UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Desenvolvimento Tecnológico - CDTec

Curso de Graduação em Biotecnologia

Trabalho de Conclusão de Curso

Prospecção *in silico* de RNAs circulares em morango (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) expressos em resposta a estresses abióticos e à aplicação de ácido abscísico

Maria Clara Martins Ferreira

Pelotas, 2018

Maria Clara Martins Ferreira

Prospecção *in silico* de RNAs circulares em morango (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) expressos em resposta a estresses abióticos e à aplicação de ácido abscísico

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Vanessa Galli

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F384p Ferreira, Maria Clara Martins

Prospecção in silico de RNAs circulares em morango (Fragaria × ananassa Duch.) expressos em resposta a estresses abióticos e à aplicação de ácido abscísico / Maria Clara Martins Ferreira ; Vanessa Galli, orientadora. — Pelotas, 2018.

62 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) — Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. circRNAs. 2. RNA-Seq. 3. Predição. 4. Bioinformática. I. Galli, Vanessa, orient. II. Título.

CDD : 634.75

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Maria Clara Martins Ferreira

Prospecção *in silico* de RNAs circulares em morango (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) expressos em resposta a estresses abióticos e à aplicação de ácido abscísico

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de novembro de 2018

Banca examinadora:

.....

Profª Dr.ª Vanessa Galli (Orientadora)

Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....

MSc. Frederico Schmitt Kremer

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

MSc. William Borges Domingues

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho aos meus pais Suzana e Vilmar, à minha irmã Janaína e à minha sobrinha Clarice

Agradecimentos

Aos meus pais Suzana e Vilmar, meus maiores exemplos de humildade e caráter, por todo amor e sacrifício depositado. Cada passo dessa minha trajetória acadêmica foi dado com o incentivo de vocês e para vocês!

À minha irmã Janaína, por toda sua sabedoria e bondade de irmã mais velha, ao meu cunhado Moisés por todos os conselhos dados e à minha sobrinha Clarice por tornar minha vida mais iluminada.

À minha tia Lúcia por ter cuidado de mim como uma segunda mãe ao longo desses quatro anos de curso.

A todas pessoas especiais que Pelotas me proporcionou.

A todos meus colegas do Grupo de Pesquisa em Genômica Vegetal que me acolheram tão bem e aos membros do BioProLab por todo suporte no meu trabalho, em especial ao Frederico Kremer.

À minha professora e orientadora acadêmica Vanessa Galli por todos os ensinamentos e pela confiança depositada. Obrigada por ter contribuído de forma tão especial e significante na minha formação acadêmica. Você é meu exemplo do que quero me tornar como profissional.

A todos professores e funcionários por transformarem o curso de Biotecnologia da UFPel em um curso de alto nível científico e à professora Luciana Bicca por todo incentivo e por desenvolver projetos de extensão que mudam a visão dos estudantes.

À Universidade Federal de Pelotas e as agências de fomento pela concessão de bolsas durante minha jornada de iniciação científica e de extensão. E a todos os demais que foram igualmente importantes, mas não estão citados aqui, muito obrigada!

Resumo

FERREIRA, Maria Clara Martins **Prospecção *in silico* de RNAs circulares em morango (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) expressos em resposta a estresses abióticos e à aplicação de ácido abscísico.** 2018. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os RNAs circulares são uma classe emergente de RNAs competitivos endógenos, cuja estrutura constitui um *loop* fechado covalentemente entre os sítios de *splice* 5' e 3'. Os avanços nas técnicas de sequenciamento e bioinformática relevaram que circRNAs tem origem genômica e podem se originar a partir de éxons, íntrons e regiões intergênicas a partir de um mecanismo conservado entre plantas e animais, dependente de reações de *backsplicing.* CircRNAs tem despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa devido ao fato desses RNAs atuarem na regulação pós-transcricional e também como possíveis esponjas de miRNAs, Tais estudos vêm sendo conduzidos principalmente em plantas modelo e em estudos de relações com fatores ambientais e estresses bióticos, devido ao impacto e prejuízo econômico. Entretanto, ainda não há disponível na literatura nenhum dado e/ou predição dessas moléculas em morango (*Fragaria ananassa*). Dessa forma, dados de RNA-Seq públicos de bibliotecas foram utilizados neste trabalho para a predição *in silico* de circRNAs em *Fragaria ananassa* utilizando o algoritmo find_circ. No ‘Conjunto ABA de RNA-Seq’ foi possível obter um total de 176 circRNAs filtrados no grupo de amostras CK0, 157 circRNAs no CK5, 163 circRNAs no CK8, 179 circRNAs no ABA5 e 103 circRNAs no ABA8. Além disso, no ‘Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq’ se obteve um total de 66 circRNAs no grupo controle, 45 circRNAs no grupo estresse hídrico e 50 circRNAs no grupo estresse salino. Análises de ontologia gênica e de enriquecimento funcional de genes parentais relevaram importantes informações de funções biológicas que demonstraram que circRNAs são responsivos a condições de estresse abiótico e aplicação de ácido abscísico. Tais dados poderão abrir caminho para uma maior elucidação do papel de circRNAs e suas redes de interação e futuramente, para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas.

Palavras-chave: circRNAs; RNA-Seq; predição; bioinformática

Abstract

FERREIRA, Maria Clara Martins. ***In silico* prospecting of circular RNAs in strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) expressed in response to abiotic stress and abscisic acid application.** 2018. 62f. Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Circular RNAs are an emerging class of endogenous competitive RNAs whose structure forms a loop covalently closed between 5 'and 3' splice sites. Advances in sequencing and bioinformatics techniques have shown that circRNAs have a genomic origin and can be originated from exons, introns and intergenic regions from a mechanism conserved between plants and animals, dependent on backsplicing reactions. CircRNAs have aroused attention of several research groups due to the fact that these RNAs act in post-transcriptional regulation and also as possible sponges of miRNAs. Such studies have been conducted mainly in model plants and in relation with environmental factors and biotic stresses, due to the impact and economic loss. However, no data and/or prediction of these molecules in strawberry (*Fragaria ananassa)* has yet been available in the literature. Thus, public RNA-Seq data from libraries were used in this work for in silico prediction of circRNAs in *Fragaria ananassa* using find_circ algorithm. In the ‘ABA RNA-Seq Set’ it was possible to obtain a total of 176 filtered circRNAs in CK0 group, 157 circRNAs in CK5 group, 163 circRNAs in CK8 group, 179 circRNAs in ABA5 group and 103 circRNAs in ABA8 group. In addition, in the 'Saline Stress / Saline Stress RNA-Seq Set', a total of 66 circRNAs were obtained in the control group, 45 circRNAs in the water stress group and 50 circRNAs in the saline stress group. Analyzes of gene ontology and functional enrichment of parental genes have revealed important informations on biological functions, which demonstrated that circRNAs are responsive to conditions of abiotic stress and application of abscisic acid. Such data can elucidate the role of circRNAs and the interaction networks and, in future, can be useful for development of new biotechnological tools.

Key-words: circRNAs; RNA-Seq; prediction; bioinformatics

Lista de Figuras

Figura 1	Biogênese dos circRNAs.....	19
Figura 2	ciRS-7 atua como esponja para mir-7.....	21
Figura 3	Biogênese de circRNA e dois tipos de algoritmos de detecção de circRNAs.....	24
Figura 4	Papel regulatório da rede circRNA-miRNA-mRNA em condições de estresse abiótico.....	27
Figura 5	Quantidade de circRNAs preditos e filtrados e desenho metodológico.....	35
Figura 6	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle GEK-137.....	47
Figura 7	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Estresse Salino GEK-139.....	48
Figura 8	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Estresse Hídrico GEK-138.....	49
Figura 9	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK0.....	51
Figura 10	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK5.....	52
Figura 11	Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK8.....	53

Figura 12 Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo ABA5..... 54

Figura 13 Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo ABA8..... 55

Lista de Tabelas

Tabela 1 Ferramentas mais utilizadas para predição in silico de circRNAs..... 23

Tabela 2 Condições e grupos experimentais do Conjunto ABA de RNA-Seq..... 31

Tabela 3 Condições e grupos experimentais do Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq..... 32

Tabela 4 *Output* find_circ..... 33

Tabela 5 Categoria de sítios de *splice* geradas pelo find_circ..... 34

Tabela 6 CircRNAs preditos no grupo Controle (GEK-137)..... 37

Tabela 7 CircRNAs preditos no grupo Estresse Hídrico (GEK-138)..... 38

Tabela 8 CircRNAs preditos no grupo Estresse Salino (GEK-139)..... 39

Tabela 9 CircRNAs preditos no grupo Controle (CK0.1 e CK0.2)..... 40

Tabela 10 CircRNAs preditos no grupo Controle (CK5.1 e CK5.2)..... 41

Tabela 11 CircRNAs preditos no grupo Controle (CK8.1 e CK8.2)..... 42

Tabela 12 CircRNAs preditos no grupo ABA (ABA5.1 e ABA5.2)..... 43

Tabela 13 CircRNAs preditos no grupo ABA (ABA8.1 e ABA8.2)..... 44

Tabela 14 circRNAs com maior número de *reads* do Conjunto Estresse Hídrico/Salino de RNAseq..... 45

Tabela 15 circRNAs com maior número de *reads* do Conjunto ABA de RNAseq..... 46

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABA	Ácido Abscísico
BSJ	Junção *backspliced*
cDNA	DNA complementar
ceRNAs	RNAs competidores endógenos
circRNA	RNA circular
FSJ	Junção encaminhada pra frente, do inglês *forward spliced-junction*
GABA	Ácido g-aminobutírico
GO	*Gene Ontology*
KEGG	Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNAs	RNAs não-codantes
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNAi	RNA de interferência
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA ribossomal
tRNA	RNA transportador
EROs	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido Dismutase

Sumário

1. Introdução..... 13
2. Objetivos..... 16
2.1. Objetivo geral..... 16
2.2. Objetivos específicos..... 16
3. Revisão de literatura..... 17
3.1. RNAs codantes e não codantes..... 17
3.2. circRNAs: identificação, características e mecanismos moleculares..... 18
3.3. circRNAs como esponjas de miRNAs..... 20
3.4. Algoritmos de predição e banco de dados de circRNAs..... 21
3.5. Papel regulatório da rede circRNA-miRNA-mRNA em plantas submetidas a estresse abiótico..... 24
3.6. Ácido abscísico: Regulador chave na tolerância de estresse abiótico em plantas..... 27
3.7. Importância dos estudos de mecanismos regulatórios em morango..... 28
4. Metodologia..... 30
4.1. Bibliotecas de RNA-Seq..... 30
4.2. Find_circ..... 32
4.3. Enriquecimento funcional dos genes parentais..... 34
5. Resultados e discussão..... 35
5.1. Identificação de circRNAs..... 35
5.2. Enriquecimento funcional dos genes parentais..... 46
6. Conclusão e perspectivas..... 57
Referências..... 58

1. Introdução

No decorrer das últimas décadas, foi possível obter conhecimento acerca de uma lista cada vez maior de categorias de RNA não-codantes (ncRNAs) com capacidade funcional expressas em células eucarióticas (MORRIS e MATTICK, 2014). Com o advento do sequenciamento de última geração e da bioinformática, esse catálogo cresceu mais rapidamente. Apesar do conhecimento da existência de transcritos circulares por pelo menos 20 anos, no passado, tais moléculas eram consideradas artefatos e erros de *splicing* aberrante de RNA. Ou ainda, acreditava-se que tais moléculas podiam estar associadas especificamente a patógenos (JECK et al., 2013; SANGER et al., 1976).

Atualmente, sabe-se que RNAs circulares (circRNAs) possuem origem genômica, extremidades 3 'e 5' covalentemente ligadas e constituem uma classe de RNA recentemente explorada (SALZMAN et al., 2012). A detecção da expressão ubíqua de circRNA se deve à revolução de RNA-Seq, que permitiu aos pesquisadores obter facilmente milhões de leituras de sequenciamento curtas representando diferentes isoformas de RNA (SALZMAN, 2016).

Embora ainda não exista consenso quanto à função dos circRNAs, diversos estudos revelaram que os circRNAs são conservados e amplamente distribuídos em uma variedade de organismos eucarióticos, incluindo mamíferos e plantas (MEMCZAK et al., 2013; YE et al., 2015) e são expressos de maneira regulada independente de suas isoformas lineares cognatas. Demonstrando, portanto, que essas moléculas desempenham importante papel regulatório biológico.

A maioria dos circRNAs encontrados na natureza são gerados por meio de reações de *backsplicing* e parecem desempenhar funções não-codificadoras (CHEN & YANG, 2015). No entanto, foi demonstrado que alguns circRNAs endógenos de *Drosophila* e humanos codificam proteínas (LEGNINI et al., 2017; PAMUDURTI et al., 2017). Além de possuírem potencial codificador de proteínas, os circRNAs carecem das extremidades livres necessárias para a degradação mediada por exonuclease, tornando-os resistentes e concedendo-lhes tempo de vida prolongado em comparação a RNAs mensageiros (mRNAs) lineares. A obtenção de uma produção

estável de proteínas a partir de RNA exógeno tem sido um objetivo biotecnológico de longa data. Por esse motivo, a circularização pode permitir, por exemplo, uma maior estabilização de RNAs exógenos (WESSELHOEFT, KOWALSKI & ANDERSON, 2018).

Além disso, alguns estudos sugerem que circRNAs podem atuar como esponjas de miRNAs, como potenciais reguladores pós-transcricionais, ligando-se a miRNAs para regular positivamente a expressão de seus RNAs mensageiros alvos (DU TOIT, 2013; HANSEN et al., 2013). Indicando dessa forma, que circRNAs são importantes membros de RNAs endógenos competidores (ceRNAs).

Percebendo a importância e a novidade de circRNAs no que tange a questões envolvendo mecanismos de controle transcricional e pós-transcricional, diversos grupos vem publicando progressivamente estudos na tentativa de elucidar o papel e a expressão de circRNAs frente a condições de amadurecimento, estresses abióticos e bióticos (DARBANI et al., 2016; WANG et al., 2017; ZHAO et al., 2017; ZHOU et al., 2018). Visto que tais situações levam à perda da produtividade de diferentes culturas, acarretando em um grande prejuízo econômico (PANDEY et al., 2017). Nesse sentido, tais estudos têm permitido a construção e a alimentação de banco de dados de circRNAs em plantas. Atualmente, entretanto, os bancos de dados disponíveis contam com pouca diversidade de espécies, sendo em sua maioria, circRNAs identificados a partir de sequências genômicas de plantas modelos ou de grande impacto comercial, tais como *Arabidopsis*, soja (*Glycine max*) e trigo (*Triticum spp.*).

