



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DE ncRNAs: ASPECTOS
GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS DE circRNAs NA COVID-19

JHULLY AZEVEDO DOS SANTOS PINHEIRO

BELÉM – PARÁ
DEZEMBRO – 2024

JHULLY AZEVEDO DOS SANTOS PINHEIRO

**POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DE ncRNAs: ASPECTOS
GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS DE circRNAs NA COVID-19**

Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Genética e Biologia Molecular.
Orientador: Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos

BELÉM – PARÁ
DEZEMBRO – 2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DE ncRNAs: ASPECTOS
GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS DE circRNAs NA COVID-19

JHULLY AZEVEDO DOS SANTOS PINHEIRO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sidney Emanuel Batista dos Santos (ICB/UFPA – Orientador)

Prof. Dr. Fabiano Cordeiro Moreira (ICB/UFPA – Membro)

Prof. Dr. Pablo Diego do Carmo Pinto (ICB/UFPA – Membro)

Dr^a Giovanna Chaves Cavalcante (Departamento de Bioquímica do IQ/USP – Membro)

Dr. Leandro Lopes de Magalhães (ITV – Membro)

BELÉM – PARÁ
DEZEMBRO – 2024

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

1. Instituições Participantes

- 1.1 Universidade Federal do Pará (UFPA)
- 1.2 Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)
- 1.3 Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO/HUJBB)
- 1.4 Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)
- 1.5 Instituto Tecnológico Vale (ITV)

2. Fontes Financiadoras

- 2.1 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- 2.2 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- 2.3 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus pela honra de viver, pela sua grandeza, por me fortalecer durante toda a minha vida, por me guiar nessa longa caminhada, pelo seu amor incondicional, carinho e cuidado comigo e minha família.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), ao Programa de Genética e Biologia Molecular (PPGBM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por tornarem possível a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr Sidney Emanuel Batista dos Santos, por ter me fornecido a primeira oportunidade para entrar na pesquisa na UFPA, por ter me recebido e acolhido de maneira tão especial no LGHM e NPO, pela sua competência e paciência ao passar seu conhecimento, obrigada por todo aprendizado, e principalmente obrigada por ser um ser humano incrível que me ensinou muito sobre humildade e que confiou à mim todas as etapas desse trabalho.

À Profª Drª Ândrea Ribeiro, por me acolher no LGHM, por acompanhar meu trabalho e me dar suporte neste laboratório. Ao prof. Dr Gil por todo apoio acadêmico e amizade. E à Profª Drª Amanda por todo amor e dedicação ao ensinar e me ajudar em toda a minha jornada desse mestrado.

Ao prof. Dr. Fabiano Cordeiro, que com sua humildade, dedicação e competência, contribuiu para os objetivos desse trabalho, e além disso, agradeço por me ensinar o caminho para uma carreira acadêmica ética, justa e colaborativa.

À Profª MSc. Marcilene Caldas que me ensinou o caminho para a carreira acadêmica, muito obrigada.

Como orientadora da Liga de Genética Rosalind Franklin (Ligen), agradeço os seus ligantes que contribuem para um ensino de genética acessível à comunidade. E ao Prof. Dr. Sávio Reis que me permitiu começar minhas primeiras experiências na área de genética, e que até hoje, através da Ligen me concede a oportunidade de compartilhar conhecimentos de genética além da universidade.

Aos amigos do LGHM, que me acolheram em Belém e deram apoio emocional e técnico para a realização dessa tese.

Ao corpo técnico do LGHM, especialmente ao Dr. Caio Santos, que acompanhou e me ensinou pacientemente as técnicas laboratoriais, mas também me ensinou sobre companheirismo e amizade, sempre disposto a ajudar e acolher, se tornando um grande amigo.

Ao meu pai Jenerias, por sua preocupação com minha carreira acadêmica e profissional, sendo essencial em cada etapa para que eu chegasse até aqui, à minha mãe Sônia, minha inspiração para entrar na pesquisa, uma mulher forte, corajosa, que venceu o câncer,

sábia nos seus ensinamentos, com conselhos tão valiosos e amor incondicional, que está comigo e me ampara em todos os momentos da minha vida. Meus pais são um exemplo de vida para mim, e isso me deixa imensamente orgulhosa. E aos meus irmãos Chirley e Wiliam por me darem força e sempre acreditarem na minha capacidade, além de me presentear com meus queridos sobrinhos Arthur, Lucas e João Vitor. Também agradeço aos meus cunhados Andrea e Neto, que sempre me ofereceram suporte quando precisei.

Aos meus sogros, que sempre apoiam e incentivam a minha jornada acadêmica.

Ao meu esposo Erberson, que me acompanhou e me ajudou durante todo o doutorado e antes mesmo de eu entrar nele. Por sua paciência e compreensão nas horas de angústia, desespero, ausência. Por cuidar tão bem do nosso Anthony, por ser um grande companheiro, amigo, professor, meu grande amor.

Ao meu maior presente durante a jornada do doutorado e da vida, meu filho Anthony, que juntamente comigo vivenciou os desafios da pesquisa e da maternidade, mas foi compreensivo, se tornando independente de acordo com a necessidade das circunstâncias, e com amor, alegria e carinho têm me nutrido em qualquer momento. Eu te amo meu futuro cientista *baby* Ligen.

Ao meu avô Onias (*in memoriam*), por seu cuidado, alegria ao ver minhas vitórias e todo amor que sempre me proporcionou e me fortaleceu, à minha vó Doraci pelo carinho, à minha vó Jovelina (*in memoriam*) que durante toda a sua vida teve o cuidado em saber cada passo que eu dava, assim como me ajudou muitas vezes a caminhar e manter firme nessa caminhada, uma mulher que sem a oportunidade de estudar, ensinou aos filhos e netos a importância do estudo, deixando ensinamentos eternos.

À minha ajudante Beatriz, que cuidou do Anthony nesse último ano com muito amor e carinho.

Aos meus familiares, por depositarem sua confiança em mim, e estarem sempre acompanhando meus estudos, me incentivando a estudar e valorizando cada conquista minha, sempre me deixando confiante na minha trajetória.

Aos meus amigos, que mesmo distantes se fizeram presentes.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	120
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 <i>CORONAVIRUS DISEASE 2019 (COVID-19)</i>	11
1.1.1 Epidemiologia da COVID-19.....	13
1.1.2 Aspectos Biológicos do SARS-CoV-2.....	18
1.1.3 Aspectos Imunológicos do Hospedeiro.....	20
1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NA COVID-19	22
1.2.1 Alterações genéticas.....	22
1.2.2 Modificações Epigenéticas	24
1.3 RNAS NÃO CODIFICANTES.....	24
1.3.1 Classificação de RNAs não codificantes	24
1.3.2 Regulação por RNAs não codificantes	25
1.4 piRNA	26
1.4.1 piRNA: Conceito e Histórico	26
1.4.2 piRNA: Biogênese	26
1.4.2.2 Biogênese Primária e Secundária	27
1.4.3 piRNA: Função	29
1.4.4 piRNAs diferencialmente expressos na COVID-19	31
1.4.5 Polimorfismos relacionados com piRNAs associados com COVID-19 ..	32
1.5 circRNA	33
1.5.1 circRNA: Conceito e Histórico	33
1.5.2 circRNA: Biogênese.....	33
1.5.3 circRNA: Função	37
1.6 CIRCARNAS ENVOLVIDOS COM A PATOGÊNESE DA COVID-19.....	39
1.6.1 circRNAs diferencialmente expressos na COVID-19	41
1.6.2 Polimorfismos relacionados com circRNAs associados à COVID-19....	44
2 JUSTIFICATIVA.....	47
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 OBJETIVO GERAL.....	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4 CAPÍTULO I	50
5 CAPÍTULO II.....	65
6 DISCUSSÃO GERAL	89
7 CONCLUSÃO	94

REFERÊNCIAS	95
APÊNDICES: ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.	117
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>CELLS</i>...	117
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES</i>.....	118
APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>CURRENT ISSUES IN MOLECULAR BIOLOGY</i>.....	119
APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>FRONTIERS IN PUBLIC HEALTH</i>.....	120
APÊNDICE E – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>GENES</i> ..	121
APÊNDICE F – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>SCIENTIFIC REPORTS</i>.....	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação gráfica da evolução da COVID-19 no mundo do número cumulativo de casos (a) e número cumulativo de mortes (b) por COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).	14
Figura 2. Evolução da COVID-19 no mundo, por regiões: número cumulativo de casos confirmados com COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).	15
Figura 3. Representação gráfica da evolução da COVID-19 no Brasil do número cumulativo de casos (a) e mortes (b) por COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).	16
Figura 4. Estruturas virais (a) e estrutura genômica (b) do SARS-CoV-2. (Adaptado de Aggarwal et al., 2021 e Askari et al., 2020).	18
Figura 5. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2 (Adaptado de KADAM et al., 2021).	19
Figura 6. Via primária (a) e via secundária (b) de piRNA. (Cabral et al., 2020).	28
Figura 7. Silenciamento mediado por piRNA em nível transcricional (a) e pós-transcricional (b). (Cabral et al., 2020).	30
Figura 8. Biogênese de circRNAs. a) ciclização de íntros lariat (ciRNA), b) ciclização direcionadas por íntros lariat que geram circRNAs de éxons, c) ciclização mediada por emparelhamento de íntros a partir de íntros, d) ciclização mediada por proteínas de ligação ao RNA (RBPs), e) ciclização conduzida por splicing de tRNA, f) ciclização conduzida por splicing de rRNA, g) ciclização a partir de íntros flanquados por splicing, em regiões intergênicas (Adaptado de ZHANG et al., 2017 e WANG et al., 2019).	34
Figura 9. Biogênese de circRNAs e principal classificação. a) <i>Exonic</i> circRNA (eciRNA) e <i>Exon-intron</i> circRNAs (ElciRNA). O <i>splicing</i> canônico produz mRNA lineares enquanto o <i>splicing</i> não canônico (<i>backsplicing</i>) produz eciRNAs, se íntros forem retidos gera ElciRNAs. b) <i>Intronic</i> circRNA (ciRNA) produzido por <i>splicing</i> de íntros (Adaptado de Meng et al., 2016).	35
Figura 10. Funções de circRNAs. CircRNAs podem atuar no núcleo (ciRNA e ElciRNA) na regulação transcricional ou no citoplasma (eciRNAs), na regulação pós-transcricional (Adaptado de MENG et al., 2017 e NAHAND et al., 2020).	38

RESUMO

Alterações genéticas e epigenéticas reguladas por RNAs não codificantes (ncRNAs) têm sido associadas ao desenvolvimento de doenças. Evidências sugerem que variantes podem influenciar a função de ncRNAs, como piRNAs e circRNAs. Essas moléculas têm sido estudadas em doenças infecciosas, incluindo COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2. No entanto, os aspectos envolvidos na relação entre variantes genéticas e a expressão de piRNAs ou circRNAs não estão totalmente descritos. O objetivo deste estudo foi caracterizar polimorfismos em regiões de piRNAs para testar a hipótese de que variantes podem afetar a expressão de ncRNAs. Além disso, investigamos o perfil de expressão global e os padrões regulatórios de eQTL de circRNAs, bem como sua associação com a COVID-19. Usamos dados genômicos do piRBase e do 1000 Genomes Project para caracterizar polimorfismos em regiões de piRNA. Posteriormente, amostras de swab naso-orofaríngeo e saliva coletadas de 66 indivíduos diagnosticados com COVID-19, classificados como assintomáticos (11), leves (15) e graves (22) foram sequenciadas por RNA-Seq para identificar circRNAs diferencialmente expressos (DE). A análise dos dados foi realizada usando os pacotes edgeR v.4.0.14. e CircTest R v.0.1.1, considerando valores de p ajustados $< 0,05$ como estatisticamente significativos. Análises de eQTL foram realizadas para avaliar a associação entre variantes e a expressão de circRNAs. Todas as análises estatísticas foram conduzidas usando o Software R Studio v.4.1.1. Nossos achados sugeriram que polimorfismos podem afetar a estrutura da sequência do piRNA, enfatizando que toda a sequência de piRNA é crucial para a ligação ao alvo, permitindo alguns *mismatches*. Investigações experimentais revelaram que polimorfismos em piRNAs podem influenciar a supressão da atividade dos transposons, o que justifica uma investigação mais aprofundada em estudos futuros. Após testar a hipótese de que variantes podem afetar a expressão de ncRNAs, a análise comparativa da expressão de circRNA entre os grupos identificou oito circRNAs DE. As análises *in silico* revelaram cinco circRNAs (hsa-NIPBL_0053, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, hsa-SETD3_0001, hsa-XPO1_0001), interagindo com miRNAs. A análise dos genes alvo regulados destacou os processos biológicos envolvidos na infecção por SARS-CoV-2, incluindo respostas celulares à hipóxia, sinalização WNT, citocina, regulação da resposta imune e resposta celular ao vírus. A análise de eQTL demonstrou variantes genéticas no gene TMPRSS13 e gene parental XPO1, afetando a expressão gênica. Assim, os achados deste estudo podem ajudar a elucidar o papel dos mecanismos genéticos e epigenéticos na fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2.

PALAVRAS-CHAVE: ncRNA, piRNA, circRNA, COVID-19, Polimorfismo.

ABSTRACT

Genetic and epigenetic alterations regulated by non-coding RNAs (ncRNAs) have been associated with the development of diseases. Evidence suggests that genomic changes may influence the function of ncRNAs, such as piRNAs and circRNAs. These molecules have been studied in infectious diseases, including COVID-19 caused by SARS-CoV-2. However, the aspects involved in the relationship between genetic variants and piRNAs or circRNAs expression are not fully described. The aim of this study was to characterize polymorphisms in regions encoding piRNAs to test the hypothesis that variants may affect ncRNAs expression. Additionally, we investigate the global expression profile and eQTL regulatory patterns of circRNAs, as well as their association with COVID-19 severity. We used genomic data from piRBase and 1000 Genomes Project to characterize polymorphisms in piRNA regions. Subsequently, naso-oropharyngeal swab and saliva samples were collected from 66 individuals diagnosed with COVID-19, classified as asymptomatic (11), mild (15) and severe (22), and sequencing using RNA-Seq to identify differentially expressed (DE) circRNAs. The data analysis was performed using the edgeR v.4.0.14. and CircTest R v.0.1.1 packages, considering adjusted p-values < 0.05 as statistically significant. eQTL analyses were performed to evaluate the association between variants and the circRNAs expression. All statistical analyses were conducted using the Software R Studio v.4.1.1. Our findings suggest that polymorphisms can affect the piRNA sequence structure, emphasizing that the entire piRNA sequence is crucial for target binding, allowing minimal mismatches. Experimental investigations revealed that polymorphisms in piRNAs may influence the suppression of transposons, which warrants further investigation in future studies. After testing the hypothesis that genetic variants may affect ncRNAs expression, comparative analysis of circRNA expression among the groups identified eight circRNAs DE. In silico analyses, revealed five circRNAs (hsa-NIPBL_0053, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, hsa-SETD3_0001, hsa-XPO1_0001), interacting with miRNAs. Functional enrichment analysis of the target genes regulated highlighted biological process involved in SARS-CoV-2 infection, including cellular responses to hypoxia, WNT signaling, cytokine, regulation of the immune response and cellular response to the virus. eQTL analysis further demonstrated genetic variants in the *TMPRSS13* and parental *XPO1* genes affecting genic expression. Thus, the findings of this study may help to elucidate the role of genetic and epigenetic mechanisms in the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection.

KEYWORDS: ncRNA, piRNA, circRNA, COVID-19, Polymorphism.

1 INTRODUÇÃO

Os vírus utilizam a maquinaria do hospedeiro para sua replicação e sobrevivência, resultando em perturbações na homeostase do hospedeiro, que causam alterações nos níveis de transcritos, proteínas e metabólitos, e afeta o organismo do hospedeiro, que responde através do sistema imune; e esses processos compreendem um quadro que envolve mecanismos de interação vírus-hospedeiro (AGGARWAL et al., 2021).

Recentemente, um vírus denominado *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), causador da doença *Coronavirus disease 2019* (COVID-19), se disseminou rapidamente e causou um surto mundial, declarado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como pandemia global em 11 de março de 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a, 2020b, 2020d).

Em 25 de fevereiro de 2020, o Brasil relatou seu primeiro caso de COVID-19, confirmado por meio de diagnóstico molecular, seguido de sequenciamento genético, e desde então apresentou uma rápida disseminação do SARS-CoV-2, se tornando o segundo país com maior total de mortes registradas desde o início da pandemia, com uma emergência de saúde pública nacional (JESUS et al., 2020; SOUZA et al., 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022b).

Em relação ao surgimento do vírus, inicialmente, sugeriu-se que os morcegos eram prováveis reservatórios para SARS-CoV-2 (BONI et al., 2020). Posteriormente, identificaram os pangolins como hospedeiro intermediário, que pode ter facilitado a transferência do vírus para humano, no entanto, o entendimento desse hospedeiro ainda é complexo; mas é proposto que provavelmente os morcegos podem ser o possível reservatório primário e ocorreu um evento de recombinação entre coronavírus de morcego e pangolim, que se materializou no Pangolim-malaio através do qual uma nova cepa de vírus pode ter surgido (LAM et al., 2020; SHEREEN et al., 2020; KADAM et al., 2021).

1.1 *Coronavirus disease 2019* (COVID-19)

A *Coronavirus disease 2019* (COVID-19) é uma doença causada pelo vírus *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), pertencente ao gênero *Betacoronavirus* e família *Coronaviridae* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020b, 2020c; GORBALENYA et al., 2020), que surgiu em Wuhan, na China, em dezembro de 2019, com apresentação clínica muito semelhante à pneumonia viral (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020a).

Os pacientes com infecção por SARS-CoV-2 apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas e desfechos clínicos, com evolução de quadros assintomáticos à graves; eles também podem desenvolver insuficiência respiratória aguda e Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), com falência de múltiplos órgãos que pode levar à morte (CASCELLA et al., 2022; HUANG et al., 2020; ARORA et al., 2020).

De acordo com o *National Institutes of Health* (NIH) (2022) a gravidade da doença pode ser classificada em cinco categorias: i) Infecção Assintomática ou pré-sintomática, que inclui indivíduos com teste positivo para SARS-CoV-2, mas não apresenta sintomas consistentes com COVID-19; ii) Doença leve, que abrange indivíduos com sintomas da COVID-19, como, por exemplo, febre, tosse, dor de garganta, mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, náusea, vômito, diarreia, perda de paladar e olfato, mas que não apresentam falta de ar, dispneia ou imagem torácica anormal; iii) Doença moderada, que compreende indivíduos com quadro de doença respiratória inferior e Saturação de Oxigênio medida por Oximetria de Pulso (SpO_2) $\geq 94\%$; iv) Doença grave, que inclui indivíduos que têm $SpO_2 < 94\%$, relação entre Pressão parcial Arterial de Oxigênio e Fração Inspirada de Oxigênio (PaO_2/FiO_2) < 300 mm Hg, frequência respiratória > 30 respirações/min, ou infiltrados pulmonares $> 50\%$; iv) Doença crítica, que considera indivíduos com insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos, e podem desenvolver a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), que tende a ocorrer aproximadamente uma semana após o início dos sintomas.

A COVID-19 pode ser considerada uma doença viral sistêmica, que causa vários sintomas devido o seu envolvimento em vários órgãos (CASCELLA et al., 2020). De forma geral, os principais sintomas clínicos dos pacientes com COVID-19 são: febre, tosse, mialgia ou fadiga, expectoração e dispneia; os sintomas menos comuns são: dor de cabeça ou tontura, diarreia, náuseas e vômito (LI et al., 2020; ALIMOHAMADI et al., 2020; HUANG et al., 2020; CHEN et al., 2020; WANG et al., 2020) com provável associação entre tempestade de citocinas e a gravidade doença, levando a um processo inflamatório que causa lesão pulmonar (HUANG et al., 2020).

No início da pandemia verificou-se que pacientes com idade avançada e comorbidades como asma, obesidade, diabetes *mellitus*, doença pulmonar crônica, doença cardiovascular, doença renal crônica, doença hepática crônica, infecção por Síndrome da Imunodeficiência Humana (HIV), gravidez, tabagismo, condições neoplásicas e pessoas em tratamento com terapia imunossupressora apresentaram um maior risco de desenvolver COVID-19 grave e suas complicações associadas (CASCELLA et al., 2022; HARRISON et al., 2020; NATIONAL

INSTITUTES OF HEALTH, 2022; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022).

O vírus pode ser transmitido de humano para humano por meio de contato próximo com pessoas infectadas, através de gotículas, aerossóis e fômites (WANG; DU, 2020). Mutações virais e recombinação deram origem a novas cepas do vírus, que podem apresentar diferentes taxas de reprodução ou infectividade e assim afetar o curso e a gravidade da doença (GASPERSIC; DOLZAN, 2022). Atualmente já foram descritas mais de 1890 variantes em todo o mundo, das quais destacam-se as *Variant of concern* (VOC) (PARUMS, 2021). As VOCs já identificadas até o momento são: B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), P.1(Gamma), B.1.617.2 (Delta) e B.1.1.529 (Ômicron) (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022a), e são caracterizadas por possuírem mutações que permitem a rápida disseminação do vírus e aumentam sua resistência aos tratamentos (WALENSKY; WALKE; FAUCI, 2021; KANNAN; ALI; SHEEZA, 2021; RAMBAUT et al., 2020; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022a).

Essas mutações no genoma do SARS-CoV-2, presentes em sequências da proteína *Spike* (S) e outras proteínas do vírus (GURUPRASAD, 2021), podem afetar o diagnóstico molecular, Wang e colaboradores (2020b) encontraram inúmeras mutações nos alvos de diagnóstico COVID-19 comumente usados em todo o mundo, incluindo aqueles designados pelo Centers for Disease Control (CDC) dos EUA (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022a), e essas mutações podem afetar a sensibilidade do diagnóstico e devem ser consideradas na vigilância epidemiológica da COVID-19.

1.1.1 Epidemiologia da COVID-19

A partir dos dados epidemiológicos mundiais de saúde do relatório anual da OMS (2022), que mostram uma análise da evolução epidemiológica da pandemia nos últimos dois anos, incluindo o impacto do excesso de mortalidade, juntamente com um resumo dos problemas nos serviços de saúde em todo o mundo, observa-se que mesmo dois anos após ter sido declarada emergência de saúde pública de interesse internacional pela OMS, a COVID-19 continua a ser uma ameaça global à saúde, isso porque apesar do rápido desenvolvimento de vacina, a sua distribuição ocorre de forma desigual em concomitante com o surgimento de VOCs do SARS-CoV-2 (WORLD HEALTH STATISTICS, 2022). Além disso, atualmente ela ainda representa a quarta principal causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024a)

As variantes Alfa e Beta surgiram em dezembro de 2020 e foram seguidas pela variante Gamma em janeiro de 2021 e a variante Delta em Abril de 2021. Em novembro de 2021, a Ômicron, uma variante mais transmissível, capaz de escapar parcialmente da imunidade no trato respiratório superior, foi identificada e rapidamente se tornou a variante dominante em todo o mundo, mas com características menos severas que a Delta, apesar da sua maior transmissibilidade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022; NEXTRAIN/GISAID, 2022; WORLD HEALTH STATISTICS, 2022).

De acordo com os dados epidemiológicos da OMS, até Novembro de 2024, a infecção por SARS-CoV-2 foi responsável por mais de 615 milhões de casos confirmados e causou a morte de mais de 7 milhões de pessoas no mundo todo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024b) (Figura 1).

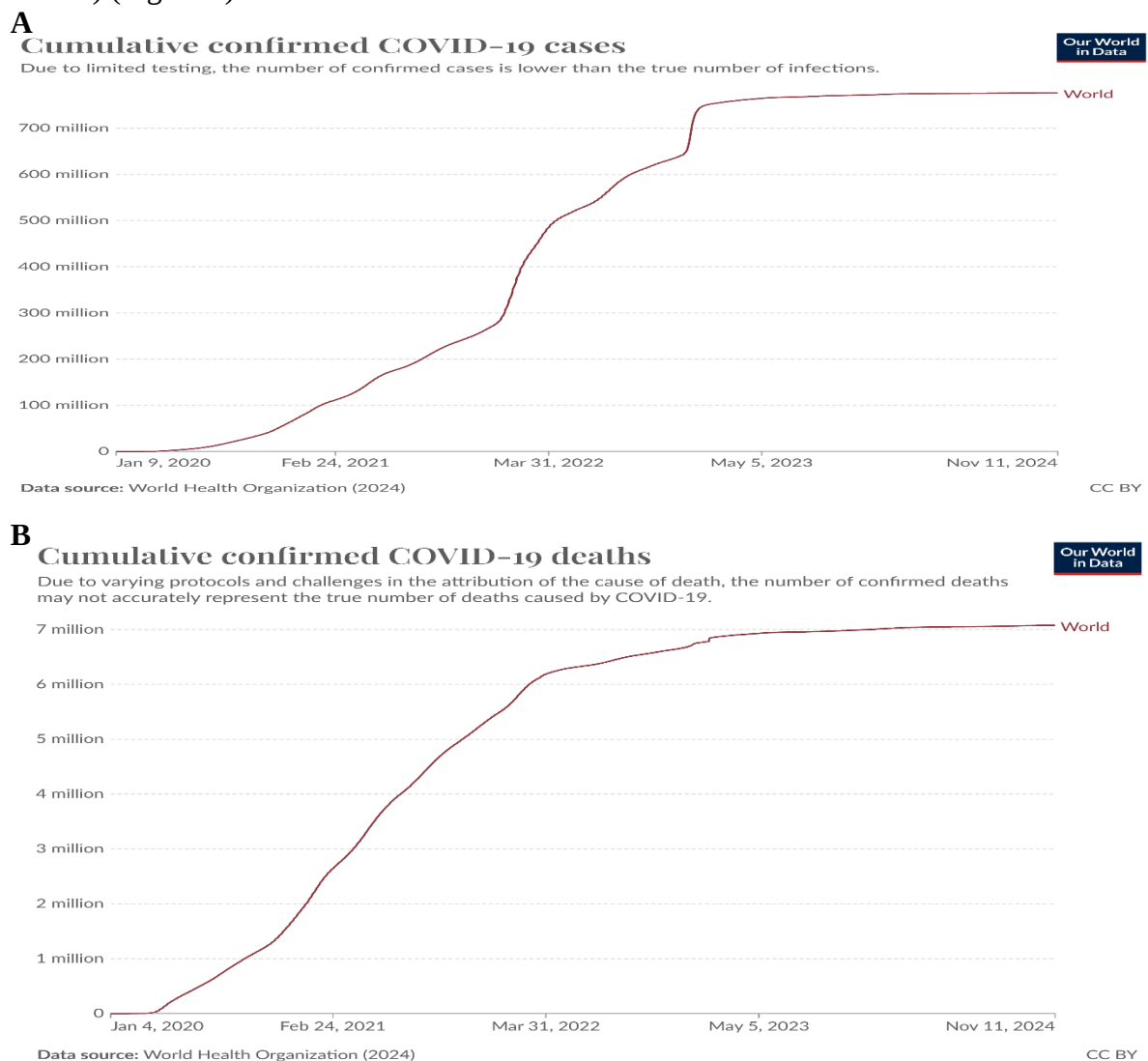
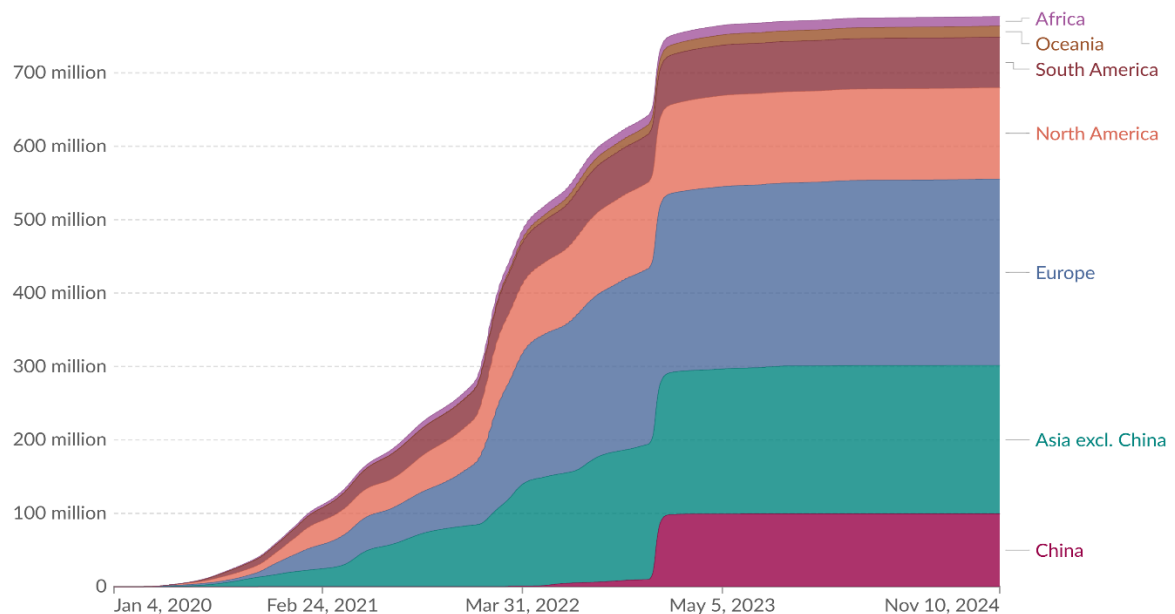


Figura 1. Representação gráfica da evolução da COVID-19 no mundo do número cumulativo de casos (a) e número cumulativo de mortes (b) por COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).

As regiões da OMS mais afetadas foram a Região das Américas e a Região do Sudeste Asiático, com declínios de cerca de 3 anos na expectativa de vida (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024a) (Figura 2).

Cumulative confirmed COVID-19 cases by world region

7-day rolling average. Due to limited testing, the number of confirmed cases is lower than the true number of infections.



Data source: World Health Organization (2024)

OurWorldinData.org/coronavirus | CC BY

Figura 2. Evolução da COVID-19 no mundo, por regiões: número cumulativo de casos confirmados com COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).

Até novembro de 2024, o Brasil reportou 37, 51 milhões de casos acumulados e 702.616 mortes registradas desde o início da pandemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024b) (Figura 3).

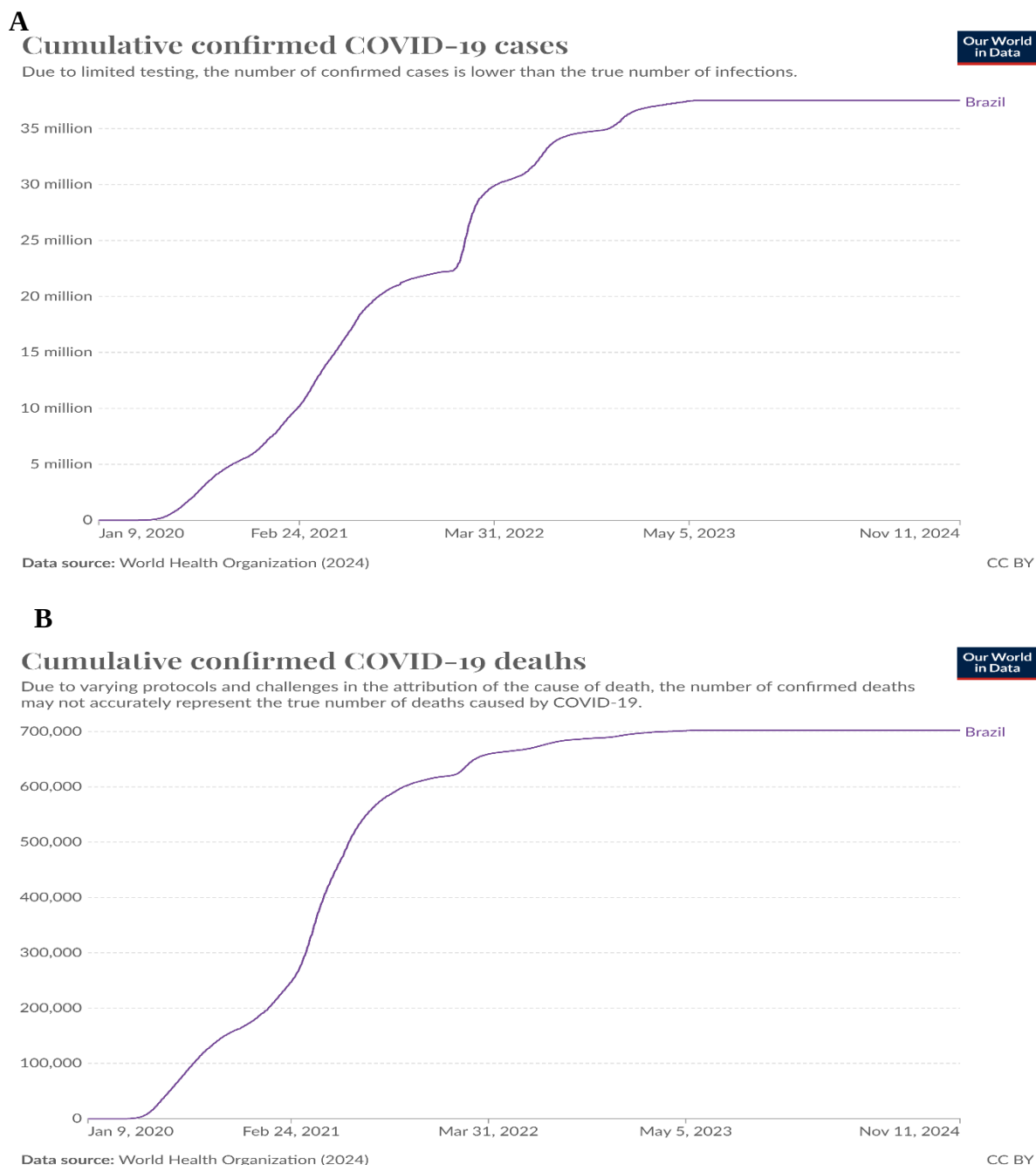


Figura 3. Representação gráfica da evolução da COVID-19 no Brasil do número cumulativo de casos (a) e mortes (b) por COVID-19 (Adaptado de OurWorldInData/JHU CSSE COVID-19 Data, 2024).

Na primeira semana de 2022, entre as regiões, a região Norte apresentou a maior taxa de mortalidade (0,6 óbito/100 mil hab.), seguido pelo Centro-Oeste (0,5 óbito/100 mil hab.), Nordeste (0,4 óbito/100 mil hab.), Sudeste (0,3 óbito/100 mil hab.) e Sul (0,3 óbito/100 mil hab.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Entre os estados da região norte, Tocantins se destacou com a maior incidência (200,5 casos/100 mil hab.), e o Pará apresentou a segunda maior taxa de mortalidade da região Norte (0,8 óbito/100 mil hab.), no início do ano de 2022 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022)

Atualmente, de acordo com os dados do Ministério da Saúde (2024), no decorrer das semanas epidemiológicas do ano de 2020 até abril de 2024, os casos e óbitos novos relacionados à COVID-19 se mostraram heterogêneos entre as diferentes regiões do Brasil.

Globalmente, em 2024, a última Atualização Epidemiológica Semanal da COVID-19 da OMS (16 de setembro – 13 de Outubro), mostrou que nessa semana, o maior número de admissões em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) foram relatados no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024b). Reforçando, que o Brasil, apesar de apresentar uma queda na taxa de mortalidade, mundialmente ainda se destaca com o impacto deixado pela pandemia.

No dia 5 de maio de 2023, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) da COVID-19, justificado pela redução das hospitalizações e das internações em unidades de terapia intensiva resultantes da doença, bem como os altos níveis de imunidade da população. Porém, o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional não significa, contudo, que a COVID-19 tenha deixado de ser uma ameaça à saúde, principalmente para aqueles com maior risco de desenvolvimento de doença grave, tendo em vista que o vírus continua em circulação no Brasil e no mundo e há risco de surgimento de novas *Variant of concern* (VOC) ou *Variant of interest* (VOI) do SARS-CoV-2 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Em vista disso, o Ministério da Saúde enfatiza que as ações de vigilância epidemiológica, laboratorial, genômica e de imunização estabelecidas no Brasil devem ser continuadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2024).

Diante desses dados, observa-se que apesar da ampla vacinação e o fim da Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional da COVID-19 ainda se faz necessário investigar diferentes aspectos do vírus, incluindo as características genômicas. Historicamente, as pesquisas têm se concentrado na detecção, contenção, tratamento e análise de vírus que são patogênicos para humanos, com pouca ênfase para as características biológicas do vírus (GORBALENYA et al., 2020). Nesse contexto, apesar de haver muitos dados epidemiológicos sobre a infecção por SARS-CoV-2, o conhecimento sobre sua fisiopatologia não está bem estabelecido (ARORA et al., 2020; ZHANG et al., 2022c).

Dessa forma, é essencial analisar as características fisiopatológicas do vírus, para monitorar sua futura adaptação ao hospedeiro, evolução viral, infectividade, transmissibilidade e patogenicidade (HUANG et al., 2020).

1.1.2 Aspectos Biológicos do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA, de sentido positivo, envelopado (ASKARI; HADIZADEH; RASHIDIFAR, 2022; WU et al., 2020), o seu genoma possui um comprimento entre 26 e 32 Kb, e apresenta 11 ORFs: ORF1a, ORF1b, ORF2 (proteína *Spike*), ORF3a, ORF4 (proteína de envelope), ORF5 (proteína de membrana), ORF6, ORF7ab, ORF8, ORF9 (proteína do nucleocapsídeo) e ORF10. O gene *orf1ab* localizado na extremidade 5' do genoma, codifica uma poliproteína, que compreende 16 proteínas não estruturais (NSP1-NSP16). A extremidade 3' do genoma codifica quatro proteínas estruturais: glicoproteína de superfície *Spike* (S), proteína do Envelope (E), proteína da Membrana (M), proteína do Nucleocapsídeo (N), e o restante das ORFs produzem proteínas acessórias (WU et al., 2020; YOSHIMOTO, 2020) (Figura 4). O complexo NSP1-NSP16 está envolvido na replicação e transcrição do RNA viral e modulação da resposta imune; as proteínas E e M são essenciais na montagem viral, e a proteína N é necessária para a síntese do RNA viral; já a proteína S é encontrada na superfície da partícula viral e auxilia na entrada do vírus na célula hospedeira (AGGARWAL et al., 2021).

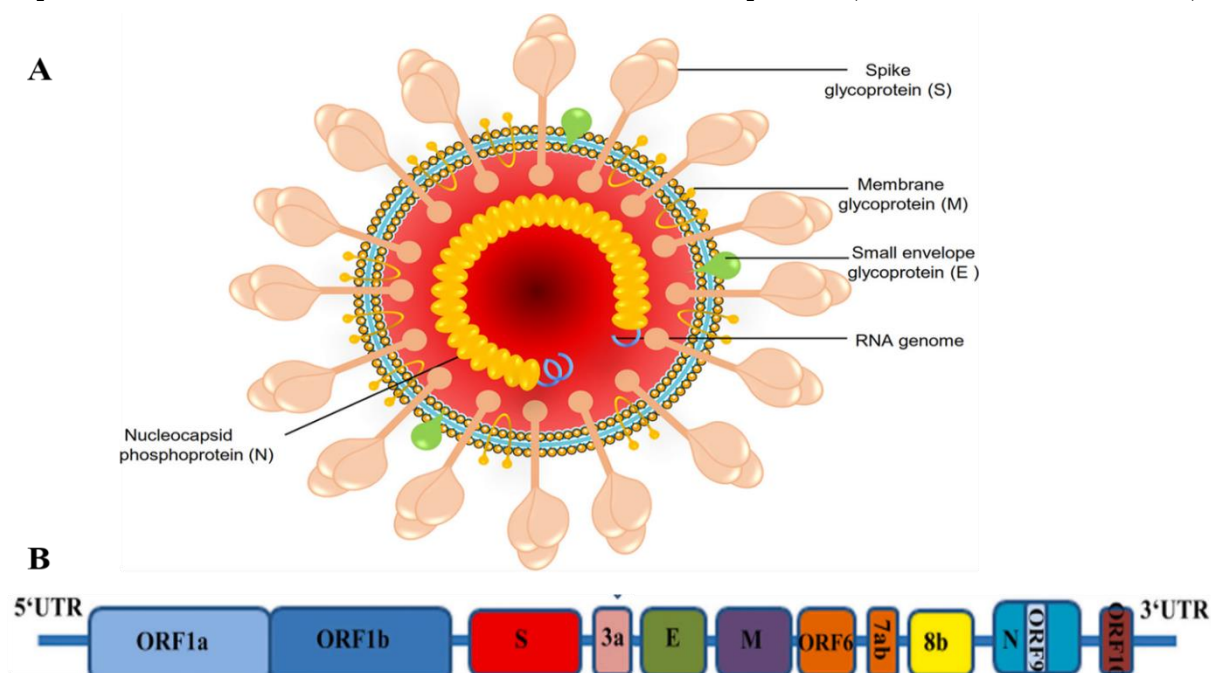


Figura 4. Estruturas virais (a) e estrutura genômica (b) do SARS-CoV-2. (Adaptado de Aggarwal et al., 2021 e Askari et al., 2020).

O SARS-CoV-2 entra no corpo humano por via nasal-oral e induz a resposta inata, que produz interferons (IFNs), em contrapartida, o IFN ativa a expressão da proteína Enzima

Conversora da Angiotensina 2 (*ACE2*), um receptor que é reconhecido pelo Domínio de Ligação ao Receptor (RBD) da região S1 da proteína S (KADAM et al., 2021). Essa interação, em associação com proteases do hospedeiro leva à clivagem proteolítica pela pré-ativação da pró-proteína convertase Furina no sítio S1/S2, que reforça a entrada do vírus na célula, e principalmente pela Serina Protease 2 Transmembrana (*TMPRSS2*) no sítio S2, que induz a fusão da membrana plasmática e ativa a entrada do SARS-CoV-2 S na célula, levando à infecção bem-sucedida das células hospedeiras (AGGARWAL et al., 2021; BESTLE et al., 2020; DJOMKAM et al., 2020; HOFFMANN et al., 2020; SHANG et al., 2020; ZIEGLER et al., 2020).

Após a entrada na célula, por endocitose, dentro do endossomo o envelope viral é degradado e o RNA liberado para o citoplasma, com a sequente tradução da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que auxilia na transcrição de uma fita negativa de RNA, que serve como molde para a replicação do RNA viral (GASPERSIC; DOLZAN, 2022). De forma geral, o RNA genômico viral de fita simples é traduzido para produzir polipeptídeos virais, que codificam o Complexo de Replicação-Transcrição (RTC) que continuamente replica e produz vários RNAs mensageiros subgenômicos, que codificam as proteínas acessórias e estruturais (KADAM et al., 2021). As proteínas sofrem modificações e são envolvidas em torno da proteína N, ligada ao RNA viral, sendo montados para formar as partículas virais; posteriormente a vesícula contendo o vírus se funde com a membrana plasmática do hospedeiro e as partículas virais são exocitadas da célula (Figura 5) (KADAM et al., 2021; GASPERSIC; DOLZAN, 2022).

