessários para uma maior compreensão da abrangência do fenômeno, bem como para melhores inferências evolutivas (Copley, 2008).

O mecanismo de *splicing* alternativo e a geração de diversidade

Diferentemente de organismos procariotos, mais dependentes de eventos de mutação ou transposição para a geração de novos fenótipos, em eucariotos a evolução por alteração no processamento de RNA é auxiliada pela manutenção de um genoma rico em *introns*, o que aumenta a probabilidade de formação de novos fenótipos. Tal genoma poderia ser considerado como uma fonte de aparecimento de variações que eventualmente se mostram funcionais a partir da união de antigos componentes em novas combinações. As modificações do DNA por mutação, conversão gênica, transposição, retrotransposição entre outras, podem alterar o perfil de transcritos e assim, aumentar a diversidade de produtos (Herbech e Rich, 1999).

Modrek e Lee (2003) propuseram uma hipótese para a importância do *splicing* alternativo na evolução: o mecanismo aumentaria a taxa de mudanças evolutivas em *exons* específicos. Para que um gene modifique sua atividade, sua seqüência deve passar por uma série de modificações, sendo que as formas intermediárias podem apresentar seu *fitness* (grau de sucesso reprodutivo, considerando a transmissão dos genes para as gerações seguintes) reduzido para ambas as atividades (inicial e modificada). Quando há uma incorporação de *exon* por *splicing* alternativo, este seria primeiramente incluso em poucos transcritos e estaria livre para acumular mutações, enquanto o transcrito original poderia continuar exercendo sua atividade sem perdas significativas de *fitness*. Assim, o *splicing* alternativo permitiria à seqüência sobressalente se converter de formas de baixo *fitness* para formas neutras onde modificações poderiam ser

acumuladas mais rapidamente. Possivelmente, isso geraria uma nova função, que poderia ser positivamente selecionada. Assim, o *exon*, produto de *splicing* alternativo, evoluiria sem prejudicar a função original do gene. Desse modo, o *splicing* alternativo “expandiria os caminhos para a evolução neutra” aumentando a taxa de modificações. Caso não existisse o *splicing* alternativo, os novos *exons* provavelmente não seriam selecionados, diminuindo a possibilidade de modificações serem geradas e acumuladas (Boue e col., 2003; Mordrek e Lee, 2003; Laureau e col., 2004).

Xing e Lee (2005), por outro lado, questionam a generalidade da ocorrência de redução da pressão seletiva por *splicing* alternativo, exemplarmente no caso do *splicing* alternativo que gera produtos claramente funcionais. Também alegam a falta de evidências para considerar o fenômeno como adaptativo. Em seu trabalho os autores analisaram diferentes tipos de pressão seletiva em diferentes mamíferos e mostraram que o *splicing* alternativo gera aumento na densidade de mutações em aminoácidos e diminuição na freqüência de mutações silenciosas dentro de *exons* (mutações sinônimas). Esse aumento na pressão seletiva contra mutações sinônimas em *exons* alternativos foi acompanhado por aumento na pressão seletiva para a preservação da fase de leitura da proteína, sugerindo que o *splicing* alternativo seria importante para criar os denominados *hotspots* evolutivos, nos quais uma porção da proteína poderia acumular mutações em seus aminoácidos em taxas muito mais altas do que as demais porções.

Conclusão

Apesar de existirem discordâncias de modelos teóricos/experimentais apresentados por diversos autores, é possível dizer que o *splicing* alternativo é um mecanismo abundante e funcionalmente importante: relevante na regulação da expressão gênica e no aumento da diversidade de transcritos e proteínas. Os padrões de *exons* alternativos podem ser mais ou menos conservados entre as espécies, tornando o *splicing* alternativo relevante também como um caráter auxiliar na investigação das relações filogenéticas entre os diversos grupos. Assim, o *splicing* alternativo pode ser uma ferramenta interessante nos estudos evolutivos. Entretanto, faz-se necessário ressaltar a importância de mais estudos nessa área, de forma a assegurar que erros metodológicos sejam minimizados.

Agradecimentos. Lucile Maria Floeter-Winter (IB-USP); Cintia Etsuko Yamashita (IB-USP); Danilo Eugênio França Laurindo Flôres (IB-USP); Marie-Anne Van Sluys (IB-USP); Rodrigo Brincalpepe Salvador (MZUSP); e aos revisores da Revista da Biologia.