Apesar da sua grande aceitação pelo mercado consumidor e seu relevante impacto econômico, ainda não há dados na literatura ou em bancos de dados de circRNA estudados e identificados em morango *(Fragaria × ananassa).* Além disso, o morango é considerado uma cultura particularmente sensível a estresses hídricos e salinos. Nesse contexto, o ácido abscísico aparece como molécula chave na regulação de tais condições ambientais (GINÉ-BORDONABA & TERRY, 2016).

Sendo assim, a identificação de circRNAs e de genes parentais em bibliotecas de RNA-Seq de morango poderá trazer nova luz aos mecanismos moleculares envolvidos entre circRNAs, estresse abiótico e ácido abscísico nesta espécie. Esse conhecimento inovador poderá ser utilizado para alimentação de banco de dados e para uma maior elucidação da função de circRNAs. Além disso, futuramente, tais

dados poderão abrir caminho para o desenvolvimento de novas ferramentas biotecnológicas e estudos de melhoramento genético em morango.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho consistiu na predição *in silico* de potenciais circRNAs a partir de bibliotecas de RNA-Seq de amostras de morango (*Fragaria* × *ananassa*) submetidas a condições de estresse abiótico e aplicação de ácido abscísico.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar potenciais circRNAs e genes parentais a partir de bibliotecas de RNA-Seq de amostras de *Fragaria* × *ananassa* submetidas a condições de estresse abiótico e aplicação de ácido abscísico.

- Predizer o perfil transcricional *in silico* dos circRNAs identificados e filtrados, em bancos de RNA-Seq provenientes de amostras submetidas a condições de estresse abiótico e à aplicação de ácido abscísico.

- Obter informações acerca da função e atividade biológica de genes parentais que dão origem aos circRNAs identificados a partir de análises de ontologia gênica e enriquecimento funcional.

- Identificar genes parentais e circRNAs relacionados com função de ligação a RNAs para futura validação biológica da rede circRNA-miRNA-mRNA.

3. Revisão da literatura

3.1 RNAs codificantes e não-codificantes

Células eucarióticas contém dois tipos de RNAs: RNAs não-codificantes e RNAs codificantes. RNAs codificantes tem seu importante papel biológico de codificação proteica e por essa razão, por muito tempo, foram a classe que despertaram maior atenção. Entretanto, mais recentemente tem sido demonstrado que outros RNAs, que não codificam para proteínas, apresentam papéis biológicos importantes, incluindo a regulação dos RNAs codificantes. RNAs não-codificantes pertencem a um grupo heterogêneo de moléculas de RNA, que podem ser classificadas de acordo com sua localização, comprimento e função biológica. De acordo com seu comprimento, os ncRNAs podem ser divididos em pequenos RNAs (sRNAs, do inglês *small RNAs*), com tamanho aproximado de 18-30 nucleotídeos, RNAs de tamanho médio com 31-200 nucleotídeos e ncRNAs longos (lncRNAs, do inglês *long non-coding RNAs*) com tamanho maior que 200 nucleotídeos (WANG et al., 2017). Os ncRNAs canônicos, como RNAs ribossômicos (rRNAs) e RNAs transportadores (tRNAs), foram descobertos na década de 1950 e seus papéis centrais na síntese proteica são bem estabelecidos.

Lee e colaboradores em 1993, relataram a descoberta de uma molécula de RNA com 22 nucleotídeos que regulava o desenvolvimento pós-embrionário em *Caenorhabditis elegans.* Essa molécula referia-se aos microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs endógenos de fita simples, cuja principal função é atuar no silenciamento pós-transcricional.

Desde então, a revolução dos ncRNAs ganhou enorme impulso desde então. Atualmente, a utilização de sequenciamento em larga escala tem auxiliado na descoberta da existência de milhares de ncRNAs com uma variedade de papéis impressionantes na expressão de genes e na remodelação do genoma eucariótico.

3.2 circRNAs: identificação, características e mecanismos moleculares

RNAs circulares são uma classe emergente de RNAs, cuja estrutura constitui um *loop* fechado covalentemente entre os sítios de *splice* 5' e 3'. Devido ao seu formato circular, circRNAs são mais resistentes ao ataque de exonucleases do que RNAs lineares (FISCHER et al., 2017). CircRNAs apresentam-se, em sua maioria, como ncRNAs. Todavia, estudos recentes têm demonstrado que alguns circRNAs endógenos de *Drosophila* e humanos podem codificar proteínas (LEGNINI et al., 2017; PAMUDURTI et al., 2017).

Apesar do conhecimento da existência de transcritos circulares por pelo menos 20 anos, no passado, tais moléculas eram consideradas artefatos e erros de *splicing* aberrante de RNA. Além disso, acreditava-se que tais moléculas podiam estar relacionadas especificamente a patógenos, como por exemplo, viróides de plantas (JECK et al., 2013). As características do mecanismo de replicação de viróides e suas estruturas circulares são semelhantes aos circRNAs intracelulares. No entanto, ao contrário dos viróides, que entram nas células a partir do exterior, o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) de alto rendimento da sequência parental de circRNAs permitiram demonstrar o mapeamento de uma ordem de éxons distinta de origem genômica. Dessa forma, pode-se observar que circRNAs eram formados a partir de reações “cabeça-cauda”, também denominadas reações de *backsplicing* (LEE et al., 2017). Por terem as extremidades 3’ e 5’ unidas, circRNAs não eram detectados e analisados de forma precisa por técnicas moleculares tradicionais, por não apresentarem essas extremidades livres ou mesmo um final de RNA poliadenilado (SALZMAN et al., 2012).

Em 2015, Ye e colaboradores realizaram uma identificação genômica de circRNAs em Arabidopsis e arroz (*Oryza sativa*) e descobriram um grande número desta classe em ambas as espécies. Além disso, descobriram mais de 700 genes parentais (genes que dão origem a RNAs circulares) ortólogos entre Arabidopsis e arroz. Desde então, um número significativo de circRNAs foi identificado em diferentes espécies vegetais, como: tomate (TAN et al., 2017; WANG et al., 2017; YIN et al., 2018; ZUO et al., 2016), trigo (WANG et al., 2017), soja (ZHAO et al., 2017), milho (CHEN et al., 2018), cevada (DARBANI et al., 2016), batata (ZHOU et al., 2018) e kiwi (WANG et al., 2017), demonstrando que os circRNAs são conservados em espécies filogeneticamente próximas e amplamente distribuídos. Dessa forma, tais estudos e

descobertas modificaram a percepção sobre a relação e a importância de circRNAs nos processos biológicos.

De modo geral, o precursor de RNA mensageiro (mRNA) pode sofrer processos de *splicing* canônico, dando origem a uma molécula de mRNA linear, que codificará uma proteína. Entretanto, se acontecerem eventos de circularização dependentes de reações de *backsplicing*, tal molécula precursora dará origem a um circRNA. CircRNAs podem se originar a partir de um ou mais éxons (circRNAs exônicos), íntrons (circRNAs intrônicos) ou de ambos a partir de regiões intergênicas (circRNAs exônicos-intrônicos) (LI et al., 2017), tal como demonstrado na Figura 1. A biogênese dessas moléculas é um mecanismo conservado entre plantas e animais, sendo regulada por elementos cis e fatores trans, tais como sequências complementares reversas em íntrons mais longos que contribui para a formação de circRNAs (JECK et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

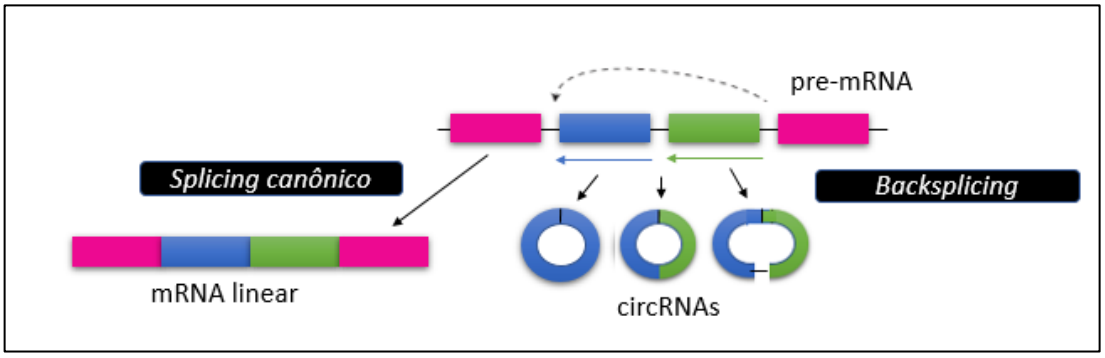

Figura 1. Biogênese dos circRNAs. Adaptado de: Chen, 2016.

Alguns estudos têm demonstrado que circRNAs exônicos estão enriquecidos principalmente em amostras citoplasmáticas (JECK et al., 2013; MEMCZAK et al., 2013; SALZMAN et al., 2012). Enquanto que os circRNAs intrônicos e intergênicos estão localizados predominantemente no núcleo (LI et al., 2015; ZHANG et al., 2013).

Outra característica importante dos circRNAs de plantas é que eles são gerados não apenas do genoma nuclear, mas também do genoma mitocondrial e do genoma plastidial. Em *A. thaliana*, cerca de 6% e 1% dos circRNAs preditos estão presentes nos cloroplastos e mitocôndrias, respectivamente (SUN et al., 2016). Além disso, alguns circRNAs envolvidos na homeostase de micronutrientes na cevada são altamente expressos em mitocôndrias (DARBANI et al., 2016). Esses achados

sugerem que os circRNAs em plantas são expressos de maneira organela/tecido específica e podem contribuir para o desenvolvimento celular (LEE et al., 2017).

3.3 circRNAs como esponjas de miRNAs

Apesar do conhecimento de que alguns circRNAs endógenos de *Drosophila* e humanos são capazes de codificar proteínas (LEGNINI et al., 2017; PAMUDURTI et al., 2017), suas funções ainda não estão bem compreendidas e validadas. Alguns estudos sugerem que circRNAs podem atuar como esponjas de miRNAs, como potenciais reguladores pós-transcricionais, ligando miRNAs para regular positivamente a expressão de seus mRNAs-alvos (DU TOIT, 2013; HANSEN et al., 2013). É válido ressaltar ainda que os circRNAs apresentam uma deleção de polimorfismos nos sítios de ligação ao miRNA (THOMAS; SÆTROM, 2014). Dessa forma, a rede de interação circRNA-miRNA indica que os circRNAs são importantes membros de RNAs endógenos competidores (ceRNAs) e podem se ligar competitivamente a miRNAs.

Como citado anteriormente, circRNAs exônicos estão enriquecidos predominantemente no citosol. A localização citosólica também pode suportar a função pós-transcrição desses circRNAs.

Em um estudo publicado por Hansen e colaboradores (2013), foi demonstrado a relação de ligação e competição entre RNAs. O circRNA ciRS-7, localizado predominantemente no citosol, é um RNA circular esponja para mir-7 e é produzido por *backsplicing* do transcrito anti-senso do gene CDR1, envolvido com degeneração cerebelar de vertebrados. CDR1as. - ciRS-7 contém mais de 70 sítios conservados para miR-7 (Figura 2).

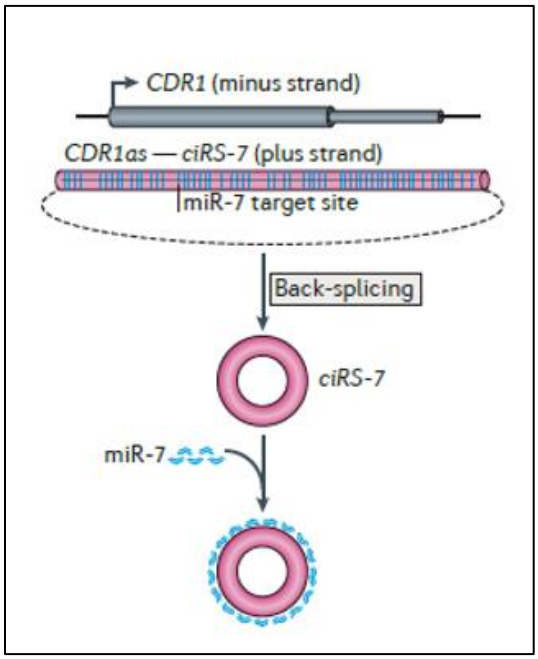

Figura 2. ciRS-7 atua como esponja para mir-7. Adaptado de: Chen, 2016.

Um dos primeiros estudos genômicos identificando locais de ligação de miRNA em circRNAs de plantas mostrou que apenas cerca de 5% e 6,6% dos circRNAs preditos podem atuar como esponjas de miRNA em *Arabidopsis* e arroz, respectivamente (YE et al., 2015). E mais recentemente, seis dos 62 circRNAs de trigo foram presumidos por atuarem como esponjas de miRNA (WANG et al., 2017). No entanto, em plantas, ainda não há evidências que comprovem tal função de esponja de miRNAs, tais mecanismos ainda precisam ser melhor validados e compreendidos.

3.4 Algoritmos de predição e banco de dados de circRNAs

A maior parte dos estudos de identificação de circRNAs utilizam RNA ribossomal depletado e RNA total tratado com RNase R para criação de bibliotecas de sequenciamento. Isso deve-se a sua estrutura circular, sem extremidades livres, que acabam fazendo dos circRNAs estruturas mais resistentes ao ataque de exonucleases em comparação a outros RNAs. Todavia, também é possível a detecção de circRNAs a partir de RNA-Seq de amostras cujo DNA complementar (cDNA) foi obtido utilizando oligodT.