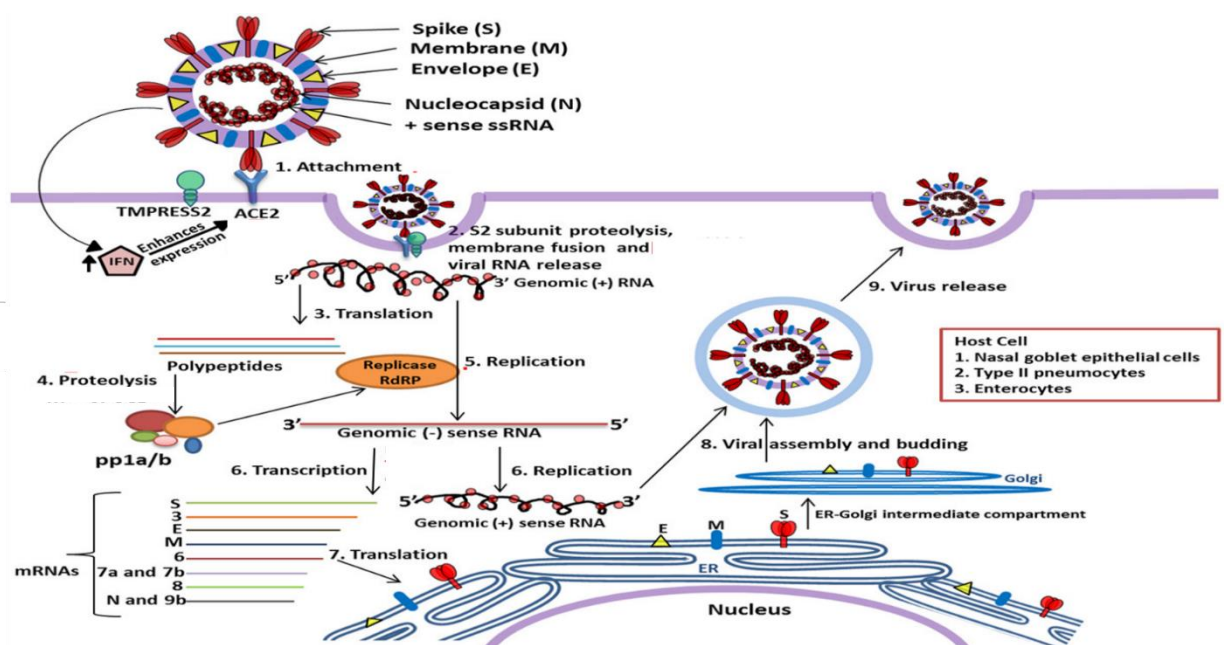


Figura 5. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2 (Adaptado de KADAM et al., 2021).

O SARS-CoV-2 foi detectado em diferentes órgãos, e ao entrar nas células epiteliais alveolares, se replica rapidamente e desencadeia uma resposta inflamatória e imunológica, resultando na síndrome de tempestade de citocinas (HADJADJ et al., 2020; LIU et al., 2021a; MEHTA et al., 2020).

Uma metanálise sugeriu que quatro vias principais podem ser afetadas durante a infecção por SARS-CoV-2, sendo elas: o sistema imunológico, sinalização de Receptor de Células T (TCR), sinalização de Receptor de Células B e sinalização por interleucinas (AGGARWAL et al., 2021).

1.1.3 Aspectos Imunológicos do Hospedeiro

O sistema imunológico é responsável pela defesa contra a invasão de diferentes patógenos e pela manutenção da homeostase (CHEN et al., 2019). Durante uma infecção o sistema imune reage de duas formas: pela resposta imune inata e a resposta imune adaptativa (AGGARWAL et al., 2021).

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro, que atua de forma inespecífica, e além de agir contra patógenos invasores, também auxilia no desencadeamento da resposta imune adaptativa, obtida somente após um contato inicial com o patógeno ou seus componentes, por meio de infecção ou exposição a vacinas; a imunidade adaptativa confere proteção específica do patógeno ao hospedeiro e pode ser uma resposta imune celular, mediada por células T, ou uma resposta imune humoral, que é regulada por células B ativadas e anticorpos (AGGARWAL et al., 2021).

Dados da literatura sugerem que respostas imunes inatas e adaptativas são desencadeadas em reação à infecção por SARS-CoV-2, e que esse vírus possui capacidade para inibir a resposta imune (afetando a arquitetura e função das células imunes) e evadir do sistema imune (STUKALOV et al., 2021; CAI et al., 2021).

De maneira geral, as respostas imunológicas do hospedeiro à infecção por SARS-CoV-2 incluem ativação do sistema complemento (SHEN et al., 2020; MESSNER et al., 2020) e ativação da via de inflamação da imunidade inata induzida por interleucinas (MESSNER et al., 2020; AGGARWAL et al., 2021). Análises *in vitro* também sugeriram a ativação das vias de TGF β e EGFR (envolvidas na imunidade inata) pelo SARS-CoV-2 (STUKALOV et al., 2021; AGGARWAL et al., 2021).

Em pacientes graves, o SARS-CoV-2 causa uma exacerbada desregulação da respostas imune com secreção excessiva de citocinas inflamatórias, aumentos dos níveis de IL-6 e IL-8, e desequilíbrios na proporção de células T (NOROOZI et al., 2020; LI et al., 2021). A expressão de moléculas de superfície das células T, de subunidades do receptor de células T (TCR) e

moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) estava regulada negativamente em pacientes com sintomas graves em comparação aos casos leves, com consequente redução da população e atividade de células T (LI et al., 2021; SCHULTHEISS et al., 2020). A baixa população de células B também foi um padrão associado a um quadro clínico mais grave da doença (SCHULTHEISS et al., 2020).

A infecção pelos SARS-CoV-2 desencadeia vários mecanismos dependentes da interação vírus-hospedeiro, em que a replicação viral influencia os fatores de transcrição que podem afetar a expressão de diferentes genes do hospedeiro, e induzir à replicação viral e em contrapartida, o hospedeiro, através de mecanismos de defesa, ativa fatores para impedir a replicação do vírus (GASPERSIC; DOLZAN, 2022).

Fatores genéticos e epigenéticos associados à defesa do hospedeiro e sistema imunológico podem ter efeitos significativos na interação vírus-hospedeiro durante a infecção por SARS-CoV-2 (GASPERSIC; DOLZAN, 2022; SERPELONI et al., 2021).

A variabilidade genética do hospedeiro desempenha um papel importante na progressão do COVID-19, variantes nos genes *ACE2* e *TMPRSS2* foram associadas com a suscetibilidade ou resistência genética à COVID-19 (SERPELONI et al., 2021; YAMAMOTO et al., 2020).

A regulação da expressão gênica por RNAs não codificantes (ncRNAs) também é essencial para o controle do sistema imune em resposta à infecção por SARS-CoV-2 (SERPELONI et al., 2021). Análises de transcriptoma indicaram que os RNA longo não codificante (lncRNAs) podem estar envolvidos com a regulação de genes da resposta imune (CARPENTER et al., 2013), desenvolvimento de células imunes e participar de vias de resposta a patógenos, regulando as funções imunológicas (CHEN; SATPATHY; CHANG, 2017; LIU et al., 2020). Na COVID-19 eles foram identificados associados com a infecção viral, regulação da resposta imune inata, vias inflamatórias, do ciclo celular e apoptose (SERPELONI et al., 2021; WU et al., 2021b)(SERPELONI et al., 2021; WU et al., 2021).

Dentro da classe de lncRNAs, mas com a compreensão de aspectos da resposta imune ainda limitados, os circRNAs já foram associados com processos relacionados à regulação do sistema imune; por estímulo de infecção viral, eles podem interagir com a proteína quinase (PKR) e serem degradados para ativação dessa proteína na resposta imune (LIU et al., 2019a). Além disso, análises de expressão diferencial de circRNAs em células infectadas por SARS-CoV-2 sugeriram que os genes parentais dos circRNAs estavam envolvidos nas respostas imune e inflamatória (YANG et al., 2021).

1.2 ALTERAÇÕES GENÉTICAS E EPIGENÉTICAS NA COVID-19

O desenvolvimento da COVID-19 pode ser determinado pela interação entre fatores ambientais, genéticos e epigenéticos (SERPELONI et al., 2021). Entre os aspectos ambientais destaca-se os fatores de risco que influenciam na gravidade da doença, como tabagismo, obesidade e presença de comorbidades (SERPELONI et al., 2021; YAMAMOTO et al., 2021).

A Análise de fatores genéticos permite avaliar a predisposição genética para infecção viral ou progressão da doença, polimorfismos do tipo Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP) ou Inserção-Deleção (INDEL) podem ser usados como biomarcadores para detectar e prever a gravidade ou a condição de risco de vida durante a infecção da COVID-19 (GASPERSIC; DOLZAN, 2022; SERPELONI et al., 2021; ELLINGHAUS et al., 2020).

Mecanismos epigenéticos como regulação por RNAs não codificantes (ncRNAs) e metilação do DNA também pode estar envolvidos na infecção pelo SARS-CoV (SAKSENA; BONAM; MIRANDA-SAKSENA, 2021; AYDEMIR et al., 2021; YANG et al., 2021b). A demetilação dos genes sincitina 1 e 2 pelo SARS-CoV-2, para aumento da transcrição gênica foi descrita (SAKSENA; BONAM; MIRANDA-SAKSENA, 2021), também observou-se alterações nos níveis de metilação de *ACE2* e *TNF* em associação com a gravidade da doença (MOURA et al., 2021). Ainda, foram preditos diversos miRNAs codificados pelo genoma do SARS-CoV-2, que estão associados processos celulares importantes e auxiliam na regulação gênica durante a infecção por SARS-CoV-2 (AYDEMIR et al., 2021).

Além disso, a importância dos piRNAs para atividade antiviral de SARS-CoV-2 já foi relatada (YU et al., 2020a); e a expressão diferencial de circRNAs também foi associada à gravidade da COVID-19 (YANG et al., 2021).

Nessa perspectiva, considerando que o conhecimento de fatores genéticos e epigenéticos podem ajudar na compreensão da infecção pelo SARS-CoV-2, observa-se que é necessário, primeiro compreender os aspectos genéticos e epigenéticos da interação vírus-hospedeiro para posteriormente direcionar as melhores alternativas de rastreamento da doença e tratamento dos pacientes.

1.2.1 Alterações genéticas

Entre as alterações genéticas relacionadas com a infecção por SARS-CoV-2, uma combinação de polimorfismos genéticos como SNPs e INDELs podem estar envolvidos no estabelecimento da gravidade da COVID-19 (SERPELONI et al., 2021; YAMAMOTO et al., 2021).

1.2.1.1 Polimorfismos Genéticos Associados com a COVID-19

Diversos estudos investigaram a associação de polimorfismos com a COVID-19, Hou e colegas (2020), sugeriram que genes que interagem diretamente com a proteína *Spike* (*ACE2* e *TMPRSS2*) estavam associados com a suscetibilidade genética à COVID-19, e podem influenciar a entrada do vírus na célula (BREST et al., 2020; GASPERSIC; DOLZAN, 2022). Também foram identificadas variantes envolvidas no metabolismo da vitamina D associadas à gravidade da doença (AL-ANOUTI et al., 2021). Em outra análise, verificou-se que polimorfismos em genes de receptores Toll-like atenuam a resposta da imunidade inata, e foram associados à gravidade, mortalidade e tempestade de citocinas na COVID-19 (TAHA et al., 2021), outros polimorfismos em genes envolvidos com a resposta do sistema imune também foram descritos (DELANGHE; BUYZERE; SPEECKAERT, 2021; NIA et al., 2022).

O conjunto de estudos de polimorfismos apontam que estes podem regular a expressão do receptor ACE2 e de proteases que controlam o processo de liberação do SARS-CoV-2 (BREST et al., 2020; CAO et al., 2020; WANG et al., 2020b). Além disso foi constatada a associação entre polimorfismos genéticos e suscetibilidade ou proteção à gravidade SARS-CoV-2, mostrando que a infecção viral pode ser influenciada pela variabilidade genética do hospedeiro durante todas as fases, desde a entrada e transcrição até o estágio final da replicação viral (GASPERSIC et al., 2022).

As alterações induzidas pelo SNP podem afetar as sequências de ligação do fator de transcrição, a eficiência da tradução e sequências de moléculas regulatórias como lncRNAs, afetar a sua função, e assim causar doença. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais essas variações genéticas dentro de regiões de RNAs não codificantes afetam sua função ainda precisam ser revelados (MIRZA et al., 2014).

Foram descritos vários SNPs em UTRs que alteram o conjunto estrutural de mRNA dos genes associados (HALVORSEN et al., 2010). Resultados de análises de variantes de risco genético localizadas em regiões não codificantes sugerem que esses polimorfismos podem desempenhar papéis reguladores e possivelmente alterar a função de lncRNAs, modulando sua expressão e estrutura espacial que, por sua vez, podem afetar a expressão de outros genes (MIRZA et al., 2014).

Estudos de associação com Expression Quantitative Trait Loci (eQTL) fornecem informações sobre fatores genéticos associados com a variação da expressão gênica, análise com células linfoblastóides mostraram relação entre a variação da sequência no genoma e a expressão de circRNA (AHMED et al., 2019). A investigação desses mecanismos pode

favorecer o entendimento dos papéis funcionais dos circRNAs e polimorfismos no contexto de doenças infecciosas.

1.2.2 Modificações Epigenéticas

Modificações epigenéticas são alterações mitoticamente ou meioticamente herdadas, que promovem a variação da expressão genética, sem mudanças na sequência de DNA (SHARMA; KELLY; JONES, 2009). Mecanismos epigenéticos como metilação do DNA e regulação por ncRNAs, particularmente circRNAs foram associados com a infecção por SARS-CoV-2 (GASPERSIC; DOLZAN, 2022; SERPELONI et al., 2021; YANG et al., 2021).

1.3 RNAs NÃO CODIFICANTES

O *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE), um grande projeto de consórcio com o objetivo de identificar e caracterizar todos os elementos funcionais no genoma humano, catalogou um grande conjunto de RNAs (EDDY, 2013). Djebali e colegas, em 2012, relataram a identificação e caracterização de RNAs anotados no projeto ENCODE e redefiniram o conceito de gene, ampliando o conceito para um termo que abrange todos os transcritos funcionais (mRNAs codificantes e RNAs não codificantes), independente da sua localização genômica, que contribuem para uma determinada característica fenotípica.

1.3.1 Classificação de RNAs não codificantes

Os RNAs não codificantes (ncRNAs), portanto, funcionais, podem ser classificados em duas classes, baseado no seu tamanho: RNA pequeno não codificante (sncRNA), com menos de 200 nucleotídeos, e RNA longo não codificante (lncRNA), com mais de 200 nucleotídeos (WANG et al., 2017; BHATTI et al., 2021).

sncRNAs tem sido amplamente investigados, principalmente miRNAs; os piRNAs, apesar de pouco investigado, já demonstrou ter um importante papel na defesa viral (LI et al., 2020; DONYAVI et al., 2021; WANG et al., 2017; YU et al., 2020a)

Muitos lncRNAs exibem diversas funções na transcrição de genes e regulação de proteínas (CHEN; SATPATHY; CHANG, 2017). O RNA longo não codificante (lncRNA) pode ser categorizado como: antisense, intrônico, intergênico, divergente e *enhancer* (KNOLL; LODISH; SUN, 2015). Mas outras classificações são permitidas, dentre essas, pode-se destacar os RNAs circulares (circRNAs), que possuem suas extremidades 5' e 3' ligadas covalentemente, gerados a partir de seus genes parentais por um processo denominado de *backsplicing* (SALZMAN et al., 2012; LASDA; PARKER, 2014; LIANG; WILUSZ, 2014).

1.3.2 Regulação por RNAs não codificantes

Estudos apontaram o papel de RNAs não codificantes (ncRNAs) na regulação dos processos presentes na interação vírus-hospedeiro, eles estão envolvidos em mecanismos genéticos e epigenéticos, associados à vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e infecciosas como Dengue, Hepatite C, Enterovírus, HIV, SARS-CoV e SARS-CoV-2 (LIU et al., 2016; LUNA et al., 2015; ZHENG et al., 2013; LAI et al., 2014; FULZELE et al., 2020; BHATTI et al., 2021).

Ao longo dos últimos anos as pesquisas sugeriram o papel dos RNAs não codificantes na regulação da interação entre as interações vírus-hospedeiro, do sistema imune, e na resposta antiviral (BHATTI et al., 2021).

Entre os sncRNAs, os miRNAs foram identificados diferencialmente expressos (DE) e apontados como biomarcadores e possíveis alvos terapêuticos na COVID-19, com atuação na regulação da resposta imunes e replicação viral durante a infecção viral (LI et al., 2020a; BAUTISTA-BECERRIL et al., 2021; DONYAVI et al., 2021). Também foram preditos miRNAs em genomas SARS-CoV-2 relacionados com respostas do hospedeiro e patogenicidade do vírus (ARISAN et al., 2020). Assim como na maioria da doenças infecciosas, na investigação da COVID-19, os estudos são principalmente voltados para a regulação por miRNAs (BHATTI et al., 2021; FULZELE et al., 2020; DEMIRCI; ADAN, 2020). Em relação aos piRNAs, Yu e colaboradores (2020) identificaram sequências de piRNAs que poderiam ter como alvo o genoma de RNA do SARS-CoV-2, com potencial antiviral.

Os lncRNAs podem atuar através de interações com DNA ou RNA por meio de pareamento de base de ácido nucleico, ou com proteínas, nesse contexto, circRNAs interagem com miRNA, RBPs e enzimas como RNA polimerase para modular a expressão gênica (CHEN; SATPATHY; CHANG, 2017; ASHWAL-FLUSS et al., 2014; LI et al., 2015).

A aplicação de estudos com ncRNAs no manejo e controle de doenças tem recebido maior atenção nas estratégias de terapias, sendo apresentados promissores como biomarcadores e agentes terapêuticos na COVID-19 (ASKARI; HADIZADEH; RASHIDIFAR, 2022), pois como observado em estudos com piRNAs e circRNAs, eles podem desempenhar um papel importante através da influência em processos celulares e atuação no controle da regulação da expressão gênica na infecção por SARS-CoV-2 (YANG et al., 2021b; YU et al., 2020). (YU et al., 2020^a; YANG et al., 2021).

1.4 piRNA

1.4.1 piRNA: Conceito e Histórico

A classe de piRNAs é definida como pequeno RNA não codificante (sncRNA), codificado a partir de várias regiões genômicas, intergênicas, íntrons, pseudogenes e éxons, além de derivarem de lncRNAs (CHIRN et al., 2015; SINGH et al., 2018; WATANABE; LIN, 2014; WENG et al., 2018).

Os piRNAs foram descobertos em 2006, através de estudos em camundongos (ARAVIN et al., 2006), incluindo estudos que avaliavam o seu papel na gametogênese em mamíferos (GIRARD et al., 2006; GRIVNA et al., 2006). Entretanto, piRNAs incluem uma classe descoberta anteriormente em estudos em *Drosophila melanogaster*, denominada de *Repeat-Associated RNA* (rasiRNAs) (ROSS; WEINER; LIN, 2014; ARAVIN et al., 2003).

Em relação à sua estrutura, os piRNAs são sncRNAs de cadeia simples, com um tamanho maior que as sequências de miRNA, de 21-35 nucleotídeos, que interagem com proteínas da família PIWI, têm preferência por uma uracila na extremidade 5' (U 5') e possuem um açúcar que é 2'-O- metilado na sua extremidade 3' (ARAVIN et al., 2006; SAITO et al., 2007; OZATA et al., 2019).

Esses sncRNAs interagem com proteínas argonauta da subfamília PIWI e formam a via piRNA – PIWI. Nessa via os precursores de piRNAs são transcritos de seus *clusters*, clivados por proteínas PIWI para produzir piRNA maduro e formar o Complexo Silenciador Induzido por piRNA (piRISC) (ROSS; WEINER; LIN, 2014; SIOMI et al., 2011; HAN; ZAMORE, 2014; ROMANO et al., 2017).

Após a formação do complexo piRISC, os piRNAs migram de volta para o núcleo, onde podem reconhecer e silenciar a transcrição de Elementos Transponíveis/transposons (ETs), mantendo a integridade do genoma (SIOMI et al, 2011; HAN; ZAMORE, 2014; ROMANO et al., 2017). Eles também podem induzir a repressão de RNA mensageiros, via emparelhamento de bases imperfeito entre os piRNAs e mRNAs alvo, por um mecanismo que se assemelha aos miRNAs, porém com mais extensa complementariedade de sequência (GOU et al., 2014; SINGH et al., 2018; SIOMI et al, 2011).

1.4.2 piRNA: Biogênese

O mecanismo da biogênese é descrito em linhagens germinativas de organismos como a *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Mus musculus* (WEICK; MISKA, 2014). Destes, os mecanismos mais similares ao dos humanos são os da *Drosophila* e o do camundongo (SANDOVAL, 2017). A via de biogênese do piRNA é um sistema que silencia

os transposons ativos com sequências complementares aos transcritos do *cluster* de piRNA (HAN; ZAMORE, 2014).

1.4.2.2 Biogênese Primária e Secundária

Embora não esteja totalmente claro como os precursores são processados em piRNAs maduros, dois mecanismos foram caracterizados: (1) *via/biogênese primária* e (2) *amplificação/ciclo de “ping pong” ou via/biogênese secundária* (ROMANO et al., 2017) (ROMANO et al., 2017; CABRAL et al., 2020). Primeiro, a biogênese primária do piRNA fornece um conjunto inicial de piRNAs primários, que visam múltiplos ETs. Segundo, piRNAs primários entram na via secundária, molda ainda a população de piRNA, para gerar piRNAs secundários, amplificando sequências que visam transposons ativos (SIOMI et al., 2011; FU; WANG, 2014).

a) Via Primária

Na via primária da biogênese do piRNA, precursores de piRNA longos são transcritos pela RNA Polimerase II (Pol II) de *locus* genômicos específicos denominados de *clusters* de piRNA, clivados e modificados no citoplasma, e então transportados para o núcleo em complexo com PIWI, e processados em sequências menores (piRNAs maduros) por complexos proteicos desconhecidos de maneira ainda não clara e independente de Dicer (MALONE et al., 2009; WEICK; MISKA, 2014).

Para o mecanismo da via primária de piRNA algumas proteínas mitocondriais são essenciais, ZUC, MINO, GASZ e ARMI, respectivamente mitoPLD, GPAT1/2, GASZ e MOV10L1 em camundongos (ROMANO et al., 2017). Os precursores do piRNA de cadeia simples são exportados do núcleo. No citoplasma, os precursores são processados em piRNAs maduros, sendo clivados por uma provável endonuclease denominada ZUC para gerar sua extremidade 5'. A endonuclease ZUC é necessária para a maturação do piRNA e para a localização nuclear de PIWI. Depois são transportados pela PIWI para o corpo Yb perinuclear, uma estrutura citoplasmática específica de ovário com o nome da proteína Yb, em um processo que depende das helicases ARMI e VRETENO, contendo o domínio TUDOR, além desse complexo de proteínas, essenciais para a estabilidade de PIWI; estudos demonstraram que o carregamento realizado por essa proteína, depende da atividade de HSP90. Posteriormente, os piRNAs são clivados no comprimento apropriado por uma exonuclease desconhecida. Os piRNAs maduros são então 2'-O-metilados por uma metiltransferase conservada, HEN1 ou PIMET (HENMT1 em camundongos). Finalmente, em uma etapa não caracterizada, o complexo piRNA-PIWI é importado para o núcleo para exercer sua função reguladora

(Figura 6) (OLIVIERI et al., 2010; ROSS; WEINER; LIN, 2014; KIRINO; MOURELATOS, 2007; SAITO et al., 2010; IZUMI et al., 2013; OZATA et al., 2019).

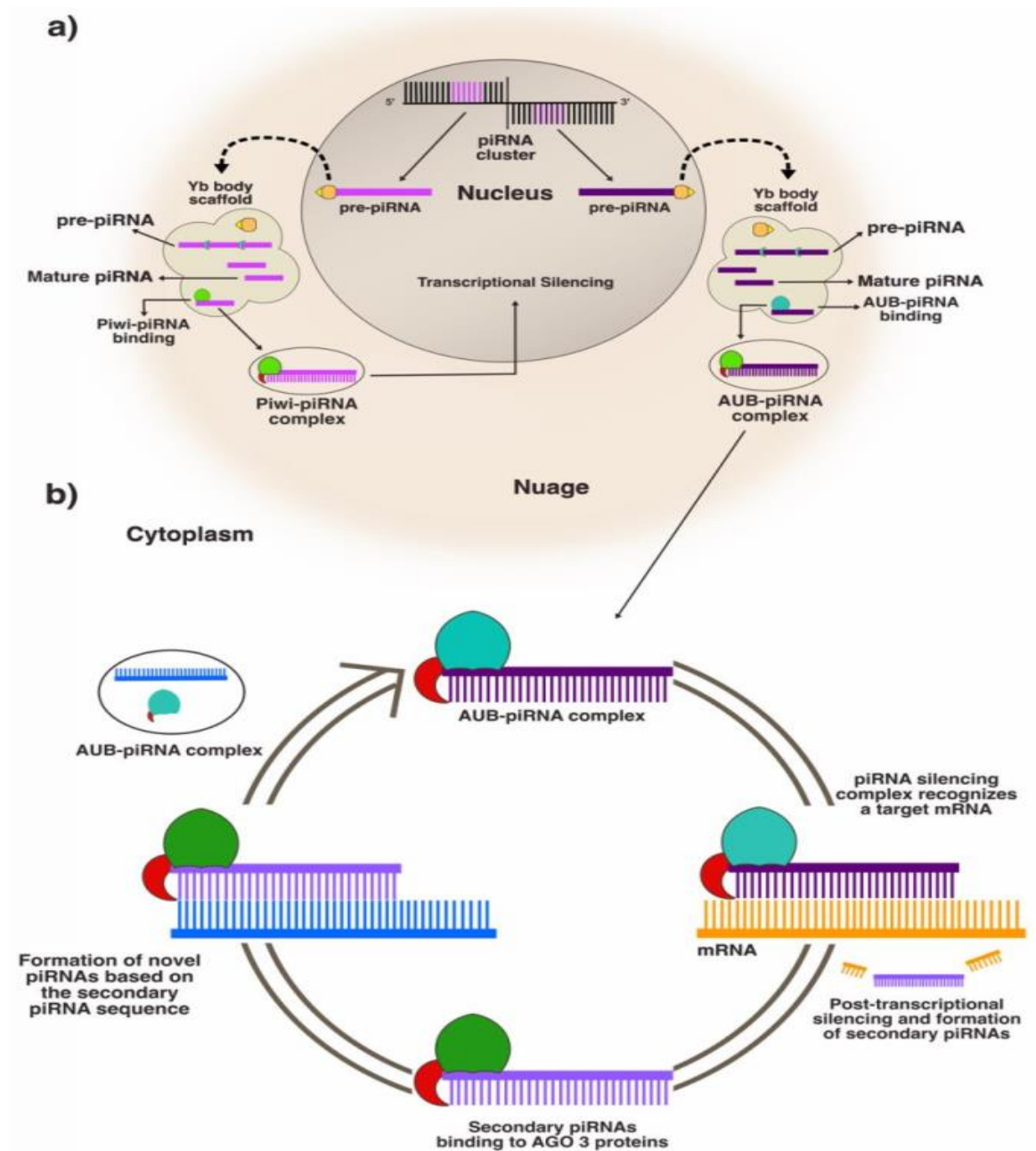


Figura 6. Via primária (a) e via secundária (b) de piRNA. (Cabral et al., 2020).

b) Via Secundária

As proteínas da família PIWI se envolvem em um *loop* de amplificação dependente de clivagem, entre *clusters* de piRNA e elementos transponíveis (BRENNECKE et al., 2007), denominado ciclo “*ping pong*”, que liga a amplificação do piRNA ao silenciamento do alvo pós-transcricional (WEICK; MISKA, 2014). A proteína PIWI não participa da amplificação por “*ping pong*”, pois uma vez ligada a piRNAs, é importada para o núcleo para reprimir

elementos transponíveis, através de modificações na cromatina (SIOMI; SIOMI, 2015; SAITO et al., 2010).

Os piRNAs antisense a transposons expressos, identificam e clivam seus alvos, gerando um novo piRNA sense ligado a AGO3. Esse complexo busca alvos (transcritos com sequências de transposon antisense). E a clivagem por AGO3 gera piRNAs antisense capazes de silenciar elementos transponíveis ativos e de reiniciar o ciclo com a geração de mais piRNAs sense. Esse ciclo de amplificação permite que piRNAs sense e antisense atuem em conjunto para aumentar a produção de RNAs competentes em silenciamento em resposta à atividade de transposons (Figura 6) (BRENNECKE et al., 2007).

1.4.3 piRNA: Função

A função do piRNA bem caracterizada é o silenciamento de elementos transponíveis, definidos como fragmentos autônomos de DNA, que codificam uma enzima denominada Transposase, que catalisa o movimento dos transposons; essa enzima entra no núcleo e cliva as extremidades do transposon, para excisá-lo do genoma; essa molécula é então inserida em um novo sítio no genoma, podendo causar mutações prejudiciais ao DNA (SIOMI et al., 2011; WEICK; MISKA, 2014).

A regulação desses elementos por piRNA envolve o reconhecimento da sequência alvo pela complementariedade de pares de bases (pb), através do piRISC, e posterior clivagem endonucleotídica (*slicing*) (WEICK; MISKA, 2014). O silenciamento de ETs, tanto nos níveis transcricionais quanto pós-transcricionais (Figura 7) em linhagens germinativas é um papel altamente conservado na maioria das espécies animais (SIOMI et al., 2011; CABRAL et al., 2020). A maquinaria existente na via secundária, em que um transposon é reconhecido por um piRNA e clivado pelas proteínas da família PIWI, é um mecanismo pós-transcricional bem compreendido para a repressão do transposon. Na linhagem germinativa, esse processo evita o acúmulo de alterações no genoma da próxima geração e representa o aspecto mais bem elucidado da biologia do piRNA (WEICK; MISKA, 2014).

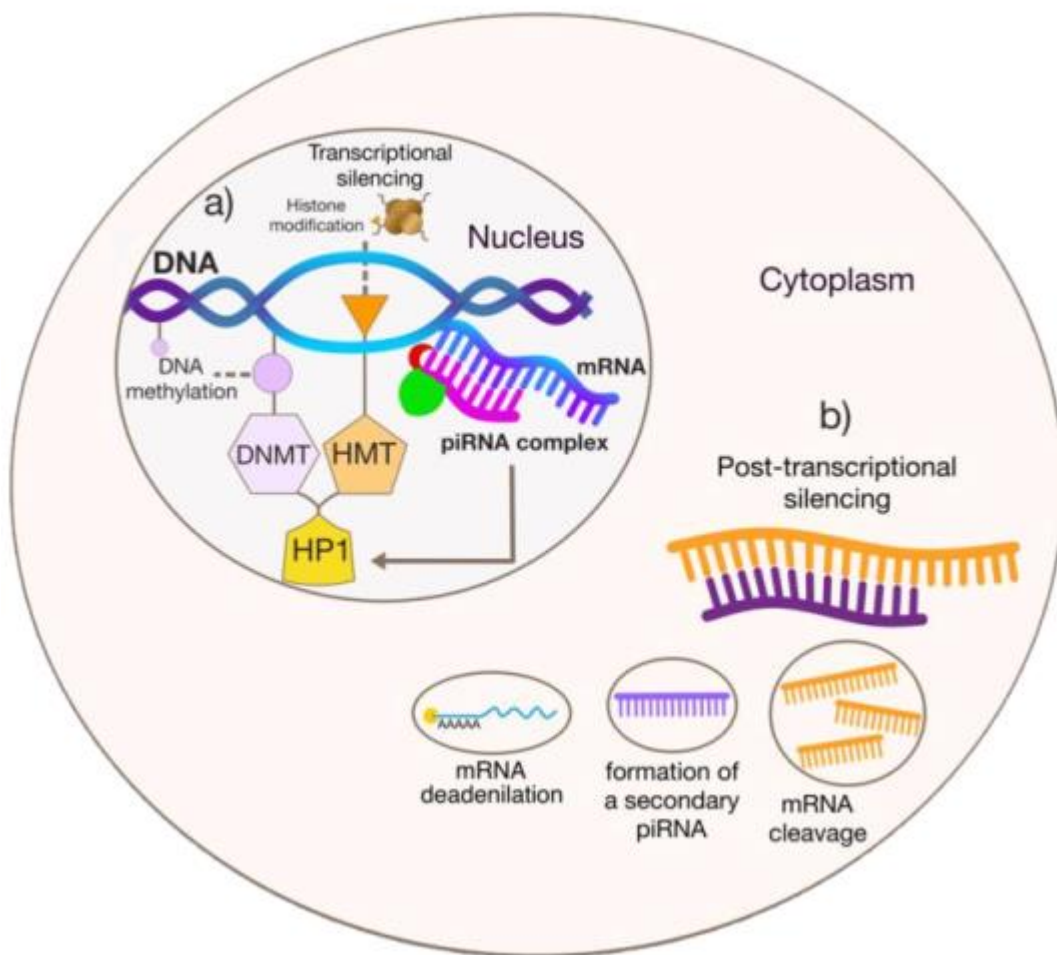


Figura 7. Silenciamento mediado por piRNA em nível transcricional (a) e pós-transcricional (b). (Cabral et al., 2020).

Além de atuarem no silenciamento transcricional e pós-transcricional de ETs, os piRNAs operam na manutenção da função das células germinativas e na regulação da tradução e estabilidade do mRNA, através da regulação transcricional e pós-transcricional (WEICK; MISKA, 2014; CABRAL et al., 2020). A regulação pós-transcricional de mRNA, se dá através ligação do complexo piRNA-PIWI a sequências alvo complementares e promovem a degradação ou deadenilação do mRNA, em que proteínas formam um complexo de deadenilação, se associam ao complexo piRNA-PIWI e induzem o encurtamento da cauda poli-A do mRNA por ação de exonucleases, limitando a quantidade de mRNAs disponíveis, regulando assim o nível de expressão gênica (PONNUSAMY et al., 2017).

Considerando esses aspectos, os estudos apontam que uma desregulação na via piRNA-PIWI pode provocar alterações que levam ao desenvolvimento de doenças infecciosas como *Human Immunodeficiency Virus* (HIV), *Herpes Simplex Virus Type* (HSV-1), hanseníase e tuberculose (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ et al., 2020; PINTO et al., 2020; WANG et al., 2023; ZHANG et al., 2019b).

Estudos analisaram variações genéticas em regiões que codificam piRNAs, e sugeriram que esses polimorfismos podem afetar o risco de suscetibilidade à doenças, mas

especificamente ao câncer de mama, melanoma e glioma (CHENG et al., 2011; FU et al., 2015; JACOBS et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

piRNAs também tem sido investigado em infecções virais, mas em relação à associação de variantes com expressão de piRNAs, seu papel ainda é incerto.

1.4.4 piRNAs diferencialmente expressos na COVID-19

Em relação à investigação de piRNAs diferencialmente expressos na COVID-19, Yu e colaboradores (2020) identificaram sequências de piRNAs em exossomos/microvesículas (Ex/Mv) de Células tronco neurais de camundongos (NCS) *in vitro*, e que poderiam ter como alvo o genoma de RNA do SARS-CoV-2, com potencial antiviral. Posteriormente dados desse mesmo grupo apontaram que esses exossomos/microvesículas (Ex/Mv) NSC podem suprimir a replicação do SARS-CoV-2; além disso, eles demonstraram que esse efeito inibitório era anulado com o *Knockout* da proteína *PIWIL2*; uma vez que essa proteína participa da via piRNA-PIWI, ao avaliar a expressão de piRNAs que tem como alvo o genoma do SARS-CoV-2, eles observaram que a maioria desses piRNAs diminuiu seus níveis de expressão em Ex/Mv de htNSC-PIWIL2 KO em comparação com Ex/Mv de htNSCs controle. Esse estudo também demonstrou que a estimulação de htNSCs com fragmentos de RNA SARS-CoV-2 pode levar ao aumento da produção de alguns piRNAs de sequência correspondente e montá-los em Ex/Mv para liberação (IKHLAS et al., 2022). Essas análises reforçam que as funções do piRNAs são importantes para o processo de replicação do vírus, e podem contribuir para os efeitos antivirais do NSC Ex/Mv

Akimniyazova e colegas (2022) ao realizarem predições *in silico*, identificaram sequências de piRNAs de humanos que tem como alvo o RNA genômico (gRNA) do SARS-CoV-2 e ao estimarem os efeitos do piRNA no RNA genômico (gRNA) do SARS-CoV-2 mostraram que mais de 100 piRNAs podem potencialmente inibir a replicação viral. Esse mesmo grupo, através de uma metodologia semelhante, identificou piRNAs que podem interagir com o gRNA da variante Ômicron do genoma do SARS-CoV-2, e mostraram a possibilidade de piRNAs afetarem a síntese de proteínas do vírus através dessa interação, sugerindo uma possível capacidade dos piRNAs em suprimir a replicação viral (RAKHMETULLINA et al., 2023).

Um estudo, através de dados de RNA-seq e análises de expressão diferencial, identificou piRNAs diferencialmente expressos em diferentes tipos celulares, quando comparado pacientes com COVID-19 com quadro clínico grave e indivíduos saudáveis, além de identificar piRNAs DE em linfócitos (KONDRATOV ET AL., 2024). A expressão de piRNAs em linfócitos T

humanos já foi relatada previamente, promovendo o decaimento de pré-mRNA (ZHONG et al., 2015). Apontando para um sinal de atividade antiviral, com papel significativo na resposta imune.

1.4.5 Polimorfismos relacionados com piRNAs associados com COVID-19

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e inserção-deleção (INDELs) podem afetar a expressão gênica, variantes em sequências de piRNA foram associadas a um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer (FU et al., 2015).

Pesquisadores ao realizarem ensaios funcionais *in vitro* em linhagens celulares de glioma para investigar o impacto de piRNAs e suas variantes alélicas, encontraram que a variante SNP rs147061479 no piR-598 aumentou o risco para glioma. Demonstraram também que a inserção de um piR-598 *mimic* selvagem diminuiu significativamente a viabilidade celular em relação ao tratamento controle, enquanto que o tratamento com a variante de piRNA foi suficiente para eliminar o efeito anti-proliferativo do piR-598 e promover a formação de colônias (JACOBS et al., 2016). Portanto, apesar de inicial, funções de polimorfismos em regiões de piRNAs já começaram a ser desvendadas.

Análises de eQTL também evidenciaram o papel de variantes na expressão de piRNAs associado à Câncer Gástrico (LIN et al., 2019).

Em relação à polimorfismos em regiões de piRNAs associados à vírus, somente um estudo foi encontrado. Seus achados sugeriram que polimorfismos em fatores da via do piRNA são responsáveis pelo aumento da produção de piRNA e podem suprimir a atividade de transposons (RYAZANSKY et al., 2017). Sendo necessário mais estudos para verificar o potencial de polimorfismos em regiões de piRNAs associados com doenças infecciosas.

Por outro lado, trabalhos recentes já demonstraram o envolvimento de circRNAs e polimorfismos de circRNA na infecção pelo SARS-CoV-2.

1.5 circRNA

1.5.1 circRNA: Conceito e Histórico

Os RNAs Circulares (circRNAs) foram descobertos em plantas (SANGER et al., 1976; JIAO et al., 2021), caracterizados como éxons “*scrambled*” na década de 90 (NIGRO et al., 1991), são moléculas circulares definidos primeiramente como Transcrito Circular Antisense, identificados e redescobertos em 2011 em amostras de tecidos de camundongos e humanos (HANSEN et al., 2011), estando presente em eucariotos, procariotos e vírus (WANG et al., 2014; DANAN et al., 2012; CAI et al., 2021b). São evolutivamente conservados, relativamente estáveis no citoplasma e apresentam padrões de expressão específicos para tecidos e estágios de desenvolvimento (HANSEN et al., 2011; MEMCZAK et al., 2013; AHMED et al., 2019).

Os circRNAs apresentam uma estrutura circular, não poliadenilada, unida covalentemente em suas extremidades 5’ e 3’, que o torna resistente à degradação normal por exonuclease; porém, esse mesmo estudo demonstrou que o circRNA pode ser clivado endonucleotidicamente por miRNAs, de uma maneira dependente de AGO2 (HANSEN et al., 2011). Por outro lado, um outro estudo identificou um circRNA resistente à desestabilização mediada pelo miR-7, se ligando a elementos de resposta de miRNAs (MREs) – sequências complementares de miRNAs nas 3'-UTRs de mRNAs alvo, e suprimindo fortemente a atividade de miR-7 (HANSEN et al., 2013).

1.5.2 circRNA: Biogênese

Os RNAs circulares podem ser produzidos principalmente a partir de um *splicing* de RNA não canônico (*backsplicing*), em que um sítio de junção 5’ a jusante – *downstream* (doador de *splicing*) de um éxon é ligado a um sítio de junção 3’ a montante – *upstream* (aceitador de *splicing*) de outro éxon (SALZMAN et al., 2012; LASDA; PARKER, 2014).

Essas moléculas podem ser formadas de várias formas: i) ciclização direta de éxons por *backsplicing* (eciRNA) (JECK et al., 2013), ii) ciclização de íntros *lariat*, que pode gerar cirnas de íntros (ciRNA) ou de éxons (ZHANG et al., 2013), iii) ciclização mediada por emparelhamento de íntrons a partir de íntrons (LIANG; WILUSZ, 2014) ou de éxon-íntron (os éxons são circularizados com os íntrons retidos entre os éxons, por eventos de “*exon-skipping*”) (ElciRNA) (LI et al., 2015), iv) ciclização mediada por proteínas de ligação ao RNA (RBPs) (CONN et al., 2015), v) ciclização conduzida por *splicing* de tRNA (DANAN et al., 2012; NOTO; SCHMIDT; MATERA, 2017; LU et al., 2015), vi) ciclização conduzida por *splicing* de rRNA (DANAN et al., 2012); vii) ciclização a partir de íntrons flanquados por *splicing*, em

regiões intergênicas (GAO; WANG; ZHAO, 2015) (Figuras 8 e 9). Os mecanismos de ciclização a partir de tRNA e rRNA não está esclarecido em humanos.