Bibliografia

- Abril, J. F., Castelo, R., Guigó, R. (2005). Comparison of splice sites in mammals and chicken. *Genome Research*. 15(1), 111-119.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). *Biologia Molecular da Célula* (4ª Ed.). Editora Artes Médicas, Porto Alegre, RS.
- Ast, G. (2004). How did alternative splicing evolve? *Nature Review Genetics*. 5(10), 773-782.
- Blencowe, B.J. (2006). Alternative splicing: New insights from global analysis. *Cell*. 126(1), 37-47.
- Boue, S., Letunic, I., Bork, P. (2003). Alternative splicing and evolution. *Bioessays*. 25(11), 1031-1034.
- Burge, C., Tuschl, T., Sharp, P.A. (1999). Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. P. 525-529. In: Gesteland, R.F.; Cech, T.R.; Atkins, J.F. (eds). 1999. *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, New York.
- Brett, D., Pospisil, H., Valcárcel, J., Reich, J., Bork, P. (2002). Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genetics*. 30(1), 29 – 30.
- Copley, R.R. (2008). The animal in the genome: comparative genomics and evolution. *Philosophical Transactions of The Royal Society*. 363(1496), 1453-1461.
- Ferreira, E.N., Galante, P.A.F., Carraro, D.M., de Souza, S.J. (2007). Alternative splicing: a bioinformatics perspective *Molecular bioSystems* 3(7), 473-477.
- Herbert, A. e Rich, A. (1999). RNA processing and the evolution of eukaryotes. *Nature Genetics*. 21(3), 265-269.
- Harrington, E.D., Boue, S., Valcárcel, J., Reich, J.G., Bork, P. (2004). Estimating rates of alternative splicing in mammals and invertebrates. *Nature Genetics*. 36(9), 915–916; author reply, 916–917.
- Irrina, M., Rukov, J.L., Roy, S.W., Vinther, J., Garcia-Fernandez, J. (2009). Quantitative regulation of alternative splicing in evolution and development. *Bioessays*. 31(1), 40-50.
- Johnson, J.M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P.M., Armour, C.D., Santos, R., Schdat, S.E., Stoughton, R., Shoemaker, D.D. (2003). Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*, 302(5653), 2141-2144.
- Kim, H., Majewski, R.K.J., Ott, J. (2004). Estimating rates of alternative splicing in mammals and invertebrates. *Nature Genetics*. 36(9), 915 – 916; author reply, 916-917.
- Kim, E., Goren, A., Ast, G. (2007a). Alternative splicing: current perspectives. *BioEssays*. 30(1), 38-47.
- Kim, E., Magen, A., Ast, G. (2007b). Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Research*. 35(1), 125–131
- Kondrashov, F.A., Koonin, E.V. (2003). Evolution of alternative splicing: deletions, insertions and origin of functional parts of proteins from intron sequences. *Trends in genetics*. 19(3), 115-119.
- Lareau, L.F., Green, R.E., Bhatnagar, R.S., Brenner, S.E. (2004). The evolving roles of alternative splicing. *Current Opinion in Structural Biology*. 14(3), 273–282.
- Letunic, I., Copley, R.R., Bork, P. (2002). Common exon duplication in animals and its role in alternative splicing. *Human Molecular Genetics*. 11(13), 1561–1567.
- Lev-Maor, G., Goren, A., Sela, N., Kim, E., Keren, H., Doron-Faigenboim, A., Leibman-Barak, S., Pupko, T., Ast, G. (2007). The “alternative” choice of constitutive exons throughout evolution. *Plos Genetics*. 3(11), e203.
- Liu, C., Bai, B., Skogerbø, G., Cai, L., Deng, W., Zhang, Y., Bu, D., Zhao, Y., Chen, R. (2005). NONCODE: an integrated knowledge database of non-coding RNAs *Nucleic Acid Research*. 33(database issue), D112-D115.
- Modrek, B. e Lee, C.J. (2002). A genomic view of alternative splicing. *Nature Genetics*. 30(1), 13-19.
- Modrek, B. e Lee, C.J. (2003). Alternative splicing in the human, mouse and rat genomes is associated with an increased frequency of exon creation and/or loss. *Nature Genetics*. 34(2), 177-180.
- Sharp, P.A. (2009). The Centrality of RNA. *Cell*, 136(4), 577-580.
- Su, Z., Wang, J., Yu, J., Huang, X., Gu, X. (2006). Evolution of alternative splicing after gene duplication. *Genome Research*. 16(2), 182-189.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebukova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G.P., Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 456(7221), 470-476.
- Xing, Y., Lee, C. (2005). Evidence of functional selection pressure for alternative splicing events that accelerate evolution of protein subsequences. *PNAS*. 102(38), 13526–13531.
- Xing, Y., Lee, C. (2006). Alternative splicing and RNA selection pressure-evolutionary consequences for eukariotic genomes. *Nature Reviews Genetics*. 7(7), 499-509.
- Zhang, X.H.F. e Chasin, L.A. (2006). Comparison of multiple vertebrate genomes reveals the birth and evolution of human exons. *PNAS*. 103(36), 13427–13432.