Atualmente, existem dois bancos de dados de RNAs circulares em plantas: PlantcircBase (CHU et al., 2017) e PlantCircNet (ZHANG et al., 2017). Nesses bancos de dados, estão coletadas sequências de junção *backspliced* disponíveis publicamente e as sequências completas de circRNAs identificados em plantas. Com base nos circRNAs coletados, há ainda uma previsão de circRNAs que podem agir como esponjas de miRNA e suas redes potenciais nas espécies correspondentes. Além disso, há informações de genes parentais, expressão, validação, e ferramentas de bioinformática para visualizar estruturas de circRNAs e prever circRNAs a partir de sequências de consulta.

O PlantcircBase conta com *datasets* de 12 espécies de plantas diferentes, sendo elas: *Arabidopsis thaliana, Gossypium arboreum, Gossypium hirsutum, Glycine max, Gossypium raimondii, Hordeum vulgare, Oryza sativa, Poncirus trifoliata, Solanum lycopersicum, Solanum tuberosum, Triticum aestivum e Zea mays*. Enquanto o PlantCircNet conta com *datasets* de 8 espécies diferentes: *Arabidopsis thaliana, Brachypodium distachyon, Glycine max, Hordeum vulgare, Oryza sativa, Solanum lycopersicum, Triticum aestivum e Zea mays.* Esses bancos de dados são alimentados com informações e sequências geradas a partir de diferentes metodologias e algoritmos de detecção.

De modo geral, um genoma de referência é necessário para todos os algoritmos de detecção de circRNAs, mas pode ser usado de diferentes maneiras. O uso mais comum envolve o alinhamento direto de todas as leituras de sequenciamento contra o genoma de referência. A maioria dos algoritmos de detecção, como find_circ (MEMCZAK et al., 2013), CIRI (GAO et al., 2015), CIRCExplorer (ZHANG et. al., 2014) e UROBORUS (SONG et al., 2016) podem ser classificados nesta categoria. As ferramentas mais comuns de predição *in silico* de circRNAs podem ser observadas na tabela 1.

Tabela 1. Ferramentas mais utilizadas para predição in silico de circrRNAs.

Ferramenta	Linguagem	Mapeador	Vantagens	Desvantagens
circRNA_finder	Perl	STAR	Rápido	Baixa sensibilidade e acurácia
CIRCexplorer	Python	Bowtie1 e 2	Alta acurácia e boa sensitividade	Processamento lento, anotação do genoma requerida
CIRI	Perl	Bwa	Alta sensibilidade	Devagar, alto requerimento de RAM e baixa acurácia
find_circ	Python	Bowtie2	Rápido e baixo requerimento de RAM	Baixa acurácia

Adaptado de: HANSEN et al., 2015.

Como circRNAs são diferentes de outros RNAs em vista de sua circularidade, uma característica que pode ser captada a partir do alinhamento é a junção circular, denominada junção *backspliced* (BSJ). Ao contrário das junções encaminhadas pra frente (FSJ, do inglês *forward-spliced junctions*) em mRNAs que geram leituras de sequenciamento que são alinhadas colinearmente no genoma, as leituras abrangendo BSJ são divididas em segmentos e estão alinhados com a sequência de referência em ordem inversa (Figura 3). Portanto, os algoritmos de detecção nesta categoria podem ser denominados abordagens baseadas em alinhamento dividido. No entanto, para outros algoritmos, como KNIFE (SZABO et al., 2016) e NCLscan (CHUANG et al., 2016) o genoma de referência é combinado com a anotação correspondente do genoma para construir pseudo-sequências em torno de supostas BSJs nas primeiras etapas. As etapas subsequentes são então focadas no alinhamento completo das leituras de sequenciamento contra tais pseudo-sequências para reconhecer leituras de BSJ. Essa abordagem é denominada abordagem baseada em pseudo-referência (GAO e ZHAO, 2018; HANSEN et al., 2015).

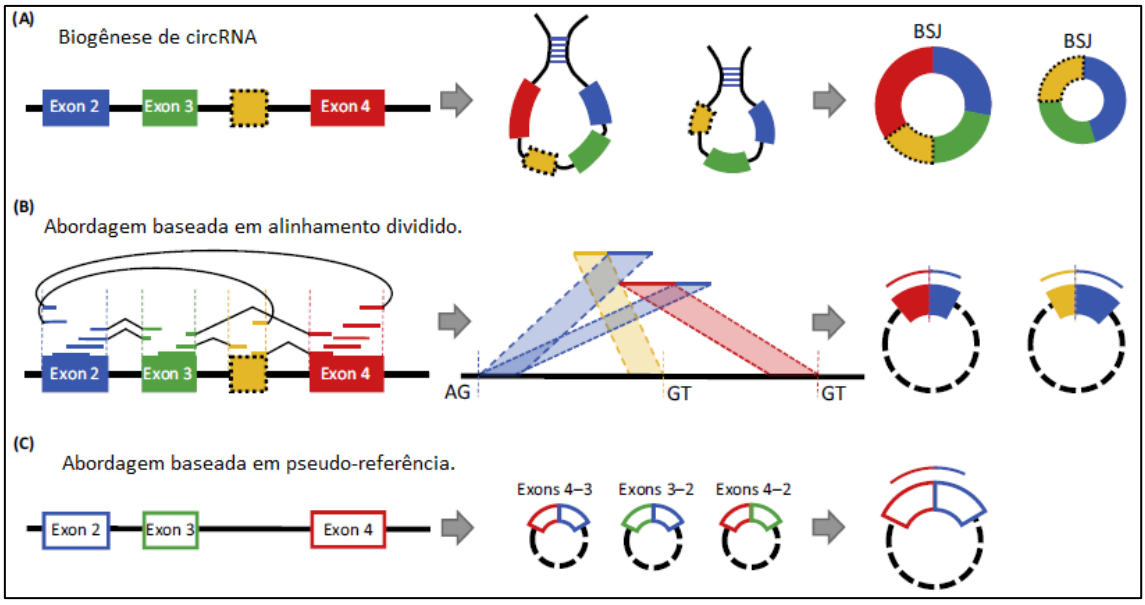

Figura 3. Biogênese de circRNA e dois tipos de algoritmos de detecção de circRNAs. Abreviações: BSJ, junção *backspliced*. Adaptado de: GAO e ZHAO, 2018.

Devido ao grande volume de dados que são gerados na predição de circRNAs, características como processamento rápido e baixo requerimento de memória RAM fazem da ferramenta find_circ uma opção viável de análise e predição.

3.5 Papel regulatório da rede circRNA-miRNA-mRNA em plantas submetidas a estresse abiótico

O panorama atual global destaca-se por questões intrínsecas ao aumento populacional e a mudanças climáticas. Visto isso, há uma grande necessidade do desenvolvimento de plantas mais resistentes a estresses abióticos, que acabam por acarretar grande prejuízo econômico. Mas para tal, se faz necessário o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na resposta a estes estresses.

Estudos demonstram que miRNAs são capazes de atuar como reguladores pós-transcricionais de expressão gênica em condições de estresses ambientais. Por exemplo, Zhou e colaboradores (2013) demonstraram que *Agrostis stolonifera* transgênica superexpressando miRNA319a exibiu tolerância aumentada a estresse salino e seca. Dessa maneira, visto que miRNAs podem ser regulados por circRNAs

e em virtude das demais funções preditas, possivelmente esses RNAs possuem um papel relevante na resposta a estresses abióticos.

Pesquisadores utilizando análise de genoma e transcriptoma completo tem focado em descobrir o papel dos circRNAs em respostas a estresses, principalmente utilizando plantas modelos ou ainda, plantas que são relevantes no contexto de agricultura mundial. Alguns circRNAs encontrados em cevada e em arroz respondem a desequilíbrios na homeostase de nutrientes, como ferro, zinco e fosfato. Em arroz, um total de 27 circRNAs exônicos foram identificados como diferencialmente expressos sob privação de fosfato e em condições de suficiência desse nutriente. No estudo publicado por Ye e colaboradores em 2015, alguns circRNAs exônicos de arroz demonstraram um padrão de expressão em um tempo específico, como por exemplo, o RNA circular Os_ciR1569 foi expresso apenas após 6h sob condições de suficiência e insuficiência de fosfato.

Na cevada (*Hordeum vulgare* L.), alguns RNAs circulares envolvidos na homeostase de micronutrientes, regulados por aplicações foliares de ferro e zinco, são altamente expressos nas mitocôndrias. Descobriu-se que alguns circRNAs exônicos estão conectados com genes mitocondriais que codificam componentes respiratórios, como por exemplo, a subunidade da enzima citocromo c oxidase 1 (COX1) e apocitocromo b. Esses achados podem ser explorados para pesquisas que envolvam a biofortificação do ferro e de zinco (DARBANI et al., 2016).

Em 2016, Zuo e colaboradores publicaram um estudo de genoma completo sobre a identificação e o papel do circRNAS na resposta ao frio em tomates. O fruto do tomate quando exposto a uma situação de baixa temperatura, desenvolve muitos sintomas que levam a uma perda na qualidade do produto. Neste trabalho, um total de 163 circRNAs foram sugeridos como sendo regulados em resposta à lesão por frio. Entre esses, 138 estavam *up-regulated* (com expressão aumentada) e 25 *down-regulated* (com expressão diminuída). Além disso, 102 circRNAs foram identificados como esponjas de 24 miRNAs em tomate, sendo que os genes alvo destes miRNAs apresentam função predita em reações redox e como fatores de transcrição induzidos por baixa temperatura. Levantando, portanto, a hipótese de que os circRNAs podem desempenhar um papel fundamental em resposta a estresse por frio.

Além do estresse causado por baixas temperaturas, outro importante estresse abiótico que prejudica o desenvolvimento e o crescimento das plantas é o estresse hídrico. Nesse sentido, Wang e colaboradores (2017) identificaram circRNAs e seus alvos em trigo (*Triticum aestivum* L.) sob condições de estresse por desidratação. Eles identificaram um total de 88 circRNAs e 62 circRNAs expressos diferencialmente entre o grupo estressado por desidratação e o controle, e seis circRNAs preditos com ação de esponjas de 26 miRNAs. A análises por Ontologia Gênica (GO, *do inglês Gene Ontology*) e pela Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG, do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) dos mRNAs alvos demonstrou que essa interação de rede de RNAs pode estar envolvida no processo responsivo à desidratação, metabolismo da clorofila, fotossíntese, biossíntese de aminoácidos, fosforilação oxidativa e transdução de sinal hormonal.

O estresse hídrico também foi abordado em um estudo genômico envolvendo perfis térmicos e circRNAs em *A. thaliana*. Um total de 1583 circRNAs específicos para condições de calor foram identificados e 439 circRNAs mostraram expressão significativamente diferencial sob estresse térmico. Dentre estes, cerca de 70% após o choque térmico foram expressos em um padrão similar com seus genes parentais, demonstrando correlação positiva de expressão entre circRNAs e genes parentais nessas condições. Além disso, observou-se que o estresse térmico também aumentou a quantidade de éxons circularizados, eventos alternativos de circularização e o comprimento dos circRNAs, sugerindo um papel importante dos circRNAs na resposta ao estresse térmico em plantas (PAN et al., 2018).

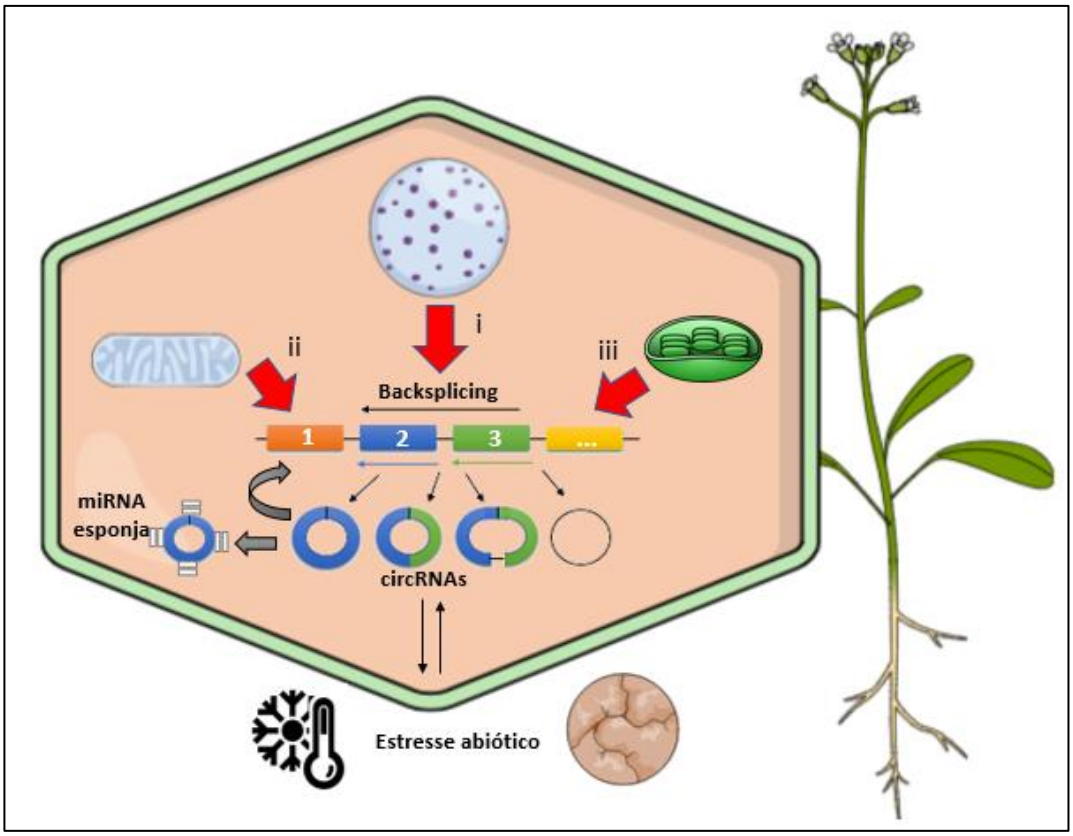

Figura 4. Papel regulatório da rede circRNA-miRNA-mRNA em condições de estresse abiótico. Os circRNAs podem ter origem genômica nuclear (i), mitocondrial (ii) ou a partir de cloroplastos (iii). As condições de estresse abiótico podem mudar os perfis e padrões de expressão de circRNAs e também suas interações com miRNAs e respectivos genes parentais.