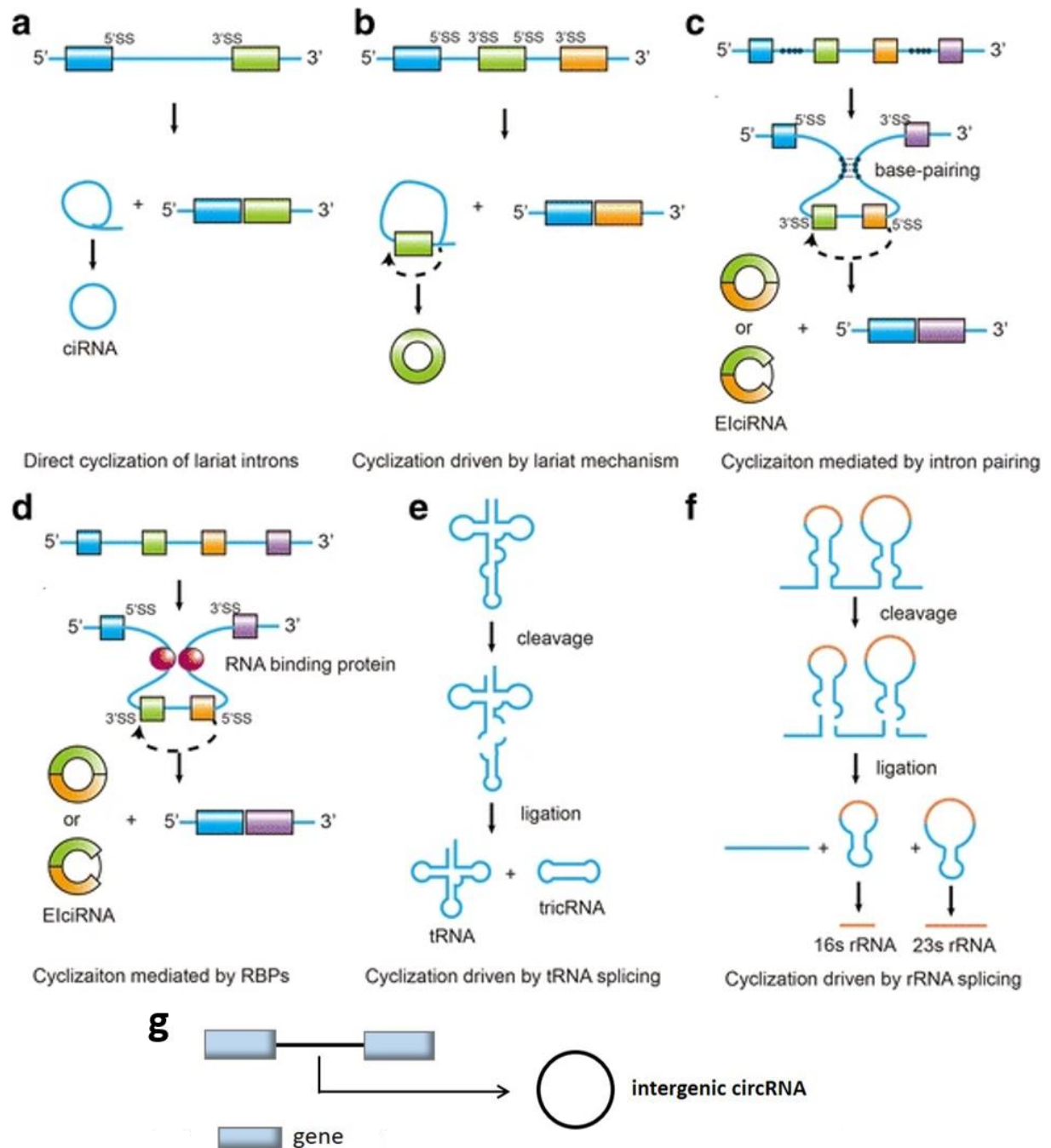


Figura 8. Biogênese de circRNAs. a) ciclização de íntrons *lariat* (ciRNA), b) ciclização direcionadas por íntrons *lariat* que geram circRNAs de éxons, c) ciclização mediada por emparelhamento de íntrons a partir de íntrons, d) ciclização mediada por proteínas de ligação ao RNA (RBPs), e) ciclização conduzida por *splicing* de tRNA, f) ciclização conduzida por *splicing* de rRNA, g) ciclização a partir de íntrons flanquados por *splicing*, em regiões intergênicas (Adaptado de ZHANG et al., 2017 e WANG et al., 2019).

De acordo com os seus componentes, os circRNAs podem ser classificados em três categorias: i) circRNAs exônicos (ecircRNAs), compostos exclusivamente por éxons, ii) circRNAs intrônicos (ciRNA), compostos exclusivamente por íntrons, e iii) circRNAs éxon-íntron (ElciRNA) que contêm sequências relacionadas a éxon e íntron, e circRNAs intergênicos, de regiões intergênicas flanqueadas por íntrons (Figura 9) (WANG et al., 2019; GAO et al., 2015).

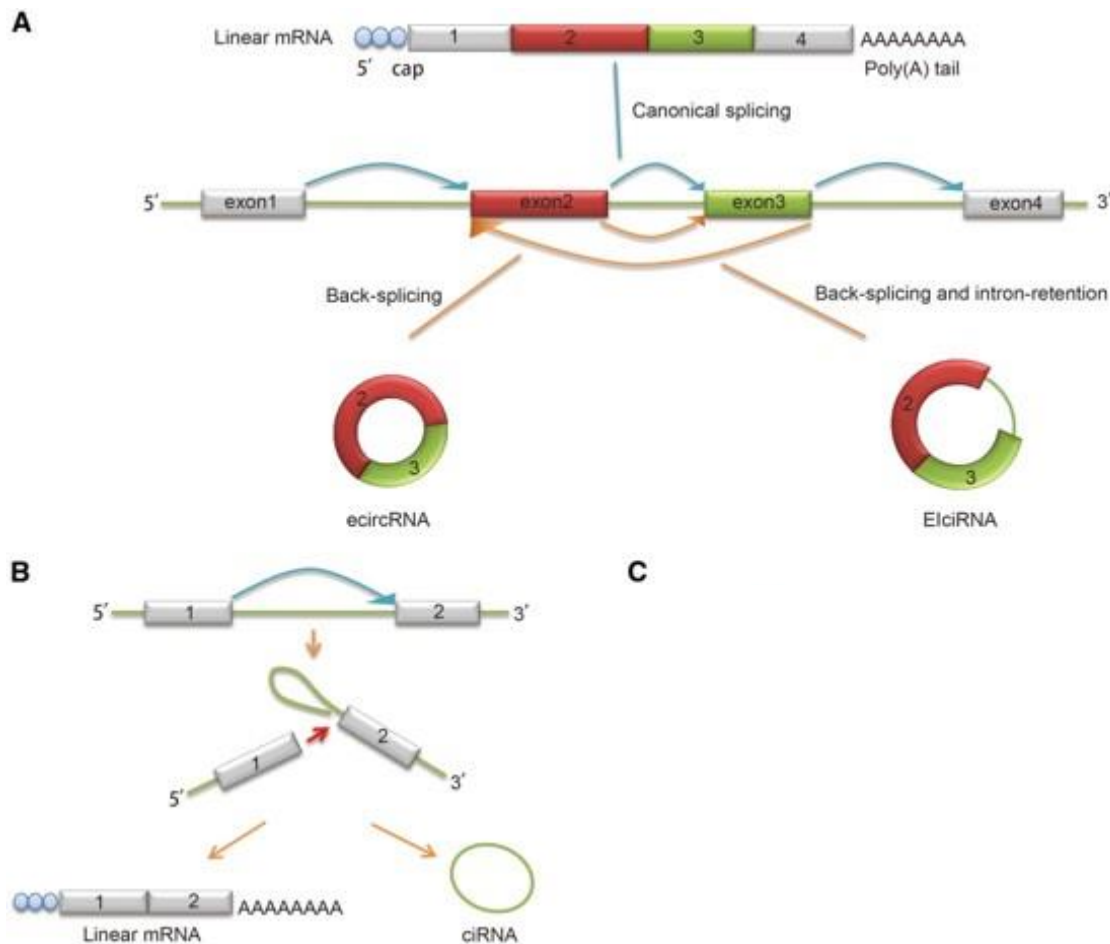


Figura 9. Biogênese de circRNAs e principal classificação. a) *Exonic* circRNA (ecircRNA) e *Exon-intron* circRNAs (ElciRNA). O *splicing* canônico produz mRNA lineares enquanto o *splicing* não canônico (*backsplicing*) produz ecirRNAs, se íntrons forem retidos gera ElciRNAs. b) *Intronic* circRNA (ciRNA) produzido por *splicing* de íntrons (Adaptado de Meng et al., 2016).

A biogênese de circRNAs não está completamente elucidada, mas investigações têm esclarecido alguns mecanismos envolvidos nesse processo. Ashwal-Fluss e colaboradores (2014) demonstraram que em drosófilas e humanos, os circRNAs são gerados cotranscricionalmente, uma vez que eles observaram que sua produção compete com o *splicing* canônico do pré-mRNA; seus dados também sugeriram que o *splicing* linear e a produção de

circRNA se regulam mutuamente, competindo por sítios de *splicing*, essa descoberta permite pensar que circRNAs tenham um impacto regulatório no *splicing* linear do mRNA hospedeiro.

Em suas investigações de interações da RBP MBLN1, Ashwal-Fluss e colegas (2014) também identificaram que essa RBP interage com íntrons flanqueadores para promover a circularização do éxon, e produção de circMbl. Em suas análises também encontraram que quando essa proteína está em excesso, ela diminui a produção de seu próprio mRNA, promovendo a produção de circMbl, e apontaram essa RBP como um fator regulador do mRNA, que pode promover a biogênese do circRNA, sugerindo que fatores gerais de *splicing* podem determinar o equilíbrio entre a biogênese do circRNA e o *splicing* canônico.

Análises funcionais com circRNAs mostraram que íntrons contendo apenas as sequências do sítio de *splicing* juntamente com repetições invertidas curtas foram suficientes para permitir que os éxons circularizassem eficientemente, pois essas repetições pareiam, aproximando assim os sítios de *splicing* uns dos outros e facilitando a ligação; porém, nem todas as sequências de repetição intrônicas suportam a circularização, um grampo formado entre as repetições às vezes pode inibir fortemente a circularização. Constataram ainda que a circularização requer um sinal de processamento de extremidade 3' funcional, bem como a colaboração entre as repetições intrônicas e as sequências exônicas, apresentando um modelo generalizável de como a maquinaria de *splicing* pode determinar se deve produzir um RNA circular ou um mRNA linear (JECK et al., 2013; ZHANG et al., 2014b; LIANG; WILUSZ, 2014).

Os mRNAs precursores (pré-mRNAs) são processados de modo que os íntrons sejam removidos e os éxons sejam unidos. Se um pré-mRNA sofre um *splicing* padrão, dito canônico, é gerado um mRNA linear que pode ser posteriormente traduzido para produzir uma proteína. Alternativamente, a maquinaria de *splicing* pode fazer um *backsplicing* (retornar) e produzir um RNA circular que possui extremidades ligadas covalentemente. Dessa forma, a escolha entre a produção de um mRNA linear e um RNA circular parece ser bem regulada (LIANG; WILUSZ, 2014). A ligação do fator de *splicing* Quaking (QKI) à íntrons flanqueadores, por exemplo, é suficiente para fazer com que circRNAs sejam produzidos a partir de transcritos que normalmente sofrem apenas *splicing* linear canônico (CONN et al., 2015).

Mesmo com vastos estudos sobre os mecanismos biológicos de biogênese do RNA circular, continuam os esforços das pesquisas para tentar entender como é determinado se a região de um pré-mRNA produz um mRNA ou um circRNA, além disso são necessários mais modelos mecanicistas detalhados de como a circularização geralmente ocorre.

1.5.3 circRNA: Função

Estudos fornecem evidências de que os circRNAs são uma classe de reguladores transcricionais e pós-transcricionais e apresentam uma função conservada na regulação gênica ao competir com o *splicing* canônico, funcionando como esponja de miRNAs, reduzindo sua capacidade de regular mRNAs (ZHANG et al., 2013; MEMCZAK et al., 2013; HANSEN et al., 2013; ASHWAL-FLUSS et al., 2014;).

Para evidenciar que circRNAs não são apenas subprodutos sem funções bem estabelecidas, análises de dados do ENCODE revelaram que os padrões de expressão de circRNA podem ser específicos do tipo de célula, o que destaca a necessidade de uma regulação na sua produção, e isso sugere que esses ncRNAs são produzidos de maneira regulada para realizar funções celulares específicas, e justificando fortemente a existência de mecanismos e funções exercidas por essas moléculas (SALZMAN et al., 2013).

As funções de circRNAs mais bem caracterizadas até o momento são esponja de miRNAs e de RBPs para regulação da expressão gênica (HANSEN et al., 2013; BARBAGALLO et al., 2022). Análise de dados de sequenciamento mostraram que os circRNAs competem com RNA por ligação à Proteínas de Ligação ao RNA (RBP) ou miRNAs, com provável função na modulação da quantidade de RBP ou seus sítios de ligação (MEMCZAK et al., 2013).

Como esponja de miRNAs, os circRNAs podem estar tipicamente envolvidos em redes endógenas competitivas de RNA (ceRNA) (ARORA et al., 2020). As RBPs podem funcionar como fatores que influenciam no processo de *splicing* e biogênese de circRNAs, elas podem se ligar a sequências específicas dentro de seus genes alvo e aumentar a proximidade dos sítios de *splicing*, conduzindo assim a circularização (ASHWAL-FLUSS et al., 2014), nessa linha diversos trabalhos sugeriram que fatores de *splicing* podem participar na regulação da biogênese do circRNA (LIANG; WILUSZ, 2014); CONN et al., 2015).

Embora, os relatos destaquem que circRNAs atuam como esponjas de miRNAs, e interação com RBPs (HANSEN et al., 2013; MEMCZAK et al., 2013); estudos sugerem que os circRNAs podem ter outras funções (Figura 10): i) reservatório de miRNAs, para estabilizar a expressão de miRNAs alvo e permitir a supressão do gene alvo (WANG et al., 2017b); ii) inibição de *splicing* linear canônico por competição endógena (LASDA; PARKER, 2014; ASHWAL-FLUSS et al., 2014); iii) como transporte intracelular de miRNAs (PIWECKA et al., 2017); iv) regulação da maturação do rRNA, por meio da ligação à PES1 (HOLDT et al., 2016); v) regulação de *splicing* de RNA (CONN et al., 2017); vi) interação com proteínas para

processos regulatórios (MEMCZAK et al., 2013; DU et al., 2017); vii) atuação na síntese de proteínas, de maneira dependente de *splicing* e independente de cap, descrito em moscas, camundongos e humanos (PAMUDURTI et al., 2017; LEGNINI et al., 2017;; YANG et al., 2017; HENTZE; PREISS, 2013; HANSEN et al., 2011; CHEN; SARNOV, 1995).

CircRNAs podem atuar no núcleo (ciRNA e ElciRNA) na regulação transcricional ou no citoplasma (eciRNAs), na regulação pós-transcricional (ZHANG et al., 2013; HANSEN et al., 2013; JECK et al., 2013). Um estudo sugeriu que circRNAs oriundos de íntrons *lariat* e de éxon-íntron são associados com RNA Pol II e pode atuar no núcleo na regulação da expressão do gene parental e possivelmente não atuam como esponja de miRNAs no núcleo, além disso eciRNAs, em específico, podem participar da interação RNA-RNA com snRNP podem ainda interagir com o complexo de transcrição da RNA Pol II nos promotores de genes e promover a sua transcrição para aumentar a o nível de expressão gênica dos genes parentais (LI et al., 2015; ZHANG et al., 2013) (Figura 10).

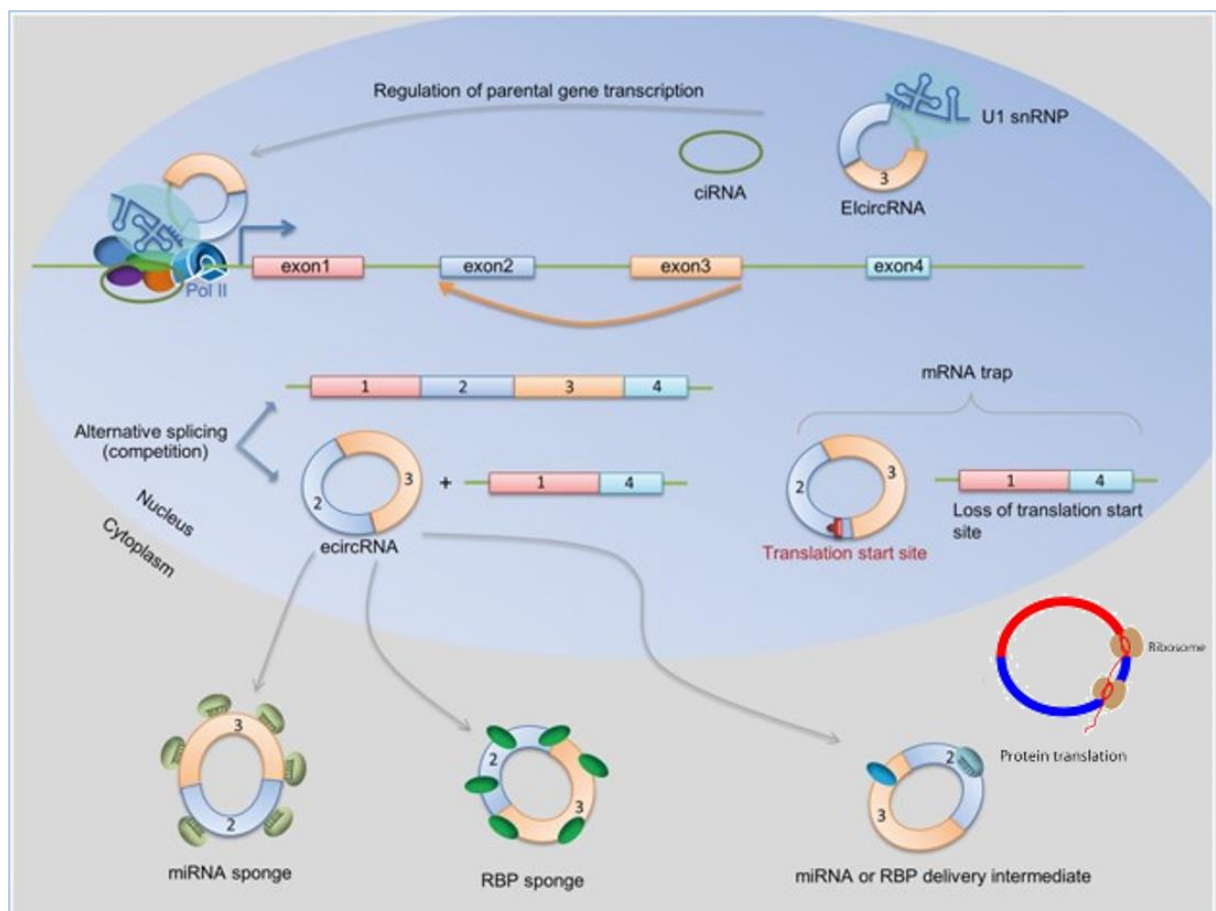


Figura 10. Funções de circRNAs. CircRNAs podem atuar no núcleo (ciRNA e ElciRNA) na regulação transcricional ou no citoplasma (eciRNAs), na regulação pós-transcricional (Adaptado de MENG et al., 2017 e NAHAND et al., 2020).

Foi proposto que modificações químicas em circRNAs podem ser um nível adicional de regulação pelo qual as células de mamíferos distinguem circRNAs endógenos versus patógenos invasores contendo circRNAs (YANG et al., 2017). No entanto, se esse reconhecimento é feito durante a infecção por SARS-CoV-2, ainda não se sabe.

Anotações funcionais de circRNAs sugeriram que eles podem desempenhar papéis reguladores importantes no desenvolvimento de doenças (WU; JI; ZHAO, 2020). Essas moléculas circulares foram associadas a diversas condições fisiológicas e patológicas, incluindo doenças infecciosas como tuberculose, hepatite B, influenza e COVID-19 (LIU et al., 2019b; YU et al., 2019; ZHANG et al., 2022; YANG et al., 2021).

Extensas revisões reuniram dados sobre a atuação de circRNAs em infecções virais, que mostram que os RNAs circulares do hospedeiro (circRNAs) e dos vírus (VcircRNA) desempenham importantes papéis na patogênese das infecções virais; investigações recentes também têm observado a influência dessas moléculas na patogênese da COVID-19 (KRISTENSEN et al., 2019; GHOSAL et al., 2014; TAGAWA et al., 2018; ARORA et al., 2020; DEMIRCI; DEMIRCI, 2021; BARBAGALLO et al., 2022).

1.6 circRNAs ENVOLVIDOS COM A PATOGÊNESE DA COVID-19

Muitos estudos investigaram alterações na expressão em células hospedeiras humanas infectadas com SARS-CoV-2. Diferentes abordagens mostraram que vários tipos de RNAs não codificantes, como microRNAs (miRNAs), lncRNAs e RNAs circulares (circRNAs), podem participar de vários processos celulares, incluindo a regulação gênica durante a infecção (GHOSAL et al., 2014; LI et al., 2017; ARORA et al., 2020; BARBAGALLO et al., 2022).

lncRNAs podem desempenhar papéis significativos nas vias inflamatórias, regulando assim a expressão gênica por meio de vários mecanismos, incluindo a atuação por meio de RNAs endógenos concorrentes (ceRNA) (ARORA et al., 2020; GHOSAL et al., 2014).

Pfaffenrot e colaboradores (2021) realizaram ensaios funcionais utilizando circRNAs artificiais projetados para atuar como antisense-RNAs direcionados ao RNA do genoma SARS-CoV-2, em particular sua região 5' não traduzida, estruturalmente conservada, e identificaram que segmentos específicos da região 5' não traduzida de SARS-CoV-2 podem ser acessados por circRNAs, resultando na redução de proliferação do vírus em cultura de células.

Os circRNAs podem ser ligar a miRNAs competitivamente e atuar como RNAs Endógenos Concorrentes (ceRNAs), regulando a expressão de miRNAs de mRNAs-alvos específicos, agindo assim como uma esponja para miRNAs (ARORA et al., 2020). A partir de

análises *in silico* também foi proposta redes de interações circRNAs-miRNAs-mRNAs em células hospedeiras após a infecção por SARS-CoV-2 (DEMIRCI; DEMIRCI, 2021).

circRNAs virais podem afetar redes de ceRNA presentes nas células hospedeiras (GHOSAL et al., 2014). O circ_3205, por exemplo, sintetizado a partir do SARS-CoV-2, especificamente de uma sequência incorporada na codificação ORF para a proteína N do vírus, foi identificado na infecção da célula hospedeira; observou-se que ele pode se comportar como ceRNA, e atuar como esponja do hsa-mir-298, contribuindo para a regulação positiva de mRNAs como KCNMB4 e PRKCE; a partir disso foi sugerido que essa interação pode ser associada com coagulação sanguínea e resposta imune e assim contribuir para a progressão da infecção, estabilizando o genoma do SARS-CoV-2 e desencadeando processos biológicos como inflamação e apoptose (BARBAGALLO et al., 2022).

Li e colaboradores (2017) demonstraram que NF90/NF110 promovem *backsplicing* no núcleo, atuando na biogênese do circRNA, e a infecção viral induz sua exportação para o núcleo e leva à redução dos níveis de circRNAs; essas RBPs, quando liberadas de circRNPs se ligam à mRNAs virais para resposta imune antiviral; isso sugere que circRNAs e sua função de esponja de RBPs podem estar envolvidos em mecanismos antivirais do hospedeiro.

Em um recente estudo, foi demonstrado que células infectadas com vírus MERS-CoV ou SAR-CoV-2 aumentaram os níveis de Ribonucleoproteína C nuclear heterogênea (hnRNP C), com papéis descritos na regulação de circRNAs, para ativar a via CRK-mTOR. Ao realizar a inibição específica do fator de *splicing* hnRNP C, observou-se uma diminuição significativa na expressão do circRNA hsa_circ_0004445 e seu cognato mRNA CRK (um regulador de quinase). Também observaram que a depleção de CRK regulou negativamente a fosforilação de mTOR, com redução significativa da replicação viral durante infecções por MERS -CoV e SARS-CoV-2. Os dados deste estudo revelaram o papel da RBP hnRNP C na modulação de circRNAs do hospedeiro em infecções por coronavírus (ZHANG et al., 2022c), e sugerem que circRNAs podem regular a expressão de seus mRNAs cognatos.

circRNAs do hospedeiro estão envolvidos nas respostas imunes contra infecções virais, e além de produzidos por humanos, essas moléculas denominadas circRNA viral (VcircRNA) podem ser codificadas pelos vírus, incluindo SARS-CoV-2, em que podem desempenhar um papel na patogênese dessa doença (NAHAND et al., 2020; AVILALA et al., 2021; HUANG et al., 2019; CAI et al., 2020; TAN; LIM, 2021).

Resultados experimentais já sugerem que os circRNAs podem ter funções potenciais na regulação da resposta imune contra vírus, incluindo SARS-CoV-2, participando de importantes vias biológicas da defesa viral (FIROOZI et al., 2022; LU et al., 2020; LUO et al., 2020).

A análise de RNA-seq encontrou circRNA e lncRNA diferencialmente expressos no COVID-19, e a análise complementar do GO e KEGG, indicou que essas moléculas podem desempenhar um papel em múltiplas vias imunológicas e inflamatórias, no crescimento e apoptose de células hospedeiras, principalmente envolvidas na regulação da imunidade e inflamação das células hospedeiras, metabolismo de substâncias e energia, ciclo celular e apoptose celular (WU et al., 2021).

A análise baseada em vias sugeriu que o circRNA pode participar das vias como interação do receptor de citocina-citocina, via de sinalização de quimiocina, via de sinalização de neurotrofina e invasão bacteriana de células epiteliais (QIAN et al., 2018), genes parentais de circRNAs diferencialmente expressos podem estar associados ao processo de infecção viral, principalmente o processo do sistema imunológico e a inflamação mediada pela via de sinalização de quimiocina e citocina (HU et al., 2021), com potencial papel biológico na lesão (WANG et al., 2021).

Os RNAs circulares do SARS-CoV-2 podem regular negativamente os genes associados a processos metabólicos e positivamente os genes associados às respostas celulares ao estresse oxidativo, e afetar o *splicing* do mRNA do hospedeiro, com consequentes alterações na célula e favorecimento do desenvolvimento da infecção (CAI et al., 2020).

Evidências recentes de sequenciamento de amostras de sangue de pacientes com COVID-19 mostraram que lncRNA e circRNA estavam DE e envolvidos principalmente na regulação do ciclo celular do hospedeiro, apoptose, inflamação imune e via de sinalização, e podem fornecer informações relevantes sobre a infecção pelo SARS-CoV-2 (WU et al., 2021).

1.6.1 circRNAs diferencialmente expressos na COVID-19

Os circRNAs foram identificados diferencialmente expressos em várias infecções virais, como a doença mão-pé-boca (HFMD) causada pelo Coxsackievirus A16 (CV-A16) (HU et al., 2021), vírus da influenza A (WANG et al., 2021). circRNAs foram encontrados desregulados e apontados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico de Tuberculose (TB) (ZHANG et al., 2017; HUANG et al., 2018; QIAN et al., 2018; FU et al., 2019)

Os padrões de expressão de circRNAs do hospedeiro também foram encontrados alterados na Hepatite B, Papilomavírus Humano (HPV), Influenza, tuberculose, hanseníase e COVID-19 (SHI et al., 2017; HUANG et al., 2017; CUI et al., 2017; YU et al., 2020; ZHENG et al., 2018; QU et al., 2021; YI et al., 2018; GAO et al., 2022; WU et al., 2021; YANG et al., 2021b).

Recentemente, trabalhos foram desenvolvidos para avaliar a expressão diferencial de circRNAs na COVID-19 (AYAZ et al., 2023; REINHOLD et al., 2023; MIRZAEI et al., 2024)

De acordo com a progressão da infecção por SARS-CoV-2, os circRNAs podem exibir uma regulação dinâmica do padrão de expressão e função na COVID-19 (YANG et al., 2021). O primeiro estudo a avaliar os perfis de expressão de circRNAs na COVID-19, identificou circRNAs expressos diferencialmente em células epiteliais pulmonares humanas infectadas por SARS-CoV-2 (YANG et al., 2021), sugerindo sua potencial função biológica durante a infecção pelo vírus. Esse mesmo estudo demonstrou que genes parentais dos circRNAs expressos diferencialmente podem estar envolvidos na regulação da infecção viral e na resposta antiviral do hospedeiro. Além disso, eles podem formar uma rede regulatória complexa com mRNAs e miRNAs, denominada ceRNA, para regular a expressão gênica em resposta à infecção viral (YANG et al., 2021). Além disso, os circRNAs podem se ligar aos RBPs para regular a expressão gênica durante a infecção por SARS-CoV-2, a análise de enriquecimento funcional dos RBPs que se ligam aos circRNAs mostrou que a maioria dos RBPs, como EIF4A3, AGO2, TIAL1, IGF2BP3, LIN28B e FUS, estavam envolvidos em processos biológicos, incluindo estabilidade do RNA, tradução, regulação do processo apoptótico celular e imunidade (YANG et al., 2021).

Os circRNAs também podem interagir com fatores de *splicing* para regular sua produção (ASHWAL-FLUSS et al., 2014). Descobertas recentes demonstraram que hnRNP C pode modular a expressão de circRNAs e mRNAs cognatos perturbados por MERS-CoV e SARS-CoV-2, através de ligação física direta, isso porque a ligação física é uma característica presente em quase todas as interações entre fatores de *splicing* e circRNAs (ZHANG et al., 2022b). Esses resultados abrem uma nova perspectiva sobre a expressão dos circRNAs hospedeiros e seus mRNAs cognatos mediadas por fatores de *splicing* na infecção viral.

É importante saber que os circRNAs do SARS-CoV-2 também são altamente expressos durante a infecção pelo SARS-CoV-2 (YANG et al., 2022). Suas características são distintas dos circRNAs do hospedeiro, especialmente porque o SARS-CoV-2 tende a produzir circRNAs de exon único, enquanto os circRNAs do hospedeiro tendem a ser produzidos por excisão de íntron, também os circRNAs do SARS-CoV-2 são mais longos do que os circRNAs do hospedeiro e podem ser produzidos independentemente da transcrição mediada pela RNA polimerase II e do *splicing* do pré-mRNA (independente dos mecanismos moleculares do hospedeiro). Por outro lado, ambos podem expressar circRNAs com mais de um exons circulares, podem ser potencialmente traduzíveis, podem atuar como esponja de miRNA, interagir com RBPs e regular genes hospedeiros envolvidos em funções celulares (YANG et

al., 2022). Posteriormente, usando Hibridização In Situ por Fluorescência Amplificada (ampFISH), pesquisadores desse mesmo grupo detectaram um desses circRNA SARS-CoV-2 (NC_045512.2:29 122|28 295), codificado na região do gene N do genoma SARS-CoV-2, confirmando assim sua produção pelo genoma viral (JAIJYAN et al., 2024).

Esses achados revelam que a infecção por SARS-CoV-2 pode impactar os perfis de expressão de circRNA viral e do hospedeiro (YANG et al., 2021).

Para terapias, ensaios funcionais demonstraram pela primeira vez que o uso de circRNAs curtos sintéticos contendo sequências de RNA antisense que têm como alvo segmentos específicos da região 5'-não traduzida (UTR) do SARS-CoV-2, uma região estruturalmente conservada e fundamental para o ciclo de vida viral, resultou em até 90% de redução da proliferação do vírus em cultura de células (PFAFENROT et al., 2021). O experimento também revelou que a capacidade deste antisense-circRNA de inibir a proliferação viral foi eficiente antes e depois da infecção viral, com utilidade clara para estratégias profiláticas, proteção contra infecção viral e para abordagens de terapia antiviral. Também provou que a atividade antisense foi mais eficiente quando a sequência antisense foi apresentada dentro de um circRNA em vez de um RNA linear correspondente, provavelmente devido à estabilidade metabólica relativamente alta dos RNAs circulares.

A análise de enriquecimento de Reinhold e colaboradores (2023) mostrou genes associados a vesículas extracelulares, sugerindo que a COVID-19 pode afetar o perfil de RNA de vesículas extracelulares derivadas do cérebro. Wu e colegas (2021) também identificaram circRNAs expressos diferencialmente relacionados a exossomos, moléculas que podem ser usadas como biomarcadores de diagnóstico de doenças. Dado que circRNAs também foram identificados enriquecidos dentro de vesículas extracelulares e secretados de forma mediada por EV, isso pode indicar que as vesículas podem ser fatores importantes na patogênese da COVID-19. Mas estudos experimentais são necessários para entender os mecanismos envolvidos neste processo.

A análise de expressão de Barbagallo e colaboradores (2022) demonstrou que circ_3205, um circRNA sintetizado pelo SARS-CoV-2 após infecção de células hospedeiras, foi expresso apenas em células Calu3 infectadas com SARS-CoV-2 e sua quantidade correlacionou-se positivamente com a do mRNA Spike (S) e carga viral do SARS-CoV-2. O miR-298 humano (hsa) foi previsto para interagir com circ_3205 e *KCNMB4* e *PRKCE* foram previstos como alvos do hsa-miR-298. A PCR quantitativa em tempo real detectou os genes *KCNMB4* e *PRKCE* mais expressos em amostras positivas em comparação com amostras negativas e sua expressão correlacionou-se positivamente com a do circ_3205. As conclusões

do estudo sugerem que este circRNA pode funcionar como um RNA endógeno competitivo (ceRNA), absorvendo hsa-miR-298, contribuindo para a regulação positiva dos mRNAs *KCNMB4* e *PRKCE*, com função envolvida no processo de coagulação sanguínea e resposta imune, respectivamente, apontando que o ceRNA SARS-Cov-circ_3205/hsa-miR-298/*KCNMB4* e SARS-Cov-circ_3205/hsa-miR-298/*PRKCE* podem contribuir para a progressão da infecção por SARS-CoV-2.

Apesar dos estudos revelarem os aspectos dos mRNAs do hospedeiro em resposta à infecção por SARS-CoV-2, a compreensão de RNAs não codificantes, especialmente a dinâmica de transcrição do circRNA e as funções do hospedeiro durante a infecção por SARS-CoV-2 é limitada (YANG et al., 2021).

Foram relatados polimorfismos em genes envolvidos em vários mecanismos da infecção por SARS-CoV-2: entrada e replicação do SARS-CoV-2 (*ACE2* e *TMPRSS2*), aspectos imunológicos como resposta imune (Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC), mas ainda não está claro o impacto dos polimorfismos em genes do complemento no risco e gravidade da infecção por SARS-CoV-2, sendo necessário mais estudos para desvendar o efeito de polimorfismos na expressão de genes (HOU et al., 2020; GUNAL et al., 2021; SANTOS et al., 2021).

1.6.2 Polimorfismos relacionados com circRNAs associados à COVID-19

Embora exista diversos estudos que avaliam a expressão de circRNAs, em várias doenças, o conhecimento sobre o controle genético da expressão de RNA circular ainda é limitado (GUO et al., 2017; AHMED et al., 2019; YANG et al., 2021b; ZHAO; QU, 2020).

Investigações usando abordagens de análise de associação de Loci de Traços Quantitativos de Expressão (eQTL) identificaram genes relacionados à COVID-19 (LI et al., 2024; ZHANG et al., 2024; ZHU et al., 2023).

A literatura revelou que a maioria dos estudos com COVID-19 têm analisado eQTL com mRNA. Também foram investigados eQTL de miRNAs e lncRNAs (GJORGJIEVA et al., 2023; LIU et al., 2022). O perfil de genotipagem, expressão de miRNA e mRNA com análise de eQTL relataram que miRNA eQTL implicam em miRNAs associados à admissão na UTI, sugerindo regulação pós-transcricional como um mecanismo potencial que impacta as características sanguíneas subjacentes à gravidade da COVID-19 (Gjorgjieva et al., 2023). Enquanto estudos de eQTL com circRNA estão em seu estágio inicial. No entanto, análises cis-eQTL já revelaram que os SNPs circQTL podem afetar ou influenciar a biogênese do circRNA (LIU et al., 2019c)

Análises de eQTL forneceram informações sobre fatores genéticos, como SNPs, associados à variação na expressão gênica de circRNAs, Ahmed e colaboradores (2019), analisaram de forma integrada a expressão de circRNA e a variação da sequência do genoma em linhagens celulares e identificaram um conjunto de polimorfismos que influenciam a expressão de circRNA, referidos como circQTLs, enriquecidos em regiões regulatórias, que controlam processos celulares importantes, como regulação do ciclo celular e formação de spliceossomos. E também mostraram que um polimorfismo pareceu direcionar a expressão circular e linear do gene, mas em direções opostas, possivelmente modulando os níveis de circRNA em detrimento do mRNA, e ao avaliarem a influência circQTLs e eQTLs na expressão do mRNA do gene hospedeiro, mostraram que a maioria dos marcadores se associam exclusivamente à expressão de circRNA ou mRNA. E isso levanta hipóteses sobre o papel regulatório de variantes genéticas na expressão de mRNAs e circRNAs.

Zhao e Qu (2021) a partir de anotações de variantes em regiões de circRNAs, sugeriu que variantes em regiões de circRNAs podem ter efeitos significativos em processos celulares e mudanças no perfil de expressão de circRNAs, podendo afetar a expressão do gene parental, e ser associado com doenças. A relação entre Polimorfismos em regiões de circRNAs e a sua expressão foram associados com algumas doenças, como carcinoma hepatocelular; Aterosclerose, Esclerose Múltipla, Doença Arterial Coronariana (GUO et al., 2017; ZHANG et al., 2019; SUNAGAWA et al., 2021; BURD et al., 2010; HOLDT et al., 2016; PARABOSCHI et al., 2018; LIU et al., 2021b; ZHOU et al., 2020). Esses resultados já demonstram que o nível de expressão de circRNAs pode ser influenciado pelo genótipo de SNPs associados à doenças ou polimorfismos em regiões que codificam essas moléculas.

Também foram identificados polimorfismos em regiões de circRNAs que podem influenciar a expressão de circRNA, alterando sítios de *backsplicing* (LIU et al., 2019b). Sugestivamente essa alteração pode afetar a biogênese do circRNA e desregular a sua função.

Recentemente, um estudo de eQTL com circRNAs identificou circRNAs relacionados à resposta imune (NGUYEN, 2023), mas análises de eQTL investigando especificamente o papel da expressão de circRNA na COVID-19 ainda não foram desenvolvidos.

De forma geral, todas essas análises permitem inferir que polimorfismos associados à expressão de circRNAs ou doenças podem ter um efeito funcional na modulação dos níveis de circRNAs; além disso, podem influenciar de forma indireta nos níveis de expressão de RNAs lineares como lncRNAs, mRNAs e piRNAs, e então contribuir para o desenvolvimento de doença; questões ainda não esclarecidas na patogênese da COVID-19.

Esse conjunto de dados indicam que fatores genéticos podem influenciar na variação da expressão de piRNAs e circRNAs, entretanto, o estudo de variantes genéticas e expressão de circRNAs na COVID-19 ainda não foi explorado.

Entender os aspectos genéticos do hospedeiro são essenciais para investigar os fatores de risco e proteção envolvidos no desenvolvimento da COVID-19, e os estudos de expressão de eQTL são úteis para avaliar o impacto da variação da sequência de DNA em mudanças na expressão gênica, e isso pode contribuir para o entendimento de fatores envolvidos no desenvolvimento de doenças.

2 JUSTIFICATIVA

A pandemia da COVID-19 levou a investigações urgentes sobre essa doença, seu agente causador e sua interação com o hospedeiro humano. Contudo, as diversas vias fisiopatológicas envolvidas na progressão da doença e as sequelas da doença permanecem obscuras (AGGARWAL et al., 2021). As tecnologias baseadas em ômicas (genômica, transcriptômica, proteômica, interatômica e metabolômica) fornecem novos insights sobre essa complexa doença (AGGARWAL et al., 2021; YANG; YAN; ZHONG, 2021).

No entanto, como alterações genéticas do hospedeiro podem influenciar na infecção viral ou resposta imune e como os vírus modulam biogênese dos circRNAs do hospedeiro para facilitar sua replicação ainda não está completamente elucidado.

Polimorfismos em regiões responsáveis por processos biológicos como entrada viral e replicação podem ter impacto na infecção e influenciar o curso da COVID-19 (HOU et al., 2020).

Foi demonstrado que as funções do piRNAs são importantes para o processo de replicação do vírus, podendo potencialmente inibir a replicação viral (AKIMNIYAZOVA et al., 2022; RAKHMETULLINA et al., 2023)

Vários estudos também destacaram o papel de circRNAs como importantes reguladores da expressão gênica, através da atuação como esponjas de miRNA ou interagindo com RBPs em infecções virais, fornecendo novas perspectivas sobre interações vírus-hospedeiro envolvendo circRNAs, mRNAs cognatos e RBPs, no contexto de infecções pelo SARS-CoV-2 (LI et al., 2017; ARORA et al., 2020; BARBAGALLO et al., 2022; ZHANG et al., 2022b).

Esses achados esclarecem os papéis dos polimorfismos, de expressão de piRNAs e circRNAs nas interações vírus-hospedeiro, no curso da infecção e patogênese por SARS-CoV-2. Entretanto, poucas pesquisas analisaram o impacto de variantes relacionado com piRNAs ou circRNAs (JACOBS et al., 2016; RYAZANSKY et al., 2017; LIN et al., 2019; GUO et al., 2017; ZHANG et al., 2019; ZHAO; QU, 2020).

Estudos de eQTL de piRNAs e circRNAs sugeriram que polimorfismos associados com sua expressão podem modular os seus níveis e está relacionado com doenças (AHMED et al., 2019; LIN et al., 2019).

Estudos de eQTL com miRNAs e lncRNAs associado à COVID-19 já foram desenvolvidos (GJORGJEVA et al., 2023; LIU et al., 2022), mas até onde sabemos, em piRNAs ou circRNAs, essa abordagem ainda não foi investigada. Nesse sentido, apesar dos esforços em investigações de polimorfismos e expressão de piRNAs ou circRNAs, ainda não

foi analisado como circRNAs ou piRNAs em conjunto com alterações genéticas podem atuar sobre o genoma do SARS-CoV-2 e modular a resposta do hospedeiro ao vírus, e afetar a interação entre o SARS-CoV2 e o hospedeiro. Esse é o primeiro estudo a verificar esse tipo de mecanismo na COVID-19.

Estudos de análise do perfil de expressão gênica de piRNAs e circRNAs em associação com polimorfismos por meio de análises de eQTL podem esclarecer sobre as vias biológicas alteradas em doenças infecciosas, e contribuir para o entendimento de fatores biológicos relacionados com o desenvolvimento da COVID-19, permitindo uma maior compreensão dos mecanismos moleculares do hospedeiro em resposta à infecção por SARS-CoV-2.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar polimorfismos em regiões que codificam piRNAs e investigar o perfil de expressão global e padrão regulatório de eQTL de circRNAs, assim como sua associação com a COVID-19.

3.2 Objetivos específicos

Caracterizar e identificar polimorfismos descritos no 1000 *Genomes Project*, em regiões de piRNAs anotados no *pirBase*.

Identificar e descrever o perfil de expressão global dos circRNAs em amostras de *swab* e naso-orofaringe de pacientes com diagnóstico de COVID-19, classificados como assintomáticos, leves e graves, de uma população do estado do Pará.

Comparar o perfil de expressão dos circRNAs entre os três grupos de indivíduos com diagnóstico de COVID-19.

Realizar predições *in silico* dos miRNAs alvos dos circRNAs encontrados diferencialmente expressos na COVID-19, e através dos genes alvos dos miRNAs investigar as potenciais vias celulares em que estão envolvidos.

Investigar a associação entre polimorfismos e a progressão clínica da COVID-19.

Investigar a correlação entre variantes e o nível de expressão de cada circRNA associado com a COVID-19.

Investigar a correlação entre variantes e os genes parentais de cada circRNA associado com a COVID-19.

Identificar circRNAs e polimorfismos relacionados com a patogênese da COVID-19.

4 CAPÍTULO I

Este capítulo é referente ao Artigo “**Identification and Characterization of Polymorphisms in piRNA Regions**” publicado na revista *Currente Issues Molecular Biology* (Fator de impacto: 2.8).



Article

Identification and Characterization of Polymorphisms in piRNA Regions

José Roberto Sobrinho Lima ^{1,†}, Jhully Azevedo-Pinheiro ^{2,†}, Roberta Borges Andrade ^{1,2}, André Salim Khayat ¹ , Paulo Pimentel de Assumpção ¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,2}, Sidney Emanuel Batista dos Santos ^{1,2} and Fabiano Cordeiro Moreira ^{1,*}

1 Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO), Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-005, PA, Brazil; jsroberto.slima@gmail.com (J.R.S.L.); robertaborgesandrade@gmail.com (R.B.A.); khayatas@gmail.com (A.S.K.);

assumpcaopp@gmail.com (P.P.d.A.); akely@ufpa.br (Â.R.-d.-S.); sidneysantosufpa@gmail.com (S.E.B.d.S.)

2 Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; jhully.pinheiro@icb.ufpa.br

* Correspondence: fcmoreira@ufpa.br; Tel.: +55-091-98107-0858

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: piRNAs are a class of noncoding RNAs that perform functions in epigenetic regulation and silencing of transposable elements, a mechanism conserved among most mammals. At present, there are more than 30,000 known piRNAs in humans, of which more than 80% are derived from intergenic regions, and approximately 20% are derived from the introns and exons of pre-mRNAs. It was observed that the expression of the piRNA profile is specific in several organs, suggesting that they play functional roles in different tissues. In addition, some studies suggest that changes in regions that encode piRNAs may have an impact on their function. To evaluate the conservation of these regions and explore the existence of a seed region, SNP and INDEL variant rates were investigated in several genomic regions and compared to piRNA region variant rates. Thus, data analysis, data collection, cleaning, treatment, and exploration were implemented using the R programming language with the help of the RStudio platform. We found that piRNA regions are highly conserved after considering INDELs and do not seem to present an identifiable seed region after considering SNPs and INDEL variants. These findings may contribute to future studies attempting to determine how polymorphisms in piRNA regions can impact diseases.

Keywords: piRNA; polymorphisms; conservation



Citation: Lima, J.R.S.;

Azevedo-Pinheiro, J.; Andrade, R.B.;

Khayat, A.S.; Assumpção, P.P.d.;

Ribeiro-dos-Santos, Â.; Batista dos

Santos, S.E.; Moreira, F.C. Identification

and Characterization of Polymorphisms

in piRNA Regions. *Curr. Issues Mol. Biol.*

2022, *44*, 942–951.

<https://doi.org/10.3390/cimb44020062>

Academic Editor: Md Mehedi Hasan

Received: 13 December 2021

Accepted: 20 January 2022

Published: 15 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors.

Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This

article is an open access article

distributed under the terms and

conditions of the Creative Commons

Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), a large consortium project to map all functional elements in the human genome, has suggested that up to 80% of the genome is biologically active and functional with an essential role in controlling DNA expression and spatial organization of the genome [1–3]. This regulation is carried out by DNA sequences that are transcribed into noncoding RNA molecules [2]. Three major families of small noncoding RNAs (sncRNAs) in eukaryotic cells have been widely studied: microRNAs (miRNAs), interference RNAs (siRNAs), and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) [4].

piRNAs are a class of recently discovered sncRNAs that were described for the first time in germ cells [5–8] and identified later in somatic cells [9]. These sncRNAs have 24–31 nucleotides, interact with argonaute proteins of the PIWI subfamily, and form the PIWI–piRNA pathway, which plays roles in transcriptional and posttranscriptional silencing of transposable elements (TEs), epigenetic regulation, the maintenance of germ cell function, and the regulation of mRNA [9–11]. However, the most well-characterized piRNA function is TE silencing [11]. The silencing of TEs and other genetic elements in germlines,

at both the transcriptional and the posttranscriptional levels, is highly conserved across animal species [12,13].

There are over 30,000 piRNAs in humans, among which more than 80% are derived from intergenic regions, and approximately 20% are derived from introns and exons of pre-mRNAs [14,15].

These sncRNAs, like miRNAs, can act by inducing mRNA repression through imperfect base pairing [12,16,17]. The piRNA expression profile is tissue-specific suggesting that it has functional roles [18]. Additionally, genomic studies have revealed that piRNA expression is deregulated in several diseases, including cancer [19–21].

Recently, some studies have investigated genetic variations in piRNAs and have suggested that these polymorphisms may affect the risk of susceptibility to various types of cancer [19,22–24]. In this sense, it is noted that changes in genes encoding piRNAs can significantly impact their synthesis and functions.

The importance of piRNA as a regulatory molecule has been previously described. Thus, in this study, we used genomic data from the 1000 Genomes Project [25] and piR-Base [26] to analyze its conservation by analyzing single-nucleotide polymorphism (SNP) and insertion/deletion (INDEL) variation patterns, as approached by Bhattacharya and Cui [27] when analyzing miRNAs.

2. Materials and Methods

2.1. Data Acquisition

The genomic positions of the piRNAs were obtained from the annotation available in piRBase [26], the largest existing database on piRNA containing more than 77 million sequences [26].

The data were obtained from piRBase and the 1000 Genomes Project based on the same reference genome (GRCh37). The piRNA annotation file was extracted in BED format. BEDtools [28] was used to merge piRNAs colocalized in the annotation [29]. piRNAs were divided into two distinct groups: (i) low-repetition piRNAs (~3%)—those with three or fewer repetitions in the human genome; (ii) high repetition piRNAs (~97%)—those with more than three repetitions in the genome. In total, 600,960 piRNA genome positions were investigated.

2.2. Statistical Analysis

Data analysis of polymorphisms in piRNAs and conservation graphs of the piRNA regions were obtained with the statistical analysis software R [30]. The flanking and adjacent regions have the same piRNA length: flanking regions are located immediately alongside the 5' and 3' piRNA extremities, and adjacent regions are located 1000 bases away in both the 5' and the 3' directions. Variant SNPs and INDEL types were obtained from 2504 individuals sequenced by the 1000 Genomes Project [25]. To better understand piRNA region conservation within the human genome, we compared the variation rate of piRNA regions against different genomic regions, such as miRNA, exonic, and intronic/intergenic (non-exonic) regions. Lastly, our analysis included the study of variations among the piRNAs' nucleotide sequences.

The Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons was used to compare variation rates among piRNAs and other genomic regions, such as miRNAs, as well as exonic and non-exonic regions, in addition to piRNAs' adjacent and flanking regions (the value n for each region is 24 due to the number of chromosomes); this method was also used to compare variation rates among chromosomes on each piRNA's nucleotide position (the value n for each position is the number of piRNAs, which varies from 821,929 to 368,387 due to their differences in size). This specific statistical approach is suitable because more than three variables are compared in our analysis and because nonparametric tests provide reliable results even when the data and samples do not follow the assumptions of normality.

The libraries *vcfR* [31] and *VariantAnnotation* [32] were used in the R platform to quantify variations in piRNA nucleotides. Similar methods and R libraries were applied to quantify the miRNAs and the exonic and non-exonic variations.

3. Results

We identified 583,680 variants among 2504 samples from the 1000 Genomes Project in 360,202 piRNA locations (59.94% of piRNAs), of which 98.59% (575,447) were SNPs and 1.41% (8,233) were INDELs. Approximately 40% of the investigated piRNAs did not have any variants in all samples.

Upon analyzing piRNA region variation frequency by chromosome, there was no significant difference among them (95% confidence), except for the sex chromosomes. On the X chromosome, 51.77% of the piRNA regions had at least one SNP, while only 5.54% on the Y chromosome harbored genetic variations. Similar results were obtained for INDELs; the X chromosome presented a rate of 1.92%, and no such variant was found on the Y chromosome.

In order to analyze the conservation of piRNA regions, we compared it with other regions with better known conservation degrees (miRNAs, exonic, and non-exonic). When comparing SNP rates in piRNA with different genomic regions, there were significant differences in comparison to miRNAs (adjusted p -value = 2.054999×10^4) and exonic (adjusted p -value = 1.790354×10^7) but not in those from non-exonic regions (adjusted p -value = 5.005757×10^1) (Figure 1a and Supplementary Tables S1 and S2).

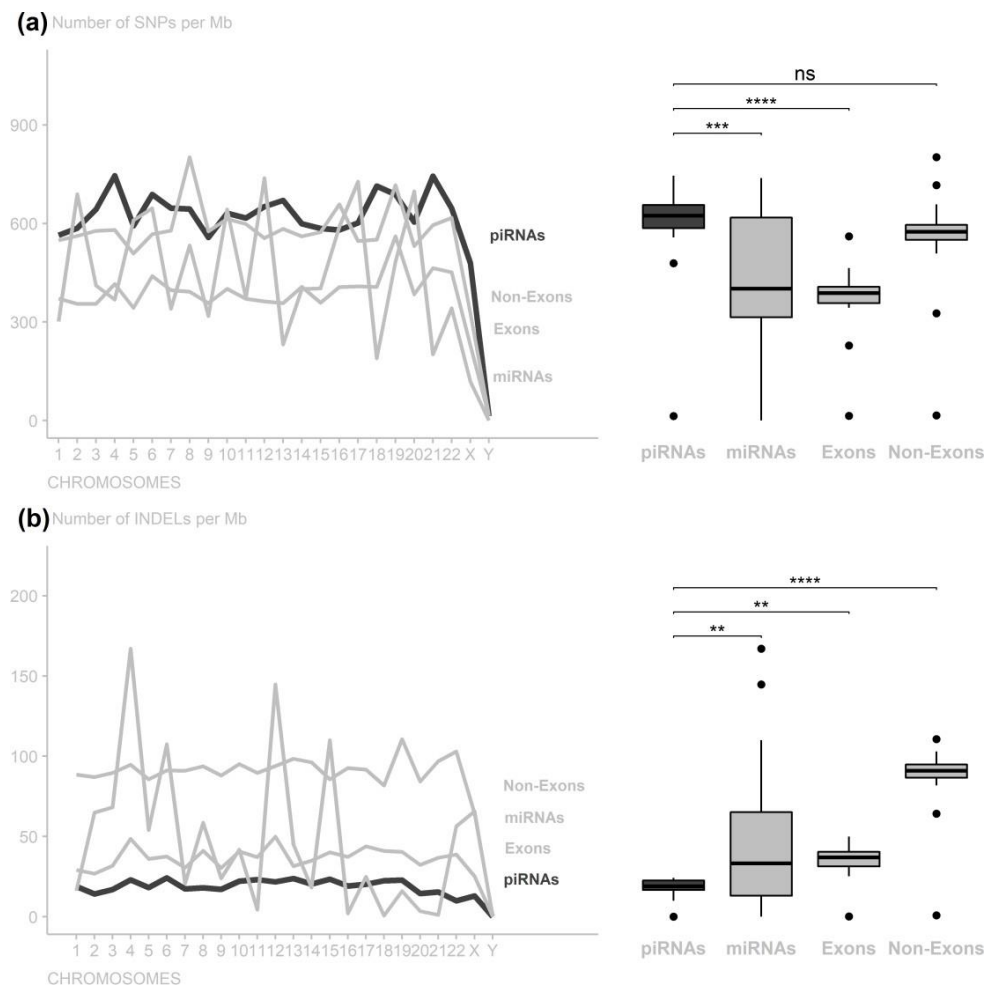


Figure 1. Number of variants per 1,000,000 nucleotides along the chromosomes per genomic region. (a) piRNA regions have low conservation compared to exonic and miRNA regions, despite greater

miRNA variance, without a significant difference from non-exonic regions. (b) piRNA regions are as conserved as exonic regions, with conservation level close to that of miRNA regions (ns: nonsignificant; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001; **** p -value < 0.0001).

According to the INDEL rate, the piRNA regions significantly differed from the miRNA regions (adjusted p -value = 1.986334×10^2) but did not differ from the exonic regions (adjusted p -value = 2.174223×10^1). The exon INDEL rates also did not differ from the miRNA regions (adjusted p -value = 2.174223×10^1). Additionally, the piRNA, miRNA, and exonic rates differed from those in the non-exonic regions (adjusted p -values = 1.786511×10^4 , 9.627623×10^{10} , and 7.760338×10^7 , respectively) (Figure 1b and Supplementary Tables S3 and S4).

We also compared piRNA region variations with their flanking (5' and 3' extremities) and adjacent regions (± 1000 nt), and it was possible to notice for INDELs that piRNA regions presented significant differences compared to the 5' flanking regions (adjusted p -value = 3.897142×10^2), 3' flanking regions (adjusted p -value = 1.120359×10^8), and adjacent regions (-1000 nt with adjusted p -value = 3.569849×10^{11} and $+1000$ nt with adjusted p -value = 2.272380×10^{11}) (Figure 2 and Supplementary Tables S5 and S6).

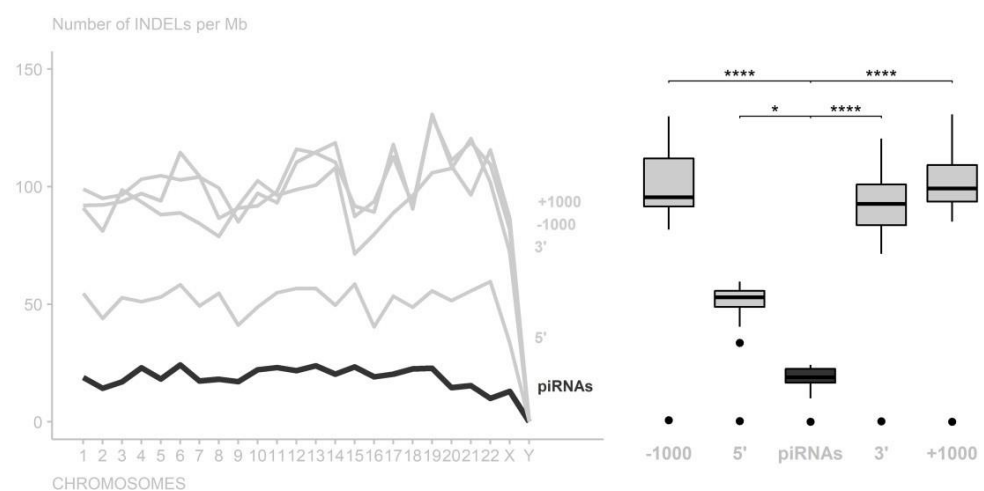


Figure 2. Number of INDELs per 1,000,000 nucleotides in the piRNA regions among their flanking and adjacent regions. In all chromosomes, the piRNAs had the highest conservation level (* p -value < 0.05; **** p -value < 0.0001).

To verify the presence of a seed region in the piRNA sequences, we analyzed variation rates in piRNAs per chromosome and nucleotide position, and it was not possible to identify outstanding regions, only isolated nucleotide positions. For SNP variants, position 4 was the most conserved, whereas positions 1, 2, and 7 were less conserved. For INDEL polymorphisms, otherwise, no position was highlighted as more conserved; however, positions 1, 31, and 32 presented higher variation rates (Figure 3 and Supplementary Tables S7 and S8). These INDEL variations may be biases due to cloning artefacts and/or non-templated nucleotides at these positions. Additionally, the variation in piRNA size may affect the mutation rates of the last few nucleotides. These results suggest that there is no specific region of piRNA that stands out as a seed region. However, there were nucleotide preferences: U in the first position (79%), G in the second (46%), and A in the 10th (33%) (Figure 4 and Supplementary Tables S7 and S8).

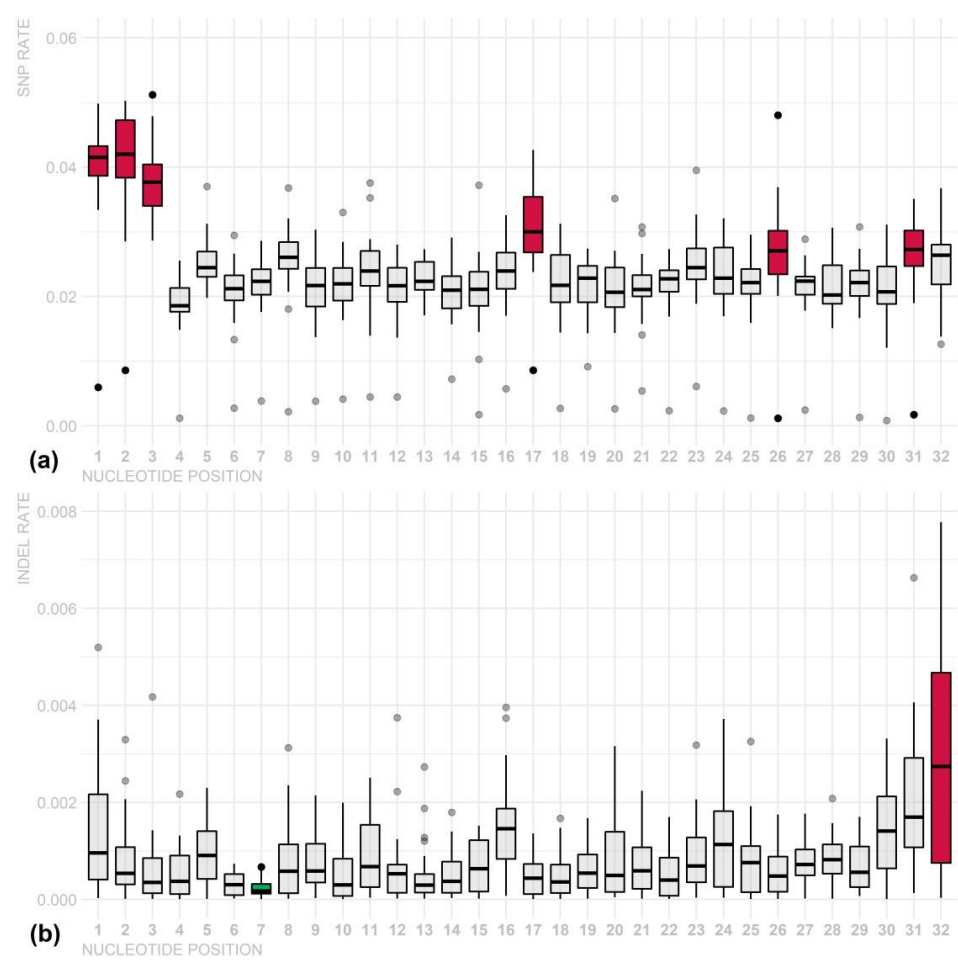


Figure 3. SNP (a) and INDEL (b) variation rates in piRNA regions per chromosome and nucleotide. Less conserved nucleotides are shown in red, and more conserved nucleotides are shown in blue. Although there were significant differences among some nucleotides (p -value < 0.05), this result suggests that there is no specific region of piRNA that stands out as a seed region.

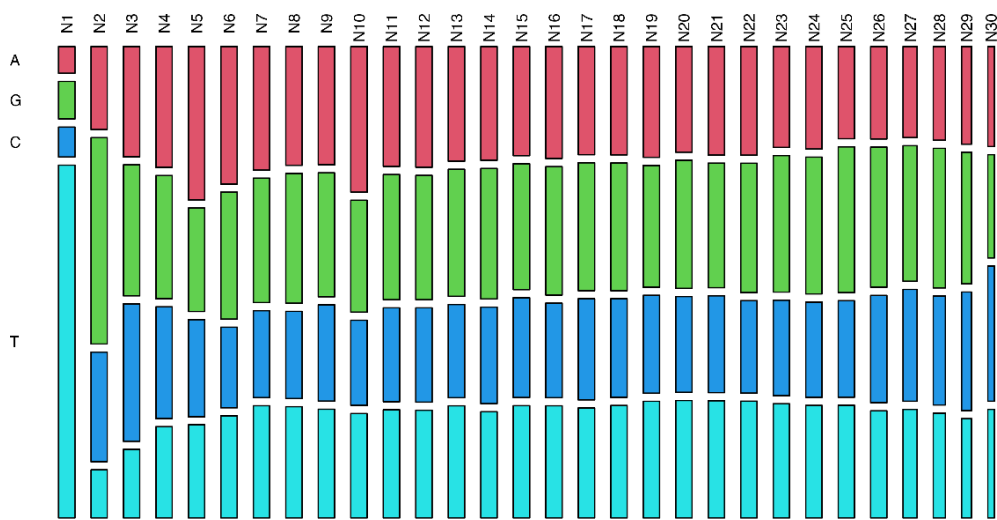


Figure 4. Frequency of each nucleotide base along with piRNA transcripts. The analyzed distribution of the nucleotides by position showed a preference for base U in the first position (79%), G in the second position (46%), and base A in the 10th position (33%).

4. Discussion

It was observed that the Y chromosome presents different behaviors than the other chromosomes in several aspects due to its unique properties, which involve male specificity, haploidy, and structure predominantly averse to the crossing over phenomenon [33]. There are two types of regions on the Y chromosome with different conservation behaviors: the male-specific region of the Y (MSY) and the pseudoautosomal regions (PAR1 and PAR2) [33,34]. MSY has high variant rates compared to other autosomal chromosomes; however, the PAR1 and PAR2 regions have a very low density of SNPs and almost no INDEL variation since they cause male sterility [35,36]. Therefore, the low rates of SNPs and especially INDEL variants in Y chromosome piRNAs indicate that these changes may result in critical functional changes in cell physiology.

Investigating all of the other chromosome SNP variation rates and comparing them among different genomic structures, the piRNA regions were found to be less conserved in both the exonic and the miRNA regions, and the non-exonic regions did not present different conservation levels when compared to the piRNA regions. Upon observing the INDEL variations, however, no significant differences were observed when compared to the exonic region, and the piRNA regions suggested less conserved structures than the miRNAs and more conserved structures than the non-exonic regions.

The divergent behavior of SNP and INDEL variation rates in the piRNA regions suggested that it has a structure that is more permissible for SNP-type polymorphisms, indicating that these variants have little influence on the function of these structures. For INDEL polymorphisms, however, piRNA regions have a low variation rate, similar to the miRNA regions rate values. The effect of INDELs on miRNAs has been proven to have a significant impact [27], and, similar to piRNAs, these data also indicate a potentially harmful behavior on their functional role.

Concerning INDEL variants, in general, piRNAs, miRNAs, and exonic regions are more conserved, tending to preserve the original structure to avoid loss or deregulation of their function. These observations may suggest that there is selective pressure against genetic variations in piRNAs, mainly because INDEL polymorphisms possibly have more impact than SNPs [37,38] since substitution of a base probably does not interfere with the regulatory function of piRNA, as pairing with the target region does not need to be perfect [12].

The piRNA nucleotide structure is characterized by one U at the 5' end, and this nucleotide is needed for PIWI recognition protein and endonucleolytic cleavage by Zucchini protein (which acts in piRNA processing) [39,40]. In addition, studies have demonstrated that three proteins can bind to the piRNA: PIWI, AUB, and AGO3; PIWI is more frequently involved, and AUB and AGO3 bind less often. PIWI- and AUB-bound RNAs have a strong preference for a 5' end uridine, a trend that is not present in AGO3-bound piRNAs. AUB pairs to its target mRNA and induces cleavage, generating piRNA with A at position 10 that is recognized by AGO3, since this piRNA that binds to AGO3 has enrichment for A, the complement of the 5' U, at position 1 present in piRNAs that bind to AUB [39–42].

Additionally, the G base in the second position was also identified by Gebert and Ketting [43], which suggests a conserved role of the Piwi/piRNA pathway in posttranscriptional regulation in mammals. These findings agree with our results; the distribution of nucleotides showed a preference of base U in the first position, base A in the 10th position, and base G in the second position.

One of the regulatory mechanisms described for piRNA is posttranscriptional silencing by pairing in the 3' UTR of mRNAs, similar to the miRNA acting model [16]. Saunders and colleagues [44] were the first to observe a low-level gene variation in miRNAs, especially mature miRNAs and their seed regions, compared to surrounding regions. In miRNAs, the seed region is predominantly defined as falling between the second and eighth bases, counted from the 5' end of the structure [45].

Thus, to investigate the rules adjacent to target piRNA binding, specific and nonspecific sequence-based functions have been proposed. Zhang and colleagues [46], researching

the role of piRNAs in *Caenorhabditis elegans*, found results that reinforce specific sequence binding, giving a region between the second and seventh nucleotides a critical role in pairing with the target region. This is precisely the role of the seed in miRNAs, showing a possible similarity in both structures' target-specific mechanisms. However, it should be noted that the non-seed region would also be necessary for the recognition function, although it is more permissive to alterations. The non-seed region allows for some variations (at most three) to occur with no interference with its function, whereas the seed region is not permissive, completely misrepresenting the recognition function if a single variation occurs in this region.

Analyzing Figure 3, we observed that there is no region in the piRNA sequences that can be considered a seed sequence, including the one defined by Zhang and colleagues [46]. This may indicate that all the piRNA sequence is equally essential for interacting with their target sites. Our findings could not identify any more conserved position; however, it showed some particular nucleotides with significantly higher INDEL variation rates at positions 1, 31, and 32, which can be explained by the tolerance of a few modifications of piRNA sequences already described in the literature [46,47].

on this matter, Rojas-Ríos and Simonelig [48] proposed that it needs a perfect match. Several studies suggest a seed region in piRNAs, although there is little consensus. nucleotides 2–11 and fewer than five mismatches at nucleotides 12–21, whereas Shen and colleagues [47], studying *C. elegans*, proposed that the seed sequence (i.e., positions 2–8) and supplemental nucleotides near the 3' end (positions 14–19) of the piRNA are important determinants of piRNA target binding and silencing. In addition, our results corroborate the findings of Vourekas and colleagues [49]; base-paired piRNAs in *Drosophila melanogaster* revealed a preference to utilize nucleotides at positions 2–6 with additional base pairs at positions 16–24, and this suggests that piRNAs do not utilize a conserved seed sequence, although the mechanics of piRNA complementary binding are analogous to those of microRNAs.

The performed analysis has some possible biases since the 1000 Genomes Project data have low coverage in intronic and intergenic regions, which may alter some mutation rates identified in the piRNA regions; nevertheless, we believe that the sample size (2504 samples) is large enough to minimize this bias. Another limitation is that we inferred conservation on the basis of mutation rates rather than comparing species. However, we believe that our approach allows robust results since INDEL- and SNP-type polymorphisms in all regions of piRNAs were investigated and compared with all other genomic regions.

Analyzing the conservation of piRNA regions considering the polymorphism rate and the presence of a seed region in mature piRNA sequence allowed us to infer the impact of variants on the piRNA sequence. This allows directing analyses that investigate how the pairing of piRNAs to the transcript occurs since it may not have a specific pairing region, thus recognizing different transcripts and amplifying their functional effect on epigenetic regulation. Furthermore, studies like this help elucidate issues related to the structure of piRNAs and their genomic region, contributing to understanding their biology and function.

5. Conclusions

In general, it was observed that piRNA regions have higher conservation for INDEL variants and lower conservation for SNP variants relative to exonic regions. This suggests that piRNA regions are more permissive to SNP variations and less permissive to INDEL variations, indicating that SNPs may have little effect on piRNA regular activity, and that INDELs may have a significant impact on its structure and functions. Analysis of the surrounding regions indicated that piRNA regions were more conserved than the flanking and adjacent regions (± 1000 nt). In addition, in this study, the Y chromosome presented unique conservation patterns as compared to the other chromosomes.

Lastly, our analyses suggest that there is no specific region of piRNA that can be considered a seed, as occurs in miRNAs, since the conservation degree of piRNAs as a

whole did not allow for highlighting a more conserved region or a specific genomic position. This may imply that the entire structure of piRNAs, allowing for a few modifications, is important for them to carry out their roles in regulating gene expression. However, further studies are needed to examine the effects of variants on piRNA function.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cimb44020062/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, F.C.M., J.R.S.L., J.A.-P. and S.E.B.d.S.; data curation, F.C.M., J.R.S.L., J.A.-P. and S.E.B.d.S.; formal analysis, F.C.M., J.R.S.L., J.A.-P. and S.E.B.d.S.; investigation, F.C.M. and S.E.B.d.S.; resources, Á.R.-d.-S. and S.E.B.d.S.; supervision, F.C.M. and J.R.S.L.; validation, F.C.M. and S.E.B.d.S.; writing—original draft, F.C.M. and S.E.B.d.S.; writing—review and editing, F.C.M., J.R.S.L., J.A.-P., R.B.A., A.S.K., P.P.d.A., Á.R.-d.-S. and S.E.B.d.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: We acknowledge funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA).

Data Availability Statement: All data analyzed were obtained from piRBase and the 1000 Genomes Project based on the same reference genome (GRCh37). Annotations available in piRBase were used to describe genomic positions of the piRNAs. The piRNA annotation file was extracted in BED format. BEDtools was used to merge piRNAs colocalized in the annotation. Variant SNPs and INDEL types were obtained from 2504 individuals sequenced by the 1000 Genomes Project.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eddy, S.R. The ENCODE project: Steps overshadowing a success. *CURBIO* **2013**, *23*, R259–R261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wang, J.; Samuels, D.; Zhao, S.; Xiang, Y.; Zhao, Y.; Guo, Y. Current Research on Non-Coding Ribonucleic Acid (RNA). *Genes* **2017**, *8*, 366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Rands, C.M.; Meader, S.; Ponting, C.P.; Lunter, G. 8.2% of the Human Genome Is Constrained: Variation in Rates of Turnover across Functional Element Classes in the Human Lineage. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Mei, Y.; Clark, D.; Mao, L. Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer Lett.* **2013**, *336*, 46–52. [[CrossRef](#)]
5. Aravin, A.A.; Lagos-Quintana, M.; Yalcin, A.; Zavolan, M.; Marks, D.; Snyder, B.; Gaasterland, T.; Meyer, J.; Tuschl, T. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. *Dev. Cell* **2003**, *5*, 337–350. [[CrossRef](#)]
6. Aravin, A.; Gaidatzis, D.; Pfeffer, S.; Lagos-Quintana, M.; Landgraf, P.; Iovino, N.; Morris, P.; Brownstein, M.J.; Kuramochi- Miyagawa, S.; Nakano, T.; et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **2006**, *442*, 203–207. [[CrossRef](#)]
7. Girard, A.; Sachidanandam, R.; Hannon, G.J.; Carmell, M.A. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* **2006**, *442*, 199–202. [[CrossRef](#)]
8. Grivna, S.T.; Beyret, E.; Wang, Z.; Lin, H. (2006) A novel class of small RNAs in the mouse permatogenic cells.pdf. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 1709–1714. [[CrossRef](#)]
9. Ross, R.J.; Weiner, M.M.; Lin, H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature* **2014**, *505*, 353–359. [[CrossRef](#)]
10. Li, P. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 5411. [[CrossRef](#)]
11. Weick, E.-M.; Miska, E.A. piRNAs: From biogenesis to function. *Development* **2014**, *141*, 3458–3471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Siomi, M.C.; Sato, K.; Pezic, D.; Aravin, A.A. PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 246–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Romano, G.; Veneziano, D.; Acunzo, M.; Croce, C.M. Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis* **2017**, *38*, 485–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fu, Q.; Wang, P.J. Mammalian piRNAs. *Spermatogenesis* **2014**, *4*, e27889. [[CrossRef](#)]
15. Ponnusamy, M.; Yan, K.; Liu, C.; Li, P.; Wang, K. European Journal of Cell Biology PIWI family emerging as a decisive factor of cell fate: An overview. *Eur. J. Cell Biol.* **2017**, *96*, 746–757. [[CrossRef](#)]
16. Gou, L.-T.; Dai, P.; Yang, J.-H.; Xue, Y.; Hu, Y.-P.; Zhou, Y.; Kang, J.-Y.; Wang, X.; Li, H.; Hua, M.-M.; et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res.* **2014**, *24*, 680–700. [[CrossRef](#)]
17. Goh, W.S.S.; Falcatori, I.; Tam, O.H.; Burgess, R.; Meikar, O.; Kotaja, N.; Hammell, M.; Hannon, G.J. PiRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 1032–1044. [[CrossRef](#)]

18. Martinez, V.D.; Vucic, E.A.; Thu, K.L.; Hubaux, R.; Enfield, K.S.S.; Pikor, L.A.; Becker-Santos, D.D.; Brown, C.J.; Lam, S.; Lam, W.L. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10423. [\[CrossRef\]](#)
19. Cheng, J.; Guo, J.-M.; Xiao, B.-X.; Miao, Y.; Jiang, Z.; Zhou, H.; Li, Q.-N. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin. Chim. Acta* **2011**, *412*, 1621–1625. [\[CrossRef\]](#)
20. Firmino, N.; Martinez, V.D.; Rowbotham, D.A.; Enfield, K.S.S.; Bennewith, K.L.; Lam, W.L. HPV status is associated with altered PIWI-interacting RNA expression pattern in head and neck cancer. *Oral Oncol.* **2016**, *55*, 43–48. [\[CrossRef\]](#)
21. Singh, G.; Roy, J.; Rout, P.; Mallick, B. Genome-wide profiling of the PIWI-interacting RNA-mRNA regulatory networks in epithelial ovarian cancers. *PLoS ONE* **2018**, *13*, 1–24. [\[CrossRef\]](#)
22. Chu, H.; Xia, L.; Qiu, X.; Gu, D.; Zhu, L.; Jin, J.; Hui, G.; Hua, Q.; Du, M.; Tong, N.; et al. Genetic variants in noncoding PIWI-interacting RNA and colorectal cancer risk. *Cancer* **2015**, *121*, 2044–2052. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Fu, A.; Jacobs, D.I.; Hoffman, A.E.; Zheng, T.; Zhu, Y. PIWI-interacting RNA 021285 is involved in breast tumorigenesis possibly by remodeling the cancer epigenome. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1094–1102. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Jacobs, D.I.; Qin, Q.; Lerro, M.C.; Fu, A.; Dubrow, R.; Claus, E.B.; DeWan, A.T.; Wang, G.; Lin, H.; Zhu, Y. PIWI-interacting RNAs in gliomagenesis: Evidence from post-GWAS and functional analyses. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **2016**, *25*, 1073–1080. [\[CrossRef\]](#)
25. Sudmant, P.H.; Rausch, T.; Gardner, E.J.; Handsaker, R.E.; Abyzov, A.; Huddleston, J.; Zhang, Y.; Ye, K.; Jun, G.; Hsi-Yang Fritz, M.; et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* **2015**, *526*, 75–81. [\[CrossRef\]](#)
26. Zhang, P.; Si, X.; Skogerbø, G.; Wang, J.; Cui, D.; Li, Y.; Sun, X.; Liu, L.; Sun, B.; Chen, R.; et al. piRBase: A web resource assisting piRNA functional study. *Database* **2014**, *2014*, bau110. [\[CrossRef\]](#)
27. Bhattacharya, A.; Ziebarth, J.D.; Cui, Y. Systematic Analysis of microRNA Targeting Impacted by Small Insertions and Deletions in Human Genome. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46176. [\[CrossRef\]](#)
28. Quinlan, A.R.; Hall, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 841–842. [\[CrossRef\]](#)
29. Calcagno, Q.; da Silva Mota, E.R.; Moreira, F.C.; de Sousa, S.B.M.; Burbano, R.R.; Assumpção, P.P. Role of PIWI-Interacting RNA (piRNA) as Epigenetic Regulation. In *Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*; Springer International Publisher: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; pp. 1–23.
30. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2018.
31. Knaus, B.J.; Grünwald, N.J. vcfr: A package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Mol. Ecol. Resour.* **2017**, *17*, 44–53. [\[CrossRef\]](#)
32. Obenchain, V.; Lawrence, M.; Carey, V.; Gogarten, S.; Shannon, P.; Morgan, M. VariantAnnotation: A Bioconductor package for exploration and annotation of genetic variants. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2076–2078. [\[CrossRef\]](#)
33. Jobling, M.A.; Tyler-Smith, C. Human Y-chromosome variation in the genome-sequencing era. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 485–497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Xue, Y.; Wang, Q.; Long, Q.; Ng, B.L.; Swerdlow, H.; Burton, J.; Tyler-Smith, C. Human Y Chromosome Base-Substitution Mutation Rate Measured by Direct Sequencing in a Deep-Rooting Pedigree. *Curr. Biol.* **2009**, *19*, 1453–1457. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Hinch, A.G.; Altemose, N.; Noor, N.; Donnelly, P.; Myers, S.R. Recombination in the Human Pseudoautosomal Region PAR1. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Mohandas, T.K.; Speed, R.M.; Passage, M.B.; Yen, P.H.; Chandley, A.C.; Shapiro, L.J. Role of the pseudoautosomal region in sex-chromosome pairing during male meiosis: Meiotic studies in a man with a deletion of distal Xp. *Am. J. Hum. Genet.* **1992**, *51*, 526–533.
37. Montgomery, S.B.; Goode, D.L.; Kvikstad, E.; Albers, C.A.; Zhang, Z.D.; Mu, X.J.; Ananda, G.; Howie, B.; Karczewski, K.J.; Smith, K.S.; et al. The origin, evolution, and functional impact of short insertion-deletion variants identified in 179 human genomes. *Genome Res.* **2013**, *23*, 749–761. [\[CrossRef\]](#)
38. Clark, T.G.; Andrew, T.; Cooper, G.M.; Margulies, E.H.; Mullikin, J.C.; Balding, D.J. Functional constraint and small insertions and deletions in the ENCODE regions of the human genome. *Genome Biol.* **2007**, *8*, 1–14. [\[CrossRef\]](#)
39. Brennecke, J.; Aravin, A.A.; Stark, A.; Dus, M.; Kellis, M.; Sachidanandam, R.; Hannon, G.J. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila. *Cell* **2007**, *128*, 1089–1103. [\[CrossRef\]](#)
40. Ozata, D.M.; Gainetdinov, I.; Zoch, A.; O'Carroll, D.; Zamore, P.D. PIWI-interacting RNAs: Small RNAs with big functions. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, 89–108. [\[CrossRef\]](#)
41. Nishimasu, H.; Ishizu, H.; Saito, K.; Fukuhara, S.; Kamatani, M.K.; Bonnefond, L.; Matsumoto, N.; Nishizawa, T.; Nakanaga, K.; Aoki, J.; et al. Structure and function of Zucchini endoribonuclease in piRNA biogenesis. *Nature* **2012**, *491*, 284–287. [\[CrossRef\]](#)
42. Wang, W.; Yoshikawa, M.; Han, B.W.; Izumi, N.; Tomari, Y.; Weng, Z.; Zamore, P.D. The Initial Uridine of Primary piRNAs Does Not Create the Tenth Adenine that Is the Hallmark of Secondary piRNAs. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 708–716. [\[CrossRef\]](#)
43. Gebert, D.; Ketting, R.F.; Zischler, H.; Rosenkranz, D. piRNAs from Pig Testis Provide Evidence for a Conserved Role of the Piwi Pathway in Post-Transcriptional Gene Regulation in Mammals. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0124860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Saunders, M.A.; Liang, H.; Li, W.-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 3300–3305. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. MacFarlane, L.-A.; Murphy, P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genom.* **2010**, *11*, 537–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zhang, D.; Tu, S.; Stubna, M.; Wu, W.-S.; Huang, W.-C.; Weng, Z.; Lee, H.-C. The piRNA targeting rules and the resistance to piRNA silencing in endogenous genes. *Science* **2018**, *359*, 587–592. [[CrossRef](#)]
47. Shen, E.-Z.; Chen, H.; Ozturk, A.R.; Tu, S.; Shirayama, M.; Tang, W.; Ding, Y.-H.; Dai, S.-Y.; Weng, Z.; Mello, C.C. Identification of piRNA Binding Sites Reveals the Argonaute Regulatory Landscape of the *C. elegans* Germline. *Cell* **2018**, *172*, 937–951.e18. [[CrossRef](#)]
48. Rojas-Ríos, P.; Simonelig, M. piRNAs and PIWI proteins: Regulators of gene expression in development and stem cells. *Development* **2018**, *145*, dev161786. [[CrossRef](#)]
49. Vourekas, A.; Alexiou, P.; Vrettos, N.; Maragkakis, M.; Mourelatos, Z. Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm. *Nature* **2016**, *531*, 390–394. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials:

Supplementary Table S1. SNP rates per chromosome and genomic structure.

Chrom	Type	piRNAs	miRNAs	Exons	Non-Exons
1	SNP	5.643e-04	3.016e-04	3.715e-04	5.487e-04
2	SNP	5.859e-04	6.888e-04	3.553e-04	5.624e-04
3	SNP	6.426e-04	4.112e-04	3.551e-04	5.775e-04
4	SNP	7.453e-04	3.679e-04	4.156e-04	5.804e-04
5	SNP	5.933e-04	6.097e-04	3.433e-04	5.084e-04
6	SNP	6.883e-04	6.458e-04	4.397e-04	5.673e-04
7	SNP	6.467e-04	3.408e-04	3.971e-04	5.782e-04
8	SNP	6.440e-04	5.335e-04	3.921e-04	8.016e-04
9	SNP	5.576e-04	3.182e-04	3.571e-04	5.764e-04
10	SNP	6.310e-04	6.429e-04	4.010e-04	6.141e-04
11	SNP	6.166e-04	3.726e-04	3.710e-04	5.986e-04
12	SNP	6.513e-04	7.381e-04	3.628e-04	5.554e-04
13	SNP	6.702e-04	2.320e-04	3.577e-04	5.839e-04
14	SNP	5.988e-04	4.005e-04	4.068e-04	5.608e-04
15	SNP	5.847e-04	4.022e-04	3.587e-04	5.734e-04
16	SNP	5.802e-04	5.899e-04	4.065e-04	6.580e-04
17	SNP	6.017e-04	7.270e-04	4.082e-04	5.466e-04
18	SNP	7.138e-04	1.897e-04	4.068e-04	5.506e-04
19	SNP	6.887e-04	4.832e-04	5.610e-04	7.169e-04
20	SNP	6.044e-04	6.978e-04	3.840e-04	5.313e-04
21	SNP	7.440e-04	2.017e-04	4.639e-04	5.951e-04
22	SNP	6.459e-04	3.420e-04	4.514e-04	6.170e-04
X	SNP	4.787e-04	1.182e-04	2.287e-04	3.264e-04
Y	SNP	1.350e-05	0.000e+00	1.432e-05	1.527e-05

Supplementary Table S2. Pairwise comparisons of INDEL rates in piRNA, miRNA, exonic and non-exonic regions.

Group 1	Group 2	p-value adjusted	p-value adjusted significant
piRNAs	miRNAs	3.518e-04	***
piRNAs	Exons	2.116e-07	***
piRNAs	Non-Exons	8.922e-02	ns
miRNAs	Exons	8.922e-02	ns
miRNAs	Non-Exons	6.028e-02	ns
Exons	Non-Exons	3.518e-04	***

Dunn's-test for multiple comparisons of independent samples and p-values adjusted by Benjamini-Hochberg's method.