3.6 Ácido abscísico: Regulador chave na tolerância de estresse abiótico em plantas

O déficit hídrico ocorre nas plantas quando a taxa de transpiração excede a absorção de água e é um aspecto relacionado a diferentes estresses abióticos, tais como seca, salinidade e baixa temperatura (ROMERO et al., 2013). Para frutas pós-colheita, uma vez separado da planta, a fruta não tem fonte renovável de água para compensar a perda através da transpiração. Assim, os frutos colhidos são vulneráveis a serem afetados pelo estresse por déficit hídrico, que pode ser o principal responsável por distúrbios metabólicos notáveis envolvidos na senescência dos frutos durante o manejo e armazenamento pós-colheita. O ácido abscísico (ABA) desempenha um papel crucial durante o amadurecimento e a senescência dos frutos, especialmente em frutos não climatéricos, como o morango (CHEN et al., 2016).

O ácido abscísico é um hormônio vegetal classificado como sesquiterpeno, que exibe diversas atividades regulatórias, incluindo inibição da germinação e fechamento de estômatos (KUNDU & GANTAIT, 2017). Para que as plantas tolerem o estresse ambiental, o fitohormônio ABA opera como um mensageiro interno de sinalização entre raízes e parte aérea das plantas. Quando a disponibilidade de água se torna limitada em torno das raízes, o ABA envia um sinal para as brotações, de modo que a perda de água pela transpiração é minimizada pela diminuição da expansão das folhas e, mais importante, pelo fechamento dos estômatos (WILKINSON et al., 2012).

A aplicação exógena de ABA pode aumentar respostas adaptativas a estresses abióticos (SAH, REDDY & LI, 2016). Em um estudo recente, foi visto que, quando ABA, ácido g-aminobutírico (GABA) e ácido salicílico foram aplicados de forma exógena, efetivamente minimizaram os danos induzidos pela seca em *Agrostis stolonifera* por meio da manutenção da estabilidade da membrana e do estado da água foliar (LI et al., 2016). Além disso, Chen e colaboradores (2016) demonstraram em morangos pós-colheita, que o déficit hídrico promoveu a biossíntese de ABA e a transdução de sinalização acompanhada do aumento do acúmulo de antocianinas. Dessa forma, torna-se de suma importância e relevância a realização de estudos para maior elucidação dos mecanismos responsivos entre ABA e estresses abióticos.

3.7 Importância dos estudos de mecanismos regulatórios em morango

O morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta pertencente à família das rosáceas, que possui espécies frutíferas de interesse econômico, tais como a macieira. É uma planta nativa das regiões de clima temperado e a espécie produzida comercialmente nos dias de hoje é um híbrido natural. O morango é um pseudofruto, pois se origina de uma única flor com vários ovários. A porção suculenta do morango origina-se do receptáculo floral. Com grande aceitação pelo mercado consumidor, graças a sua atraente coloração, aroma e propriedades nutracêuticas, o morango é considerado uma das principais espécies em conteúdo de flavonoides (ANTUNES et al., 2011). Entretanto, o morango é considerado uma cultura particularmente sensível a estresses severos de sal e seca (GINÉ-BORDONABA & TERRY, 2016).

Nosso Grupo de Pesquisa em Genômica Vegetal da Universidade Federal de Pelotas vem estudando os impactos gerados a partir de diferentes estresses abióticos nesta espécie, na tentativa de elucidar os mecanismos regulatórios biológicos

envolvidos. Dessa forma, o grupo de pesquisa realizou o sequenciamento de RNAs de amostras de morango submetidas a condições de estresse hídrico e salino para análise de genes diferencialmente expressos. Todavia, a análise de circRNAs ainda não havia sido realizada neste conjunto de dados. Portanto, tais bibliotecas de RNA-Seq foram utilizadas no presente trabalho a fim de se realizar a predição *in silico*, bem como a utilização de um outro conjunto de bibliotecas público de RNA-Seq disponível no NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

4. Metodologia

4.1 Bibliotecas de RNA-Seq

Foram utilizadas dois diferentes conjuntos de bibliotecas de RNA-seq para predição *in silico* de circRNAs no presente estudo, seguindo tais condições e grupos experimentais abaixo:

- **Conjunto ABA de RNA-Seq**: Obtido no NCBI (SRA: SRP082122) publicada no GEO (do inglês, *Gene Expression Omnibus*), com o número de acesso GSE85572, a partir de análise integrada de sequenciamento de alto rendimento Illumina HiSeq 4000 no mecanismo regulador do ácido abscísico no amadurecimento de frutos de morango. Duas semanas após a antese floral, um volume de 100 µL de solução de ABA (1 µM) ou água destilada (controle) foi injetado em cada núcleo do receptáculo do fruto de *Fragaria* × *ananassa* cultivar Toyonoka através do pedicelo com uma microsseringa estéril. O RNA total foi isolado usando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, EUA). As amostras de RNA foram tratadas com DNase I isenta de RNase (Takara, Jap). Para cada grupo, amostras de 10 frutos individuais foram selecionadas aleatoriamente e o RNA foi extraído separadamente (Tabela 2). As bibliotecas *paired-end* de mRNA da Illumina foram geradas de acordo com as instruções do fabricante (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA).

Tabela 2. Condições e grupos experimentais do Conjunto ABA de RNA-Seq.

Grupo/Amostras	Tratamento
CK0.1, CK0.2 (Controle)	Fruto de morango tratado com água destilada, colhido no dia 0 de tratamento
CK5.1, CK5.2 (Controle)	Fruto de morango tratado com água destilada, colhido após 5 dias do tratamento
CK8.1, CK8.2 (Controle)	Fruto de morango tratado com água destilada, colhido após 8 dias do tratamento
ABA5.1, ABA5.2 (ABA)	Fruto de morango tratado com ABA (1 µM), colhido após 5 dias do tratamento
ABA8.1, ABA8.2 (ABA)	Fruto de morango tratado com ABA (1 µM), colhido após 8 dias do tratamento

- **Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq:** Obtido por análises experimentais realizadas pelo próprio grupo de pesquisa, número de acesso SRP148865. O estresse salino, 50 mL de NaCl 400 mM, foi aplicado uma vez por semana desde o início do florescimento (105 dias após o transplante) até o final da cultura (190 dias após o transplante) em *Fragaria* × *ananassa* cultivar Camarosa. Para o estresse hídrico, as plantas foram irrigadas com 50% da água aplicada no controle (Tabela 3). O RNA total foi isolado usando o método Trizol (Invitrogen, CA, Estados Unidos) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram obtidas pelo isolamento do RNA total (> 10 µg) de um pool de frutos maduros de *F. ananassa* obtidos das quatro repetições experimentais de cada tratamento e sequenciadas pela plataforma Illumina HiSeq 2000.

Tabela 3. Condições e grupos experimentais do Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq.

Grupo/Amostras	Tratamento
GEK-137 (Controle)	Morango tratado com água, colhido 190 dias após o transplante
GEK-138 (Estresse Hídrico)	Morango tratado com 50% do volume de água do controle, colhido 190 dias após o transplante
GEK-139 (Estresse Salino)	Morango tratado com NaCl 400 mM, colhido 190 dias após o transplante

4.2 Find_circ

Foi utilizada a ferramenta find_circ como algoritmo de predição *in silico* de prováveis candidatos de circRNAs. O find_circ utiliza o phython como linguagem padrão. Inicialmente, foi realizado o mapeamento e alinhamento de leituras de RNA-Seq contra o genoma de *Fragaria* × *ananassa* utilizando o mapeador bowtie2 (LANGMEAD & SALZBERG, 2012). O *dataset* do genoma de *Fragaria* × *ananassa* foi obtido em: https://www.rosaceae.org/node/4230473.

O alinhamento contra o genoma permitiu identificar e manter a fração que não pode ser mapeada contiguamente para procurar *splice-junctions*. Dessa forma, as leituras não mapeadas representaram uma fração de entrada para o algoritmo classificar sítios de *splice* em lineares, circulares e não ambíguos. O find_circ gera como *output* informações como: posição no cromossomo, início e término, número de leituras, fita genômica, entre outras (Tabela 4).

Tabela 4. *Output* find_circ.

Nome	Descrição
Chrom	Cromossomo/nome da contig
Start	Início
End	Término
Name	Nome provisório da junção
n_reads	Número de leituras que suportam a junção
Strand	Fita genômica (+ ou -)
n_uniq	Número de sequências lidas distintas que suportam a junção
Signal	Sinal de *splice* dinucleotídeo flanqueante (normalmente GT/AG)
Category	Lista de palavras-chave descrevendo a junção. Útil para filtragem

Além disso, o find_circ também provê classificações de características do processo de extensão das leituras, tais como: “perfeito”, “bom” e “ok” (Tabela 5). Tais informações são úteis para o processo de filtragem de prováveis circRNAs.

Tabela 5. Categoria de sítios de *splice* geradas pelo find_circ

Categoria/palavra-chave	Descrição
LINEAR	Sítio de *splice* linear (mRNA), unindo consecutivos éxons
CIRCULAR	Potencial sítio de *splice* de circRNA. Os éxons são unidos na ordem inversa
UNAMBIGUOUS_BP	Pareamento de bases não ambíguo. Exigente de flanqueamento GT/GA.
PERFECT_EXT	Leituras alinhadas perfeitamente durante o processo de extensão
GOOD_EXT	Houve um *mismatch* durante a extensão
OK_EXT	Houve mais que um *mismatch* durante a extensão

4.3 Enriquecimento funcional dos genes parentais

Foram realizados estudos de ontologia gênica (GO, do inglês *Gene Ontology*) e enriquecimento funcional dos genes parentais, ou seja, genes que dão origem aos circRNAs. O enriquecimento funcional corresponde a um método computacional para determinar se um conjunto de genes definido a priori mostra uma diferença estatisticamente significativa entre amostras biológicas. O *output* da análise é tipicamente uma lista classificada de termos GO, cada um associado a um valor *p.* Para tais análises, foi utilizada a ferramenta Blast2GO, juntamente com base de dados Swiss-Prot.

5. Resultados e discussão

5.1 Identificação de circRNAs

Após o alinhamento com o genoma e mapeamento pelo bowtie2 e a subsequente predição a partir de bibliotecas de RNA-Seq pelo find_circ, foram gerados dados e informações dos prováveis candidatos de circRNAs de *F. ananassa.* Os circRNAs gerados são exônicos, visto que tais análises foram realizadas a partir de RNA-Seq. O algoritmo find_circ também permite que haja uma filtragem de circRNAs preditos, portanto, foram filtrados e selecionados apenas os circRNAs que foram classificados nas categorias: CIRCULAR e PERFECT_EXT. Dessa forma, no 'Conjunto ABA de RNA-Seq' foi possível obter um total de 176 circRNAs filtrados no grupo de amostras CK0, 157 circRNAs no CK5, 163 circRNAs no CK8, 179 circRNAs no ABA5 e 103 circRNAs no ABA8. Além disso, no 'Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq' se obteve um total de 66 circRNAs no grupo GEK137 (controle), 45 circRNAs no GEK138 (estresse hídrico) e 50 circRNAs no GEK139 (estresse salino), tal como demonstrado na figura 5.

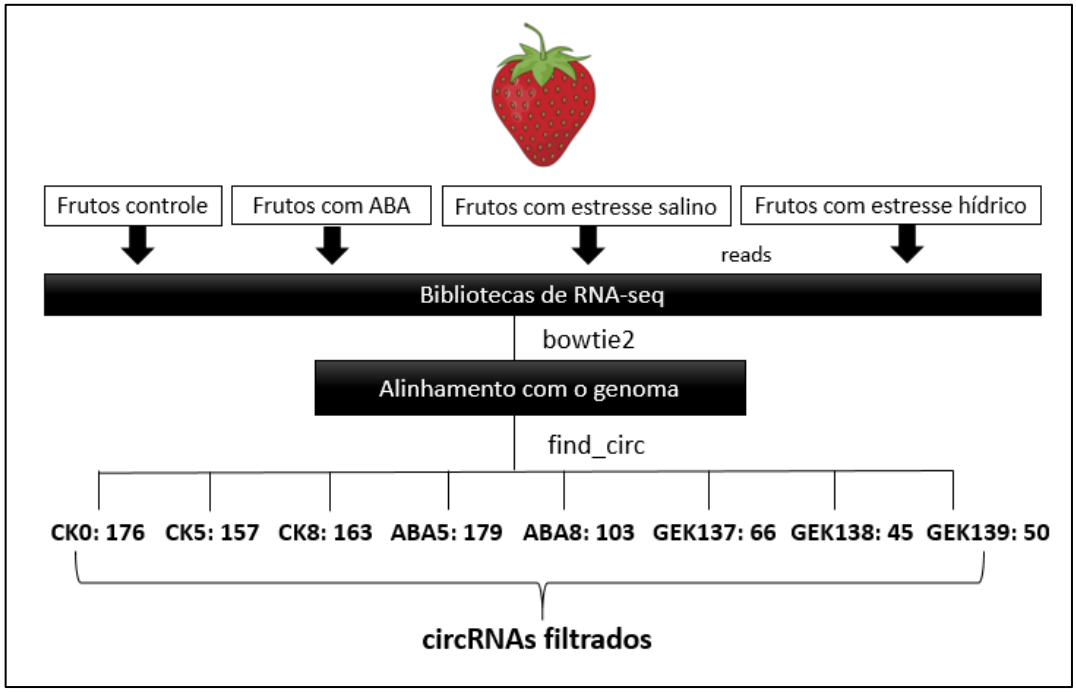

Figura 5. Quantidade de circRNAs preditos e filtrados e desenho metodológico.

Ao analisar os dados obtidos foi possível observar que foi identificado um número menor de circRNAs nos bancos de RNA provenientes de amostras submetidas a aplicação de condições de estresse abiótico (hídrico e salino, GEK138 e GEK139, respectivamente), quando comparados ao grupo controle (GEK137). Além disso, o processo de amadurecimento do fruto de morango também parece afetar a quantidade de circRNAs produzidos na célula. Embora o número de circRNAs identificados aos cinco dias pós-aplicação de ABA (ABA5 = 179) tenha sido similar ao controle (CK0 = 176), este número foi reduzido aos oito dias pós-aplicação (ABA8 = 103). Apesar deste padrão decrescente ao longo do tempo ter sido observado nas amostras que foram tratadas com ABA (ABA5 e ABA8), o mesmo não foi observado nos grupos controle, visto que o grupo CK8 apresenta mais circRNAs que o grupo CK5. Em conjunto, estes dados sugerem que este fitohormônio também influencie a síntese de circRNAs.