Supplementary Table S3. INDEL rates per chromosome and genomic structure.

Chrom	Type	piRNAs	miRNAs	Exons	Non-Exons
1	INDEL	1.885e-05	1.619e-05	2.909e-05	8.857e-05
2	INDEL	1.424e-05	6.495e-05	2.687e-05	8.699e-05
3	INDEL	1.698e-05	6.817e-05	3.171e-05	8.955e-05
4	INDEL	2.301e-05	1.670e-04	4.857e-05	9.467e-05
5	INDEL	1.822e-05	5.400e-05	3.599e-05	8.559e-05
6	INDEL	2.417e-05	1.075e-04	3.751e-05	9.108e-05
7	INDEL	1.738e-05	2.067e-05	3.054e-05	9.094e-05
8	INDEL	1.806e-05	5.851e-05	4.110e-05	9.376e-05
9	INDEL	1.704e-05	2.400e-05	3.036e-05	8.794e-05
10	INDEL	2.215e-05	4.178e-05	4.069e-05	9.512e-05
11	INDEL	2.306e-05	4.439e-06	3.716e-05	8.955e-05
12	INDEL	2.176e-05	1.447e-04	4.986e-05	9.393e-05
13	INDEL	2.380e-05	4.502e-05	3.154e-05	9.839e-05
14	INDEL	2.030e-05	1.822e-05	3.499e-05	9.615e-05
15	INDEL	2.335e-05	1.099e-04	4.012e-05	8.564e-05
16	INDEL	1.909e-05	2.120e-06	3.722e-05	9.262e-05
17	INDEL	2.023e-05	2.484e-05	4.390e-05	9.167e-05
18	INDEL	2.246e-05	7.073e-07	4.094e-05	8.173e-05
19	INDEL	2.277e-05	1.589e-05	4.040e-05	1.106e-04
20	INDEL	1.452e-05	3.408e-06	3.227e-05	8.429e-05
21	INDEL	1.542e-05	1.099e-06	3.672e-05	9.691e-05
22	INDEL	9.950e-06	5.640e-05	3.878e-05	1.029e-04
X	INDEL	1.290e-05	6.570e-05	2.521e-05	6.413e-05
Y	INDEL	0.000e+00	0.000e+00	1.929e-07	8.731e-07

Supplementary Table S4. Pairwise comparisons of INDEL rates in piRNA, miRNA, exonic and non-exonic regions.

Group 1	Group 2	p-value adjusted	p-value adjusted significant
-1000	5'	5.839e-06	****
-1000	piRNAs	2.912e-11	****
-1000	3'	3.077e-01	ns
-1000	+1000	8.259e-01	ns
5'	piRNAs	3.897e-02	*
5'	3'	5.527e-04	***
5'	+1000	2.441e-06	****
piRNAs	3'	2.254e-08	****
piRNAs	+1000	1.214e-11	****
3'	+1000	2.390e-01	ns
Dunn's-test for multiple comparisons of independent samples and p-values adjusted by Benjamini-Hochberg's method.			

Supplementary Table S5. INDEL rates in piRNA, flanking and adjacent regions.

Chrom	Type	-1000	5'	piRNAs	3'	+1000
chr1	INDEL	9.205e-05	5.461e-05	1.885e-05	9.092e-05	9.893e-05
chr2	INDEL	9.222e-05	4.393e-05	1.424e-05	8.117e-05	9.506e-05
chr3	INDEL	9.359e-05	5.279e-05	1.698e-05	9.861e-05	9.647e-05
chr4	INDEL	9.706e-05	5.104e-05	2.301e-05	9.353e-05	1.032e-04
chr5	INDEL	9.399e-05	5.302e-05	1.822e-05	8.813e-05	1.047e-04
chr6	INDEL	1.145e-04	5.829e-05	2.417e-05	8.883e-05	1.029e-04
chr7	INDEL	1.045e-04	4.928e-05	1.738e-05	8.438e-05	1.041e-04
chr8	INDEL	8.657e-05	5.466e-05	1.806e-05	7.885e-05	9.947e-05
chr9	INDEL	9.092e-05	4.113e-05	1.704e-05	9.181e-05	8.509e-05
chr10	INDEL	9.184e-05	4.882e-05	2.215e-05	1.025e-04	9.719e-05
chr11	INDEL	9.804e-05	5.494e-05	2.306e-05	9.637e-05	9.316e-05
chr12	INDEL	1.159e-04	5.666e-05	2.176e-05	9.877e-05	1.104e-04
chr13	INDEL	1.143e-04	5.670e-05	2.380e-05	1.006e-04	1.147e-04
chr14	INDEL	1.104e-04	4.953e-05	2.030e-05	1.079e-04	1.186e-04
chr15	INDEL	9.175e-05	5.859e-05	2.335e-05	7.138e-05	8.737e-05
chr16	INDEL	8.921e-05	4.041e-05	1.909e-05	7.978e-05	9.375e-05
chr17	INDEL	1.180e-04	5.343e-05	2.023e-05	8.881e-05	1.127e-04
chr18	INDEL	9.056e-05	4.875e-05	2.246e-05	9.615e-05	9.224e-05
chr19	INDEL	1.299e-04	5.562e-05	2.277e-05	1.059e-04	1.307e-04
chr20	INDEL	1.112e-04	5.155e-05	1.452e-05	1.078e-04	1.087e-04
chr21	INDEL	1.188e-04	5.567e-05	1.542e-05	1.204e-04	9.656e-05
chr22	INDEL	1.094e-04	5.957e-05	9.950e-06	1.018e-04	1.157e-04
chrX	INDEL	8.168e-05	3.353e-05	1.290e-05	7.219e-05	8.648e-05
chrY	INDEL	6.633e-07	3.078e-07	0.000e+00	2.487e-07	2.956e-08

Supplementary Table S6. Pairwise comparisons of INDEL rates in piRNA, flanking and adjacent regions.

Group 1	Group 2	p-value adjusted	p-value adjusted significant
-1000	5'	5.839e-06	****
-1000	piRNAs	2.912e-11	****
-1000	3'	3.077e-01	ns
-1000	+1000	8.259e-01	ns
5'	piRNAs	3.897e-02	*
5'	3'	5.527e-04	***
5'	+1000	2.441e-06	****
piRNAs	3'	2.254e-08	****
piRNAs	+1000	1.214e-11	****
3'	+1000	2.390e-01	ns
Dunn's-test for multiple comparisons of independent samples and p-values adjusted by Benjamini-Hochberg's method.			

Supplementary Table S7. SNP rates in piRNA regions by nucleotide (NT).

Chrom	Type	NT 1	NT 2	NT 3	NT 17	NT 26	NT 31
chr1	SNP	3.819e-02	4.141e-02	3.165e-02	3.223e-02	2.514e-02	2.874e-02
chr2	SNP	4.329e-02	4.040e-02	3.447e-02	2.855e-02	2.504e-02	2.357e-02
chr3	SNP	4.075e-02	4.718e-02	3.572e-02	2.796e-02	2.112e-02	3.022e-02
chr4	SNP	3.923e-02	5.026e-02	4.246e-02	3.535e-02	2.739e-02	3.201e-02
chr5	SNP	4.170e-02	4.007e-02	3.421e-02	2.933e-02	2.800e-02	2.682e-02
chr6	SNP	4.257e-02	3.681e-02	4.334e-02	3.136e-02	2.346e-02	2.705e-02
chr7	SNP	4.551e-02	4.324e-02	4.012e-02	3.558e-02	2.570e-02	3.242e-02
chr8	SNP	4.240e-02	2.850e-02	3.336e-02	3.176e-02	3.077e-02	2.667e-02
chr9	SNP	4.132e-02	4.248e-02	3.089e-02	2.972e-02	2.008e-02	3.256e-02
chr10	SNP	4.177e-02	4.151e-02	4.513e-02	3.659e-02	2.303e-02	2.473e-02
chr11	SNP	3.991e-02	4.916e-02	3.765e-02	3.121e-02	3.203e-02	2.749e-02
chr12	SNP	4.259e-02	3.859e-02	3.549e-02	4.037e-02	2.733e-02	3.020e-02
chr13	SNP	4.503e-02	4.744e-02	3.606e-02	4.267e-02	2.826e-02	3.016e-02
chr14	SNP	4.982e-02	3.770e-02	2.864e-02	2.384e-02	2.301e-02	2.833e-02
chr15	SNP	3.414e-02	4.556e-02	3.840e-02	2.458e-02	2.683e-02	2.048e-02
chr16	SNP	4.357e-02	5.000e-02	3.051e-02	2.724e-02	3.064e-02	2.592e-02
chr17	SNP	3.360e-02	4.060e-02	3.784e-02	2.516e-02	3.692e-02	2.520e-02
chr18	SNP	4.743e-02	4.678e-02	3.937e-02	2.380e-02	2.498e-02	3.175e-02
chr19	SNP	4.324e-02	4.874e-02	4.127e-02	2.676e-02	3.011e-02	3.507e-02
chr20	SNP	3.883e-02	3.652e-02	4.787e-02	3.032e-02	3.030e-02	2.175e-02
chr21	SNP	3.883e-02	4.982e-02	5.119e-02	3.640e-02	4.802e-02	2.828e-02
chr22	SNP	3.340e-02	4.444e-02	3.904e-02	3.597e-02	2.337e-02	1.897e-02
chrX	SNP	3.636e-02	3.608e-02	2.929e-02	2.682e-02	2.958e-02	2.456e-02
chrY	SNP	5.970e-03	8.600e-03	3.770e-02	8.600e-03	1.160e-03	1.720e-03
Only NTs with highest or lowest conservations.							

Supplementary Table S8. INDEL rates in piRNA regions by nucleotide (NT).

Chrom	Type	NT 7	NT 32
chr1	INDEL	1.000e-05	1.850e-03
chr2	INDEL	1.500e-04	5.530e-03
chr3	INDEL	4.000e-05	2.110e-03
chr4	INDEL	2.400e-04	2.200e-04
chr5	INDEL	6.000e-05	6.000e-05
chr6	INDEL	3.100e-04	1.680e-03
chr7	INDEL	1.700e-04	3.030e-03
chr8	INDEL	2.300e-04	8.400e-04
chr9	INDEL	1.400e-04	7.780e-03
chr10	INDEL	5.100e-04	1.720e-03
chr11	INDEL	1.300e-04	4.960e-03
chr12	INDEL	3.800e-04	4.740e-03
chr13	INDEL	2.300e-04	3.000e-05
chr14	INDEL	5.900e-04	3.000e-05
chr15	INDEL	1.000e-05	3.450e-03
chr16	INDEL	6.700e-04	4.910e-03
chr17	INDEL	3.300e-04	3.210e-03
chr18	INDEL	2.200e-04	2.740e-03
chr19	INDEL	1.400e-04	3.270e-03
chr20	INDEL	1.100e-04	4.000e-05
chr21	INDEL	1.200e-04	6.280e-03
chr22	INDEL	3.300e-04	6.600e-04
chrX	INDEL	6.000e-05	4.610e-03
chrY	INDEL	NA	NA
Only NTs with highest or lowest conservations.			

5 CAPÍTULO II

Este capítulo é referente ao manuscrito em preparação, intitulado “**Global expression profile and regulatory eQTL pattern of circRNAs associated with COVID-19.**”

GENETIC AND EPIGENETIC ASPECTS OF circRNAs IN COVID-19

Jhully Azevedo-Pinheiro, Giordano Bruno Soares-Souza, Cíntia Braga-da-Silva, Rafaella Souza Ferraz, Caio S. Silva, Maria Clara Barros, Jorge Estefano Santana de Souza, Catarina Torres Pinho, Giovanna C. Cavalcante, Leandro Magalhães, Cláudio Guedes Salgado, José Ricardo dos Santos Vieira, Ândrea Ribeiro-dos-Santos, Sidney Santos

ABSTRACT

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has a high incidence rate and has become a global public health problem. Genetic and epigenetic alterations regulated by non-coding RNAs (ncRNAs) have been associated with the development of this disease. Evidence suggests that genomic changes may influence the function of circRNAs, and their dysregulation has been studied in infectious diseases, including COVID-19. However, the aspects involved in the relationship between genetic variants and circRNAs expression remains poorly understood. The aim of this study was to investigate the global expression profile and eQTL regulatory patterns of circRNAs, as well as their association with COVID-19 severity. For this, naso-oropharyngeal swab and saliva samples were collected from 66 individuals diagnosed with COVID-19, classified as asymptomatic (11), mild (15) and severe (22), and sequencing using RNA-Seq. The data analysis was performed using the edgeR packages v.4.0.14. and CircTest R v.0.1.1 package, considering adjusted p-values < 0.05 as statistically significant. eQTL analyses were performed to evaluate the association between variants and the circRNAs expression. All statistical analyses were conducted using Software R Studio v.4.1.1. Comparative analysis of circRNA expression among the groups identified eight circRNAs differentially expressed. In silico analyses revealed five circRNAs (hsa-NIPBL_0053, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, hsa-SETD3_0001, hsa-XPO1_0001), interacting with miRNAs. Functional enrichment analysis of the target genes regulated highlighted biological process and pathways involved in SARS-CoV-2 infection, including cellular responses to hypoxia, WNT signaling, cytokine, regulation of the immune response and cellular response to the virus. eQTL analysis further demonstrated genetic variants in the TMPRSS13 and parental XPO1 genes affecting genic expression. Thus, the findings of this study may help to elucidate the role of genetic and epigenetic mechanisms in the pathophysiology of SARS-CoV-2 infection.

KEYWORDS: ncRNA, piRNA, circRNA, COVID-19, Polymorphism.

INTRODUCTION

Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2), persists as a significant global health challenge. Although over 67% of the global population has been vaccinated against COVID-19, the virus continues to cause weekly fatalities and remains a significant public health concern in many countries (1). Brazil, for example, achieved 75% vaccination coverage within the first year of the COVID-19 vaccination roll-out (2). However, it remains the sixth country with the highest number of cases, reporting approximately 37.5 million infections and 702,000 deaths attributed to SARS-CoV-2 (3).

Even with the end of the Public Health Emergency of International Concern (PHEIC), declared by the World Health Organization on May 5, 2023, COVID-19 is still a threat to health, especially for those at higher risk of developing severe disease, given that the virus continues to circulate in Brazil and around the world and there is a risk of the emergence of new Variants of Concern (VOC) or Variants of Interest (VOI) of SARS-CoV-2 (4). In view of this, the epidemiological, laboratory, genomic and immunization surveillance actions established in Brazil must be continued (4).

In recent years, a wide range of studies has explored the biological characteristics of SARS-CoV-2 variants and molecular features of the host, aiming to unravel virus-host interactions and develop antiviral strategies (5–9). Emerging evidence highlights the critical function of regulatory elements in COVID-19 pathogenesis, particularly the regulation mediated by noncoding RNAs (ncRNAs) like the circular RNAs (circRNAs) (10).

circRNAs comprise a class of noncoding RNAs (ncRNAs) formed by covalent binding of 3' and 5' ends, and can regulate gene expression, primarily by acting as sponges for miRNAs and RBPs binding (11,12). In the context of COVID-19, the circRNAs have been identified as pivotal regulators of the response to viral infection, being implicated in the host cell immunity and inflammation, energy metabolism, cell cycle, and cell apoptosis (13). Circ-3205, for instance, is a circRNA exclusively expressed in individuals infected with SARS-CoV-2 and is associated with viral entry into host cells through the regulation of the Spike protein gene (12). Pfaffenrot et al. (2021) (14) demonstrated that artificial circRNAs designed to act as antisense RNAs targeting the SARS-CoV-2 genome RNA, in particular its structurally conserved 5' untranslated region, can be accessed by circRNAs, resulting in reduced virus proliferation in cell culture. Furthermore, circ_00022_SMC1A and circ_00007_MAN1A2 were identified with

low expression in COVID-19 cerebrospinal fluid (CSF) from patients with severe COVID-19 when compared to healthy controls and neurological diseases (15).

The role of circRNAs in the pathology of COVID-19 is a rapidly emerging area of research. However, their potential influence on the severity of COVID-19 symptoms remains underexplored (12,16–18). Moreover, existing studies have largely overlooked populations with high levels of genetic admixture, such as those in Brazil (19,20). Exploring data on genomic characteristics and regulatory mechanisms in our population is particularly important, since this mixture can shape susceptibility to complex diseases in a specific way in Brazilian populations (21). Therefore, this study aims to characterize the regulatory mechanisms and genetic bases associated with the circRNAs expression and their contribution to the severity of COVID-19 in individuals from the Northern region of Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Ethics statement

The sample collection and procedures described in this work were approved by the Ethics Committee of the Center of the University Hospital João de Barros Barreto of the Federal University of Pará (Protocol number: 50865721.1.0000.0017). All study participants provided informed written consent in accordance with the Helsinki Declaration of 1964.

Patients and Samples Collection

The research consists of a retrospective observational study design with data collected from individuals from the state of Pará, in North Brazil, who were classified according to the clinical criteria of the National Institutes of Health (NIH) (2022): i) Asymptomatic: individuals who tested positive for SARS-CoV-2, but did not present symptoms consistent with COVID-19, ii) Mild: individuals with symptoms of COVID-19, such as fever, cough, sore throat, malaise, headache, muscle pain, nausea, vomiting, diarrhea, loss of taste and smell, but who did not present shortness of breath, dyspnea or abnormal chest imaging, and iii) Severe: individuals with a severe and critical illness, who have $SpO_2 < 94\%$, or pulmonary infiltrates $> 50\%$; or with respiratory failure, septic shock and/or multiple organ dysfunction, or developed Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS), admitted to the Intensive Care Unit (ICU) or who died.

We investigated a total of 66 individuals infected with SARS-CoV-2, including 50 samples investigated in a previous whole exome sequencing by our group (22). Further details

about the whole exome sequencing analysis are described in BARROS et al., 2024. Saliva and naso-oropharyngeal swabs collected between 2021 and 2023 were used for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR and bulk-RNA-seq of the host. Saliva samples were self-collected in sterile plastic collection tubes and swab specimens were collected and transferred into sterile tubes containing Viral Transport Medium (VTM). After collection, all samples were stored at -80°C until further analysis.

RNA extraction and quantification

RNA extraction from saliva and naso-oropharyngeal swab samples was performed using the Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit and KingFisher MagMAX™ Viral/Pathogen kits, on Maxwell and KingFisher equipment, respectively. RNA concentrations and quality were verified using the Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) and NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific) equipment. RNA integrity (RIN) was assessed using the 2200 TapeStation Instrument (Agilent Technologies).

Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR (RT-qPCR)

The presence of SARS-CoV-2 was determined by RT-qPCR using the ABI 7,500 and AriaMX equipment in accordance with the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR diagnostic panel instructions for use (23). Samples with amplification cycles threshold of Ct value ≤ 35 were evaluated as positive and selected for bulk RNA sequencing.

Library synthesis, sequencing and analysis

Total RNA libraries (Transcriptome) were constructed from 1 µg of total RNA per sample (saliva or nasopharyngeal swab) using the TruSeq Stranded Total RNA Library Preparation® with Ribozero Gold kit (Illumina). RNA integrity (RIN) was assessed using the RNA ScreenTape Assay kit on the 2200 TapeStation (Agilent Technologies). Total RNA sequencing was performed using a sample pool at 4nM using the NextSeq Sequencing System (Illumina) on the NextSeq High Output 150 cycles platform (Illumina).

Sequencing data processing, circRNA quantification and differential expression analysis

Quality control was performed using FastQC v.0.11.2 and summarized with MultiQC. Fastp v.0.19.5 was used to trim the adapters and low-quality reads. The resulting reads were aligned to GRCh 38.104 using STAR v.2.6.1 tool. DCC tool (v.0.16.0.1) was used to quantify

the circRNAs (CHENG, et al., 2016). Differential expression analysis between symptomatic, mild, and severe patients was performed using the edgeR package v.4.0.14. CircTest R package v.0.1.1 was used to test the variation of circRNAs with respect to their respective host genes. Adjusted p-values < 0.05 were considered statistically significant.

In silico prediction of circRNA-miRNA-target interaction and Functional Enrichment Analyses of the Sponged miRNAs' Target Genes

Host genes of differentially expressed circRNAs were submitted to miRNA-circRNA search using the Starbase ENCORI tool (24). We focused exclusively on miRNAs with predicted target sites located within the genomic regions of the circRNAs of interest, ensuring that the identified interactions were relevant to these circRNAs. Furthermore, we prioritized interactions that were supported by at least one CLIP-seq data. The set of miRNAs identified for each circRNA was subsequently queried in miRTarBase v10 (25), and only miRNA-target interactions supported by strong experimental evidence (e.g. reporter assays, Western blot, qPCR) were retained. The resulting interaction networks were visualized using the RedeR v.2.4.3. The biological function of the miRNA-target genes were elucidated through the functional enrichment analysis conducted with the Gene Ontology Biological Process using overrepresentation analysis implemented in clusterProfiler v.4.8.3. Enriched terms with a Benjamini-Hochberg (BH) adjusted p-value < 0.05 were considered statistically significant.

eQTL and Polymorphisms Analysis

To understand more deeply the regulatory mechanisms involved in SARS-CoV-2 infection, we expanded the common eQTL analysis to identify variants associated with circRNA expression in COVID-19 disease. We performed RNA-seq and identified 8 differentially expressed (DE) circRNAs and used identified variants in the whole exome sequencing to investigate association between circRNA expression and variants, and select significant association, which we define as circRNA expression quantitative trait locus (circeQTL).

Expression quantitative trait loci (eQTL) analysis was conducted by integrating the differential expression data generated in this study with previously acquired whole-exome sequencing data from 50 samples (27 non-severe and 23 severe groups) (BARROS et al. 2024). The analysis was performed using correlation and linear regression methods. All statistical

analyses and graphical visualizations were performed using MatrixEQTL v2.3. Statistical significance was defined as adjusted p-values less than 0.05.

Subsequently, eQTL results, an analysis was performed in the dbSNP, Clinvar, and VEP Ensembl databases to identify, characterize polymorphisms found, and select these variants. The selection of polymorphisms was based on the following criteria: a) Variants associated with variation in expression of circRNAs Differentially Expressed (DE); b) Variants present in the DE circRNAs parental genes; c) Variants present in the DE circRNAs regions; d) Variants associated with variation in expression of DE circRNAs parental genes.

Statistical Analysis of Polymorphic Association

The polymorphic association analysis was performed with the variants identified by whole-exome sequencing. Differences in allele and genotype frequencies between participants were analyzed using Fisher's exact test. The association between the genetic variant and COVID-19 susceptibility was assessed through logistic regression analysis, with results expressed as odds ratios (OR) and corresponding 95% confidence intervals (CI).

RESULTS

Participants' demographic and clinical characteristics

A total of 66 patients were included in the study and categorized according to the clinical criteria of the National Institutes of Health (NIH) (2022) into three groups: 14 asymptomatic individuals (AS), 21 individuals with mild symptoms (MLD), and 31 individuals with a severe and critical illness (SVRE). Statistically significant differences were observed in age comparisons between the groups ($p\text{-value} = 1.417\text{e-}06$). The mean age was 47 years in the asymptomatic group, 34 years in the mild group, and 60 years in the severe group (Table 1). No statistical significance was found for gender. The demographic and clinical characteristics of these participants are summarized in Table 1.

Table 1. Demographic and clinical characteristics of the participants.

Variable	Asymptomatic n = 14	Mild n = 21	Severe n = 31	Valor de p
^a Idade (anos)	47 ± 14	34 ± 11	60 ± 14	< 0.01 ^c ^b
Sexo				> 0.05 ^c
Feminino	9 (64.29%)	10 (47.62%)	16 (51.61%)	
Masculino	5 (35.71%)	11 (52.38%)	15 (48.39%)	

The categorized data are represented by absolute number of individuals (percentage).

^aValues expressed as Mean ± SD (Standard Deviation).

^bWilcoxon rank sum test with continuity correction

^cFisher's Exact Test for Count Data

Differentially Expressed circRNAs in COVID-19

A total of 291 circRNAs were identified with significant expression levels. of which 253 were detected in the asymptomatic group, 279 in the mild group, and 289 in the severe group. Comparative analysis of circRNA expression across these three clinical groups revealed eight circRNAs differentially expressed (Table 2). In the comparison between asymptomatic and severe groups, the circRNAs hsa-NIPBL_0053, hsa-XPO1_0001, MT_2225_2761, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, and hsa-SETD3_0001 were identified as significantly downregulated (Figure 1A). Notably, MT_1690_1894 was significantly upregulated in the asymptomatic group compared to the mild group (Figure 1B). Furthermore, the comparison between the mild and severe group revealed that both hsa-ARHGEF12_0001 and MT_1690_1894 were upregulated in the severe group (Figure 1C).

Table 02. Characterization of the Differentially Expressed circRNAs.

circRNA ID	GENOMIC POSITION	GENE SYMBOL	FDR
hsa-NIPBL_0053	chr5:36982165 36986301	NIPBL	< 0.01
hsa-XPO1_0001	chr2:61522611 61533903	XPO1	< 0.05
MT_2225_2761	-	MT – RNR2	< 0.05
hsa-PCMTD1_0002	chr8:51860845 51861246	PCMTD1	< 0.05
hsa-NCOA2_0001	chr8:70213903 70216764	NCOA2	< 0.05
hsa-SETD3_0001	chr14:99458279 99465813	SETD3	< 0.05

MT_1690_1894	-	< 0.01 ^a
hsa-ARHGEF12_0001	chr11:120406118 120409450	< 0.05

^aComparing: Symptomatic vs Mild ($p < 0.05$) and Mild vs Severe ($p < 0.01$)

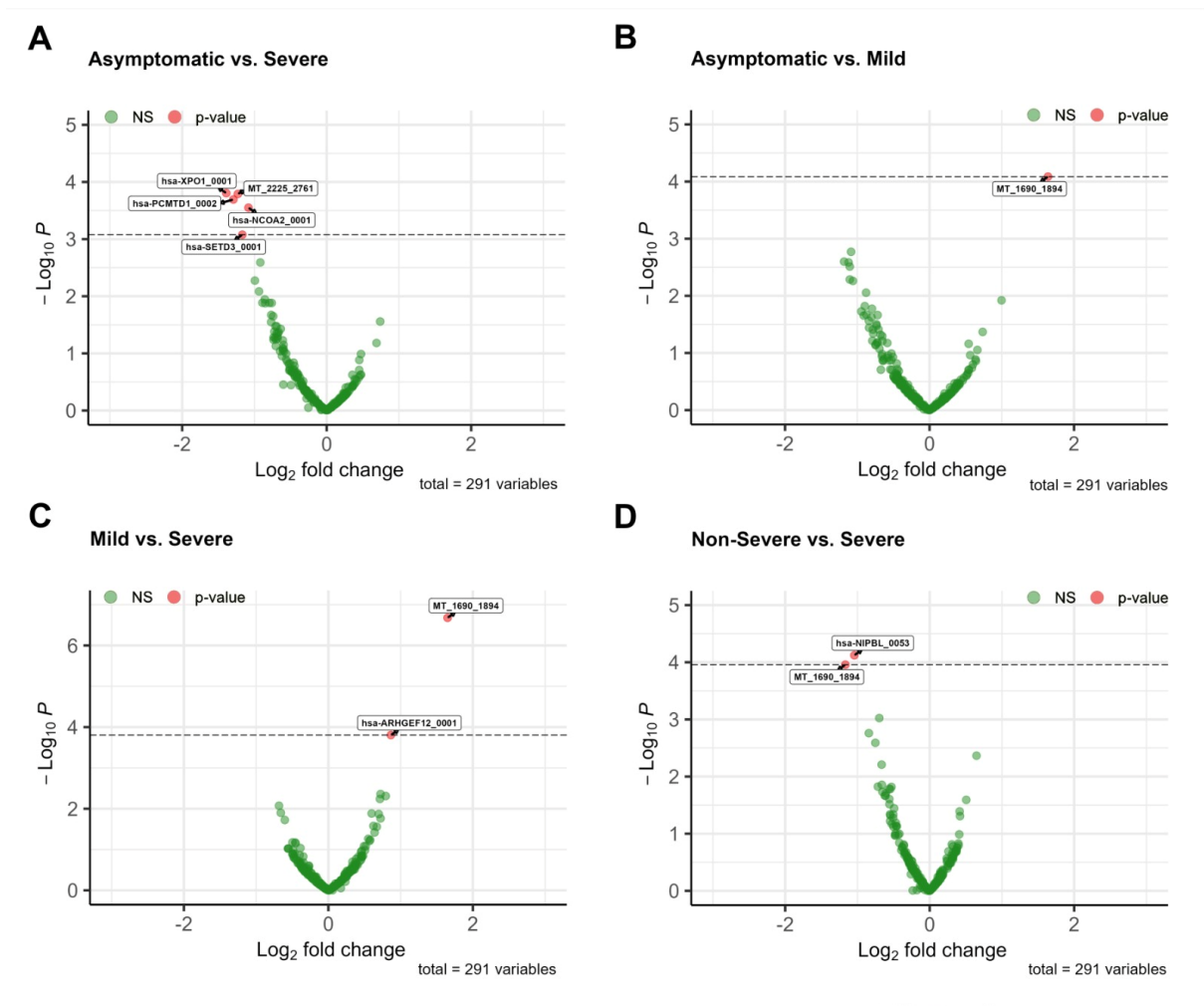


Figure 1. Differential circRNA expression profiles analysis of circRNAs. Volcano plot of differentially expressed circRNAs contrasting Asymptomatic vs Severe groups (a), Asymptomatic vs Mild groups (b), Mild vs Severe groups (c), and Non-Severe vs Severe groups (d) Red points represent circRNAs that were significantly up-regulated or down-regulated, and green points represent not significantly different in the groups. x-axis: log2 ratio of circRNA expression levels, y-axis: false-discovery rate values ($-\log_{10}$ transformed) of circRNAs.

We combined the 11 asymptomatic and 14 mild cases into a single non-severe group and performed differential expression analysis of circRNAs comparing non-severe versus severe COVID-19. This analysis revealed two DE circRNAs, MT_1690_1894 and NIPBL_0053 (Figure 1D). We performed receiver operating characteristic (ROC) analysis and area under the curve (AUC) to evaluate the potential of circRNAs as biomarkers for COVID-19. CircRNAs exhibited no significant discriminatory accuracy between the clinical groups (Figure 2).

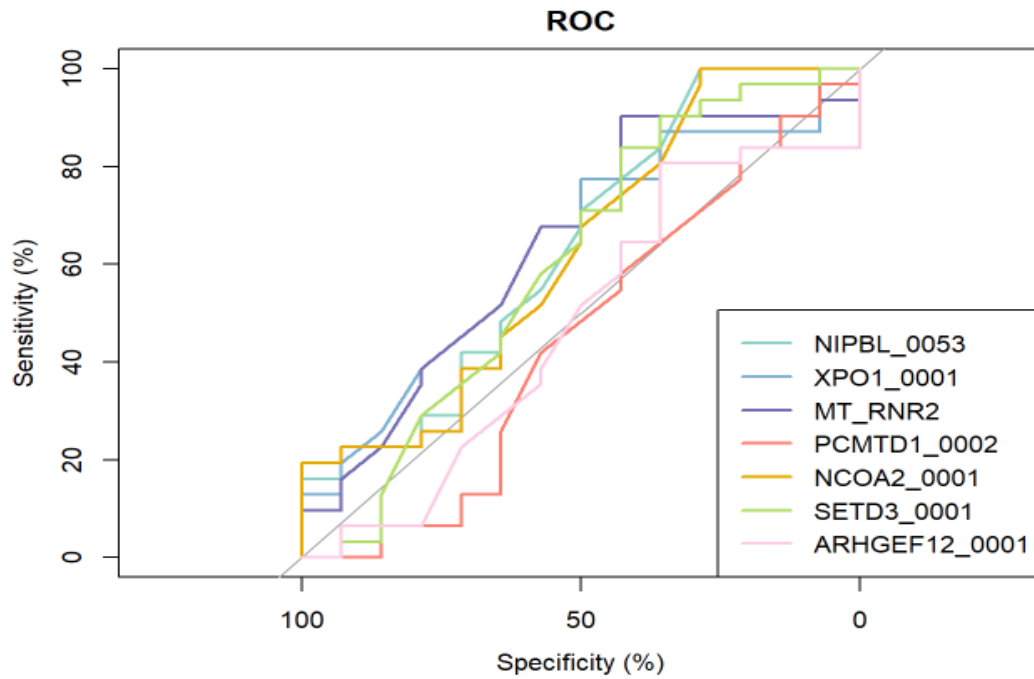


Figure 2. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis of differentially expressed circRNAs.

Characterization of circRNA-associated genomic variants and eQTL analysis

Whole exome sequencing (WES) data from Barros and collaborators (2024) were used to visualize the profile of DNA variants in individuals with COVID-19. In Polymorphic associations we do not observe association between variants and COVID-19 severity. To determine whether the circRNA expression or gene expression was controlled by any exome data Single Nucleotide Polymorphism (SNP) or Insertion-Deletion (INDEL), we performed the eQTL analysis.

In total, 4684 variants were identified, including 4549 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and 135 Insertions-Deletions (INDELs). These mutations had various genetic effects in coding regions such as missense (54%), synonymous (42%), stop gained (3%), and inframe insertion (1%), and in non-coding regions, we observed genetic effects as intron (35%), non-coding transcript (10%) and splice region (3%) principally.

We observed pathogenic, benign and variants of uncertain significance among the significant variants in the eQTL data. None of the pathogenic variants were present in genes encoding circRNAs.

To characterize the regulation of circRNA expression, we relate the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) and Insertions-Deletions (INDELs) with Differentially Expressed (DE) circRNA. We found 265 genetic variants (here we term as VRNT) associated with DE circRNAs, including 231 VRNT associated with DE circRNA expression in non-severe group and 34 eVRNT related with DE circRNA expression in severe group, except circRNA

MT_2225_2761, in that we did not find eVRNT associated with their expression. Lastly, we overlapped genetic variants associated with circRNA expression and COVID-19-related polymorphisms reported in previous studies to identify the relevance of circRNAs in COVID-19.

Given the large data set, the focus was placed on the genetic implications of variants that can impact DE circRNAs. For this, we evaluated variants in four phases: 1) Variants present in DE circRNA regions, 2) Variant associated with DE circRNAs, 3) Variant in parental gene regions of DE circRNA, 4) Variant in parental gene associated with DE circRNA; after this screening, we also sought to characterize the relation of these variants with COVID-19 pathogenesis. First, we analyze the genomic characteristics in the circAtlas to evaluate the genomic localization of circRNAs. . Second, with the DE circRNAs position, we performed screening in the Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) (McLauren et al., 2016) to identify variants of the four phases, i.e., in regions or that can affect the expression of these molecules found 265 polymorphisms that can affect the expression of circRNA. Subsequently, considering each DE circRNA and the non-severe and severe groups, we sought to characterize the regions of these variants in the dbSNP and Clinvar. When checking which variants are present in the parental genes regions of the DE circRNA and in parental gene regions associated with DE circRNA, we verified which genes these variants affect and whether they affect the parental genes themselves. Researching variants in circRNA DE parental genes regions identified two variants, but didn't find DE circRNAs or DE circRNA parental genes being regulated by these variants.

circRNA-miRNA-target interactions and functional enrichment analysis of miRNAs target genes

We investigated miRNAs that targeted genomic regions of differentially expressed circRNAs. Among these, five circRNAs (hsa-NCOA2_0001, hsa-NIPBL_0053, hsa-PCMTD1_0002, hsa-SETD3_0001, and hsa-XPO1_0001) were identified as having documented miRNAs interaction (Figure 3A). Subsequently, the miRNAs associated with each circRNA were analyzed using miRTarBase, resulting in a list of miRNAs-target genes (Supplementary Table S1). Notably, these miRNAs were found to regulate targets implicated in key biological processes to COVID-19, including cellular responses to hypoxia, cellular responses to oxygen levels, WNT pathway, cytokine, regulation of immune response, cellular response to viruses, apoptotic signaling, and cytokine-mediated signaling (Figure 3B and

Supplementary Table S2). Although each circRNA interacts with distinct miRNAs (Figure 3A), their regulatory network converges on similar biological pathways, suggesting a coordinated role in the host response to infection.

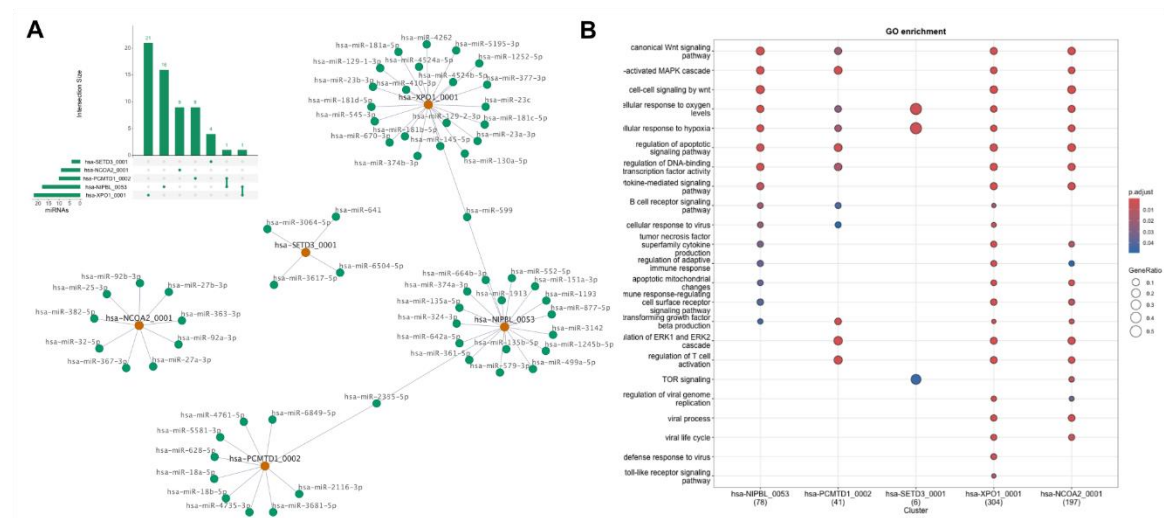


Figure 3. The circRNA-targeted miRNA interactions (A) and GO analysis of DEcircRNAs (B).

DISCUSSION

We found that circRNA expression in both mild and asymptomatic cases is significantly different from that in the severe group ($p < 0.05$), while differences between asymptomatic and mild cases were minimal, with only one DE circRNA ($p < 0.05$). In the comparison of non-severe vs. severe, we found the circRNAs MT_1690_1894 and has-NIPBL_0053 underexpressed in non-severe compared to severe individuals ($p < 0.05$).

To explore the role of circRNA in the COVID-19, we analyzed the circRNA expression profile of the samples of the individuals positive to COVID-19 infection, using whole transcriptomic sequencing. We compared the expression levels of circRNAs between these groups and found significant differences when comparing asymptomatic versus severe, and mild versus severe, and a lower level of significance was observed between asymptomatic and mild group.

The circRNAs hsa-NIPBL_0053, hsa-XPO1_0001, MT_2225_2761, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001 and hsa-SETD3_0001 were significantly downregulated in patients with asymptomatic disease compared to those with severe disease. In the comparison between mild and severe cases, we identified the circRNAs MT_1690_1894 and hsa-ARHGEF12_0001 upregulated. When comparing asymptomatic vs. mild groups, the circRNA MT_1690_1894 was also found to be upregulated.

CircRNA hsa-NIPBL_0053 was reported to be significantly upregulated in atrial fibrillation (26), and melanoma metastatic (27) involving pathways as cardiac muscle contraction. In our results this circRNA was also upregulated in severe group.

Liu et al., (2024) (28) explored the role of circRNAs in the malignant transformation of multiple lung cancer cell lines induced by NNK. Their findings suggested that increased expression of circNIPBL significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion, playing a tumor suppressor role. They also demonstrated, by RNA pulldown assays, that downregulation of circNIPBL reduces the binding of HSP90 α to AHR, influencing the nuclear and cytoplasmic distribution of AHR and promoting the occurrence of the TP53-H179R variant, whereas overexpression of circNIPBL may delay its occurrence and accumulation. circNIPBL upregulation inhibits the activity of the base excision repair pathway, thereby promoting NNK-induced DSBs and triggering cell apoptosis (29).

To our best knowledge, hsa-NIPBL_0053 has not been reported in previous COVID-19 studies. It is well established in the literature that the action of Hsp90 as a host chaperone is required for viral replication (29). A study demonstrated the role of HSP90 in SARS-CoV-2 infection (30). This protein interacts with multiple SARS-CoV-2 structural proteins (N, M, Orf3, Orf7a, and Orf7b) and regulates virion assembly (30); its dysfunction directly inhibits virion assembly, and suppresses lung injury, resulting in efficient inhibition of SARS-CoV-2 proliferation, demonstrating that HSP90 proteins are necessary to SARS-CoV-2 proliferation (31).

HSP90 chaperones activate translocation of the Aryl hydrocarbon Receptor (AhR), an transcription factor, to the nucleus (32). AhR can increase the risk of double-stranded breaks and can promote immunosuppression, and affect pathways of the antioxidant responsive elements (33).

It has been described that AhR promotes interferon-induced mucus production in a rodent model, during SARS-CoV-2 infection, also was related that this mucus production, stimulated by IFN-AhR signaling triggers hypoxia in COVID-19, this accumulated alveolar mucus affects the blood-gas barrier, inducing hypoxia and diminishing lung capacity (34). The participation of AhR in COVID-19 pathophysiology has been reported, with a potential role in the regulation of SARS-CoV-2 entry, the ‘cytokine storm’, and anti-viral defense (35). Shi et al., 2023 (36) demonstrated that infection with SARS-CoV-2 activates AhR signaling and facilitates viral replication by up-regulating ACE2 receptor expression. AhR activation can promote viral replication and contribute to lung pathology (37).

circNIPBL upregulated the expression of Wnt5a and activated the Wnt/ β -catenin signaling pathway directly sponged miR-16-2-3p, promoting metastasis of Bladder Cancer (BCa) (38). In COVID-19 patients with acute respiratory distress, the expression of the activating ligand Wnt5a is increased (39). Analysis with cells cultures demonstrated that the SARS-CoV-2 infection activates Wnt/ β -catenin pathway and the its inhibition potently reduces SARS-CoV-2 replication in vitro; it also reduces viral load, inflammation, and clinical symptoms in a murine model of COVID-19 viral (40).

Based on these aspects and compared to our results, since hsa-NIPBL_0053 is upregulated in the severe group, we suggest that hsa-NIPBL_0053 may contribute to COVID-19 pathogenesis, possibly through interactions with AhR and HSP90 protein, involving the immune response, hypoxia and pulmonar injury in the host, and SARS-CoV-2 proliferation.

Due to the scarcity of databases with functional annotations of circRNAs, we investigated their functional roles by considering that circRNAs can regulate or be regulated by miRNAs targeting genes with known functional annotations. We therefore performed enrichment analysis using the annotation of these target genes. This type of analysis has been applied in other studies (12,13,41).

The GO enrichment for the targets of miRNA sponged by hsa-NIPBL_0053 highlighted pathways mainly related to cellular responses to hypoxia, cellular responses to oxygen levels, WNT pathway, cytokine, immune response-regulation, cellular response to virus, cytokine - mediated signaling. RNA-seq analysis found differentially expressed circRNA and lncRNA in COVID-19, and complementary analysis of the GO and KEGG, indicated that these molecules may play a role in multiple immune and inflammatory pathways, as well as in the growth and apoptosis of host cells, mainly involved in regulation of the host cell immunity and inflammation, substance and energy metabolism, cell cycle and cell apoptosis (42). This indicated that in the severe group, the overexpression of this circRNA contributes to the exacerbation of the inflammatory process and consequently to the severity of the infection in these patients.

hsa-XPO1_0001 was identified upregulated in the inflammatory phase and the proliferative phase of the human skin wound repair, highlighting the role of this circRNA in the inflammatory process (43). These findings reinforce our results, as hsa-XPO1_0001 is overexpressed in the severe group, and GO enrichment analysis for the miRNAs sponged hsa-XPO1_0001 suggested a strong association with several pathways relevant to COVID-19, such as cellular responses to hypoxia, cellular responses to oxygen levels, pathway, cytokine,

immune response-regulation, cellular response to virus, cytokine -mediated signaling, cytokine production and defense response to virus, important pathways associated with COVID-19 and that can influence in the storm cytokine pathogenesis.

The has_PCMTD1_0002 expression was investigated in one study about RNA editing enzyme ADAR in the control of multidrug resistance in human renal cells, but were not found correlation of this circRNA with the activity ADARI (44). Regarding circNCOA2 and circSETD3 no studies investigating these circRNAs were found in the literature, and they are being reported for the first time. In our analysis, we identified upregulated circSETD3 in severe cases, and the pathways involved with this circRNA highlighted processes such as cellular responses to hypoxia and cellular responses to oxygen levels - important factors involved in severe COVID-19 conditions.

Interestingly, we noted the expression of mitochondrial circRNAs in all comparisons. The expression levels of mitochondrial circRNA showed higher values in the asymptomatic and mild groups and lower values in the severe group. This may suggest that lower symptom severity is associated with higher circRNA expression.

Whole-exome sequencing data (22) was used to obtain genetic information and detect DNA variants in all samples. To characterize the genetic and expression circRNAs aspects in COVID-19, we identified variants associated with circRNA and observed that circRNA expression differed significantly between the groups. We also investigated and compared variants that regulating circRNA expression with those regulating their parental genes, and observed that these variants are not associated. A similar result was reported by Ahmed and collaborators (2019) (45). When researching variants circRNAs DE parental genes regions, identified two variants. To characterize these variants, we observed the variant rs10106734 in the PCMTD1 gene, in severe and non-severe, and the rs1446532 variant in the XPO1 gene. We noted that variants in these regions did not present clinical pathogenic significance, but affect regulatory regions and coding genes, nevertheless, they do not affect the expression of DE circRNAs. In other parental circRNA genes, no variants were identified.

Analysis of eQTL has become a strategy excellent for investigating the correlation between genetic variations and miRNA and lncRNA expression associated with COVID-19 (46,47), but this approach has not yet been applied to circRNAs associated with COVID-19.

In our analysis, among the variants affecting the expression of DE circRNAs, when assessing clinical significance, no pathogenic variants were observed, only benign or of uncertain significance. Interestingly, eQTL analyses showed a variant (rs494457) in the

TMPRSS13 gene that affects the expression of the mitochondrial circRNA MT_2225_2761 only in the group of non-severe patients. This gene was identified as acting in the enhanced cellular uptake and subsequent replication of SARS-CoV-2 (Russo et al., 2020). Variants in other important genes were also found, such as CASP10 (related to apoptosis), HNRNPL (regulates the splicing process) and IF144L, the latter with mitochondrial activity. In our differential expression analyses, the mitochondrial circRNA MT_2225_2761 was downregulated in asymptomatic individuals compared to the severe group. We do not know exactly its function, but we hypothesize that the rs494457 variant may compromise TMPRSS13 function, to prevent viral replication, conferring some protection to the individual. The downregulation of MT_2225_2761 might occur as an underlying effect of the variant. However further investigations are necessary to confirm this hypothesis.

We observed that the variants that affect the expression of DE circRNAs are not present in the genomic region of the circRNA or in its parental gene, and do not exhibit clinical pathogenic significance. In the non-severe group, we identified variants that regulate the circRNAs hsa-NIPBL_0053, hsa-XPO1_0001, MT_1690_1894, hsa-PCMTD1_0002, hsa-SETD3_0001, hsa-NCOA2_0001, hsa-ARHGEF12_0001, MT_2225_2761 (only in non-severe); and among the severe cases, variants that regulate circRNAs were characterized regulate hsa-NIPBL_0053, hsa-XPO1_0001, MT_1690_1894, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, hsa-SETD3_0001, hsa-ARHGEF12_0001.

Exclusively in the severe group, we observed variants in the *IL17RD* that regulate the expression of circRNAs MT_1690_1894 (underexpressed in severe cases), hsa-NCOA2_0001 (overexpressed in severe cases), hsa-ARHGEF12_0001 (underexpressed in severe cases) and hsa-XPO1_0001 (overexpressed in severe cases). And variants affecting the expression of MT_2225_2761 were found only in non-severe cases, causing underexpression in asymptomatic vs mild and mild vs severe cases.

Overall, using Clinvar data we noted that no clinical pathogenic significance was found in variants related to DE circRNAs. These findings suggest that the regions of the parental genes are unlikely to influence the expression of DE circRNAs, and that variants in other genes important for immune response and viral defense may be contributing to the dysregulation of these circRNAs. Furthermore, since no polymorphic association was found between the variants and COVID-19, and these variants do not have clinical pathogenic significance, on the one hand we can infer that the variants are not causing the disease. On the other hand, as the

variants are not causing the disease, this finding may indicate that the majority of the transcriptional differences observed result from the consequence of infection rather than genetic variations, as seen in other investigations (48). Studies with cis-eQTL also revealed that circQTL SNPs can affect or influence circRNA biogenesis (49).

A large study by genotyping and transcriptome techniques investigated eQTL in a Japanese population and identified genes related to COVID-19 and immune response (48). Genotyping profiling, miRNA and mRNA expression with eQTL analysis reported miRNA associated with the COVID-19 (46). lncRNAs eQTL related with COVID-19 also were realized (47). However, to our knowledge, this approach has not been investigated in circRNAs. Recently, an eQTL study identified circRNAs related to immune response (50), however, eQTL studies specifically investigating the role of circRNA expression in COVID-19 have not yet been developed, especially in the north region of Brazil.

Furthermore, there are also few studies with experimental data, in general they using variants of databases for its analysis. In view of this, the mechanisms by which circQTL influence COVID-19 are still being clarified.

We are aware that we have some limitations. For instance, some circRNAs presented low counts and may leave noise in the study. Also, the sample size for polymorphic association analysis may have influenced the results. Even so, we were able to find consistent results, since we used experimental methodologies in the same samples to associate our results. Thus, in future studies, the findings presented here can be validated in other samples, using other methodologies, to evaluate the presence of specific variants, such as through genotyping and exploring the expression of specific circRNAs, such as circ_NIPBL, circ_XPO1 and mitochondrial circRNAs, to confirm our findings. Furthermore, a limitation that is recurrent in several studies is the scarcity of databases with functional annotations of circRNAs, which makes it difficult to predict their targets. As in other studies (41), we limited ourselves to evaluating their functions based on their function as miRNA sponges, identifying miRNAs that interact with these circRNAs and their respective targets. In this way, we were able to find relevant pathways that have been investigated in other studies and associated with the severity of COVID-19.

Here, we identified eQTLs by integrating RNA-seq and whole exome sequencing data from COVID-19 patient samples. These eQTL exhibited different regulatory effects on circRNAs among the Non-Severe and Severe groups, suggesting that SARS-CoV-2 infection mechanism may cause alterations in ncRNAs expression regulation. Therefore, the COVID-19

eQTL data analysis is essential to explore SARS-CoV-2 infection mechanism and host response.

CONCLUSIONS

Genetic alteration can change the genic expression, influencing the function of various genes and ncRNAs, as circRNAs. While most studies on COVID-19 etiology investigate solely the influence of genetic or epigenetic changes on SARS-CoV-2 infection pathogenesis, the comprehensive interaction between epigenetic factors and genetic variants remains poorly explored.

In this study we investigated the genetic and epigenetic aspects of circRNA regulation in COVID-19 pathogenesis. Our results demonstrated that DE circRNAs may be involved in the pathogenesis of the clinical severity of COVID-19. The potential functions of circRNAs are still under active investigation, and the discovery of the role of these circRNAs in the severity of COVID-19 infection is important for understanding how these molecules can act in viral infection. Thereby this study explores how epigenetic regulation, and genetic variants can influence the circRNAs expression and to associate with COVID-19 pathogenesis. Therefore, these research results may expand the insight into the function of these molecules in COVID-19.

REFERENCES

1. World Health Organization W. 2023 data.who.int, WHO Coronavirus (COVID-19) dashboard > Vaccines . 2023; Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/vaccines>
2. Aguilar S, Bastos LSL, Maçaira P, Baião F, Simões P, Cerbino-Neto J, et al. Impact of the first year of COVID-19 vaccination strategy in Brazil: an ecological study. *BMJ Open* [Internet]. 2024 Jul 4;14(7):e072314. Available from: <https://bmjopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bmjopen-2023-072314>
3. World Health Organization W. Coronavirus (COVID-19) dashboard > Cases. 2023; Available from: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases>
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial: Doença pelo Coronavírus – COVID-19. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2024.
5. Elhabyan A, Elyaacoub S, Sanad E, Abukhadra A, Elhabyan A, Dinu V. The role of host

- genetics in susceptibility to severe viral infections in humans and insights into host genetics of severe COVID-19: A systematic review. *Virus Res* [Internet]. 2020 Nov;289:198163. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170220310704>
6. Velavan TP, Pallerla SR, Rüter J, Augustin Y, Kremsner PG, Krishna S, et al. Host genetic factors determining COVID-19 susceptibility and severity. *eBioMedicine* [Internet]. 2021 Oct;72:103629. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396421004229>
 7. Callaway E. Delta coronavirus variant: scientists brace for impact. *Nature* [Internet]. 2021 Jul 1;595(7865):17–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-01696-3>
 8. Islam S, Islam T, Islam MR. New Coronavirus Variants are Creating More Challenges to Global Healthcare System: A Brief Report on the Current Knowledge. *Clin Pathol* [Internet]. 2022 Jan 3;15. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2632010X221075584>
 9. Zhao Y, Huang J, Zhang L, Chen S, Gao J, Jiao H. The global transmission of new coronavirus variants. *Environ Res* [Internet]. 2022 Apr;206:112240. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935121015413>
 10. Gao X, Fang D, Liang Y, Deng X, Chen N, Zeng M, et al. Circular RNAs as emerging regulators in COVID-19 pathogenesis and progression. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Nov 9;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.980231/full>
 11. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* [Internet]. 2013;495(7441):384–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11993>
 12. Barbagallo D, Palermo CI, Barbagallo C, Battaglia R, Caponnetto A, Spina V, et al. Competing endogenous RNA network mediated by circ_3205 in SARS-CoV-2 infected cells. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022 Feb 17;79(2):75. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00018-021-04119-8>
 13. Wu Y, Zhao T, Deng R, Xia X, Li B, Wang X. A study of differential circRNA and lncRNA expressions in COVID - 19 - infected peripheral blood. *Sci Rep*. 2021;1–14.
 14. Pfafenrot C, Schneider T, Christin M, Hung L, Schreiner S, Ziebuhr J, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 coronavirus proliferation by designer antisense-circRNAs.

- 2021;49(21):12502–16.
15. Reinhold D, Farztdinov V, Yan Y, Meisel C, Sadlowski H, Kühn J, et al. The brain reacting to COVID-19: analysis of the cerebrospinal fluid proteome, RNA and inflammation. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2023 Feb 9;20(1):30. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02711-2>
 16. Li X, Liu C-X, Xue W, Zhang Y, Jiang S, Yin Q-F, et al. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. *Mol Cell* [Internet]. 2017 Jul;67(2):214-227.e7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276517303635>
 17. Arora S, Singh P, Dohare R, Jha R, Ali Syed M. Unravelling host-pathogen interactions: ceRNA network in SARS-CoV-2 infection (COVID-19). *Gene* [Internet]. 2020 Dec;762(January):145057. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111920307265>
 18. Zhang X, Chu H, Chik KKH, Wen L, Shuai H, Yang D, et al. hnRNP C modulates MERS-CoV and SARS-CoV-2 replication by governing the expression of a subset of circRNAs and cognitive mRNAs. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):519–31.
 19. Giolo SR, Soler JMP, Greenway SC, Almeida MAA, de Andrade M, Seidman JG, et al. Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2012 Jan 24;20(1):111–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/ejhg2011144>
 20. Rodrigues de Moura R, Coelho AVC, de Queiroz Balbino V, Crovella S, Brandão LAC. Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol* [Internet]. 2015 Sep 10;27(5):674–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajhb.22714>
 21. Kehdy FSG, Gouveia MH, Machado M, Magalhães WCS, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2015 Jul 14;112(28):8696–701. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1504447112>
 22. Barros MC, de Souza JES, Gomes DHF, Pinho CT, Silva CS, Braga-da-Silva C, et al. Unraveling the protective genetic architecture of COVID-19 in the Brazilian Amazon. *Sci Rep* [Internet]. 2024 Nov 9;14(1):27332. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-024-78170-3>
 23. Centers for Disease Control and Prevention. Food and Drug Administration, Emergency

- use authorization for CDC 2019-novel coronavirus (2019- nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel. 2020;
24. Li J-H, Liu S, Zhou H, Qu L-H, Yang J-H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein–RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2014 Jan;42(D1):D92–7. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkt1248>
 25. Cui S, Yu S, Huang H-Y, Lin Y-C-D, Huang Y, Zhang B, et al. miRTarBase 2025: updates to the collection of experimentally validated microRNA–target interactions. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2024 Nov 23; Available from: <https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkae1072/7907368>
 26. Wu N, Li J, Chen X, Xiang Y, Wu L, Li C, et al. Identification of Long Non-Coding RNA and Circular RNA Expression Profiles in Atrial Fibrillation. *Hear Lung Circ* [Internet]. 2020 Jul;29(7):e157–67. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1443950619315215>
 27. Morales U, José A. Identification and Characterization of Circular RNAs in Metastatic Melanoma by Alejandro José Ulloa Morales A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy Department of Basic Medical Science New . 2018;
 28. Liu Y, Fang S, Lin T, Chen W, Chen Y, Wang Y, et al. Circular RNA circNIPBL regulates TP53-H179R mutations in NNK-induced bronchial epithelial carcinogenesis. *Environ Int* [Internet]. 2024;190(June):108829. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108829>
 29. Liu Y, Hua Q, Li M, Li X, Chen W, Zeng H, et al. Circular RNA circNIPBL promotes NNK-induced DNA damage in bronchial epithelial cells via the base excision repair pathway. *Arch Toxicol* [Internet]. 2022;96(7):2049–65. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-022-03297-z>
 30. Zhao Z, Xu L-D, Zhang F, Liang Q-Z, Jiao Y, Shi F-S, et al. Heat shock protein 90 facilitates SARS-CoV-2 structural protein-mediated virion assembly and promotes virus-induced pyroptosis. *J Biol Chem* [Internet]. 2023 May;299(5):104668. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925823003101>
 31. Selkrig J, Stanifer M, Mateus A, Mitosch K, Barrio-Hernandez I, Rettel M, et al. SARS-CoV-2 infection remodels the host protein thermal stability landscape. *Mol Syst Biol* [Internet]. 2021 Feb 16;17(2). Available from:

<https://www.embopress.org/doi/10.15252/msb.202010188>

32. Hughes D, Gutterman JB, Marcus CB, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Heat Shock Protein 90 Inhibitors Suppress Aryl Hydrocarbon Receptor–Mediated Activation of CYP1A1 and CYP1B1 Transcription and DNA Adduct Formation. *Cancer Prev Res* [Internet]. 2008 Nov 1;1(6):485–93. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerpreventionresearch/article/1/6/485/46439/Heat-Shock-Protein-90-Inhibitors-Suppress-Aryl>
33. Schwartz J, Capistrano KJ, Gluck J, Hezarkhani A, Naqvi AR. SARS-CoV-2, periodontal pathogens, and host factors: The trinity of oral post-acute sequelae of COVID-19. *Rev Med Virol* [Internet]. 2024 May 23;34(3). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2543>
34. Liu Y, Lv J, Liu J, Li M, Xie J, Lv Q, et al. Mucus production stimulated by IFN- α signaling triggers hypoxia of COVID-19. *Cell Res* [Internet]. 2020 Dec 6;30(12):1078–87. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41422-020-00435-z>
35. Anderson G, Carbone A, Mazzocchi G. Aryl Hydrocarbon Receptor Role in Coordinating SARS-CoV-2 Entry and Symptomatology: Linking Cytotoxicity Changes in COVID-19 and Cancers; Modulation by Racial Discrimination Stress. *Biology (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 27;9(9):249. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-7737/9/9/249>
36. Shi J, Du T, Wang J, Tang C, Lei M, Yu W, et al. Aryl hydrocarbon receptor is a proviral host factor and a candidate pan-SARS-CoV-2 therapeutic target. *Sci Adv* [Internet]. 2023 Jun 2;9(22). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.adf0211>
37. Giovannoni F, Li Z, Remes-Lenicov F, Dávola ME, Elizalde M, Paletta A, et al. AHR signaling is induced by infection with coronaviruses. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Aug 26;12(1):5148. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-021-25412-x>
38. Li Y, Kong Y, An M, Luo Y, Zheng H, Lin Y, et al. ZEB1-mediated biogenesis of circNIPBL sustains the metastasis of bladder cancer via Wnt/ β -catenin pathway. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2023 Aug 2;42(1):191. Available from: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-023-02757-3>
39. Choi EY, Park HH, Kim H, Kim HN, Kim I, Jeon S, et al. Wnt5a and Wnt11 as acute respiratory distress syndrome biomarkers for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 patients. *Eur Respir J* [Internet]. 2020 Nov;56(5):2001531. Available from: <http://publications.ersnet.org/lookup/doi/10.1183/13993003.01531-2020>

40. Xu Z, Elaish M, Wong CP, Hassan BB, Lopez-Orozco J, Felix-Lopez A, et al. The Wnt/ β -catenin pathway is important for replication of SARS-CoV-2 and other pathogenic RNA viruses. *npj Viruses* [Internet]. 2024 Feb 21;2(1):6. Available from: <https://www.nature.com/articles/s44298-024-00018-4>
41. Yang M, Qi M, Xu L, Huang P, Wang X, Sun J, et al. Differential host circRNA expression profiles in human lung epithelial cells infected with SARS-CoV-2. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2021 Sep;93:104923. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821002203>
42. Wu Y, Zhao T, Deng R, Xia X, Li B, Wang X. A study of differential circRNA and lncRNA expressions in COVID-19-infected peripheral blood. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Apr 12;11(1):7991. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86134-0>
43. Toma MA, Liu Z, Wang Q, Zhang L, Li D, Sommar P, et al. Circular RNA Signatures of Human Healing and Nonhealing Wounds. *J Invest Dermatol*. 2022;142(10):2793-2804.e26.
44. Omata Y, Okawa M, Haraguchi M, Tsuruta A, Matsunaga N, Koyanagi S, et al. RNA editing enzyme ADAR1 controls miR-381-3p-mediated expression of multidrug resistance protein MRP4 via regulation of circRNA in human renal cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2022;298(8):102184. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102184>
45. Ahmed I, Karedath T, Al-Dasim FM, Malek JA. Identification of human genetic variants controlling circular RNA expression. *RNA* [Internet]. 2019 Dec;25(12):1765–78. Available from: <http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.071654.119>
46. Gjorgjieva T, Chaloehtuem A, Shahin T, Bayaraa O, Dieng MM, Alshaikh M, et al. Systems genetics identifies miRNA-mediated regulation of host response in COVID-19. *Hum Genomics* [Internet]. 2023 Jun 12;17(1):49. Available from: <https://humgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40246-023-00494-4>
47. Liu C, Joehanes R, Ma J, Wang Y, Sun X, Keshawarz A, et al. Whole genome DNA and RNA sequencing of whole blood elucidates the genetic architecture of gene expression underlying a wide range of diseases. *Sci Rep* [Internet]. 2022 Nov 23;12(1):20167. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-24611-w>
48. Wang QS, Edahiro R, Namkoong H, Hasegawa T, Shirai Y, Sonehara K, et al. The whole blood transcriptional regulation landscape in 465 COVID-19 infected samples from

- Japan COVID-19 Task Force. Nat Commun [Internet]. 2022 Aug 22;13(1):4830. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-32276-2>
49. Liu Z, Ran Y, Tao C, Li S, Chen J, Yang E. Detection of circular RNA expression and related quantitative trait loci in the human dorsolateral prefrontal cortex. Genome Biol [Internet]. 2019 Dec 20;20(1):99. Available from: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-019-1701-8>
 50. Nguyen DT. An integrative pipeline for circular RNA quantitative trait locus discovery with application in human T cells. Schwartz R, editor. Bioinformatics [Internet]. 2023 Nov 1;39(11). Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/doi/10.1093/bioinformatics/btad667/7334462>

6 DISCUSSÃO GERAL

A investigação de ncRNAs tem apresentado uma importante contribuição para o entendimento de mecanismos celulares e a sua relação com o desenvolvimento de doenças. No entanto, as pesquisas não são uniformes em relação aos tipos de ncRNAs, uma vez que a maioria dos estudos investigam miRNAs e lncRNAs, e as funções de outros ncRNAs como piRNAs e circRNAs, são ainda pouco compreendidas. Apesar disso, os achados sobre essas moléculas já destacam o seu importante papel nos mecanismos biológicos e na patogênese de doenças como câncer e doenças infecciosas, incluindo COVID-19. Nesse sentido, esta tese teve como objetivo investigar a presença de polimorfismos em regiões de piRNAs e definir a importância da sua sequência para exercer as suas funções, para fundamentar a nossa hipótese de que polimorfismos em regiões de ncRNAs podem afetar a sua função. Dessa forma a partir dessa conclusão buscou-se entender também o papel dos polimorfismos em circRNAs e a desregulação da sua expressão na COVID-19. Esse projeto originou dois artigos, presentes nos Capítulos I e II.

No primeiro capítulo desta tese, usamos dados genômicos do piRBase e 1000 Genomes Project para caracterizar os polimorfismos em regiões que codificam piRNAs, tanto do tipo Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP), quanto do tipo Inserção-Deleção (INDEL). A partir do piRBase foram utilizadas todas as sequências de piRNAs e do 1000 Genomes Project foram utilizadas as sequências de variantes, considerando localização no genoma, tipo de mutação e frequência alélica.

Os resultados desse trabalho apontaram que os piRNAs possuem maior conservação para mutações INDEL e menor conservação para mutações SNP, ambas em comparação com regiões exônicas, o que sugere que piRNAs são mais permissivos a mutações SNP e menos permissivos a mutações INDEL, de modo que SNPs pouco afetam sua atividade normal e INDELs causam grande o impacto para as funções da estrutura dessa molécula.

Ao analisar a conservação da sequência de piRNA, o estudo destacou que não foi possível delimitar uma região específica dentro de piRNAs que possa exercer o papel de *seed* como em miRNAs, pois não foi observada uma região ou posição genômica mais conservada dentro da sequência de piRNA, indicando que toda a sequência de piRNA é importante para ligação ao alvo e realização de suas funções. Estudos experimentais já demonstraram que diferentes regiões do piRNA são importantes para sua ligação ao alvo e supressão da expressão (ROJAS-RÍOS; SIMONELIG, 2018; VOUREKAS et al., 2016), além disso, já foi demonstrado que um pareamento imperfeito é permitido, somente com poucas alterações (VOUREKAS et

al., 2016). Dessa forma, esses dados corroboram os nossos achados de que toda a sequência do piRNA é necessária para o pareamento, permitindo poucos *mismatch*, ao realizar a sua função de repressão da tradução.

Esses achados destacam a importância de estudos que avaliem polimorfismos em regiões de ncRNAs, como observado, esses polimorfismos podem afetar a função de piRNAs e prejudicar mecanismos importantes dentro da célula, e esse impacto é maior quando as alterações são do tipo INDEL. Estudos já demonstraram que polimorfismos em regiões de piRNAs podem tanto afetar a sua função, quanto está associado ao desenvolvimento de doença, destacando a relevância de avaliar tanto polimorfismos quanto a expressão de piRNAs (JACOBS et al., 2018; LIN et al., 2019)

Investigações experimentais sugeriram que polimorfismos em piRNAs podem afetar a sua expressão e então suprimir a atividade de transposons (RYAZANSKY et al., 2017). A importância dos piRNAs para atividade antiviral de SARS-CoV-2 já foi relatada. Análises com NCS identificaram sequências de piRNAs em exossomos/microvesículas (Ex/Mv) com potencial antiviral, que podem provavelmente se ligar ao genoma de RNA do SARS-CoV-2 e suprimir a replicação viral (YU et al., 2020; IKHLAS et al., 2022; AKIMNIYAZIVA et al., 2022; RAKHMETULLINA et al., 2023).

Essas análises reforçam que as funções do piRNAs são importantes para o processo de replicação do vírus, e podem contribuir para o entendimento de mecanismos antivirais.

Também já foi reportado o perfil de expressão diferencial de piRNAs em diferentes tipos celulares, quando comparado pacientes com COVID-19 com quadro clínico grave e indivíduos saudáveis (KONDRATOV et al., 2024).

Dessa forma, destaca-se que o papel dos piRNAs no desenvolvimento da patogênese da COVID-19 já foi demonstrado, além disso, já foi descrito que polimorfismos na via piRNA-PIWI podem afetar a supressão de transposons (RYAZANSKY et al., 2017). Sabendo que muitos vírus podem exercer a função de transposons, e que piRNAs podem atuar na defesa antiviral, são necessários estudos que avaliam o papel de polimorfismos na região de piRNAs que possam estar associados à COVID-19. Embora no presente trabalho essa investigação não tenha sido realizada, estudos futuros podem avaliar esses aspectos já investigados em outras doenças como câncer (LIN et al., 2019). Apesar dessa limitação técnica em avaliar piRNAs, a partir das conclusões do primeiro capítulo, no Capítulo II esta tese buscou investigar o perfil de expressão de circRNAs e identificar polimorfismos relacionados com circRNAs diferencialmente expressos na COVID-19.

No capítulo II dessa tese classificamos três grupos de pacientes, categorizados de acordo com o quadro clínico em: Assintomáticos, Leves e Graves. E analisamos em um conjunto de 66 amostras, o perfil de expressão de circRNAs a partir dos nossos dados de RNA-seq e identificamos 8 circRNAs DE. Dessas mesmas amostras, um total de 50 foram investigadas em relação à presença de variantes a partir da análise dos dados de sequenciamento de exoma completo de Barros e colaboradores (2024). Também realizamos análise de associação polimórfica, e não encontramos associação com a COVID-19. Estudos considerando análises de associação polimórfica correlacionados com expressão gênica permite apontar genes que afetam características ou mecanismos envolvidos em doenças.

Além disso, neste estudo, conduzimos a análise de dados de eQTL obtidos de dados de sequenciamento de RNA-seq e exoma completo de amostras de pacientes infectados por SARS-CoV-2. Até onde sabemos, este foi o primeiro trabalho a caracterizar o perfil de expressão de circRNAs e variantes relacionadas, com análises de eQTL associada à COVID-19.

Para entender mais profundamente os mecanismos regulatórios envolvidos na infecção por SARS-CoV-2, expandimos a análise comum de eQTL para identificar variantes associadas à expressão de circRNAs na doença COVID-19. A partir das análises do RNA-seq, identificamos 8 circRNAs DE e usando variantes identificadas no sequenciamento do exoma completo, realizamos a associação entre a expressão de circRNA e variantes, e selecionamos associações significativas de eQTL, definido como mapeamento de variantes genéticas para níveis de expressão de mRNA, e aqui definimos como Locus de Característica Quantitativa de Expressão de circRNA (circeQTL).

Identificamos circeQTLs integrando dados de sequenciamento de RNA-seq e exoma completo de amostras de pacientes com COVID-19. Esses circeQTLs apresentaram diferentes efeitos regulatórios sobre circRNAs entre os grupos Não Grave e Grave, sugerindo que o mecanismo de infecção por SARS-CoV-2 pode causar alterações na regulação da expressão de ncRNAs.

Esse estudo identificou circRNAs associados com resposta imune e envolvidos em vias importantes da COVID-19, como hsa-NIPBL_0053, hsa-XPO1_0001, circRNAs mitocondriais e variantes genéticas como as presentes no gene *TMPRSS13* e genes parental *XPO1*. Através de análises *in silico* identificamos cinco circRNAs (hsa-NIPBL_0053, hsa-PCMTD1_0002, hsa-NCOA2_0001, hsa-SETD3_0001, hsa-XPO1_0001), interagindo com miRNAs, e análises de processos biológicos dos genes alvos desses miRNAs apontaram para vias envolvidas em mecanismos descritos na infecção pelo SARS-CoV-2, incluindo respostas celulares à hipóxia,

respostas celulares aos níveis de oxigênio, via WNT, citocina, regulação da resposta imune, resposta celular ao vírus, sinalização apoptótica e sinalização mediada por citocina.

O circRNA MT 1690 1894 não foi descrito na literatura, mas genes da mesma família MT-RNR2 estão envolvidos na regulação negativa da morte celular e da resposta neuroinflamatória (GENECARD, 2024), fatores que podem influenciar a patogênese da COVID-19. Essas observações sugerem que o sequestro mitocondrial pode ser um mecanismo essencial na infecção por SARS-CoV-2 e afetar negativamente a bioenergética celular. Nesse sentido, entender como os circRNAs nucleares e mitocondriais atuam pode contribuir para diversas respostas às infecções por SARS-CoV-2.

Assim, os achados deste estudo podem ajudar a elucidar o papel dos circRNAs na gravidade da COVID-19. A compreensão da expressão e função desses circRNAs durante a infecção por SARS-CoV-2 fornecerá insights sobre a compreensão das alterações no transcriptoma e genoma do hospedeiro e sua relação com a patogênese da COVID-19.

Sabe-se que esse estudo possui algumas limitações, não realizamos o sequenciamento de piRNAs devido limitações técnicas, mas o seu impacto na defesa viral reforça que eles devem ser investigados em futuras análises. Também tivemos um pequeno número amostral para análise de associação polimórfica, sendo necessária uma validação em um número maior de amostras para confirmar de fato a presença ou ausência de associação. Além disso, é necessária a validação dos circRNAs DE mediante outras técnicas de biologia molecular para corroborar nossos achados. No entanto, os achados descritos destaca o importante papel de variantes genéticas em regiões de piRNAs, e demonstram que alterações genéticas e epigenéticas relacionados com a expressão de circRNAs podem regular mecanismos envolvidos na patogênese da infecção pelo SARS-CoV-2.

Dessa forma, os achados desses dois estudos são importantes para compreender o impacto de variantes na expressão de ncRNAs, como piRNAs e circRNAs. Ao identificar variantes genéticas em regiões de piRNAs e considerar várias regiões da sua sequência como importante para sua função, o Capítulo I evidenciou a necessidade de avaliar tanto alterações genômicas (variantes) quanto alterações epigenômicas (desregulação da expressão de ncRNAs) em estudos envolvendo indivíduos saudáveis ou na investigação de doenças, para desvendar mecanismos celulares que possam está influenciando no processo de adoecimento.

Além disso, no Capítulo II, aplicamos de forma experimental análise de expressão de circRNAs por RNA-seq e variantes por dados de exoma completo e análise integrada de eQTL para verificar as hipóteses formadas a partir do capítulo I, que regiões de ncRNAs podem afetar

a sua expressão. E identificamos variantes que podem estar regulando a expressão de circRNAs DE, envolvidas em vias relevantes da COVID-19.

Assim, os nossos resultados refletem o relevante papel dessas moléculas na COVID-19 e destacam que elas precisam ser investigadas mais profundamente, aplicando a mesma metodologia desenvolvida com circRNA na análise de associação de piRNAs com a COVID-19, além da validação dos circRNAs DE em outras amostras e metodologias, e análises funcionais que investiguem o impacto dessas variantes no perfil de expressão de circRNAs.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo, ao caracterizar os polimorfismos em regiões que codificam piRNAs, destacamos que variantes podem impactar na função dessas moléculas. Posteriormente, realizamos uma análise integrada de aspectos genéticos e epigenéticos de circRNAs na COVID-19. Ao investigar o perfil de expressão de circRNAs encontramos 8 circRNAs diferencialmente expressos. Além disso identificamos circeQTLs que podem estar regulando a expressão dessas moléculas e afetando a patogênese da doença.

Os resultados encontrados neste estudo sugerem que os circRNAs DE e circeQTL, através de vias relevantes para a patogênese da COVID-19, podem desempenhar um papel importante nos mecanismos da infecção por SARS-CoV-2. No entanto, se faz necessário investigar piRNAs associados à COVID-19 e aplicar estudos funcionais para elucidar os mecanismos genéticos e epigenéticos dos circRNAs nessa doença.

REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, S.; ACHARJEE, A.; MUKHERJEE, A.; BAKER, M. S.; SRIVASTAVA, S. Role of Multiomics Data to Understand Host-Pathogen Interactions in COVID-19 Pathogenesis. **Journal of Proteome Research**, v. 20, n. 2, p. 1107–1132, 2021.
- AHMED, I.; KAREDATH, T.; AL-DASIM, F. M.; MALEK, J. A. Identification of human genetic variants controlling circular RNA expression. **Rna**, v. 25, n. 12, p. 1765–1778, 2019.
- AKIMNIYAZOVA, A.; YURIKOVA, O.; PYRKOVA, A.; RAKHMETULLINA, A.; NIYAZOVA, T.; RYSKULOVA, A.-G.; IVASHCHENKO, A. In Silico Study of piRNA Interactions with the SARS-CoV-2 Genome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 17, p. 9919, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/9919>.
- AL-ANOUDI, F.; MOUSA, M.; KARRAS, S. N.; GRANT, W. B.; ALHALWACHI, Z.; ABDEL-WARETH, L.; UDDIN, M.; ALKAABI, N.; TAY, G. K.; MAHBOUB, B.; ALSAFAR, H. Associations between Genetic Variants in the Vitamin D Metabolism Pathway and Severity of COVID-19 among UAE Residents. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 3680, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/13/11/3680>.
- ALIMOHAMADI, Y.; SEPANDI, M.; TAGHDIR, M.; HOSAMIRUDSARI, H. Determine the most common clinical symptoms in COVID-19 patients: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 3, p. E304–E312, 2020.
- ARAVIN, A.; GAIDATZIS, D.; PFEFFER, S.; LAGOS-QUINTANA, M.; LANDGRAF, P.; IOVINO, N.; MORRIS, P.; BROWNSTEIN, M. J.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; NAKANO, T.; CHIEN, M.; RUSSO, J. J.; JU, J.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. **Nature**, v. 442, n. 7099, p. 203–207, 2006.
- ARAVIN, A. A.; LAGOS-QUINTANA, M.; YALCIN, A.; ZAVOLAN, M.; MARKS, D.; SNYDER, B.; GAASTERLAND, T.; MEYER, J.; TUSCHL, T. The Small RNA Profile during *Drosophila melanogaster* Development. **Developmental Cell**, v. 5, n. 2, p. 337–350, 2003. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1534580703002284>.
- ARISAN, E. D.; DART, A.; GRANT, G. H.; ARISAN, S.; CUHADAROGLU, S.; LANGE, S.; UYSAL-ONGANER, P. The Prediction of miRNAs in SARS-CoV-2 Genomes: hsa-miR Databases Identify 7 Key miRs Linked to Host Responses and Virus Pathogenicity-Related KEGG Pathways Significant for Comorbidities. **Viruses**, v. 12, n. 6, p. 614, 2020.
- ARORA, S.; SINGH, P.; DOHARE, R.; JHA, R.; ALI SYED, M. Unravelling host-pathogen interactions: ceRNA network in SARS-CoV-2 infection (COVID-19). **Gene**, v. 762, n. January, p. 145057, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111920307265>.
- ASHWAL-FLUSS, R.; MEYER, M.; PAMUDURTI, N. R.; IVANOV, A.; BARTOK, O.; HANAN, M.; EVANTAL, N.; MEMCZAK, S.; RAJEWSKY, N.; KADENER, S. CircRNA Biogenesis competes with Pre-mRNA splicing. **Molecular Cell**, v. 56, n. 1, p. 55–66, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.08.019>.
- ASKARI, N.; HADIZADEH, M.; RASHIDIFAR, M. A new insight into sex-specific non-coding RNAs and networks in response to SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 97, n. January, p. 105195, 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821004950>.

- AVILALA, J.; BECNEL, D.; ABDELGHANI, R.; NANBO, A.; KAHN, J.; LI, L.; LIN, Z. Role of Virally Encoded Circular RNAs in the Pathogenicity of Human Oncogenic Viruses. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.657036/full>.
- AYAZ, H.; ASLAM, N.; AWAN, F. M.; BASRI, R.; RAUFF, B.; ALZHRANI, B.; ARIF, M.; IKRAM, A.; OBAID, A.; NAZ, A.; KHAN, S. N.; YANG, B. B.; NAZIR, A. Mapping CircRNA–miRNA–mRNA regulatory axis identifies hsa_circ_0080942 and hsa_circ_0080135 as a potential theranostic agents for SARS-CoV-2 infection. **PLOS ONE**, v. 18, n. 4, p. e0283589, 2023. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0283589>.
- AYDEMIR, M. N.; AYDEMIR, H. B.; KORKMAZ, E. M.; BUDAK, M.; CEKIN, N.; PINARBASI, E. Computationally predicted SARS-COV-2 encoded microRNAs target NFKB, JAK/STAT and TGFB signaling pathways. **Gene Reports**, v. 22, p. 101012, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S245201442030426X>.
- BARBAGALLO, D.; PALERMO, C. I.; BARBAGALLO, C.; BATTAGLIA, R.; CAPONNETTO, A.; SPINA, V.; RAGUSA, M.; DI PIETRO, C.; SCALIA, G.; PURRELLO, M. Competing endogenous RNA network mediated by circ_3205 in SARS-CoV-2 infected cells. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 2, p. 1–14, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04119-8>.
- BAUTISTA-BECERRIL, B.; PÉREZ-DIMAS, G.; SOMMERHALDER-NAVA, P. C.; HANONO, A.; MARTÍNEZ-CISNEROS, J. A.; ZARATE-MALDONADO, B.; MUÑOZ-SORIA, E.; AQUINO-GÁLVEZ, A.; CASTILLEJOS-LÓPEZ, M.; JUÁREZ-CISNEROS, A.; LOPEZ-GONZALEZ, J. S.; CAMARENA, A. miRNAs, from Evolutionary Junk to Possible Prognostic Markers and Therapeutic Targets in COVID-19. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 41, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4915/14/1/41>.
- BESTLE, D.; HEINDL, M. R.; LIMBURG, H.; VAN LAM VAN, T.; PILGRAM, O.; MOULTON, H.; STEIN, D. A.; HARDES, K.; EICKMANN, M.; DOLNIK, O.; ROHDE, C.; KLENK, H.-D.; GARTEN, W.; STEINMETZER, T.; BÖTTCHER-FRIEBERTSHÄUSER, E. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells. **Life Science Alliance**, v. 3, n. 9, p. e202000786, 2020. Disponível em: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.202000786>.
- BHATTI, G. K.; KHULLAR, N.; SIDHU, I. S.; NAVIK, U. S.; REDDY, A. P.; REDDY, P. H.; BHATTI, J. S. Emerging role of non-coding RNA in health and disease. **Metabolic Brain Disease**, v. 36, n. 6, p. 1119–1134, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S025508572104127X>.
- BONI, M. F.; LEMEY, P.; JIANG, X.; LAM, T. T.-Y.; PERRY, B. W.; CASTOE, T. A.; RAMBAUT, A.; ROBERTSON, D. L. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1408–1417, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-020-0771-4>.
- BRENNECKE, J.; ARAVIN, A. A.; STARK, A.; DUS, M.; KELLIS, M.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Discrete Small RNA-Generating Loci as Master Regulators of Transposon Activity in Drosophila. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1089–1103, 2007.
- BREST, P.; REFAE, S.; MOGRABI, B.; HOFMAN, P.; MILANO, G. Host Polymorphisms May Impact SARS-CoV-2 Infectivity. **Trends in Genetics**, v. 36, n. 11, p. 813–815, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952520302031>.

BURD, C. E.; JECK, W. R.; LIU, Y.; SANOFF, H. K.; WANG, Z.; SHARPLESS, N. E. Expression of Linear and Novel Circular Forms of an INK4/ARF-Associated Non-Coding RNA Correlates with Atherosclerosis Risk. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 12, p. e1001233, 2010. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1001233>.

CABRAL, G. F.; PINHEIRO, J. A. D. S.; VIDAL, A. F.; SANTOS, S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. Pirnas in gastric cancer: A new approach towards translational research. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, 2020.

CAI, Z.; LU, C.; HE, J.; LIU, L.; ZOU, Y.; ZHANG, Z.; ZHU, Z.; GE, X.; WU, A.; JIANG, T.; ZHENG, H.; PENG, Y. Identification and characterization of circRNAs encoded by MERS-CoV, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 1297–1308, 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/bib/article/22/2/1297/6015892>.

CAI, Z.; LU, C.; HE, J.; LIU, L.; ZOU, Y.; ZHANG, Z.; ZHU, Z.; GE, X.; WU, A.; JIANG, T.; ZHENG, H.; PENG, Y. Identification and characterization of circRNAs encoded by MERS-CoV, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2. **Briefings in Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 1297–1308, 2021.

CAI, Y.; ZHANG, J.; XIAO, T.; LAVINE, C. L.; RAWSON, S.; PENG, H.; ZHU, H.; ANAND, K.; TONG, P.; GAUTAM, A.; LU, S.; STERLING, S. M.; WALSH, R. M.; RITS-VOLLOCH, S.; LU, J.; WESEMANN, D. R.; YANG, W.; SEAMAN, M. S.; CHEN, B. Structural basis for enhanced infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 variants. **Science**, v. 373, n. 6555, p. 642–648, 2021. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abi9745>.

CAO, Y.; LI, L.; FENG, Z.; WAN, S.; HUANG, P.; SUN, X.; WEN, F.; HUANG, X.; NING, G.; WANG, W. Comparative genetic analysis of the novel coronavirus (2019-nCoV/SARS-CoV-2) receptor ACE2 in different populations. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 11, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41421-020-0147-1>.