Devido ao grande volume de dados gerados de circRNAs, foi realizada uma segunda filtragem dos circRNAs obtidos e filtrados anteriormente, de modo a ordená-los em ordem decrescente de acordo com o número de *reads*. Dessa forma, foram selecionados sete circRNAs de cada grupo experimental que apresentaram os maiores números de *reads*. Tais dados estão disponíveis nas Tabelas 6-13.

Em relação ao ‘Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq’, os primeiros cinco circRNAs do grupo controle GEK-137 (Tabela 6) com maior número de *reads* apareceram também nos grupos submetidos às condições de estresse hídrico GEK-138 (Tabela 7) e estresse salino GEK-139 (Tabela 8). Devido ao fato de que a predição *in silico* de RNAs fornece um grande volume de informações e dados, provavelmente tais circRNAs em questão são os mais propensos a existirem em *F. ananassa* e serem validados biologicamente por PCR. No entanto, é válido ressaltar que não foram realizadas análises estatísticas e estes bancos carecem de replicata biológica. Portanto, se faz necessária a confirmação através de análises *in vitro*.

O mesmo acontece para quatro circRNAs do ‘Conjunto ABA de RNA-Seq’, que aparecem em maior número de *reads* entre o grupo controle (Tabelas 9, 10 e 11) e o grupo ABA (Tabelas 12 e 13). Tais circRNAs são originados a partir de *scaffolds*: FAN_iscf00053107.1, FAN_iscf00049062.1, FAN_iscf00031834.1 e FAN_iscf00309961.1.

Tabela 6. CircRNAs preditos no grupo Controle (GEK-137)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00050333.1	127	232	GEK-137circ_01	115	-	41	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00209415.1	2918	3023	GEK-137circ_02	71	+	27	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00009207.1	1678	3656	GEK-137circ_03	55	-	38	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	GEK-137circ_04	55	+	34	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00023799.1	1409	8188	GEK-137circ_05	38	+	11	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00018457.1	1810	2737	GEK-137circ_06	22	-	13	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00022895.1	101	274	GEK-137circ_07	21	+	19	GEK-137	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 7. CircRNAs preditos no grupo Estresse Hídrico (GEK-138)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00050333.1	127	232	GEK-138circ_01	75	-	28	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00209415.1	2918	3023	GEK-138circ_02	51	+	25	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00009207.1	1678	3656	GEK-138circ_03	41	-	26	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00023799.1	1409	8188	GEK-138circ_04	38	+	11	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	GEK-138circ_05	36	+	30	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_icon19701341.1	158	326	GEK-138circ_06	18	-	15	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00132078.1	452	1216	GEK-138circ_07	17	-	11	GEK-138	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 8. CircRNAs preditos no grupo Estresse Salino (GEK-139)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00050333.1	127	232	GEK-139circ_01	81	-	30	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00209415.1	2918	3023	GEK-139circ_02	52	+	32	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	GEK-139circ_03	33	+	27	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00023799.1	1409	8188	GEK-139circ_04	32	+	9	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00009207.1	1678	3656	GEK-139circ_05	31	-	23	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00132078.1	452	1216	GEK-139circ_06	17	-	14	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	GEK-139circ_07	13	+	11	GEK-139	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 9. CircRNAs preditos no grupo Controle (CK0.1 e CK0.2)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00174609.1	62	1767	CK0circ_01	780	-	290	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00049062.1	877	1643	CK0circ_02	408	+	249	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00032102.1	121	2055	CK0circ_03	407	-	222	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00053107.1	7	2274	CK0circ_04	291	-	168	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00239419.1	22	265	CK0circ_05	242	+	114	SRR4030803,SR R4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT
FAN_iscf00031834.1	2959	3150	CK0circ_06	241	-	52	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	CK0circ_07	140	+	66	SRR4030803,SRR 4030804	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 10. CircRNAs preditos no grupo Controle (CK5.1 e CK5.2)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00049062.1	877	1643	CK5circ_01	484	+	294	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00053107.1	7	2274	CK5circ_02	435	-	214	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00031834.1	2959	3150	CK5circ_03	396	-	85	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	CK5circ_04	186	+	144	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00078561.1	46	1968	CK5circ_05	111	+	71	SRR4030805, SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	CK5circ_06	99	+	59	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00205568.1	549	1799	CK5circ_07	96	-	76	SRR4030805,SRR4030806	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 11. CircRNAs preditos no grupo Controle (CK8.1 e CK8.2)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00049062.1	877	1643	CK8circ_01	469	+	276	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00053107.1	7	2274	CK8circ_02	364	-	200	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00174609.1	62	1767	CK8circ_03	352	-	184	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00031834.1	2959	3150	CK8circ_04	311	-	68	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	CK8circ_05	222	+	163	SRR4030807,SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	CK8circ_06	125	+	68	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00205568.1	549	1799	CK8circ_07	96	-	73	SRR4030807, SRR4030808	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 12. CircRNAs preditos no grupo ABA (ABA5.1 e ABA5.2)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00053107.1	7	2274	ABA5circ_01	557	-	240	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00049062.1	877	1643	ABA5circ_02	531	+	290	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00031834.1	2959	3150	ABA5circ_03	327	-	78	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	ABA5circ_04	310	+	193	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	ABA5circ_05	130	+	61	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00205568.1	549	1799	ABA5circ_06	112	-	72	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00117547.1	19	2027	ABA5circ_07	73	-	59	SRR4030809,SRR4030810	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Tabela 13. CircRNAs preditos no grupo ABA (ABA8.1 e ABA8.2)

# chrom/scaffold	start	end	name	n_reads	strand	n_uniq	tissues	signal	category
FAN_iscf00053107.1	7	2274	ABA8circ_01	258	-	107	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00049062.1	877	1643	ABA8circ_02	195	+	129	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00031834.1	2959	3150	ABA8circ_03	182	-	41	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00302931.1	112	1213	ABA8circ_04	160	+	112	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00078561.1	46	1968	ABA8circ_05	62	+	47	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00309961.1	123	2244	ABA8circ_06	49	+	30	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP
FAN_iscf00004966.1	229	407	ABA8circ_07	49	-	24	SRR4030811	GTAG	ANCHOR_UNIQUE, CANONICAL, CIRCULAR, PERFECT_EXT, UNAMBIGUOUS_BP

Por fim, foram organizados os circRNAs preditos anteriormente a fim de facilitar a visualização comparativa do número de *reads* entre os circRNAs dos diferentes grupos de condições ambientais. Além disso, a ferramenta BLAST foi utilizada a fim de identificar as *scaffolds* dos circRNAs, como demonstrado nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14. circRNAs com maior número de *reads* do Conjunto Estresse Hídrico/Salino de RNA-Seq

# chrom/scaffold	Identificação da scaffold (BLAST)	N_reads no banco GEK-137	N_reads no banco GEK-138	N_reads no banco GEK-139
FAN_iscf00050333.1	quinone oxidoredutase	115	75	81
FAN_iscf00209415.1	quinone oxidoredutase	71	51	52
FAN_iscf00009207.1	methionine--tRNA ligase	55	41	31
FAN_iscf00302931.1	ethylene receptor	55	36	33
FAN_iscf00023799.1	endo-1,3;1,4-beta-D-glucanase-like	38	38	32
FAN_iscf00018457.1	gibberellin 2-beta-dioxygenase 8-like	22	6	7
FAN_iscf00022895.1	pre-mRNA-processing protein	21	13	9
FAN_iscf00132078.1	cactin	14	17	17

É possível observar a partir das análises de comparação de circRNAs e o número de *reads* que o circRNA originado da scaffold FAN_iscf00174609.1 aparenta desempenhar papel importante em condições ambientais controle, mas não é tão responsivo a ABA (Tabela 15). Uma possível explicação é que esse circRNA em específico possa sofrer regulação negativa quando submetido a aplicação de tal fitohormônio. Todavia, não foi possível realizar a identificação de sua *scaffold* através da ferramenta BLAST.

Outro importante achado observado na tabela 15 é que o circRNA originado da *scaffold* FAN_iscf00032102.1 apresenta número de *reads* decrescente a medida que ocorre o processo de maturação. Esse circRNA pode ser responsivo, portanto, a condições de amadurecimento do fruto. Um dado surpreendente na mesma tabela é que o circRNA originado a partir da *scaffold* FAN_iscf00239419.1 aparece apenas no grupo CK0 do ‘Conjunto ABA de RNA-Seq’, não aparecendo nos resultados das

análises de predição dos outros grupos desse conjunto de biblioteca. Não se sabe ao certo por que esse fenômeno ocorreu, mas pode-se perceber que talvez esse circRNA possa ser expresso de forma condição-específica.

Tabela 15. circRNAs com maior número de *reads* do Conjunto ABA de RNA-Seq

# chrom/scaffold	Identificação da scaffold (BLAST)	N_reads no banco CK0	N_reads no banco CK5	N_reads no banco CK8	N_reads no banco ABA5	N_reads no banco ABA8
FAN_iscf00049062.1	serine/threonine-protein phosphatase PP1 isozyme 4	408	484	469	531	195
FAN_iscf00174609.1	-	780	14	352	10	2
FAN_iscf00032102.1	expansin-A1	407	32	30	23	-
FAN_iscf00239419.1	vicilin-like antimicrobial peptides 2-2	242	-	-	-	-
FAN_iscf00309961.1	chromosome-associated kinesin KIF4A	140	99	125	130	49
FAN_iscf00205568.1	sucrose nonfermenting 4-like protein	75	96	96	112	41

5.2 Enriquecimento funcional dos genes parentais

Genes parentais são genes que dão origem a circRNAs e mRNAs. Nas plantas, os circRNAs foram relatados como tendo correlação positiva com a expressão de seus genes parentais tanto em *A. thaliana* (YE et al., 2015) como em kiwi (WANG et al., 2017). Além disso a superexpressão do Os08circ16564, um circRNA identificado em arroz, pode regular negativamente o nível de expressão do seu gene parental (LU et al., 2015). Diante desses achados, é de suma importância o estudo dos genes parentais.

Como demonstrado anteriormente, GEK-137circ_01 (também denominado GEK-138circ_01 ou GEK-139circ_01) e GEK-137circ_02 (também denominado GEK-138circ_02 ou GEK-139circ_02) aparecem como os circRNAs com maior número de leituras em todas as tabelas e condições experimentais correspondentes ao Conjunto Estresse Salino/Hídrico de RNA-Seq. Tais circRNAs possuem como parentais genes relacionados à enzima oxidoredutase, enzima que catalisa a transferência de elétrons entre moléculas. As análises de enriquecimento funcional das bibliotecas de RNA-Seq demonstraram que atividades enzimáticas de oxidoredutase são as mais

estatisticamente significativas e frequentes entre os genes parentais dos circRNAs identificados de todos os grupos desse conjunto de bibliotecas (Figuras 6, 7 e 8).

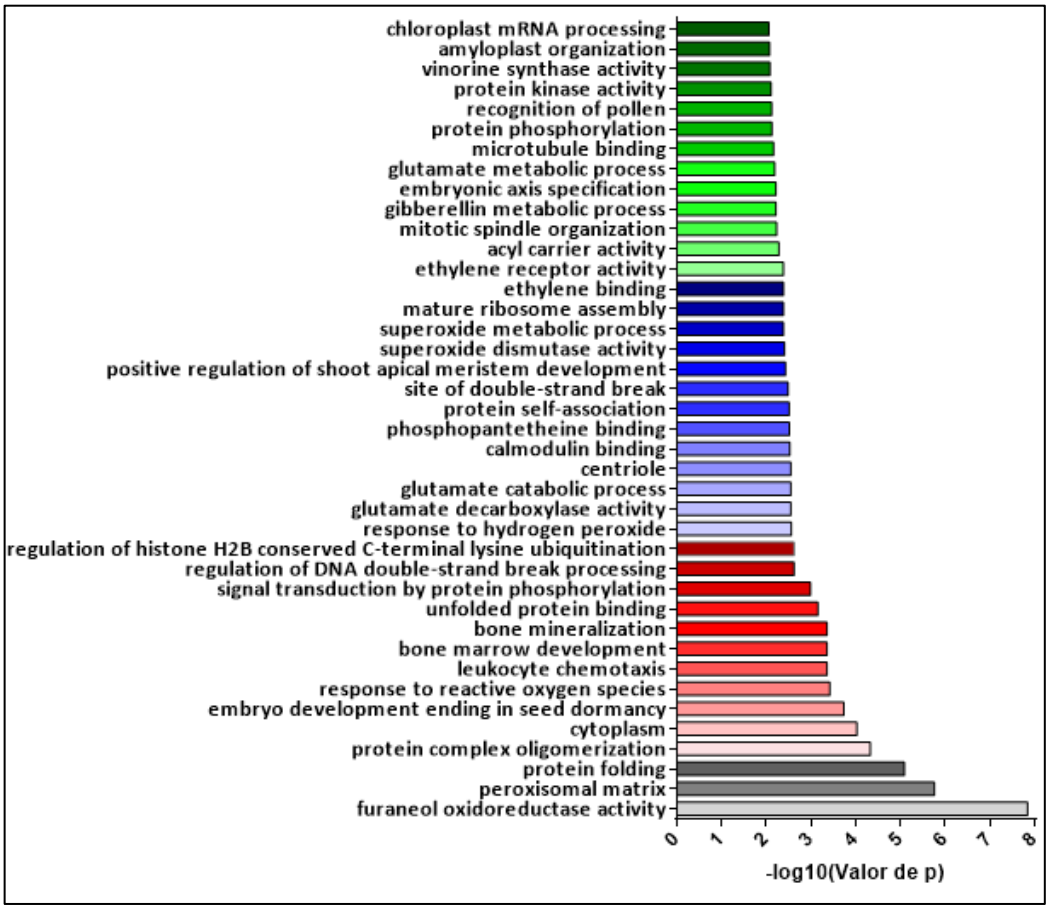

Figura 6. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle GEK-137. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

Todavia, ao analisar especificamente os dados de enriquecimento funcional, em relação ao grupo de amostras submetido a condições de estresse salino (Figura 7), os genes parentais de circRNAs tiveram como funções mais estatisticamente significativas: arginilação de proteínas (GO:0016598), função molecular de atividade de arginiltransferase (GO:0004057) e cinamato beta-D-glicosiltransferase (GO:0050412). Além de funções de fosforilação proteica (GO:0006468) e atividade de quinases (GO:0004672).