CARPENTER, S.; AIELLO, D.; ATIANAND, M. K.; RICCI, E. P.; GANDHI, P.; HALL, L. L.; BYRON, M.; MONKS, B.; HENRY-BEZY, M.; LAWRENCE, J. B.; O'NEILL, L. A. J.; MOORE, M. J.; CAFFREY, D. R.; FITZGERALD, K. A. A Long Noncoding RNA Mediates Both Activation and Repression of Immune Response Genes. **Science**, v. 341, n. 6147, p. 789–792, 2013. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1240925>.

CASCELLA, M.; RAJNIK, M.; CUOMO, A.; DULEBOHN, S. C.; DI NAPOLI, R. **Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19)**. [S. l.]: StatPearls Publishing, 2022. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554776/>. Acesso em: 8 out. 2022.

CASTRO DE MOURA, M.; DAVALOS, V.; PLANAS-SERRA, L.; ALVAREZ-ERRICO, D.; ARRIBAS, C.; RUIZ, M.; AGUILERA-ALBESA, S.; TROYA, J.; VALENCIA-RAMOS, J.; VÉLEZ-SANTAMARIA, V.; RODRÍGUEZ-PALMERO, A.; VILLAR-GARCIA, J.; HORCAJADA, J. P.; ALBU, S.; CASASNOVAS, C.; RULL, A.; REVERTE, L.; DIETL, B.; DALMAU, D.; ARRANZ, M. J.; LLUCIÀ-CAROL, L.; PLANAS, A. M.; PÉREZ-TUR, J.; FERNANDEZ-CADENAS, I.; VILLARES, P.; TENORIO, J.; COLOBRAN, R.; MARTIN-NALDA, A.; SOLER-PALACIN, P.; VIDAL, F.; PUJOL, A.; ESTELLER, M. Epigenome-wide association study of COVID-19 severity with respiratory failure. **EBioMedicine**, v. 66, p. 103339, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396421001328>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **SARS-CoV-2 Variant**

Classifications and Definitions. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>. Acesso em: 8 out. 2022.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Underlying Medical Conditions Associated with Higher Risk for Severe COVID-19: Information for Healthcare Professionals | CDC.** [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/clinical-care/underlyingconditions.html>. Acesso em: 8 out. 2022.

CHEN, C.; SARNOV, P. Initiation of Protein Synthesis by the Eukaryotic Translational Apparatus on Circular RNAs. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 415–417, 1995. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.7536344>.

CHEN, Y. G.; SATPATHY, A. T.; CHANG, H. Y. Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs. **Nature Immunology**, v. 18, n. 9, p. 962–972, 2017.

CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X.; QU, J.; GONG, F.; HAN, Y.; QIU, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; WEI, Y.; XIA, J.; YU, T.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620302117>.

CHENG, J.; GUO, J.-M.; XIAO, B.-X.; MIAO, Y.; JIANG, Z.; ZHOU, H.; LI, Q.-N. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 17–18, p. 1621–1625, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2011.05.015>.

CONN, V. M.; HUGOUVIEUX, V.; NAYAK, A.; CONOS, S. A.; CAPOVILLA, G.; CILDIR, G.; JOURDAIN, A.; TERGAONKAR, V.; SCHMID, M.; ZUBIETA, C.; CONN, S. J. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. **Nature Plants**, v. 3, n. April, p. 4–8, 2017.

CONN, S. J.; PILLMAN, K. A.; TOUBIA, J.; CONN, V. M.; SALMANIDIS, M.; PHILLIPS, C. A.; ROSLAN, S.; SCHREIBER, A. W.; GREGORY, P. A.; GOODALL, G. J. The RNA Binding Protein Quaking Regulates Formation of circRNAs. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1125–1134, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415001798>.

CUI, S.; QIAN, Z.; CHEN, Y.; LI, L.; LI, P.; DING, H. Screening of up- and downregulation of circRNAs in HBV-related hepatocellular carcinoma by microarray. **Oncology Letters**, 2017. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7265>.

DANAN, M.; SCHWARTZ, S.; EDELHEIT, S.; SOREK, R. Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 3131–3142, 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/40/7/3131/1181564>.

DAVID ELLINGHAUS, FRAUKE DEGENHARDT, LUIS BUJANDA, MARIA BUTI, AGUSTÍN ALBILLOS, PIETRO INVERNIZZI, JAVIER FERNÁNDEZ, D. P. et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 16, p. 1522–1534, 2020. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2020283>.

DE SOUZA, W. M.; BUSS, L. F.; CANDIDO, D. da S.; CARRERA, J. P.; LI, S.; ZAREBSKI, A. E.; PEREIRA, R. H. M.; PRETE, C. A.; DE SOUZA-SANTOS, A. A.; PARAG, K. V.;

BELOTTI, M. C. T. D.; VINCENTI-GONZALEZ, M. F.; MESSINA, J.; DA SILVA SALES, F. C.; ANDRADE, P. dos S.; NASCIMENTO, V. H.; GHILARDI, F.; ABADE, L.; GUTIERREZ, B.; KRAEMER, M. U. G.; BRAGA, C. K. V.; AGUIAR, R. S.; ALEXANDER, N.; MAYAUD, P.; BRADY, O. J.; MARCILIO, I.; GOUVEIA, N.; LI, G.; TAMI, A.; DE OLIVEIRA, S. B.; PORTO, V. B. G.; GANEM, F.; DE ALMEIDA, W. A. F.; FANTINATO, F. F. S. T.; MACÁRIO, E. M.; DE OLIVEIRA, W. K.; NOGUEIRA, M. L.; PYBUS, O. G.; WU, C. H.; CRODA, J.; SABINO, E. C.; FARIA, N. R. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856–865, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41562-020-0928-4>.

DELANGHE, J. R.; DE BUYZERE, M. L.; SPEECKAERT, M. M. Genetic Polymorphisms in the Host and COVID-19 Infection. In: [S. l.: s. n.], 2021. p. 109–118. Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-63761-3_7.

DEMIRCI, Y. M.; SAÇAR DEMIRCI, M. D. Circular RNA-MicroRNA-mRNA interaction predictions in SARS-CoV-2 infection. **Journal of integrative bioinformatics**, v. 18, n. 1, p. 45–50, 2021.

DJOMKAM, A. L. Z.; OLWAL, C. O.; SALA, T. B.; PAEMKA, L. Commentary: SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Frontiers in Oncology**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.01448/full>.

DONYAVI, T.; BOKHARAEI-SALIM, F.; BAGHI, H. B.; KHANALIHA, K.; ALAEI JANAT-MAKAN, M.; KARIMI, B.; SADRI NAHAND, J.; MIRZAEI, H.; KHATAMI, A.; GARSHASBI, S.; KHOSHMIRSAFA, M.; JALAL KIANI, S. Acute and post-acute phase of COVID-19: Analyzing expression patterns of miRNA-29a-3p, 146a-3p, 155-5p, and let-7b-3p in PBMC. **International Immunopharmacology**, v. 97, p. 107641, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576921002770>.

DOS SANTOS, A. C. M.; DOS SANTOS, B. R. C.; DOS SANTOS, B. B.; DE MOURA, E. L.; FERREIRA, J. M.; DOS SANTOS, L. K. C.; OLIVEIRA, S. P.; DIAS, R. B. F.; PEREIRA E SILVA, A. C.; DE FARIAS, K. F.; DE SOUZA FIGUEIREDO, E. V. M. Genetic polymorphisms as multi-biomarkers in severe acute respiratory syndrome (SARS) by coronavirus infection: A systematic review of candidate gene association studies. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104846, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S156713482100143X>.

DU, W. W.; ZHANG, C.; YANG, W.; YONG, T.; AWAN, F. M.; YANG, B. B. Identifying and Characterizing circRNA-Protein Interaction. **Theranostics**, v. 7, n. 17, p. 4183–4191, 2017. Disponível em: <http://www.thno.org/v07p4183.htm>.

EDDY, S. R. The ENCODE project : Missteps overshadowing a success. **CURBIO**, v. 23, n. 7, p. R259–R261, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.023>.

FIROOZI, Z.; MOHAMMADISOLEIMANI, E.; SHAHI, A.; NAGHIZADEH, M. M.; MIRZAEI, E.; ASAD, A. G.; SALMANPOUR, Z.; JAVAD NOURI, S. M.; MANSOORI, Y. Hsa_circ_0000479/Hsa-miR-149-5p/RIG-I, IL-6 Axis: A Potential Novel Pathway to Regulate Immune Response against COVID-19. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2022, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2022/2762582/>.

FU, A.; JACOBS, D. I.; HOFFMAN, A. E.; ZHENG, T.; ZHU, Y. PIWI-interacting RNA 021285 is involved in breast tumorigenesis possibly by remodeling the cancer epigenome.

Carcinogenesis, v. 36, n. 10, p. 1094–1102, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgv105>.

FU, Q.; WANG, P. J. Mammalian piRNAs. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 1, p. e27889, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25077039><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4114582>.

FU, Y.; WANG, J.; QIAO, J.; YI, Z. Signature of circular RNAs in peripheral blood mononuclear cells from patients with active tuberculosis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 1917–1925, 2019. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.14093>.

FULZELE, S.; SAHAY, B.; YUSUFU, I.; LEE, T. J.; SHARMA, A.; KOLHE, R.; ISALES, C. M. COVID-19 Virulence in Aged Patients Might Be Impacted by the Host Cellular MicroRNAs Abundance/Profile. **Aging and disease**, v. 11, n. 3, p. 509, 2020. Disponível em: <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2020.0428>.

GAO, Z.-R.; LIU, Q.; ZHAO, J.; ZHAO, Y.-Q.; TAN, L.; ZHANG, S.-H.; ZHOU, Y.-H.; CHEN, Y.; GUO, Y.; FENG, Y.-Z. A comprehensive analysis of the circRNA–miRNA–mRNA network in osteocyte-like cell associated with Mycobacterium leprae infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 16, n. 5, p. e0010379, 2022. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0010379>.

GAO, Y.; WANG, J.; ZHAO, F. CIRI: an efficient and unbiased algorithm for de novo circular RNA identification. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 4, 2015. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-014-0571-3>.

GASPERSIC, J.; DOLZAN, V. Viral and Host Genetic and Epigenetic Biomarkers Related to SARS-CoV-2 Cell Entry, Infection Rate, and Disease Severity. **Biology**, v. 11, n. 2, p. 178, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-7737/11/2/178>.

GHOSAL, S.; DAS, S.; SEN, R.; CHAKRABARTI, J. HumanViCe: host ceRNA network in virus infected cells in human. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2014.00249/abstract>.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M.; NEUMAN, B. W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SAMBORSKIY, D. V.; SIDOROV, I. A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020a.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; DE GROOT, R. J.; DROSTEN, C.; GULYAEVA, A. A.; HAAGMANS, B. L.; LAUBER, C.; LEONTOVICH, A. M.; NEUMAN, B. W.; PENZAR, D.; PERLMAN, S.; POON, L. L. M.; SAMBORSKIY, D. V.; SIDOROV, I. A.; SOLA, I.; ZIEBUHR, J. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020b. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-020-0695-z>.

GUNAL, O.; SEZER, O.; USTUN, G. U.; OZTURK, C. E.; SEN, A.; YIGIT, S.; DEMIRAG, M. D. Angiotensin-converting enzyme-1 gene insertion/deletion polymorphism may be associated with COVID-19 clinical severity: a prospective cohort study. **Annals of Saudi Medicine**, v. 41, n. 3, p. 141–146, 2021. Disponível em:

<http://www.annsaudimed.net/doi/10.5144/0256-4947.2021.141>.

GUO, W.; ZHANG, J.; ZHANG, D.; CAO, S.; LI, G.; ZHANG, S.; WANG, Z.; WEN, P.; YANG, H.; SHI, X.; PAN, J.; YE, H. Polymorphisms and expression pattern of circular RNA circ-ITCH contributes to the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 29, p. 48169–48177, 2017. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.18327>.

GURUPRASAD, L. Human SARS-CoV-2 spike protein mutations. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 89, n. 5, p. 569–576, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/prot.26042>.

HADJADJ, J.; YATIM, N.; BARNABEI, L.; CORNEAU, A.; BOUSSIER, J.; SMITH, N.; PÉRÉ, H.; CHARBIT, B.; BONDET, V.; CHENEVIER-GOBEAUX, C.; BREILLAT, P.; CARLIER, N.; GAUZIT, R.; MORBIEU, C.; PÈNE, F.; MARIN, N.; ROCHE, N.; SZWEBEL, T.-A.; MERKLING, S. H.; TRELUYER, J.-M.; VEYER, D.; MOUTHON, L.; BLANC, C.; THARAUX, P.-L.; ROZENBERG, F.; FISCHER, A.; DUFFY, D.; RIEUX-LAUCAT, F.; KERNÉIS, S.; TERRIER, B. Impaired type I interferon activity and inflammatory responses in severe COVID-19 patients. **Science**, v. 369, n. 6504, p. 718–724, 2020. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abc6027>.

HALVORSEN, M.; MARTIN, J. S.; BROADAWAY, S.; LAEDERACH, A. Disease-Associated Mutations That Alter the RNA Structural Ensemble. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 8, p. e1001074, 2010. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1001074>.

HAN, B. W.; ZAMORE, P. D. piRNAs. **Current Biology**, v. 24, n. 16, p. R730–R733, 2014. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982214009002>.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11993>.

HANSEN, T. B.; WIKLUND, E. D.; BRAMSEN, J. B.; VILLADSEN, S. B.; STATHAM, A. L.; CLARK, S. J.; KJEMS, J. MiRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. **EMBO Journal**, v. 30, n. 21, p. 4414–4422, 2011.

HARRISON, S. L.; FAZIO-EYNULAYEVA, E.; LANE, D. A.; UNDERHILL, P.; LIP, G. Y. H. Comorbidities associated with mortality in 31,461 adults with COVID-19 in the United States: A federated electronic medical record analysis. **PLOS Medicine**, v. 17, n. 9, p. e1003321, 2020. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1003321>.

HEIDARI NIA, M.; ROKNI, M.; MIRINEJAD, S.; KARGAR, M.; RAHDAR, S.; SARGAZI, S.; SARHADI, M.; SARAVANI, R. Association of polymorphisms in tumor necrosis factors with SARS-CoV-2 infection and mortality rate: A case-control study and in silico analyses. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 4, p. 1502–1512, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27477>.

HENTZE, M. W.; PREISS, T. Circular RNAs: Splicing's enigma variations. **EMBO Journal**, v. 32, n. 7, p. 923–925, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.53>.

HOFFMANN, M.; KLEINE-WEBER, H.; SCHROEDER, S.; KRÜGER, N.; HERRLER, T.; ERICHSEN, S.; SCHIERGENS, T. S.; HERRLER, G.; WU, N. H.; NITSCHKE, A.; MÜLLER, M. A.; DROSTEN, C.; PÖHLMANN, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and

TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, 2020.

HOLDT, L. M.; STAHRINGER, A.; SASS, K.; PICHLER, G.; KULAK, N. A.; WILFERT, W.; KOHLMAIER, A.; HERBST, A.; NORTHOFF, B. H.; NICOLAOU, A.; GÄBEL, G.; BEUTNER, F.; SCHOLZ, M.; THIERY, J.; MUSUNURU, K.; KROHN, K.; MANN, M.; TEUPSER, D. Circular non-coding RNA ANRIL modulates ribosomal RNA maturation and atherosclerosis in humans. **Nature Communications**, v. 7, 2016.

HOU, Y.; ZHAO, J.; MARTIN, W.; KALLIANPUR, A.; CHUNG, M. K.; JEHI, L.; SHARIFI, N.; ERZURUM, S.; ENG, C.; CHENG, F. New insights into genetic susceptibility of COVID-19: an ACE2 and TMPRSS2 polymorphism analysis. **BMC Medicine**, v. 18, n. 1, p. 216, 2020. Disponível em: <https://bmcmmedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12916-020-01673-z>.

HU, Y.; YANG, R.; ZHAO, W.; LIU, C.; TAN, Y.; PU, D.; SONG, J.; ZHANG, Y. circRNA expression patterns and circRNA-miRNA-mRNA networks during CV-A16 infection of SH-SY5Y cells. **Archives of Virology**, v. 166, n. 11, p. 3023–3035, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-021-05190-z>.

HUANG, J.; CHEN, J.; GONG, L.; BI, Y.; LIANG, J.; ZHOU, L.; HE, D.; SHAO, C. Identification of virus-encoded circular RNA. **Virology**, v. 529, p. 144–151, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682219300145>.

HUANG, Xiu-Yan; HUANG, Z.-L.; XU, Y.-H.; ZHENG, Q.; CHEN, Z.; SONG, W.; ZHOU, J.; TANG, Z.-Y.; HUANG, Xin-Yu. Comprehensive circular RNA profiling reveals the regulatory role of the circRNA-100338/miR-141-3p pathway in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5428, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05432-8>.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; XIAO, Y.; GAO, H.; GUO, L.; XIE, J.; WANG, G.; JIANG, R.; GAO, Z.; JIN, Q.; WANG, J.; CAO, B. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620301835>.

HUANG, Z.-K.; YAO, F.-Y.; XU, J.-Q.; DENG, Z.; SU, R.-G.; PENG, Y.-P.; LUO, Q.; LI, J.-M. Microarray Expression Profile of Circular RNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Active Tuberculosis Patients. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 1230–1240, 2018. Disponível em: <https://karger.com/CPB/article/doi/10.1159/000487454>.

IKHLAS, S.; USMAN, A.; KIM, D.; CAI, D. Exosomes/microvesicles target SARS-CoV-2 via innate and RNA-induced immunity with PIWI-piRNA system. **Life Science Alliance**, v. 5, n. 3, p. e202101240, 2022. Disponível em: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.202101240>.

IZUMI, N.; KAWAOKA, S.; YASUHARA, S.; SUZUKI, Y.; SUGANO, S.; KATSUMA, S.; TOMARI, Y. Corrigendum: Hsp90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 21, n. 6, p. 1217, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987474> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4436672>.

JACOBS, D. I.; QIN, Q.; FU, A.; CHEN, Z.; ZHOU, J.; ZHU, Y. piRNA-8041 is

downregulated in human glioblastoma and suppresses tumor growth in vitro and in vivo. **Oncotarget**, v. 9, n. 102, 2018. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/26331>.

JAIJYAN, D. K.; YANG, S.; RAMASAMY, S.; GU, A.; ZENG, M.; SUBBIAN, S.; TYAGI, S.; ZHU, H. Imaging and quantification of human and viral circular RNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. 15, p. e70–e70, 2024. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/52/15/e70/7720765>.

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. Disponível em: <http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.035667.112>.

JESUS, J. G. de; SACCHI, C.; CANDIDO, D. da S.; CLARO, I. M.; SALES, F. C. S.; MANULI, E. R.; SILVA, D. B. B. da; PAIVA, T. M. de; PINHO, M. A. B.; SANTOS, K. C. de O.; HILL, S. C.; AGUIAR, R. S.; ROMERO, F.; SANTOS, F. C. P. dos; GONÇALVES, C. R.; TIMENETSKY, M. do C.; QUICK, J.; CRODA, J. H. R.; OLIVEIRA, W. de; RAMBAUT, A.; PYBUS, O. G.; LOMAN, N. J.; SABINO, E. C.; FARIA, N. R. Importation and early local transmission of COVID-19 in Brazil, 2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, 2020. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652020000100218&tlng=en.

JIAO, S.; WU, S.; HUANG, S.; LIU, M.; GAO, B. Advances in the Identification of Circular RNAs and Research Into circRNAs in Human Diseases. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. March, p. 1–8, 2021.

KADAM, S. B.; SUKHRAMANI, G. S.; BISHNOI, P.; PABLE, A. A.; BARVKAR, V. T. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 180–202, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jobm.202000537>.

KANNAN, S.; ALI, P. S. S.; SHEEZA, A. Evolving biothreat of variant SARS-CoV-2 - molecular properties, virulence and epidemiology. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 25, n. 12, p. 4405–4412, 2021.

KIRINO, Y.; MOURELATOS, Z. The mouse homolog of HEN1 is a potential methylase for Piwi-interacting RNAs. **RNA**, v. 13, n. 9, p. 1397–1401, 2007. Disponível em: <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.659307>.

KNOLL, M.; LODISH, H. F.; SUN, L. Long non-coding RNAs as regulators of the endocrine system. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 3, p. 151–160, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2014.229>.

KONDRATOV, K. A.; ARTAMONOV, A. A.; NIKITIN, Y. V.; VELMISKINA, A. A.; MIKHAILOVSKII, V. Y.; MOSENKO, S. V.; POLKOVNIKOVA, I. A.; ASINOVSKAYA, A. Y.; APALKO, S. V.; SUSHENTSEVA, N. N.; IVANOV, A. M.; SCHERBAK, S. G. Revealing differential expression patterns of piRNA in FACS blood cells of SARS-CoV-2 infected patients. **BMC Medical Genomics**, v. 17, n. 1, p. 212, 2024. Disponível em: <https://bmcmmedgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12920-024-01982-9>.

KRISTENSEN, L. S.; ANDERSEN, M. S.; STAGSTED, L. V. W.; EBBESEN, K. K.; HANSEN, T. B.; KJEMS, J. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 675–691, 2019. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/s41576-019-0158-7>.

LAI, F. W.; STEPHENSON, K. B.; MAHONY, J.; LICHTY, B. D. Human Coronavirus OC43 Nucleocapsid Protein Binds MicroRNA 9 and Potentiates NF- κ B Activation. **Journal of Virology**, v. 88, n. 1, p. 54–65, 2014. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02678-13>.

LAM, T. T.-Y.; JIA, N.; ZHANG, Y.-W.; SHUM, M. H.-H.; JIANG, J.-F.; ZHU, H.-C.; TONG, Y.-G.; SHI, Y.-X.; NI, X.-B.; LIAO, Y.-S.; LI, W.-J.; JIANG, B.-G.; WEI, W.; YUAN, T.-T.; ZHENG, K.; CUI, X.-M.; LI, J.; PEI, G.-Q.; QIANG, X.; CHEUNG, W. Y.-M.; LI, L.-F.; SUN, F.-F.; QIN, S.; HUANG, J.-C.; LEUNG, G. M.; HOLMES, E. C.; HU, Y.-L.; GUAN, Y.; CAO, W.-C. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282–285, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41586-020-2169-0>.

LASDA, E.; PARKER, R. Circular RNAs: Diversity of form and function. **Rna**, v. 20, n. 12, p. 1829–1842, 2014.

LEGNINI, I.; DI TIMOTEO, G.; ROSSI, F.; MORLANDO, M.; BRIGANTI, F.; STHANDIER, O.; FATICA, A.; SANTINI, T.; ANDRONACHE, A.; WADE, M.; LANEVE, P.; RAJEWSKY, N.; BOZZONI, I. 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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.017>.

LI, J.; GUO, M.; TIAN, X.; WANG, X.; YANG, X.; WU, P.; LIU, C.; XIAO, Z.; QU, Y.; YIN, Y.; WANG, C.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; LIU, Z.; PENG, C.; ZHU, T.; LIANG, Q. Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis. **Med**, v. 2, n. 1, p. 99–112.e7, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2666634020300155>.

LI, C.; HU, X.; LI, L.; LI, J. Differential microRNA expression in the peripheral blood from human patients with COVID-19. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 10, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23590>.

LI, Z.; HUANG, C.; BAO, C.; CHEN, L.; LIN, M.; WANG, X.; ZHONG, G.; YU, B.; HU, W.; DAI, L.; ZHU, P.; CHANG, Z.; WU, Q.; ZHAO, Y.; JIA, Y.; XU, P.; LIU, H.; SHAN, G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 256–264, 2015. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nsmb.2959>.

LI, L. quan; HUANG, Tian; WANG, Yong qing; WANG, Z. ping; LIANG, Y.; HUANG, Tao bi; ZHANG, H. yun; SUN, W.; WANG, Yuping. COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 577–583, 2020.

LI, X.; LIU, C.-X.; XUE, W.; ZHANG, Y.; JIANG, S.; YIN, Q.-F.; WEI, J.; YAO, R.-W.; YANG, L.; CHEN, L.-L. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. **Molecular Cell**, v. 67, n. 2, p. 214–227.e7, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276517303635>.

LI, J.; YANG, G.; LIU, J.; LI, G.; ZHOU, H.; HE, Y.; FEI, X.; ZHAO, D. Integrating transcriptomics, eQTL, and Mendelian randomization to dissect monocyte roles in severe COVID-19 and gout flare. **Frontiers in Genetics**, v. 15, 2024. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2024.1385316/full>.

LIANG, D.; WILUSZ, J. E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. **Genes and Development**, v. 28, n. 20, p. 2233–2247, 2014.

LIN, X.; XIA, Y.; HU, D.; MAO, Q.; YU, Z.; ZHANG, Hejun; LI, C.; CHEN, G.; LIU, F.; ZHU, W.; SHI, Y.; ZHANG, Huihao; ZHENG, J.; SUN, T.; XU, J.; CHAO, H.; ZHENG, X.; LUO, X. Transcriptome-wide piRNA profiling in human gastric cancer. **Oncology Reports**, 2019. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2019.7073>.

LIU, S.; CHEN, L.; ZENG, Y.; SI, L.; GUO, X.; ZHOU, J.; FANG, D.; ZENG, G.; JIANG, L. Suppressed expression of miR-378 targeting gzmB in NK cells is required to control dengue virus infection. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 5, p. 700–708, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cmi201552>.

LIU, J.; LI, Y.; LIU, Q.; YAO, Q.; WANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, R.; REN, L.; MIN, J.; DENG, F.; YAN, B.; LIU, L.; HU, Z.; WANG, M.; ZHOU, Y. SARS-CoV-2 cell tropism and multiorgan infection. **Cell Discovery**, v. 7, n. 1, p. 17, 2021. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41421-021-00249-2>.

LIU, C.-X.; LI, X.; NAN, F.; JIANG, S.; GAO, X.; GUO, S.-K.; XUE, W.; CUI, Y.; DONG, K.; DING, H.; QU, B.; ZHOU, Z.; SHEN, N.; YANG, L.; CHEN, L.-L. Structure and Degradation of Circular RNAs Regulate PKR Activation in Innate Immunity. **Cell**, v. 177, n. 4, p. 865–880.e21, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867419303472>.

LIU, Z.; RAN, Y.; TAO, C.; LI, S.; CHEN, J.; YANG, E. Detection of circular RNA expression and related quantitative trait loci in the human dorsolateral prefrontal cortex. **Genome Biology**, v. 20, n. 1, p. 99, 2019. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-019-1701-8>.

LIU, W.; WANG, Z.; LIU, L.; YANG, Z.; LIU, S.; MA, Z.; LIU, Y.; MA, Y.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; JIANG, M.; CAO, X. LncRNA Malat1 inhibition of TDP43 cleavage suppresses IRF3-initiated antiviral innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 38, p. 23695–23706, 2020. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2003932117>.

LIU, M.; WANG, Q.; SHEN, J.; YANG, B. B.; DING, X. Circbank: a comprehensive database for circRNA with standard nomenclature. **RNA Biology**, v. 16, n. 7, p. 899–905, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1600395>.

LIU, X.; WANG, Q.; ZHAO, J.; CHANG, H.; ZHU, R. Inflammation-Related circRNA Polymorphism and Ischemic Stroke Prognosis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 71, n. 10, p. 2126–2133, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s12031-021-01889-5>.

LU, Z.; FILONOV, G. S.; NOTO, J. J.; SCHMIDT, C. A.; HATKEVICH, T. L.; WEN, Y.; JAFFREY, S. R.; MATERA, A. G. Metazoan tRNA introns generate stable circular RNAs in vivo. **RNA**, v. 21, n. 9, p. 1554–1565, 2015. Disponível em: <http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.052944.115>.

LU, S.; ZHU, N.; GUO, W.; WANG, X.; LI, K.; YAN, J.; JIANG, C.; HAN, S.; XIANG, H.; WU, X.; LIU, Y.; XIONG, H.; CHEN, L.; GONG, Z.; LUO, F.; HOU, W. RNA-Seq Revealed a Circular RNA-microRNA-mRNA Regulatory Network in Hantaan Virus Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2020.00097/full>.

LUNA, J. M.; SCHEEL, T. K. H.; DANINO, T.; SHAW, K. S.; MELE, A.; FAK, J. J.; NISHIUCHI, E.; TAKACS, C. N.; CATANESE, M. T.; DE JONG, Y. P.; JACOBSON, I. M.; RICE, C. M.; DARNELL, R. B. Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. **Cell**, v. 160, n. 6, p. 1099–1110, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867415001919>.

LUO, Q.; ZHANG, L.; FANG, L.; FU, B.; GUO, Y.; HUANG, Z.; LI, J. Circular RNAs hsa_circ_0000479 in peripheral blood mononuclear cells as novel biomarkers for systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, v. 53, n. 3, p. 167–176, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/08916934.2020.1728529>.

MALONE, C. D.; BRENNECKE, J.; DUS, M.; STARK, A.; MCCOMBIE, W. R.; SACHIDANANDAM, R.; HANNON, G. J. Specialized piRNA Pathways Act in Germline and Somatic Tissues of the Drosophila Ovary. **Cell**, v. 137, n. 3, p. 522–535, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409003778>.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, E.; BROCHADO-KITH, Ó.; GÓMEZ-SANZ, A.; MARTÍN-CARBONERO, L.; JIMENEZ-SOUSA, M. Á.; MARTÍNEZ-ROMÁN, P.; RESINO, S.; BRIZ, V.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, A. Comparison of methods and characterization of small RNAs from plasma extracellular vesicles of HIV/HCV coinfecting patients. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 11140, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-67935-1>.

MATTICK, J. S.; DINGER, M. E. The extent of functionality in the human genome. [s. l.], p. 2–5, 2013.

MEHTA, P.; MCAULEY, D. F.; BROWN, M.; SANCHEZ, E.; TATTERSALL, R. S.; MANSON, J. J. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1033–1034, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673620306280>.

MEMCZAK, S.; JENS, M.; ELEFSINIOTI, A.; TORTI, F.; KRUEGER, J.; RYBAK, A.; MAIER, L.; MACKOWIAK, S. D.; GREGERSEN, L. H.; MUNSCHAUER, M.; LOEWER, A.; ZIEBOLD, U.; LANDTHALER, M.; KOCKS, C.; LE NOBLE, F.; RAJEWSKY, N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 333–338, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11928>.

MESSNER, C. B.; DEMICHEV, V.; WENDISCH, D.; MICHALICK, L.; WHITE, M.; FREIWALD, A.; TEXTORIS-TAUBE, K.; VERNARDIS, S. I.; EGGER, A.-S.; KREIDL, M.; LUDWIG, D.; KILIAN, C.; AGOSTINI, F.; ZELEDZNIAK, A.; THIBEAULT, C.; PFEIFFER, M.; HIPPENSTIEL, S.; HOCKE, A.; VON KALLE, C.; CAMPBELL, A.; HAYWARD, C.; PORTEOUS, D. J.; MARIONI, R. E.; LANGENBERG, C.; LILLEY, K. S.; KUEBLER, W. M.; MÜLLEDER, M.; DROSTEN, C.; SUTTORP, N.; WITZENRATH, M.; KURTH, F.; SANDER, L. E.; RALSER, M. Ultra-High-Throughput Clinical Proteomics Reveals Classifiers of COVID-19 Infection. **Cell Systems**, v. 11, n. 1, p. 11–24.e4, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405471220301976>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico Especial: Doença pelo Coronavírus – COVID-19.** [S. l.: s. n.], 2024. 2024.

MIRZA, A. H.; KAUR, S.; BRORSSON, C. A.; POCLOT, F. Effects of GWAS-associated genetic variants on lncRNAs within IBD and T1D candidate loci. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014.

MIRZAEI, E.; SHAHI, A.; DARAEI, A.; MOVAHEDI, B.; KARIMI, J.; FARJAM, M.;

GHOLAMPOOR, Y.; MESHKIBAF, M. H.; ANSARI, A.; FIROOZI, Z.; MANSOORI, Y. Immune Regulatory Circular RNAs, circRasGEF1B and circHIPK3, are Upregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of COVID-19 Patients. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 28, n. 11, p. 452–459, 2024. Disponível em: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/gtmb.2024.0337>.

NAHAND, J. S.; JAMSHIDI, S.; HAMBLIN, M. R.; MAHJOUBIN-TEHRAN, M.; VOSOUGH, M.; JAMALI, M.; KHATAMI, A.; MOGHOOFEI, M.; BAGHI, H. B.; MIRZAEI, H. Circular RNAs: New Epigenetic Signatures in Viral Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. July, 2020.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Nih**, v. 2019, p. 1–243, 2022. Disponível em: <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/%0Ahttps://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>.

NEXTRAIN/GISAID. Nextstrain SARS-CoV-2 resources. [s. l.], 2022. Disponível em: Nextrains SARS-CoV-2 Resources. Acesso em: 8 out. 2022.

NGUYEN, D. T. An integrative pipeline for circular RNA quantitative trait locus discovery with application in human T cells. **Bioinformatics**, v. 39, n. 11, 2023. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/doi/10.1093/bioinformatics/btad667/7334462>.

NOROOZI, R.; BRANICKI, W.; PYRC, K.; ŁABAJ, P. P.; POSPIECH, E.; TAHERI, M.; GHAFOURI-FARD, S. Altered cytokine levels and immune responses in patients with SARS-CoV-2 infection and related conditions. **Cytokine**, v. 133, p. 155143, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466620301599>.

NOTO, J. J.; SCHMIDT, C. A.; MATERA, A. G. Engineering and expressing circular RNAs via tRNA splicing. **RNA Biology**, v. 14, n. 8, p. 978–984, 2017. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2017.1317911>.

OLIVIERI, D.; SYKORA, M. M.; SACHIDANANDAM, R.; MECHTLER, K.; BRENNECKE, J. An in vivo RNAi assay identifies major genetic and cellular requirements for primary piRNA biogenesis in Drosophila. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 19, p. 3301–3317, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.212>.

OZATA, D. M.; GAINETDINOV, I.; ZOCH, A.; O'CARROLL, D.; ZAMORE, P. D. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 2, p. 89–108, 2019. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41576-018-0073-3>.

PAMUDURTI, N. R.; BARTOK, O.; JENS, M.; ASHWAL-FLUSS, R.; STOTTMEISTER, C.; RUHE, L.; HANAN, M.; WYLER, E.; PEREZ-HERNANDEZ, D.; RAMBERGER, E.; SHENZIS, S.; SAMSON, M.; DITTMAR, G.; LANDTHALER, M.; CHEKULAEVA, M.; RAJEWSKY, N.; KADENER, S. Translation of CircRNAs. **Molecular Cell**, v. 66, n. 1, p. 9–21.e7, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.021>.

PARABOSCHI, E. M.; CARDAMONE, G.; SOLDÀ, G.; DUGA, S.; ASSELTA, R. Interpreting Non-coding Genetic Variation in Multiple Sclerosis Genome-Wide Associated Regions. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. December, p. 1–10, 2018.

PARUMS, D. V. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) Terminology for Variants of Concern and Variants of Interest of SARS-CoV-2. **Medical Science Monitor**, v.

27, 2021.

PFAFENROT, C.; SCHNEIDER, T.; CHRISTIN, M.; HUNG, L.; SCHREINER, S.; ZIEBUHR, J.; BINDEREIF, A. Inhibition of SARS-CoV-2 coronavirus proliferation by designer antisense-circRNAs. [s. l.], v. 49, n. 21, p. 12502–12516, 2021.

PINTO, P.; DA SILVA, M. B.; MOREIRA, F. C.; BOUTH, R. C.; GOBBO, A. R.; SANDOVAL, T. V.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, A. M.; VIDAL, A. F.; BARRETO, J. G.; SANTOS, S.; SPENCER, J. S.; SALGADO, C. G.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. Leprosy piRnome: exploring new possibilities for an old disease. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12648, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-69355-7>.

PIWECKA, M.; GLAŽAR, P.; HERNANDEZ-MIRANDA, L. R.; MEMCZAK, S.; WOLF, S. A.; RYBAK-WOLF, A.; FILIPCHYK, A.; KLIRONOMOS, F.; CERDA JARA, C. A.; FENSKE, P.; TRIMBUCH, T.; ZYWITZA, V.; PLASS, M.; SCHREYER, L.; AYOUB, S.; KOCKS, C.; KÜHN, R.; ROSENMUND, C.; BIRCHMEIER, C.; RAJEWSKY, N. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. **Science**, v. 357, n. 6357, 2017. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aam8526>.

PONNUSAMY, M.; YAN, K.; LIU, C.; LI, P.; WANG, K. European Journal of Cell Biology PIWI family emerging as a decisive factor of cell fate : An overview. **European Journal of Cell Biology**, n. June, p. 0–1, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.09.004>.

QIAN, Z.; LIU, H.; LI, M.; SHI, J.; LI, N.; ZHANG, Y.; ZHANG, X.; LV, J.; XIE, X.; BAI, Y.; GE, Q.; KO, E.-A.; TANG, H.; WANG, T.; WANG, X.; WANG, Z.; ZHOU, T.; GU, W. Potential Diagnostic Power of Blood Circular RNA Expression in Active Pulmonary Tuberculosis. **EBioMedicine**, v. 27, p. 18–26, 2018. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396417304887>.

QU, Z.; MENG, F.; SHI, J.; DENG, G.; ZENG, X.; GE, J.; LI, Y.; LIU, L.; CHEN, P.; JIANG, Y.; LI, C.; CHEN, H. A Novel Intronic Circular RNA Antagonizes Influenza Virus by Absorbing a microRNA That Degrades CREBBP and Accelerating IFN- β Production. **mBio**, v. 12, n. 4, 2021. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01017-21>.

RAKHMETULLINA, A.; AKIMNIYAZOVA, A.; NIYAZOVA, T.; PYRKOVA, A.; KAMENOVA, S.; KONDYBAYEVA, A.; RYSKULOVA, A.-G.; IVASHCHENKO, A.; ZIELENKIEWICZ, P. Endogenous piRNAs Can Interact with the Omicron Variant of the SARS-CoV-2 Genome. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 45, n. 4, p. 2950–2964, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1467-3045/45/4/193>.

RAMBAUT, A.; HOLMES, E. C.; O'TOOLE, Á.; HILL, V.; MCCRONE, J. T.; RUIS, C.; DU PLESSIS, L.; PYBUS, O. G. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 1403–1407, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-020-0770-5>.

RANDS, C. M.; MEADER, S.; PONTING, C. P.; LUNTER, G. 8 . 2 % of the Human Genome Is Constrained : Variation in Rates of Turnover across Functional Element Classes in the Human Lineage. [s. l.], v. 10, n. 7, 2014.

REINHOLD, D.; FARZTDINOV, V.; YAN, Y.; MEISEL, C.; SADLOWSKI, H.; KÜHN, J.; PERSCHEL, F. H.; ENDRES, M.; DÜZEL, E.; VIELHABER, S.; GUTTEK, K.; GOIHL, A.; VENØ, M.; TEEGEN, B.; STÖCKER, W.; STUBBEMANN, P.; KURTH, F.; SANDER, L.

E.; RALSER, M.; OTTO, C.; STREIT, S.; JARIUS, S.; RUPRECHT, K.; RADBRUCH, H.; KJEMS, J.; MÜLLEDER, M.; HEPPNER, F.; KÖRTVELYESSY, P. The brain reacting to COVID-19: analysis of the cerebrospinal fluid proteome, RNA and inflammation. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, p. 30, 2023. Disponível em: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-023-02711-2>.

ROJAS-RÍOS, P.; SIMONELIG, M. piRNAs and PIWI proteins: regulators of gene expression in development and stem cells. **Development**, v. 145, n. 17, 2018. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/145/17/dev161786/19286/piRNAs-and-PIWI-proteins-regulators-of-gene>.

ROMANO, G.; VENEZIANO, D.; ACUNZO, M.; CROCE, C. M. Small non-coding RNA and cancer. **Carcinogenesis**, v. 38, n. 5, p. 485–491, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/bgx026>.

ROSS, R. J.; WEINER, M. M.; LIN, H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. **Nature**, v. 505, n. 7483, p. 353–359, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429634>. Acesso em: 16 fev. 2019.

RYAZANSKY, S.; RADION, E.; MIRONOVA, A.; AKULENKO, N.; ABRAMOV, Y.; MORGUNOVA, V.; KORDYUKOVA, M. Y.; OLOVNIKOV, I.; KALMYKOVA, A. Natural variation of piRNA expression affects immunity to transposable elements. **PLOS Genetics**, v. 13, n. 4, p. e1006731, 2017. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1006731>.

SAÇAR DEMIRCI, M. D.; ADAN, A. Computational analysis of microRNA-mediated interactions in SARS-CoV-2 infection. **PeerJ**, v. 8, p. e9369, 2020. Disponível em: <https://peerj.com/articles/9369>.

SAITO, K.; ISHIZU, H.; KOMAI, M.; KOTANI, H.; KAWAMURA, Y.; NISHIDA, K. M.; SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Roles for the Yb body components Armitage and Yb in primary piRNA biogenesis in *Drosophila*. **Genes & Development**, v. 24, n. 22, p. 2493–2498, 2010. Disponível em: <http://genesdev.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gad.1989510>.

SAITO, K.; SAKAGUCHI, Y.; SUZUKI, T.; SUZUKI, T.; SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. **Genes & Development**, v. 21, n. 13, p. 1603–1608, 2007. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1563607>.

SAKSENA, N.; BONAM, S. R.; MIRANDA-SAKSENA, M. Epigenetic Lens to Visualize the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) Infection in COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Genetics**, v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.581726/full>.

SALZMAN, J.; CHEN, R. E.; OLSEN, M. N.; WANG, P. L.; BROWN, P. O. Cell-Type Specific Features of Circular RNA Expression. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 9, p. e1003777, 2013. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003777>.

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.

SANDOVAL, G. T. V. No Title. [s. l.], 2017.

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. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.73.11.3852>.

SCHULTHEISS, C.; PASCHOLD, L.; SIMNICA, D.; MOHME, M.; WILLSCHER, E.; VON WENSERSKI, L.; SCHOLZ, R.; WIETERS, I.; DAHLKE, C.; TOLOSA, E.; SEDDING, D. G.; CIESEK, S.; ADDO, M.; BINDER, M. Next-Generation Sequencing of T and B Cell Receptor Repertoires from COVID-19 Patients Showed Signatures Associated with Severity of Disease. **Immunity**, v. 53, n. 2, p. 442–455.e4, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.024>.

SERPELONI, J. M.; LIMA NETO, Q. A.; LUCIO, L. C.; RAMÃO, A.; CARVALHO DE OLIVEIRA, J.; GRADIA, D. F.; MALHEIROS, D.; FERRASA, A.; MARCHI, R.; FIGUEIREDO, D. L. A.; SILVA, W. A.; RIBEIRO, E. M. S. F.; CÓLUS, I. M. S.; CAVALLI, L. R. Genome interaction of the virus and the host genes and non-coding RNAs in SARS-CoV-2 infection. **Immunobiology**, v. 226, n. 5, p. 152130, 2021. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298521000784>.

SHANG, J.; WAN, Y.; LUO, C.; YE, G.; GENG, Q.; AUERBACH, A.; LI, F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11727–11734, 2020. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2003138117>.

SHARMA, S.; KELLY, T. K.; JONES, P. A. Epigenetics in cancer. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 27–36, 2009.