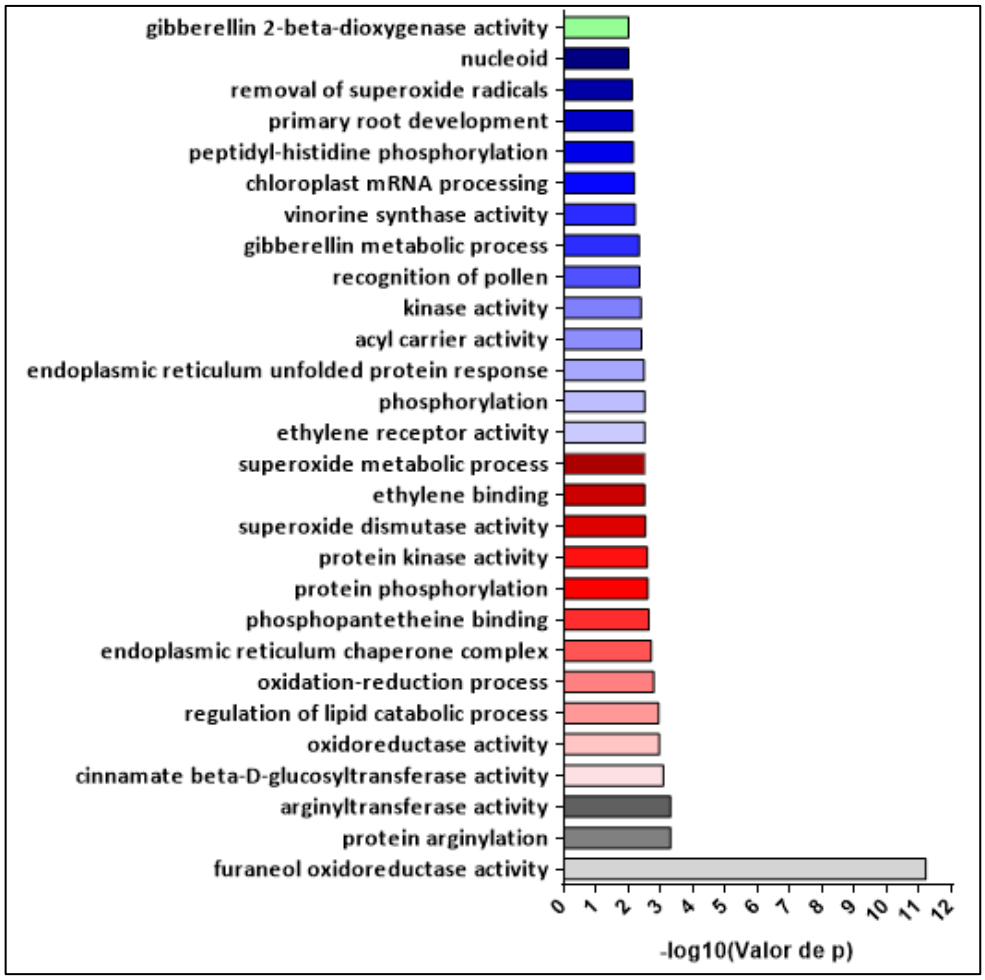

Figura 7. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Estresse Salino GEK-139. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

A regulação da estabilidade proteica e/ou degradação de proteínas mal dobradas e danificadas são processos celulares essenciais. Uma parte desta regulação é mediada pela chamada via proteolítica da regra da extremidade N, que, em conjunto com o sistema de ubiquitina-proteassoma, conduz a degradação proteica dependendo da sequência de aminoácidos da porção N-terminal. Uma importante enzima envolvida nesse processo é a arginil-t-RNA transferase. Esta enzima atua no mecanismo pós-traducional introduzindo um resíduo de arginina no terminal N de alvos proteicos específicos para sinalizar a degradação através do ubiquitina-proteassoma. O desenvolvimento de plantas, germinação de sementes, morfologia foliar e respostas à sinalização de gases em plantas estão entre os processos afetados pela via arginil-t-RNA transferase/ N-terminal (DOMITROVIC et al., 2017). Ao estudar as respostas de estresse por submersão da água e do déficit nutricional

nos mutantes da via da extremidade N, Riber e colaboradores (2015) observaram que estas plantas mutantes eram geralmente mais tolerantes às condições de déficit nutricional, ocasionados por escuridão prolongada ou submersão da água.

Em relação ao grupo de amostras que foram submetidas a condições de estresse hídrico (GEK-138), é possível observar a presença em grande proporção de genes parentais com funções relacionadas a homeostase (GO:0046916), ligação (GO:0046914) e transporte a íons metálicos (GO:0030001) (Figura 8). Além disso, também é possível observar neste grupo genes correlacionados à atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD) (GO:0004784).

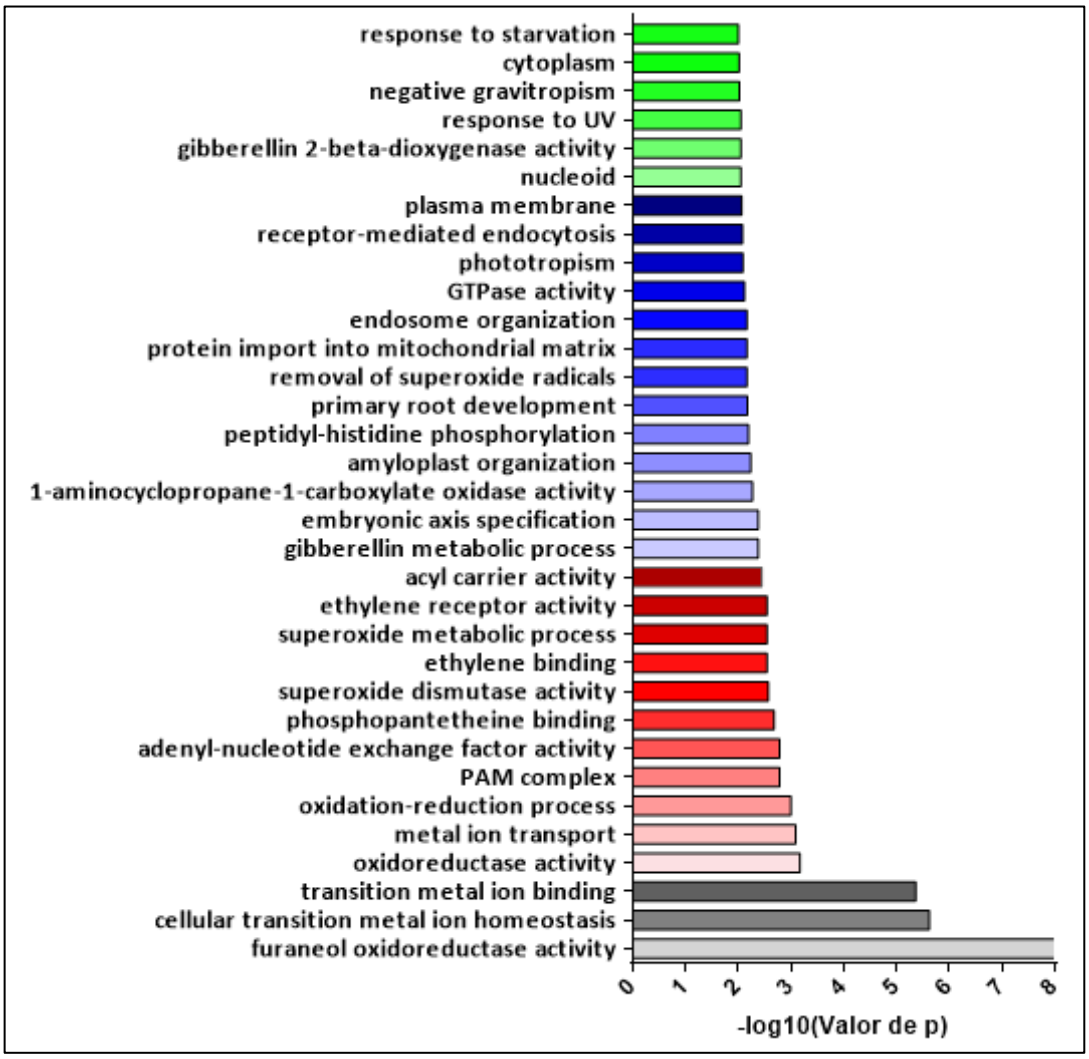

Figura 8. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Estresse Hídrico GEK-138. Os valores de p foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

A produção significativa de espécies reativas de oxigênio (EROs) na condição de estresse pode causar danos a proteínas, lipídios, ácidos nucléicos nas células. Para lidar com o dano oxidativo, o sistema de defesa antioxidante é ativado. A enzima antioxidante SOD ganha destaque nos mecanismos enzimáticos antioxidantes (ZAEFIZADEH et al., 2011). Dessa forma, a presença de genes parentais com as atividades intimamente correlacionadas a resposta a estresse hídrico demonstra que circRNAs são responsivos a tais condições.

No entanto, estudos demonstraram que EROs também servem como segundos mensageiros nas vias de sinalização. Os sinais de EROs controlam o crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo o gravitropismo (JOO et al., 2001), fisiologia celular de células-guarda (SINGH et al., 2017) e modulação da arquitetura de raiz (ORMAN-LIGEZA et al., 2016). Analisando os dados de atividade biológica de genes parentais, o grupo que recebeu a aplicação de ABA colhido após 8 dia (Figura 13) de tratamento apresenta como uma das atividades biológicas mais estatisticamente significativas a atividade de resposta a espécies reativas de oxigênio (GO:0000302). Entretanto, essa função não aparece como estatisticamente significante nos grupos controle CK0, CK5 e CK8, tal como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11, respectivamente.

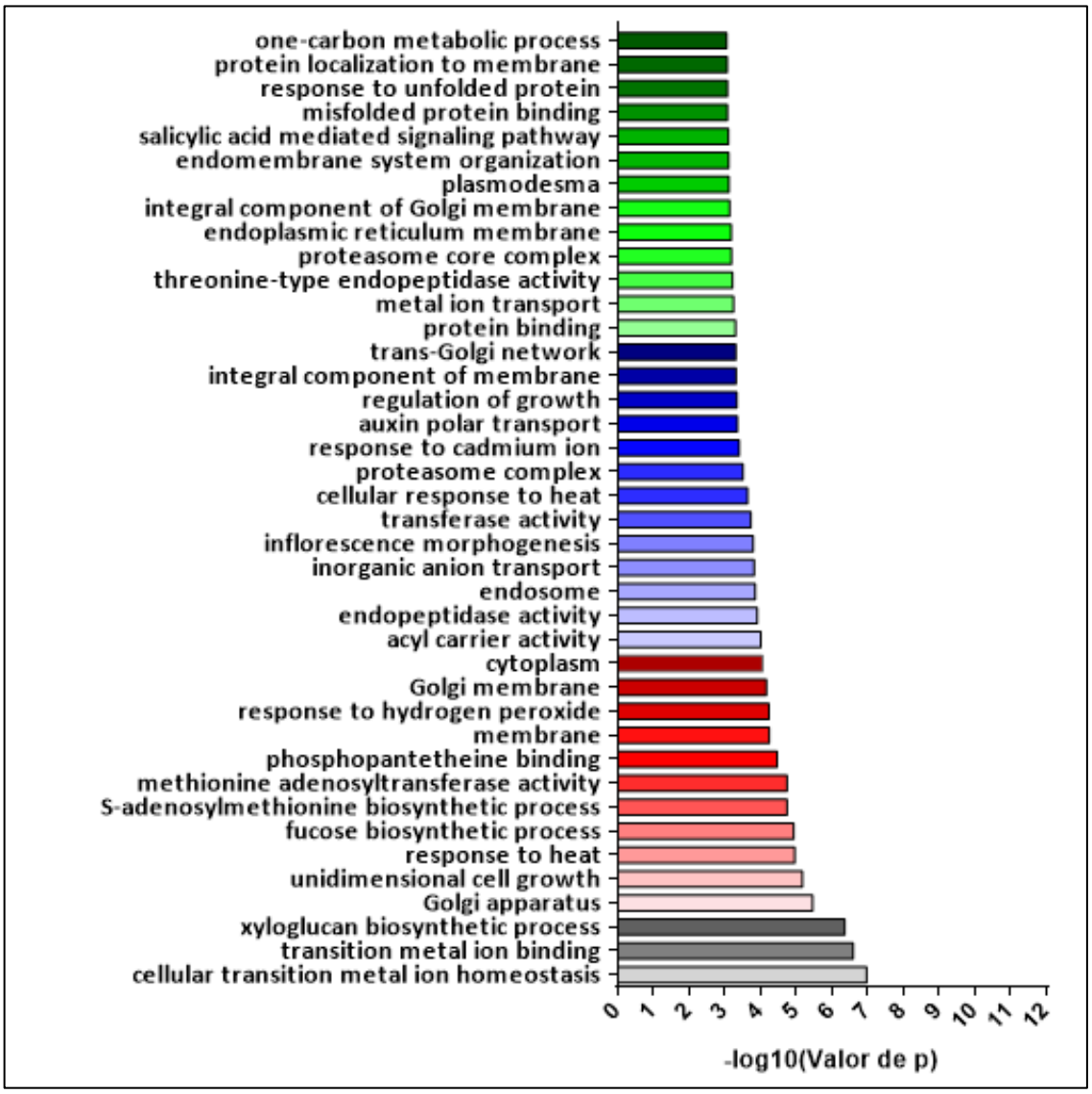

Figura 9. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK0. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

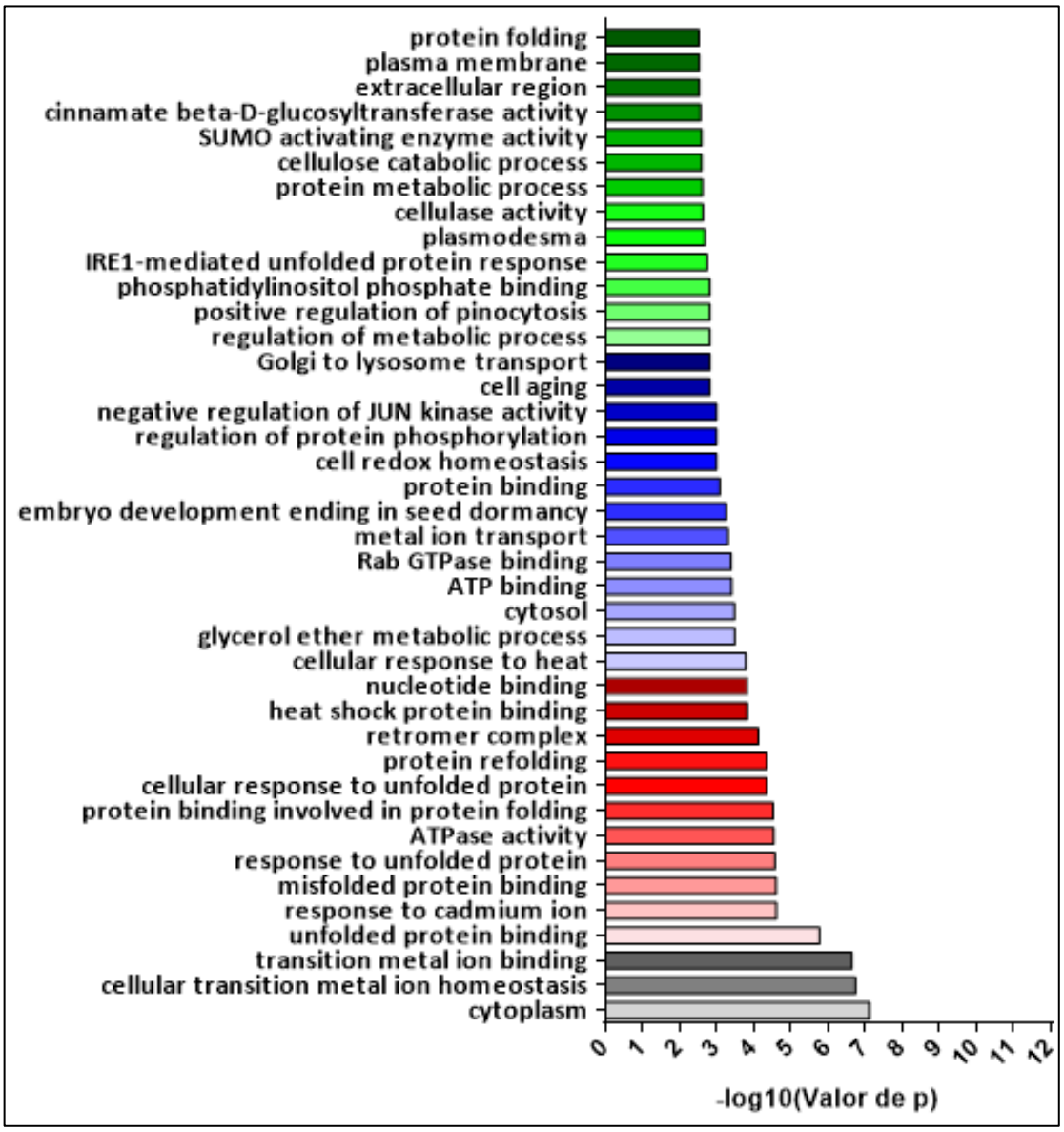

Figura 10. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK5. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

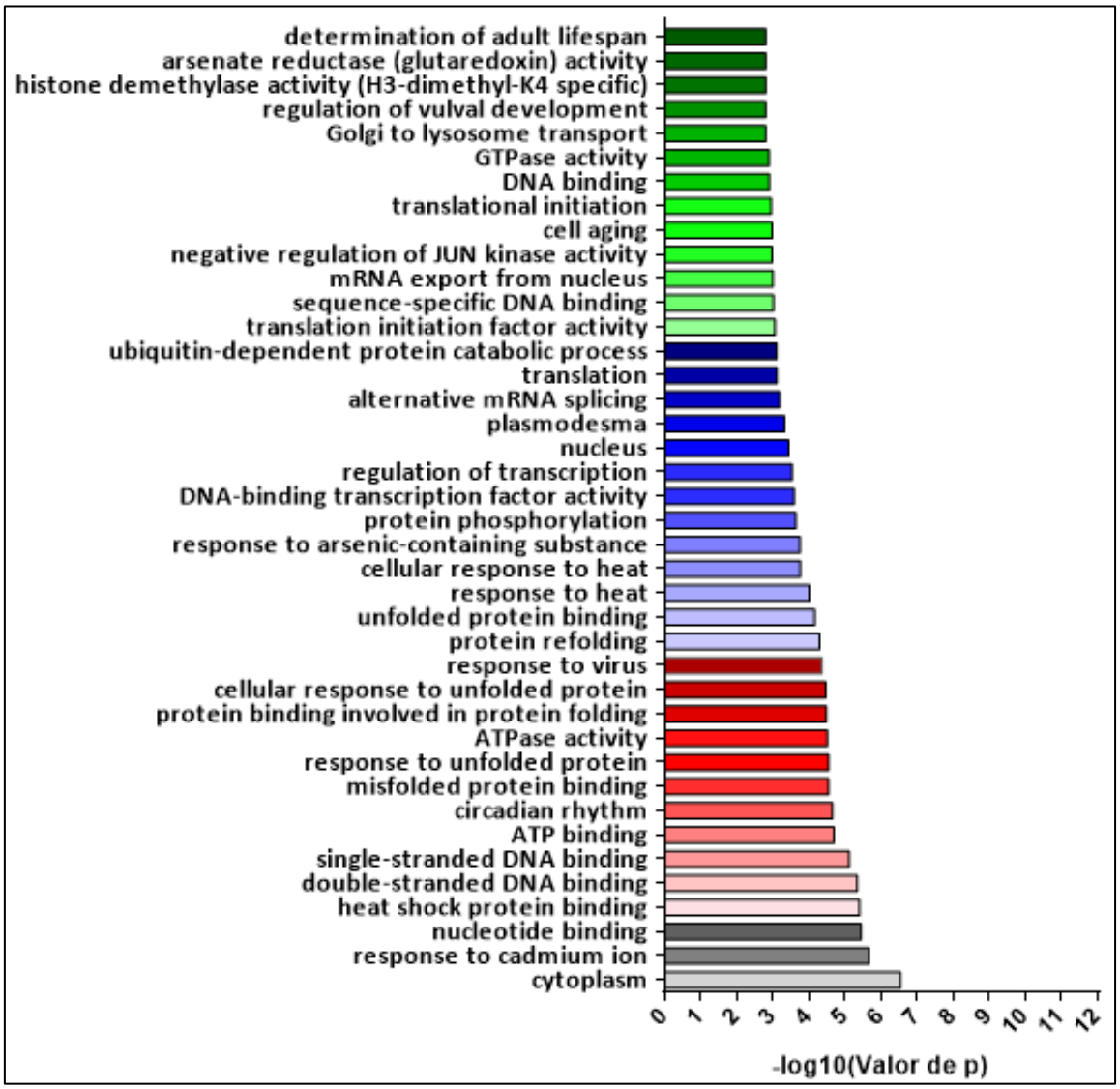

Figura 11. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo Controle CK8. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

As EROs podem ser geradas pela enzima oxidase de explosão respiratória (RBOH, do inglês *respiratory burst oxidase*)/NADPH oxidase, que reside na membrana plasmática. A RBOH produz superóxido, que pode ser convertido espontaneamente ou enzimaticamente em peróxido de hidrogênio. A atividade de RBOH é induzida por fitohormônios, como o ABA (JIANG & ZHANG, 2002), e estresse abiótico, como por exemplo, luz de alta intensidade (KARPIŃSKI et al., 2013). A presença de função biológica de genes parentais em resposta a luz de alta intensidade também aparece nos grupos ABA5 (Figura 12) e ABA8 (Figura 13) e não aparece nos

grupos controle CK0, CK5 e CK8. A produção de EROs em células-guarda ocorre em resposta à sinalização ABA, desencadeando uma complexa cascata de sinalização para fechar os estômatos (ASSMANN E JEGLA, 2016).

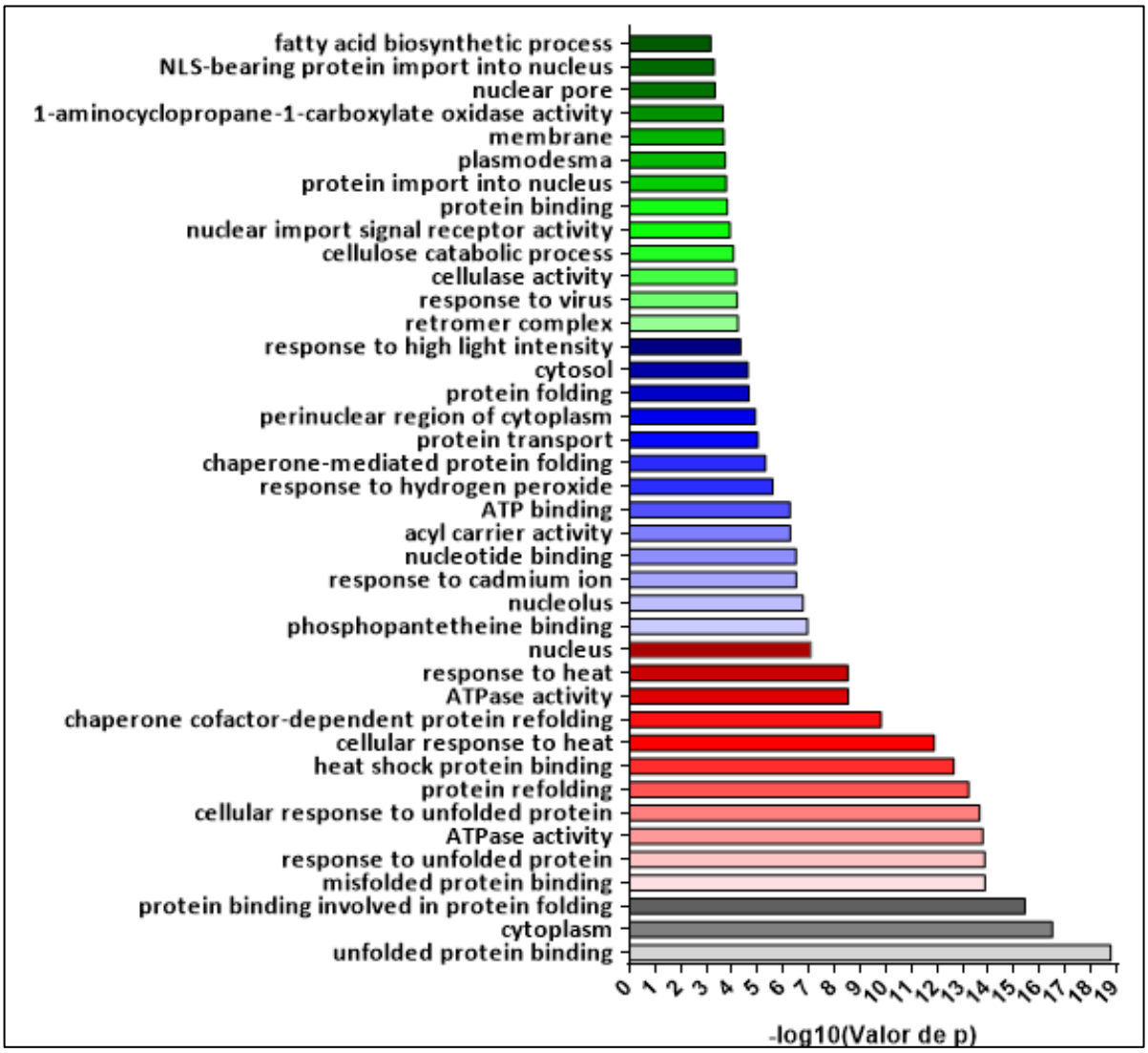

Figura 12. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo ABA5. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