SHEN, B.; YI, X.; SUN, Y.; BI, X.; DU, J.; ZHANG, C.; QUAN, S.; ZHANG, F.; SUN, R.; QIAN, L.; GE, W.; LIU, W.; LIANG, S.; CHEN, Hao; ZHANG, Y.; LI, J.; XU, J.; HE, Z.; CHEN, B.; WANG, J.; YAN, H.; ZHENG, Y.; WANG, D.; ZHU, J.; KONG, Z.; KANG, Z.; LIANG, X.; DING, X.; RUAN, G.; XIANG, N.; CAI, X.; GAO, H.; LI, L.; LI, S.; XIAO, Q.; LU, T.; ZHU, Y.; LIU, H.; CHEN, Haixiao; GUO, T. Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera. **Cell**, v. 182, n. 1, p. 59–72.e15, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420306279>.

SHEREEN, M. A.; KHAN, S.; KAZMI, A.; BASHIR, N.; SIDDIQUE, R. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 91–98, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123220300540>.

SHI, J.; HU, N.; LI, J.; ZENG, Z.; MO, L.; SUN, J.; WU, M.; HU, Y. Unique expression signatures of circular RNAs in response to DNA tumor virus SV40 infection. **Oncotarget**, v. 8, n. 58, p. 98609–98622, 2017. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.21694>.

SINGH, G.; ROY, J.; ROUT, P.; MALLICK, B. Genome-wide profiling of the PIWI-interacting RNA-mRNA regulatory networks in epithelial ovarian cancers. [s. l.], p. 1–24, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0190485>.

SIOMI, M. C.; SATO, K.; PEZIC, D.; ARAVIN, A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 4, p. 246–258, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3089>.

SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Phased piRNAs tackle transposons. **Science**, v. 348, n. 6236, p. 756–757, 2015. Disponível em: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.aab3004>.

STUKALOV, A.; GIRAULT, V.; GRASS, V.; KARAYEL, O.; BERGANT, V.; URBAN, C.;

HAAS, D. A.; HUANG, Y.; OUBRAHAM, L.; WANG, A.; HAMAD, M. S.; PIRAS, A.; HANSEN, F. M.; TANZER, M. C.; PARON, I.; ZINZULA, L.; ENGLEITNER, T.; REINECKE, M.; LAVACCA, T. M.; EHMANN, R.; WÖLFEL, R.; JORES, J.; KUSTER, B.; PROTZER, U.; RAD, R.; ZIEBUHR, J.; THIEL, V.; SCATURRO, P.; MANN, M.; PICHLMAIR, A. **Multilevel proteomics reveals host perturbations by SARS-CoV-2 and SARS-CoV.** [S. l.]: Springer US, 2021.v. 594. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03493-4>.

SUNAGAWA, Y.; YAMADA, S.; SONOHARA, F.; KURIMOTO, K.; TANAKA, N.; SUZUKI, Y.; INOKAWA, Y.; TAKAMI, H.; HAYASHI, M.; KANDA, M.; TANAKA, C.; NAKAYAMA, G.; KOIKE, M.; KODERA, Y. Genome-wide identification and characterization of circular RNA in resected hepatocellular carcinoma and background liver tissue. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85237-y>.

TAGAWA, T.; GAO, S.; KOPARDE, V. N.; GONZALEZ, M.; SPOUGE, J. L.; SERQUINHA, A. P.; LURAIN, K.; RAMASWAMI, R.; ULDRICK, T. S.; YARCHOAN, R.; ZIEGELBAUER, J. M. Discovery of Kaposi's sarcoma herpesvirus-encoded circular RNAs and a human antiviral circular RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 50, p. 12805–12810, 2018. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1816183115>.

TAHA, S. I.; SHATA, A. K.; BAILOUMY, S. A.; FOUAD, S. H.; ANIS, S. G.; MOSSAD, I. M.; MOUSTAFA, N. M.; ABDOU, D. M.; YOUSSEF, M. K. Toll-Like Receptor 4 Polymorphisms (896A/G and 1196C/T) as an Indicator of COVID-19 Severity in a Convenience Sample of Egyptian Patients. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 14, p. 6293–6303, 2021. Disponível em: <https://www.dovepress.com/toll-like-receptor-4-polymorphisms-896ag-and-1196ct-as-an-indicator-of-peer-reviewed-fulltext-article-JIR>.

TAN, K. E.; LIM, Y. Y. Viruses join the circular RNA world. **FEBS Journal**, v. 288, n. 15, p. 4488–4502, 2021.

VOUREKAS, A.; ALEXIOU, P.; VRETTOS, N.; MARAGKAKIS, M.; MOURELATOS, Z. Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm. **Nature**, v. 531, n. 7594, p. 390–394, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25102286><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4317373>.

WALENSKY, R. P.; WALKE, H. T.; FAUCI, A. S. SARS-CoV-2 Variants of Concern in the United States—Challenges and Opportunities. **JAMA**, v. 325, n. 11, p. 1037, 2021.

WANG, P. L.; BAO, Y.; YEE, M.-C.; BARRETT, S. P.; HOGAN, G. J.; OLSEN, M. N.; DINNENY, J. R.; BROWN, P. O.; SALZMAN, J. Circular RNA Is Expressed across the Eukaryotic Tree of Life. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e90859, 2014. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0090859>.

WANG, J.; DU, G. COVID-19 may transmit through aerosol. **Irish Journal of Medical Science** (1971 -), v. 189, n. 4, p. 1143–1144, 2020. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11845-020-02218-2>.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; ZHU, F.; LIU, X.; ZHANG, J.; WANG, B.; XIANG, H.; CHENG, Z.; XIONG, Y.; ZHAO, Y.; LI, Y.; WANG, X.; PENG, Z. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061, 2020. Disponível em:

<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2761044>.

WANG, F.; HUANG, S.; GAO, R.; ZHOU, Y.; LAI, C.; LI, Zhichao; XIAN, W.; QIAN, X.; LI, Zhiyu; HUANG, Y.; TANG, Q.; LIU, P.; CHEN, R.; LIU, R.; LI, X.; TONG, X.; ZHOU, X.; BAI, Y.; DUAN, G.; ZHANG, T.; XU, X.; WANG, J.; YANG, H.; LIU, S.; HE, Q.; JIN, X.; LIU, L. Initial whole-genome sequencing and analysis of the host genetic contribution to COVID-19 severity and susceptibility. **Cell Discovery**, v. 6, n. 1, p. 83, 2020. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41421-020-00231-4>.

WANG, X.; HUANG, P.; LEI, M.; MA, Y.; CHEN, H.; SUN, J.; HU, Y.; SHI, J. Global expression and functional analysis of human piRNAs during HSV-1 infection. **Virus Research**, v. 328, p. 199087, 2023. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170223000497>.

WANG, J.; SAMUELS, D.; ZHAO, S.; XIANG, Y.; ZHAO, Y.; GUO, Y. Current Research on Non-Coding Ribonucleic Acid (RNA). **Genes**, v. 8, n. 12, p. 366, 2017. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2073-4425/8/12/366>.

WANG, K.; SUN, Y.; TAO, W.; FEI, X.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) promotes clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) migration and invasion via altering the circHIAT1/miR-195-5p/29a-3p/29c-3p/CDC42 signals. **Cancer Letters**, v. 394, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383517300162>.

WANG, J.; ZHANG, Y.; ZHU, F.; CHEN, L.; WEI, Y.; ZHU, Q.; JIANG, J.; HUANG, J.; GUO, Q.; YANG, X. CircRNA expression profiling and bioinformatics analysis indicate the potential biological role and clinical significance of circRNA in influenza A virus-induced lung injury. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 2, p. 38, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s12038-021-00152-8>.

WEICK, E.-M.; MISKA, E. A. piRNAs: from biogenesis to function. **Development**, v. 141, n. 18, p. 3458–3471, 2014. Disponível em: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.094037>.

WENG, W.; LIU, N.; TOIYAMA, Y.; KUSUNOKI, M.; NAGASAKA, T.; FUJIWARA, T.; WEI, Q. Novel evidence for a PIWI-interacting RNA (piRNA) as an oncogenic mediator of disease progression , and a potential prognostic biomarker in colorectal cancer. [s. l.], p. 1–12, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **(COVID-19) Weekly Epidemiological Update: Novel Coronavirus** . [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON233>. Acesso em: 7 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. COVID-19 Epidemiological Update – 06 November 2024. [s. l.], 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Novel Coronavirus (2019-nCov): Situation Report - 22**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200211-sitrep-22-ncov.pdf>. Acesso em: 7 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. Acesso em: 8 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Weekly epidemiological update on COVID-19 - 5 October 2022**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em:

<https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---5-october-2022>. Acesso em: 8 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>. Acesso em: 7 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Director-General's remarks at the media briefing on 2019-nCoV on 11 February 2020**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-remarks-at-the-media-briefing-on-2019-ncov-on-11-february-2020>. Acesso em: 7 out. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2024: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals**. Geneva: Woed. [S. l.: s. n.], 2024. 2024.

WORLD HEALTH STATISTICS. **World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. [S. l.: s. n.], 2022. 2022.

WORLDOMETER. **Brazil COVID - Coronavirus Statistics - Worldometer**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus/country/brazil/>. Acesso em: 8 out. 2022.

WU, W.; JI, P.; ZHAO, F. CircAtlas: An integrated resource of one million highly accurate circular RNAs from 1070 vertebrate transcriptomes. **Genome Biology**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2020.

WU, A.; PENG, Y.; HUANG, B.; DING, X.; WANG, X.; NIU, P.; MENG, J.; ZHU, Z.; ZHANG, Z.; WANG, J.; SHENG, J.; QUAN, L.; XIA, Z.; TAN, W.; CHENG, G.; JIANG, T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. **Cell Host & Microbe**, v. 27, n. 3, p. 325–328, 2020.

WU, Y.; ZHAO, T.; DENG, R.; XIA, X.; LI, B.; WANG, X. A study of differential circRNA and lncRNA expressions in COVID - 19 - infected peripheral blood. **Scientific Reports**, p. 1–14, 2021.

YAMAMOTO, N.; ARIUMI, Y.; NISHIDA, N.; YAMAMOTO, R.; BAUER, G.; GOJOBORI, T.; SHIMOTOHNO, K.; MIZOKAMI, M. SARS-CoV-2 infections and COVID-19 mortalities strongly correlate with ACE1 I/D genotype. **Gene**, v. 758, p. 144944, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111920306132>.

YAMAMOTO, N.; YAMAMOTO, R.; ARIUMI, Y.; MIZOKAMI, M.; SHIMOTOHNO, K.; YOSHIKURA, H. Does Genetic Predisposition Contribute to the Exacerbation of COVID-19 Symptoms in Individuals with Comorbidities and Explain the Huge Mortality Disparity between the East and the West?. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 5000, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/9/5000>.

YANG, Yun; FAN, X.; MAO, M.; SONG, X.; WU, P.; ZHANG, Y.; JIN, Y.; YANG, Yi; CHEN, L.-L.; WANG, Y.; WONG, C. C.; XIAO, X.; WANG, Z. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. **Cell Research**, v. 27, n. 5, p. 626–641, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/cr201731>.

YANG, M.; QI, M.; XU, L.; HUANG, P.; WANG, X.; SUN, J.; SHI, J.; HU, Y. Differential host circRNA expression profiles in human lung epithelial cells infected with SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, n. January, p. 104923, 2021a. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821002203>.

YANG, M.; QI, M.; XU, L.; HUANG, P.; WANG, X.; SUN, J.; SHI, J.; HU, Y. Differential host circRNA expression profiles in human lung epithelial cells infected with SARS-CoV-2. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, p. 104923, 2021b. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134821002203>.

YANG, J.; YAN, Y.; ZHONG, W. Application of omics technology to combat the COVID-19 pandemic. **MedComm**, v. 2, n. 3, p. 381–401, 2021.

YI, Z.; GAO, K.; LI, R.; FU, Y. Dysregulated circRNAs in plasma from active tuberculosis patients. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 9, p. 4076–4084, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jcmm.13684>.

YOSHIMOTO, F. K. The Proteins of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2 or n-COV19), the Cause of COVID-19. **Protein Journal**, v. 39, n. 3, p. 198–216, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10930-020-09901-4>.

YU, J.; DING, W.; WANG, M.; GUO, X.; XU, J.; XU, Q.; YANG, Y.; SUN, S.; LIU, J.; QIN, L.; LIU, H.; YANG, F.; ZHOU, W. Plasma circular RNA panel to diagnose hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: A large-scale, multicenter study. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 6, p. 1754–1763, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.32647>.

YU, T.; DING, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; LI, Y.; LEI, J.; ZHOU, J.; SONG, S.; HU, B. Circular RNA GATAD2A promotes H1N1 replication through inhibiting autophagy. **Veterinary Microbiology**, v. 231, p. 238–245, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378113518314597>.

YU, B.; IKHLAS, S.; RUAN, C.; ZHONG, X.; CAI, D. Innate and Adaptive Immunity of Murine Neural Stem Cell-Derived piRNA Exosomes/Microvesicles against Pseudotyped SARS-CoV-2 and HIV-Based Lentivirus. **iScience**, v. 23, n. 12, p. 101806, 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004220310038>.

ZHANG, X.; CHU, H.; CHIK, K. K. H.; WEN, L.; SHUAI, H.; YANG, D.; WANG, Y.; HOU, Y.; YUEN, T. T. T.; CAI, J. P.; YUAN, S.; YIN, F.; YUEN, K. Y.; CHAN, J. F. W. hnRNP C modulates MERS-CoV and SARS-CoV-2 replication by governing the expression of a subset of circRNAs and cognitive mRNAs. **Emerging Microbes and Infections**, v. 11, n. 1, p. 519–531, 2022a.

ZHANG, X.; CHU, H.; CHIK, K. K.-H.; WEN, L.; SHUAI, H.; YANG, D.; WANG, Y.; HOU, Y.; YUEN, T. T.-T.; CAI, J.-P.; YUAN, S.; YIN, F.; YUEN, K.-Y.; CHAN, J. F.-W. hnRNP C modulates MERS-CoV and SARS-CoV-2 replication by governing the expression of a subset of circRNAs and cognitive mRNAs. **Emerging Microbes & Infections**, v. 11, n. 1, p. 519–531, 2022b. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2022.2032372>.

ZHANG, K.; LI, S.; GU, D.; XU, K.; ZHENG, R.; XIN, J.; MENG, Y.; BEN, S.; CHU, H.; ZHANG, Z.; SHU, Y.; DU, M.; LIU, L.; WANG, M. Genetic variants in circTUBB interacting with smoking can enhance colorectal cancer risk. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 325–333, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02624-1>.

ZHANG, X.; LIANG, Z.; ZHANG, Y.; ZHU, M.; ZHU, Y.; LI, S.; ZHAO, W.; HU, X.; WANG, J. Specific PIWI-Interacting Small Noncoding RNA Expression Patterns in Pulmonary

Tuberculosis Patients. **Epigenomics**, v. 11, n. 16, p. 1779–1794, 2019. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.2217/epi-2018-0142>.

ZHANG, W.; LIU, Y.; MIN, Z.; LIANG, G.; MO, J.; JU, Z.; ZENG, B.; GUAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; ZHANG, Q.; LI, H.; ZENG, C.; WEI, Y.; CHAN, G. C. F. circMine: A comprehensive database to integrate, analyze and visualize human disease-related circRNA transcriptome. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D83–D92, 2022.

ZHANG, W.; LIU, H.; YIN, J.; WU, W.; ZHU, D.; AMOS, C. I.; FANG, S.; LEE, J. E.; LI, Y.; HAN, J.; WEI, Q. Genetic variants in the PIWI-piRNA pathway gene DCP1A predict melanoma disease-specific survival. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 12, p. 2730–2737, 2016. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00000658-201602000-00003>.

ZHANG, S.; WANG, P.; SHI, L.; WANG, C.; ZHU, Z.; QI, C.; XIE, Y.; YUAN, S.; CHENG, L.; YIN, X.; ZHANG, X. Exploring COVID-19 causal genes through disease-specific Cis-eQTLs. **Virus Research**, v. 342, p. 199341, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168170224000340>.

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. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.001>.

ZHANG, Y.; ZHANG, X.-O.; CHEN, T.; XIANG, J.-F.; YIN, Q.-F.; XING, Y.-H.; ZHU, S.; YANG, L.; CHEN, L.-L. Circular Intronic Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 792–806, 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S109727651300590X>.

ZHANG, X.; ZHU, M.; YANG, R.; ZHAO, W.; HU, X.; GAN, J. Identification and comparison of novel circular RNAs with associated co-expression and competing endogenous RNA networks in pulmonary tuberculosis. **Oncotarget**, v. 8, n. 69, p. 113571–113582, 2017. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.22710>.

ZHAO, M.; QU, H. circVAR database: genome-wide archive of genetic variants for human circular RNAs. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2020.

ZHENG, Z.; KE, X.; WANG, M.; HE, S.; LI, Q.; ZHENG, C.; ZHANG, Z.; LIU, Y.; WANG, H. Human MicroRNA hsa-miR-296-5p Suppresses Enterovirus 71 Replication by Targeting the Viral Genome. **Journal of Virology**, v. 87, n. 10, p. 5645–5656, 2013. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02655-12>.

ZHENG, S.-R.; ZHANG, H.-R.; ZHANG, Z.-F.; LAI, S.-Y.; HUANG, L.-J.; LIU, J.; BAI, X.; DING, K.; ZHOU, J.-Y. Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein alters the expression profiles of circular RNAs in Caski cells. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 20, p. 3755–3764, 2018. Disponível em: <http://www.jcancer.org/v09p3755.htm>.

ZHONG, F.; ZHOU, N.; WU, K.; GUO, Y.; TAN, W.; ZHANG, Hong; ZHANG, X.; GENG, G.; PAN, T.; LUO, H.; ZHANG, Y.; XU, Z.; LIU, J.; LIU, B.; GAO, W.; LIU, C.; REN, L.; LI, J.; ZHOU, J.; ZHANG, Hui. A SnoRNA-derived piRNA interacts with human interleukin-4 pre-mRNA and induces its decay in nuclear exosomes. **Nucleic Acids Research**, p. gkv954, 2015. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkv954>.

ZHOU, Y.-L.; WU, W.-P.; CHENG, J.; LIANG, L.-L.; CEN, J.-M.; CHEN, C.; LIU, X.;

XIONG, X.-D. CircFOXO3 rs12196996, a polymorphism at the gene flanking intron, is associated with circFOXO3 levels and the risk of coronary artery disease. **Aging**, v. 12, n. 13, p. 13076–13089, 2020. Disponível em: <https://www.aging-us.com/lookup/doi/10.18632/aging.103398>.

ZHU, Z.; CHEN, X.; WANG, C.; ZHANG, S.; YU, R.; XIE, Y.; YUAN, S.; CHENG, L.; SHI, L.; ZHANG, X. An integrated strategy to identify COVID-19 causal genes and characteristics represented by LRRC37A2. **Journal of Medical Virology**, v. 95, n. 2, 2023. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.28585>.

ZIEGLER, C. G. K.; ALLON, S. J.; NYQUIST, S. K.; MBANO, I. M.; MIAO, V. N.; TZOUANAS, C. N.; CAO SARS-CoV-2 Receptor ACE2 Is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Detected in Specific Cell Subsets across Tissues. **Cell**, v. 181, n. 5, p. 1016-1035.e19, 2020.

APÊNDICES: Artigos publicados durante o doutorado.

APÊNDICE A – Artigo publicado na revista *Cells*



Review

Unraveling Cell Death Pathways during Malaria Infection: What Do We Know So Far?

Camille Sena-dos-Santos ¹, Cíntia Braga-da-Silva ¹, Diego Marques ¹, Jhully Azevedo dos Santos Pinheiro ¹,
Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,2} and Giovanna C. Cavalcante ^{1,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Belém 66.075-110, Brazil; camille.santos@icb.ufpa.br (C.S.-d.-S.); cintia.silva@icb.ufpa.br (C.B.-d.-S.); diego.costa.santos@icb.ufpa.br (D.M.); jhully.pinheiro@icb.ufpa.br (J.A.d.S.P.); akely@ufpa.br (Â.R.-d.-S.)

² Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Belém 66.075-110, Brazil

* Correspondence: giovanna.cavalcante@icb.ufpa.br; Tel.: +55-091-3201-7843

Abstract: Malaria is a parasitic disease (caused by different *Plasmodium* species) that affects millions of people worldwide. The lack of effective malaria drugs and a vaccine contributes to this disease, continuing to cause major public health and socioeconomic problems, especially in low-income countries. Cell death is implicated in malaria immune responses by eliminating infected cells, but it can also provoke an intense inflammatory response and lead to severe malaria outcomes. The study of the pathophysiological role of cell death in malaria in mammals is key to understanding the parasite–host interactions and design prophylactic and therapeutic strategies for malaria. In this work, we review malaria-triggered cell death pathways (apoptosis, autophagy, necrosis, pyroptosis, NETosis, and ferroptosis) and we discuss their potential role in the development of new approaches for human malaria therapies.

Keywords: malaria; *Plasmodium*; immune response; cell death



Citation: Sena-dos-Santos, C.; Braga-da-Silva, C.; Marques, D.; Azevedo dos Santos Pinheiro, J.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Cavalcante, G.C. Unraveling Cell Death Pathways during Malaria Infection: What Do We Know So Far? *Cells* **2021**, *10*, 479. <https://dx.doi.org/10.3390/cells10020479>

Received: 20 November 2020

Accepted: 11 December 2020

Published: 23 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Malaria is a parasitic disease—caused by protozoa pathogens of the *Plasmodium* genus—that is estimated to have infected around 228 million of people worldwide in 2018, representing a risk especially for residents of developing countries in tropical and subtropical regions [1]. This is particularly relevant considering underreporting, due to diagnostic difficulties in some malaria-endemic areas. Therefore, malaria control and elimination are the central goals of the World Health Organization (WHO) Global Malaria Program (GMP); to achieve this goal, WHO recommends the administration of antimalarial drugs, but the emerging of genetic resistance in these parasites to artemisinin-based combination therapies (ACTs), the gold-standard antimalarial treatment, and the lack of an efficacious vaccine impose limitations on the progress of malaria elimination [1,2].

In the search for new methods to stem malaria, researchers have been studying intrinsic factors of the host, such as genetic profile and immunological mechanism [3–5]. The *Plasmodium* infection includes multiple stages, so immunity to malaria needs to be multifaceted and stage-specific [6]. The immune system has a set of strategies to fight off malaria parasites, among which is cell death. Indeed, the description of different cell death pathways underlying immune response to infectious and parasitic diseases highlighted cell death as a fundamental immunological mechanism to control parasitemia [7–9].

Considering the above, comprehensive knowledge about the genetic, molecular, and biochemical mechanisms of the different cell death modalities has taken a prominent position in recent advances in immune response and the design of prophylactic and therapeutic methods against malaria. This infection has been reported to induce different

APÊNDICE B – Artigo publicado na revista *International Journal of Molecular Sciences*



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Nuclear and Mitochondrial Genome, Epigenome and Gut Microbiome: Emerging Molecular Biomarkers for Parkinson's Disease

Gleyce Fonseca Cabral ¹, Ana Paula Schaan ¹, Giovanna C. Cavalcante ¹, Camille Sena-dos-Santos ¹, Tatiane Piedade de Souza ¹, Natacha M. Souza Port's ², Jhully Azevedo dos Santos Pinheiro ¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,3,4,*} and Amanda F. Vidal ^{1,4,5,*}



Citation: Fonseca Cabral, G.; Schaan, A.P.; Cavalcante, G.C.; Sena-dos-Santos, C.; de Souza, T.P.; Souza Port's, N.M.; dos Santos Pinheiro, J.A.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Vidal, A.F. Nuclear and Mitochondrial Genome, Epigenome and Gut Microbiome: Emerging Molecular Biomarkers for Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 9839. <https://doi.org/10.3390/ijms22189839>

Academic Editors: Marcello Ciacio and Luisa Agnello

Received: 2 June 2021

Accepted: 28 June 2021

Published: 11 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, R. Augusto Correa, Belém 66075-110, Brazil; cabralffg@gmail.com (G.F.C.); apschaan@gmail.com (A.P.S.); giovannacavalcante@gmail.com (G.C.C.); camillebiologia@gmail.com (C.S.-d.-S.); tati_souz14@outlook.com (T.P.d.S.); jhully.asp@gmail.com (J.A.d.S.P.)
 - ² Laboratório de Neurofarmacologia Molecular, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; natachamsports@gmail.com
 - ³ Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará—R. dos Mundurucus, Belém 66073-000, Brazil
 - ⁴ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, R. Augusto Correa, Belém 66075-110, Brazil
 - ⁵ ITVDS—Instituto Tecnológico Vale Desenvolvimento Sustentável—R. Boaventura da Silva, Belém 66055-090, Brazil
- * Correspondence: akelyufpa@gmail.com (Â.R.-d.-S.); amandaferreiravidal@gmail.com (A.F.V.); Tel.: +55-(91)-3201-7843 (Â.R.-d.-S.)

Abstract: Background: Parkinson's disease (PD) is currently the second most common neurodegenerative disorder, burdening about 10 million elderly individuals worldwide. The multifactorial nature of PD poses a difficult obstacle for understanding the mechanisms involved in its onset and progression. Currently, diagnosis depends on the appearance of clinical signs, some of which are shared among various neurologic disorders, hindering early diagnosis. There are no effective tools to prevent PD onset, detect the disease in early stages or accurately report the risk of disease progression. Hence, there is an increasing demand for biomarkers that may identify disease onset and progression, as treatment-based medicine may not be the best approach for PD. Over the last few decades, the search for molecular markers to predict susceptibility, aid in accurate diagnosis and evaluate the progress of PD have intensified, but strategies aimed to improve individualized patient care have not yet been established. Conclusions: Genomic variation, regulation by epigenomic mechanisms, as well as the influence of the host gut microbiome seem to have a crucial role in the onset and progress of PD, thus are considered potential biomarkers. As such, the human nuclear and mitochondrial genome, epigenome, and the host gut microbiome might be the key elements to the rise of personalized medicine for PD patients.

Keywords: Parkinson's disease; neurodegeneration; genetics; non-coding RNAs; microbiome; mitochondria; epigenetics; biomarkers; precision medicine

1. Introduction

As life expectancy rises as a result of technological advances, humanity faces an increased burden of aging diseases, such as cancer, diabetes, cardiovascular and neurodegenerative disorders. Degenerative diseases affecting the nervous system are recognized as major causes of death and disabilities among the elderly population worldwide [1]. However, the molecular mechanisms engaged in the onset and progression of neurodegenerative diseases remain elusive. A complete understanding of the molecular biology of neurodegeneration will benefit the search for biomarkers to be employed in strategies for



Article

Identification and Characterization of Polymorphisms in piRNA Regions

José Roberto Sobrinho Lima ^{1,†}, Jhully Azevedo-Pinheiro ^{2,†}, Roberta Borges Andrade ^{1,2}, André Salim Khayat ¹ , Paulo Pimentel de Assumpção ¹, Ândrea Ribeiro-dos-Santos ^{1,2}, Sidney Emanuel Batista dos Santos ^{1,2} and Fabiano Cordeiro Moreira ^{1,*}

- ¹ Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO), Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-005, PA, Brazil; jsroberto.slima@gmail.com (J.R.S.L.); robertaborgesandrade@gmail.com (R.B.A.); khayatas@gmail.com (A.S.K.); assumptaopp@gmail.com (P.P.d.A.); akely@ufpa.br (Â.R.-d.-S.); sidneysantosufpa@gmail.com (S.E.B.d.S.)
- ² Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM), Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; jhully.pinheiro@icb.ufpa.br
- * Correspondence: fcmoreira@ufpa.br; Tel.: +55-091-98107-0858
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Lima, J.R.S.;

Azevedo-Pinheiro, J.; Andrade, R.B.; Khayat, A.S.; Assumpção, P.P.d.; Ribeiro-dos-Santos, Â.; Batista dos Santos, S.E.; Moreira, F.C.

Identification and Characterization of Polymorphisms in piRNA Regions.

Curr. Issues Mol. Biol. **2022**, *44*, 942–951. <https://doi.org/10.3390/cimb44020062>

Academic Editor: Md Mehedi Hasan

Received: 13 December 2021

Accepted: 20 January 2022

Published: 15 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: piRNAs are a class of noncoding RNAs that perform functions in epigenetic regulation and silencing of transposable elements, a mechanism conserved among most mammals. At present, there are more than 30,000 known piRNAs in humans, of which more than 80% are derived from intergenic regions, and approximately 20% are derived from the introns and exons of pre-mRNAs. It was observed that the expression of the piRNA profile is specific in several organs, suggesting that they play functional roles in different tissues. In addition, some studies suggest that changes in regions that encode piRNAs may have an impact on their function. To evaluate the conservation of these regions and explore the existence of a seed region, SNP and INDEL variant rates were investigated in several genomic regions and compared to piRNA region variant rates. Thus, data analysis, data collection, cleaning, treatment, and exploration were implemented using the R programming language with the help of the RStudio platform. We found that piRNA regions are highly conserved after considering INDELs and do not seem to present an identifiable seed region after considering SNPs and INDEL variants. These findings may contribute to future studies attempting to determine how polymorphisms in piRNA regions can impact diseases.

Keywords: piRNA; polymorphisms; conservation

1. Introduction

The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE), a large consortium project to map all functional elements in the human genome, has suggested that up to 80% of the genome is biologically active and functional with an essential role in controlling DNA expression and spatial organization of the genome [1–3]. This regulation is carried out by DNA sequences that are transcribed into noncoding RNA molecules [2]. Three major families of small noncoding RNAs (sncRNAs) in eukaryotic cells have been widely studied: microRNAs (miRNAs), interference RNAs (siRNAs), and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) [4].

piRNAs are a class of recently discovered sncRNAs that were described for the first time in germ cells [5–8] and identified later in somatic cells [9]. These sncRNAs have 24–31 nucleotides, interact with argonaute proteins of the PIWI subfamily, and form the PIWI–piRNA pathway, which plays roles in transcriptional and posttranscriptional silencing of transposable elements (TEs), epigenetic regulation, the maintenance of germ cell function, and the regulation of mRNA [9–11]. However, the most well-characterized piRNA function is TE silencing [11]. The silencing of TEs and other genetic elements in germlines,



OPEN ACCESS

EDITED BY
Severino Jefferson Ribeiro da Silva,
University of Toronto, Canada

REVIEWED BY
Sully Marquez,
Universidad San Francisco de Quito, Ecuador
Cristina Oliveira,
Diagnósticos da América S/A (DASA), Brazil

*CORRESPONDENCE

Amanda F. Vidal
✉ amanda.vidal@itv.org

*These authors have contributed equally to this work and share first authorship

RECEIVED 15 March 2023

ACCEPTED 30 May 2023

PUBLISHED 05 July 2023

CITATION

Pinho CT, Vidal AF, Negri Rocha TC, Oliveira RRM, da Costa Barros MC, Closset L, Azevedo-Pinheiro J, Braga-da-Silva C, Silva CS, Magalhães LL, do Carmo Pinto PD, Souza GS, dos Santos Vieira JR, Burbano RMR, de Sousa MS, de Souza JES, Nunes G, da Silva MB, da Costa PF, Salgado CG, Sousa RCM, Degraive WMS, Ribeiro-dos-Santos A, Oliveira G and on behalf of Research Network for the Genomic Sequencing of SARS-CoV-2 (2023) Transmission dynamics of SARS-CoV-2 variants in the Brazilian state of Pará. *Front. Public Health* 11:1186463. doi: 10.3389/fpubh.2023.1186463

COPYRIGHT

© 2023 Pinho, Vidal, Negri Rocha, Oliveira, da Costa Barros, Closset, Azevedo-Pinheiro, Braga-da-Silva, Silva, Magalhães, do Carmo Pinto, Souza, dos Santos Vieira, Burbano, de Sousa, de Souza, Nunes, da Silva, da Costa, Salgado, Sousa, Degraive, Ribeiro-dos-Santos, Oliveira and on behalf of Research Network for the Genomic Sequencing of SARS-CoV-2. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Transmission dynamics of SARS-CoV-2 variants in the Brazilian state of Pará

Catarina T. Pinho^{1†}, Amanda F. Vidal^{2*†}, Tatianne Costa Negri Rocha^{2†}, Renato R. M. Oliveira², Maria Clara da Costa Barros^{1,3}, Laura Closset¹, Jhully Azevedo-Pinheiro^{1,3}, Cintia Braga-da-Silva^{1,3}, Caio Santos Silva¹, Leandro L. Magalhães^{1,3}, Pablo Diego do Carmo Pinto¹, Giordano Bruno Soares Souza¹, José Ricardo dos Santos Vieira¹, Rommel Mario Rodríguez Burbano⁴, Maísa Silva de Sousa⁵, Jorge Estefano Santana de Souza^{6,7}, Gisele Nunes², Moises Batista da Silva⁸, Patrícia Fagundes da Costa⁸, Claudio Guedes Salgado⁸, Rita Catarina Medeiros Sousa⁹, Wim Maurits Sylvain Degraive¹⁰, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{1,3}, Guilherme Oliveira² and on behalf of Research Network for the Genomic Sequencing of SARS-CoV-2

¹Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, ²Instituto Tecnológico Vale, Belém, Pará, Brazil, ³Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, ⁴Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Ophir Loyola, Belém, Pará, Brazil, ⁵Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, ⁶Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, ⁷Bioinformatics Núcleo Multidisciplinar de Bioinformática, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil, ⁸Laboratório de Dermatologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Marituba, Pará, Brazil, ⁹Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brazil, ¹⁰Laboratório de Genômica Funcional e Bioinformática, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: After three years since the beginning of the pandemic, the new coronavirus continues to raise several questions regarding its infectious process and host response. Several mutations occurred in different regions of the SARS-CoV-2 genome, such as in the spike gene, causing the emergence of variants of concern and interest (VOCs and VOIs), of which some present higher transmissibility and virulence, especially among patients with previous comorbidities. It is essential to understand its spread dynamics to prevent and control new biological threats that may occur in the future. In this population-based retrospective observational study, we generated data and used public databases to understand SARS-CoV-2 dynamics.

Methods: We sequenced 1,003 SARS-CoV-2 genomes from naso-oro-pharyngeal swabs and saliva samples from Pará from May 2020 to October 2022. To gather epidemiological data from Brazil and the world, we used FIOCRUZ and GISAID databases.

Results: Regarding our samples, 496 (49.45%) were derived from female participants and 507 (50.55%) from male participants, and the average age was 43 years old. The Gamma variant presented the highest number of cases, with 290 (28.91%) cases, followed by delta with 53 (5.28%). Moreover, we found seven (0.69%) Omicron cases and 651 (64.9%) non-VOC cases. A significant association was observed between sex and the clinical condition (female, $p=8.65e-08$; male, $p=0.008961$) and age ($p=3.6e-10$).



Article

Association between INDELs in MicroRNAs and Susceptibility to Gastric Cancer in Amazonian Population

Antonio A. C. Modesto ¹, Milene R. de Moraes ², Cristina M. D. Valente ², Marta S. C. R. Costa ¹, Diana F. da V. B. Leal ¹, Esdras E. B. Pereira ¹, Marianne R. Fernandes ^{1,*}, Jhully A. dos S. Pinheiro ², Karla B. C. C. Pantoja ¹, Fabiano C. Moreira ¹, Rommel M. R. Burbano ³, Paulo P. de Assumpção ¹, Ney P. C. dos Santos ¹ and Sidney E. B. dos Santos ^{1,2}

¹ Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, R. dos Mundurucus 4487, Guamá, Belém 66073-000, Brazil

² Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66073-000, Brazil

³ Hospital Ophir Loyola, Belém 66063-240, Brazil

* Correspondence: fernandesmr@yahoo.com.br; Tel.: +91-99123-4727



Citation: Modesto, A.A.C.; Moraes, M.R.d.; Valente, C.M.D.; Costa, M.S.C.R.; Leal, D.F.d.V.B.; Pereira, E.E.B.; Fernandes, M.R.; Pinheiro, J.A.d.S.; Pantoja, K.B.C.C.; Moreira, F.C.; et al. Association between INDELs in MicroRNAs and Susceptibility to Gastric Cancer in Amazonian Population. *Genes* **2023**, *14*, 60. <https://doi.org/10.3390/genes14010060>

Academic Editors: Lucio Bertario, Bernardo Bonanni and Davide Serrano

Received: 26 September 2022

Revised: 23 November 2022

Accepted: 24 November 2022

Published: 24 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Gastric cancer (GC) is a multifactorial, complex, and aggressive disease with a prevalence of one million new cases and high global mortality. Factors such as genetic, epigenetic, and environmental changes contribute to the onset and progression of the disease. Identification of INDELs in miRNA and its target sites in current studies showed an important role in the development of cancer. In GC, miRNAs act as oncogenes or tumor suppressors, favoring important cancer pathways, such as cell proliferation and migration. This work aims to investigate INDELs in the coding region of miRNAs (hsa-miR-302c, hsa-miR-548AJ-2, hsa-miR-4274, hsa-miR-630, hsa-miR-516B-2, hsa-miR-4463, hsa-miR-3945, hsa-miR-548H_4, hsa-miR-920, hsa-miR-3171, and hsa-miR-3652) that may be associated with susceptibility and clinical variants of gastric cancer. For this study, 301 patients with GC and 145 individuals from the control group were selected from an admixed population in the Brazilian Amazon. The results showed the hsa-miR-4463, hsa-miR-3945, hsa-miR-548H_4, hsa-miR-920 and hsa-miR-3652 variants were associated with gastric cancer susceptibility. The hsa-miR-4463 was significantly associated with clinical features of GC such as diffuse gastric tumor histological type, “non-cardia” localization region, and early onset. Our findings indicated that INDELs could be potentially functional genetic variants for gastric cancer risk.

Keywords: gastric cancer; INDEL; potential biomarker; miRNA; susceptibility

1. Introduction

Cancer is a global health problem, with 18 million new cases and 9.6 million deaths per year. It represents about 12% of all causes of death and is the fourth leading cause of death of those aged 70 years or over in most countries [1,2]. Among all types of cancer, gastric cancer (GC) is the fifth most frequently diagnosed cancer and the third most deadly neoplasm worldwide. GC is a multifactorial, complex, and aggressive disease with a number of genetic, epigenetic, and environmental factors [3].

In 2020, over one million new cases of gastric cancer and 769,000 deaths were estimated worldwide. Infection with *Helicobacter pylori* is the primary identified cause of gastric cancer. Other risk factors for gastric cancer include a high intake of salty and smoked food, obesity, alcoholism, and smoking. However, a diet rich in fruits, vegetables, cereals, and seafood acts as a protective factor against GC [4,5]. Recent evidence shows that genetic variants are also an important factor for the tumorigenic process [6–8].

Somatic mutations such as INDELs may provide a selective advantage for cell growth and may initiate cancer development, including GC [9]. These genomic alterations in miRNA genes (pri-miRNAs, pre-miRNAs, mature region and SEED region) or target sites



OPEN Unraveling the protective genetic architecture of COVID-19 in the Brazilian Amazon

Maria Clara Barros^{1,12}, Jorge Estefano Santana de Souza^{2,9,12}, Daniel Henrique F. Gomes², Catarina Torres Pinho¹, Caio S. Silva¹, Cíntia Braga-da-Silva¹, Giovanna C. Cavalcante¹, Leandro Magalhães³, Jhully Azevedo-Pinheiro¹, Juarez Antônio Simões Quaresma^{4,5}, Luiz Fábio Magno Falcão⁵, Patrícia Fagundes Costa⁶, Cláudio Guedes Salgado⁶, Thiago Xavier Carneiro⁷, Rommel Rodrigues Burbano⁷, José Ricardo dos Santos Vieira⁸, Sidney Santos¹⁰, Giordano Bruno Soares-Souza³, Sandro José de Souza^{2,9,11} & Andrea Ribeiro-dos-Santos¹⁰✉

Despite all the efforts acquired in four years of the COVID-19 pandemic, the path to a full understanding of the biological mechanisms involved in this disease remains complex. This is partly due to a combination of factors, including the inherent characteristics of the infection, socio-environmental elements, and the variations observed within both the viral and the human genomes. Thus, this study aimed to investigate the correlation between genetic host factors and the severity of COVID-19. We conducted whole exome sequencing (WES) of 124 patients, categorized into severe and non-severe groups. From the whole exome sequencing (WES) association analysis, four variants (rs1770731 in *CRYBG1*, rs7221209 in *DNAH17*, rs3826295 in *DGKE*, and rs7913626 in *CFAP46*) were identified as potentially linked to a protective effect against the clinical severity of COVID-19, which may explain the less severe impact of COVID-19 on the Northern Region. Our findings underscore the importance of carrying out more genomic studies in populations living in the Amazon, one of the most diverse from the point of view of the presence of rare and specific alleles. To our knowledge, this is the first WES study of admixed individuals from the Brazilian Amazon to investigate genomic variants associated with the clinical severity of COVID-19.

Keywords SARS-CoV-2, COVID-19, WES, Amazon, Clinical severity

Throughout the four-year duration of the pandemic, extensive research has been dedicated to understanding COVID-19. As a result, non-genetic factors within the host, such as advanced age, male sex, and comorbidities such as hypertension, diabetes, and cardiovascular diseases, have already been associated with a worse prognosis in COVID-19.

However, these identified risk factors do not fully account for the diverse spectrum of clinical manifestations observed in the disease. It is noteworthy that severe forms of the disease, marked by poor oxygen saturation and lung damage, have not been confined solely to individuals within the aforementioned high-risk groups. Rather, they have also manifested in young individuals, with or without comorbidities^{1–4}. These features suggest, according to Novelli et al., several hypotheses, including a breakdown of immunological tolerance, the viral load, an innate immune inefficiency, and the presence of common or rare risk alleles in protein-coding genes

¹Laboratory of Human and Medical Genetics (LGHM) / Graduate Program Genetics and Molecular Biology (PPGBM), Federal University of Pará (UFPA), Belém 66075-110, PA, Brazil. ²Graduate Program Bioinformatics, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal 59078-970, RN, Brazil. ³Vale Technological Institute (ITV), Belém 66055-090, PA, Brazil. ⁴Laboratory of Infectious Disease, School of Medicine, Federal University of Pará (UFPA), Belém 66075-110, PA, Brazil. ⁵Department of Infectious Disease, School of Medicine, State University of Pará (UEPA), Belém 66087-670, PA, Brazil. ⁶Dermatology and Immunology Laboratory, Federal University of Pará (UFPA), Marituba 67105-290, PA, Brazil. ⁷Molecular Biology Laboratory, Ophir Loyola Hospital (HOL), Belém 66063-240, PA, Brazil. ⁸Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém 66075-110, PA, Brazil. ⁹Multidisciplinary Bioinformatics Center (BiOMe), Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal 59078-970, RN, Brazil. ¹⁰Center of Oncology Research, Federal University of Pará (UFPA), Belém 66073-005, PA, Brazil. ¹¹DNA-GTX Bioinformatics, Natal, RN, Brazil. ¹²Maria Clara Barros and Jorge Estefano Santana de Souza have contributed equally to this work. ✉email: jwojwo@gmail.com; sandro@i2bio.org; akelyufpa@gmail.com