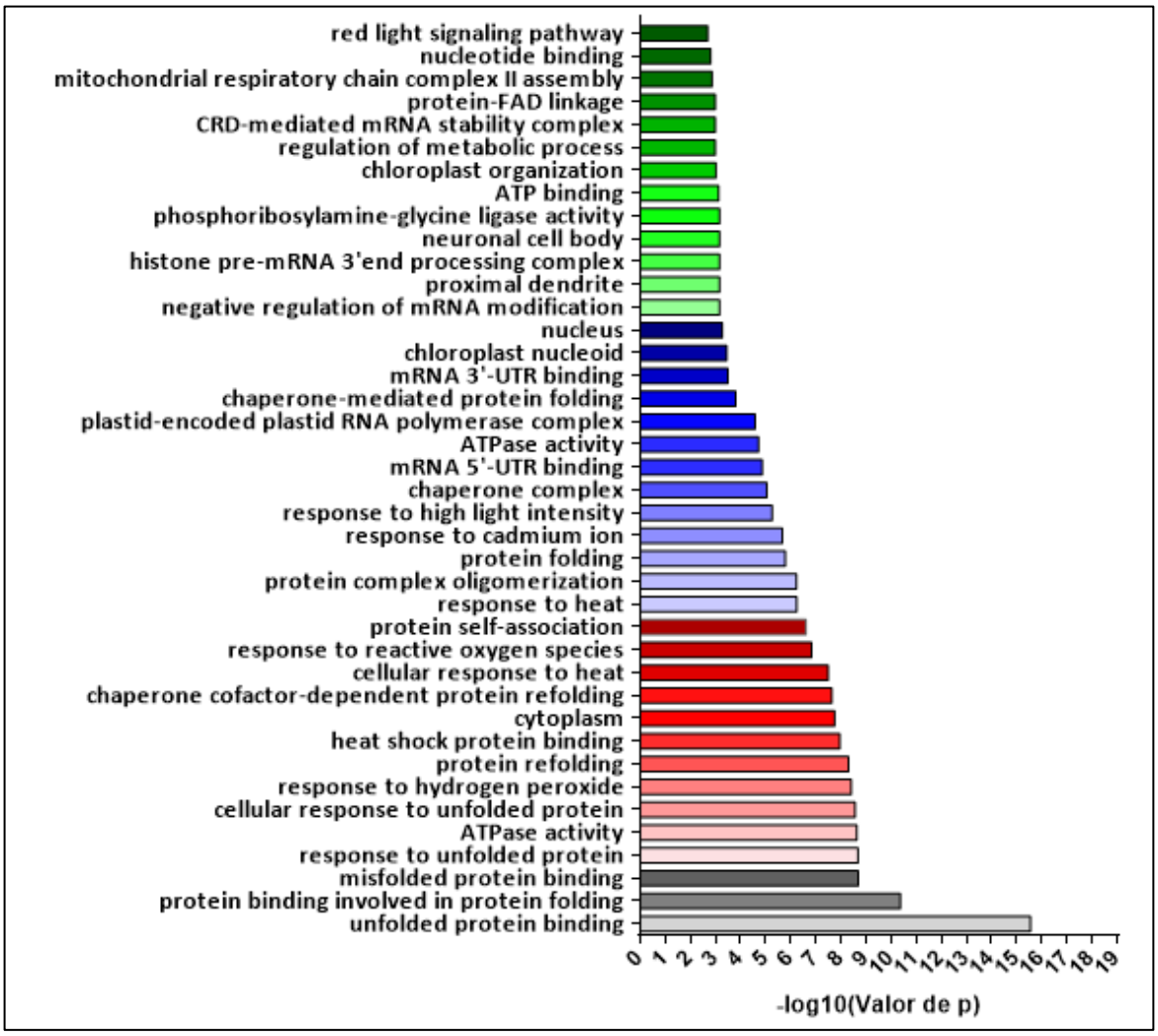

Figura 13. Enriquecimento funcional e identificação de atividade biológica de genes parentais do grupo ABA8. Os valores de *p* foram obtidos a partir do teste exato de Fischer.

Subsequente a isso, também é válido destacar que em todos os grupos do ‘Conjunto ABA de RNA-Seq’ algumas funções basais relacionadas a componentes celulares se repetem, como era esperado, tais como: atividade citoplasmática (GO:0005737) e de membrana (GO:0016020). Todavia, os genes parentais de circRNAs dos grupos controle CK0, CK5 e CK8 também parecem ser responsivos ao processo de amadurecimento do fruto de *F. ananassa,* visto que apenas nos grupos CK5 e CK8 aparece a função de processo biológico de envelhecimento celular (GO:0007569), como estatisticamente significativa. Por fim, apesar de não estar demonstrado nas figuras anteriores devido ao fato de não existir genes parentais em quantidades estatisticamente relevantes no enriquecimento funcional, alguns genes

parentais do ‘Conjunto ABA de RNA-Seq’ apresentaram de forma mais pontual funções de ligação a RNA (GO:0044822), produção de miRNAs envolvidos no silenciamento gênico (GO:0030918), ligação a RNA de fita dupla (GO:0003725) e ligação a miRNA (GO:0035198). Tais circRNAs no futuro poderão ser validados biologicamente para a confirmação da rede circRNA-miRNA-mRNA.

6. Conclusão e perspectivas

Apesar do crescente número de artigos publicados e informações em bancos de dados sobre circRNAs de plantas, ainda há escassez de estudos sobre esses RNAs em uma série de espécies vegetais, especialmente em plantas não-modelos. Além disso, as investigações sobre os mecanismos moleculares subjacentes à biogênese e funções de circRNAs de plantas ainda são raras. Dessa forma, este trabalho visou contribuir para o incremento de novos dados sobre uma espécie (*F. ananassa*) não disponível nos bancos de dados atuais.

Devido ao grande volume de dados inicial gerado pela ferramenta find_circ, foi necessária a filtragem de tais dados para obter maior confiabilidade nos resultados gerados. Essa filtragem foi essencial para que o trabalho fosse aprofundado e para a seleção de circRNAs identificados a serem validados biologicamente em trabalhos futuros.

As análises de ontologia gênica e enriquecimento funcional demonstraram que as funções biológicas identificadas de genes parentais parecem estar intimamente associadas a respostas a estresses abióticos e ao ácido abscísico. Visto que há uma possível regulação negativa desses genes parentais por eventos de circularização e formação de circRNAs, isso demonstra que circRNAs podem ser importantes reguladores gênicos frente a fatores ambientais.

Além disso, a identificação de ontologia permitiu observar genes parentais de circRNAs associados a ligação a RNAs, incluindo ligação a miRNAs. Estudos futuros serão direcionados a analisar e validar estes circRNAs para confirmação da hipótese da rede circRNA-miRNA-mRNA.

Referências

ASSMANN, S. M.; JEGLA, T. Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO2. **Current Opinion in Plant Biology**, 2016.

CHEN, L. L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2016.

CHEN, L. L.; YANG, L. Regulation of circRNA biogenesis. **RNA Biology**, v. 12, n. 4, p. 381–388, 2015.

CHEN, L.; ZHANG, P.; FAN, Y.; LU, Q.; LI, Q.; YAN, J.; MUEHLBAUER, G. J.; SCHNABLE, P. S.; DAI, M.; LI, L. Circular RNAs mediated by transposons are associated with transcriptomic and phenotypic variation in maize. **New Phytologist**, v. 217, n. 3, p. 1292–1306, 2018.

CHU, Q.; ZHANG, X.; ZHU, X.; LIU, C.; MAO, L.; YE, C.; ZHU, Q. H.; FAN, L. **PlantcircBase: A Database for Plant Circular RNAs Molecular Plant**, 2017.

CHUANG, T. J.; WU, C. S.; CHEN, C. Y.; HUNG, L. Y.; CHIANG, T. W.; YANG, M. Y. NCLscan: Accurate identification of non-co-linear transcripts (fusion, trans-splicing and circular RNA) with a good balance between sensitivity and precision. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 3, 2016.

DARBANI, B.; NOEPARVAR, S.; BORG, S. Identification of Circular RNAs from the Parental Genes Involved in Multiple Aspects of Cellular Metabolism in Barley. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

TOIT, A DU. RNA: circular RNAs as miRNA sponges. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. April, p. 11993, 2013.

FISCHER, J. W.; LEUNG, A. K. L. CircRNAs: a regulator of cellular stress. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, 2017.

GAO, Y.; WANG, J.; ZHAO, F. CIRI: An efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, 2015.

GAO, Y.; ZHAO, F. **Computational Strategies for Exploring Circular RNAsTrends in Genetics**, 2018.

GINÉ-BORDONABA, J.; ECHEVERRIA, G.; UBACH, D.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; LÓPEZ, M. L.; LARRIGAUDIÈRE, C. Biochemical and physiological changes during fruit development and ripening of two sweet cherry varieties with different levels of cracking tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2017.

HANSEN, T. B.; JENSEN, T. I.; CLAUSEN, B. H.; BRAMSEN, J. B.; FINSEN, B.; DAMGAARD, C. K.; KJEMS, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 384–388, 2013.

HANSEN, T. B.; KJEMS, J.; DAMGAARD, C. K. Circular RNA and miR-7 in Cancer. **Cancer Research**, 2013.

HANSEN, T. B.; VENØ, M. T.; DAMGAARD, C. K.; KJEMS, J. Comparison of circular RNA prediction tools. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 6, 2015.

JECK, W. R.; SORRENTINO, J. A.; WANG, K.; SLEVIN, M. K.; BURD, C. E.; LIU, J.; MARZLUFF, W. F.; SHARPLESS, N. E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. **RNA**, v. 19, n. 2, p. 141–157, 2013.

JIANG, M.; ZHANG, J. Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings. **Planta**, 2002.

JOO, J. H.; BAE, Y. S.; LEE, J. S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. **Plant physiology**, 2001.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEE, S. M.; KONG, H. G.; RYU, C. M. Are Circular RNAs New Kids on the Block? **Trends in Plant Science**, 2017.

LEGNINI, I. *et al.* Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. **Molecular Cell**, v. 66, n. 1, p. 22–37.e9, 2017.

LI, Q. F.; ZHANG, Y. C.; CHEN, Y. Q.; YU, Y. Circular RNAs roll into the regulatory network of plants. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017.

LU, T. *et al.* Transcriptome-wide investigation of circular RNAs in rice. **RNA**, v. 21, n. 12, p. 2076–2087, 2015.

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

MORRIS, K. V.; MATTICK, J. S. The rise of regulatory RNA. **Nature Reviews Genetics**, 2014.

ORMAN-LIGEZA, B.; PARIZOT, B.; RYCKE, R. DE; FERNANDEZ, A.; HIMSCHOOT, E.; BREUSEGEM, F. VAN; BENNETT, M. J.; PÉRILLEUX, C.; BEECKMAN, T.; DRAYE, X. RBOH-mediated ROS production facilitates lateral root emergence in *Arabidopsis*. **Development**, 2016.

PAMUDURTI, N. R. *et al.* Translation of CircRNAs. **Molecular Cell**, v. 66, n. 1, p. 9–21.e7, 2017.

PAN, T.; SUN, X.; LIU, Y.; LI, H.; DENG, G.; LIN, H.; WANG, S. Heat stress alters genome-wide profiles of circular RNAs in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 3, p. 217–229, 2018.

PANDEY, P.; IRULAPPAN, V.; BAGAVATHIANNAN, M. V.; SENTHIL-KUMAR, M. Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

SALZMAN, J. Circular RNA Expression: Its Potential Regulation and Function. **Trends in Genetics**, 2016.

SALZMAN, J.; GAWAD, C.; WANG, P. L.; LACAYO, N.; BROWN, P. O. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.

SANGER, H. L.; KLOTZ, G.; RIESNER, D.; GROSS, H. J.; KLEINSCHMIDT, A. K. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 11, p. 3852–3856, 1976.

SINGH, R.; PARIHAR, P.; SINGH, S.; MISHRA, R. K.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives. **Redox Biology**, 2017.

SONG, X.; ZHANG, N.; HAN, P.; MOON, B. S.; LAI, R. K.; WANG, K.; LU, W. Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 9, 2016.

SUN, X. *et al.* Integrative analysis of Arabidopsis thaliana transcriptomics reveals intuitive splicing mechanism for circular RNA. **FEBS Letters**, 2016.

SZABO, L.; MOREY, R.; PALPANT, N. J.; WANG, P. L.; AFARI, N.; JIANG, C.; PARAST, M. M.; MURRY, C. E.; LAURENT, L. C.; SALZMAN, J. Statistically based splicing detection reveals neural enrichment and tissue-specific induction of circular RNA during human fetal development. **Genome Biology**, 2016.

TAN, J.; ZHOU, Z.; NIU, Y.; SUN, X.; DENG, Z. Identification and Functional Characterization of Tomato CircRNAs Derived from Genes Involved in Fruit Pigment Accumulation. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

THOMAS, L. F.; SÆTROM, P. Circular RNAs are depleted of polymorphisms at microRNA binding sites. **Bioinformatics**, 2014.

WANG, J.; MENG, X.; DOBROVOLSKAYA, O. B.; ORLOV, Y. L.; CHEN, M. Non-coding RNAs and Their Roles in Stress Response in Plants. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, 2017.

WANG, Y.; YANG, M.; WEI, S.; QIN, F.; ZHAO, H.; SUO, B. Identification of Circular RNAs and Their Targets in Leaves of Triticum aestivum L. under Dehydration Stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2017.

WANG, Y.; WANG, Q.; GAO, L.; ZHU, B.; LUO, Y.; DENG, Z.; ZUO, J. Integrative analysis of circRNAs acting as ceRNAs involved in ethylene pathway in tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 161, n. 3, p. 311–321, 2017.

WANG, Z.; LIU, Y.; LI, D.; LI, L.; ZHANG, Q.; WANG, S.; HUANG, H. Identification of Circular RNAs in Kiwifruit and Their Species-Specific Response to Bacterial Canker Pathogen Invasion. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

WESSELHOEFT, R. A.; KOWALSKI, P. S.; ANDERSON, D. G. Engineering circular RNA for potent and stable translation in eukaryotic cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

YE, C. Y.; CHEN, L.; LIU, C.; ZHU, Q. H.; FAN, L. Widespread noncoding circular RNAs in plants. **New Phytologist**, v. 208, n. 1, p. 88–95, 2015.

YIN, J.; LIU, M.; MA, D.; WU, J.; LI, S.; ZHU, Y.; HAN, B. Identification of circular RNAs and their targets during tomato fruit ripening. **Postharvest Biology and Technology**, v. 136, p. 90–98, 2018.

ZHANG, P.; MENG, X.; CHEN, H.; LIU, Y.; XUE, J.; ZHOU, Y.; CHEN, M. PlantCircNet: a database for plant circRNA–miRNA–mRNA regulatory networks. **Database**, v. 2017, p. 89–1, 2017.

ZHANG, X. O.; WANG, H. BIN; ZHANG, Y.; LU, X.; CHEN, L. L.; YANG, L. Complementary sequence-mediated exon circularization. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 134–147, 2014.

ZHAO, W.; CHENG, Y.; ZHANG, C.; YOU, Q.; SHEN, X.; GUO, W.; JIAO, Y. Genome-wide identification and characterization of circular RNAs by high throughput sequencing in soybean. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5636, 2017.

ZHOU, M.; LI, D.; LI, Z.; HU, Q.; YANG, C.; ZHU, L.; LUO, H. Constitutive Expression of a miR319 Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. **PLANT PHYSIOLOGY**, 2013.

ZHOU, R.; ZHU, Y.; ZHAO, J.; FANG, Z.; WANG, S.; YIN, J.; CHU, Z.; MA, D. Transcriptome-wide identification and characterization of potato circular RNAs in response to pectobacterium carotovorum subspecies brasiliense infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 2018.

ZUO, J.; WANG, Q.; ZHU, B.; LUO, Y.; GAO, L. Deciphering the roles of circRNAs on chilling injury in tomato. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 479, n. 2, p. 132–138, 2016.