

## IDENTIFICAÇÃO, ANÁLISE E SEQUENCIAMENTO DE POSSÍVEIS GENES HOMÓLOGOS DE sbRNAs NO GENOMA DE *Bradysia hygida*

Daniel Caligari (Bolsista Fundação Araucária), Francisco Ferreira Duarte  
Júnior (co-orientador), Maria Aparecida Fernandez, e-mail:  
aparecidafernandez@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/CCB,  
Maringá, PR.

**Área e Subárea:** Ciências Biológicas, Bioquímica.

**Palavras-chave:** Replicação, ncRNA, Sciarídeos.

### Resumo

*Bradysia hygida* é um sciarídeo utilizado no Brasil há mais de 40 anos, como modelo para estudos de biologia celular e molecular, onde se destacam os estudos relacionados aos processos moleculares presentes nas células politênicas de sua glândula salivar. No estudo de amplificação gênica desenvolvimental, que ocorre nessas células, a identificação de RNAs não codificantes, associados ao controle da iniciação da replicação do DNA, como os descritos para ncRNAs denominados Y em mamíferos, é indispensável para a compreensão de processos de replicação adicional do DNA em insetos. Em invertebrados, os stem-bulge RNAs, sbRNAs, detectados expressos em *Caenorhabditis elegans* e *Bombyx mori*, apresentam uma estrutura secundária com um padrão de haste-loop e são homólogos aos RNAs Y. Neste trabalho, foram amplificados e sequenciados dois fragmentos de RNA expressos em larvas de *B. hygida*, os quais possuem sequências homólogas às do gene *DmsbRNA2*, recentemente detectado em *Drosophila melanogaster*. Um desses fragmentos amplificados, de 264 pares de bases (pb), mostra uma sequência interna com segmentos alinhados em genomas de diversos dípteros. O outro fragmento, de 50 pb, mostrou identidade muito reduzida aos motivos descritos para sbRNAs. A identificação de novas moléculas de ncRNAs em Sciarídeos é um trabalho original e relevante para compreensão de processos metabólicos desses insetos.

### Introdução

A distribuição da família Sciaridae, no Brasil, ocorre por meio dos gêneros *Trichosia spp.* e *Bradysia spp.*, entre outros. Esta família abrange insetos geralmente conhecidos como moscas de fungos e, a maioria pode ser encontrada próximo aos trópicos. Ao todo, os sciarídeos são estimados em mais de 20.000 espécies. *Bradysia hygida* (Sauaia e Alves, 1968) tem sido usado como modelo para a elucidação de eventos moleculares por diversos pesquisadores no Brasil, por mais de 40 anos. Dos estudos realizados com este díptero, destacam-se para este trabalho, a descrição de processos replicativos não convencionais, que ocorrem nas regiões formadoras de

pufes de DNA e nos eventos de amplificação. Porém, os mecanismos de regulação destes processos ainda não foram elucidados (Simon et al., 2016). Os non-coding RNAs (ncRNAs) têm sido amplamente estudados nas últimas décadas, pelo fato de estarem ligados à regulação de várias funções bioquímicas na célula. Recentemente, admitiu-se a existência de um grupo específico de ncRNA para invertebrados, os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs), homólogos aos RNAs Y, encontrados em vertebrados (Duarte Junior et al., 2015). Estudos funcionais de sbRNAs descritos em *Caenorhabditis elegans* demonstraram que estes RNAs possuem uma estrutura secundária tipo haste-loop característica além de motivos conservados aos RNAs Y, que garantem sua funcionalidade (Kowalski et al., 2016). Em termos de evolução, a identificação destes genes e pseudogenes em organismos evolutivamente distantes, demonstraram um grande avanço na área do estudo de RNA não codificantes (Perreault et al., 2007). Identificações de sbRNAs em insetos (Duarte Júnior et al., 2015; F.F. Duarte Júnior, informação pessoal) e a elucidação de suas funções, corroboram para a possibilidade da ocorrência destes genes também em *B. hygida*. Para isso, foram clonados e sequenciados fragmentos amplificados do transcriptoma deste inseto e verificado a homologia aos sbRNAs já descritos.

## Materiais e métodos

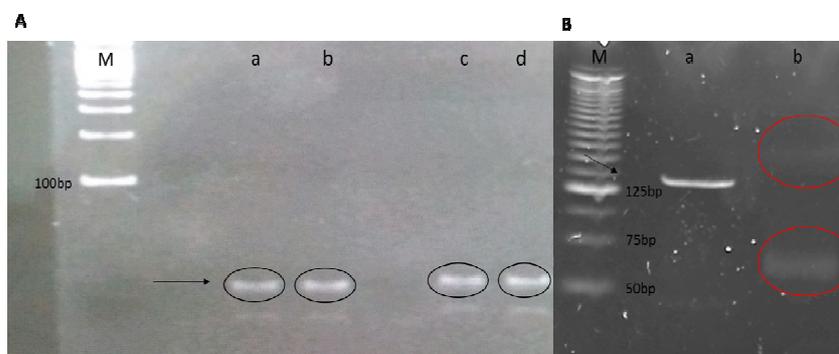
*B. hygida* é mantida no Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF), da Universidade Estadual de Maringá. O RNA total foi extraído a partir de moscas e larvas inteiras, com a utilização do reagente TRIzol LS (*Invitrogen*). Após tratamento com DNase I (*Invitrogen*), o RNA foi usado para a síntese das fitas de cDNA, que foram realizadas com o kit *SuperScript® III* (*Thermo Fisher*). O cDNA foi então utilizado como *template* nas reações de PCR, onde foram usados *primers* para os genes *BmsbRNA* (Duarte Junior et al., 2015) e *DmsbRNA1*, *DmsbRNA2* (gentilmente cedidos por F.F. Duarte Júnior). Para o controle da amostra, utilizamos *primers* para o gene constitutivo *BheEF1-1A* de *B. hygida* (Figura 1B, amostra a). Os produtos amplificados foram clonados em vetor (*TOPO-TA Cloning® Kit*, *Invitrogen*) e transformados em bactérias termocompetentes *DH5-α*. As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *BigDye Direct Cycle Sequencing* (*ThermoFisher*), e o sequenciamento, por sua vez, com o equipamento *Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems HITACHI*). Para verificar a homologia da estrutura, utilizou-se o software *BLASTn* e *Mfold Web Server*, para a identificação da homologia e da estrutura secundária. As amostras foram verificadas em géis de poliacrilamida 10%.

## Resultados e Discussão

*Primer DmsbRNA1 e BmsbRNA* - As reações de PCR com estes *primers* não apresentaram amplificação (Figura 1A, amostras a-d). Esse resultado

pode ter três possíveis explicações: Nenhum gene homólogo ao *DmsbRNA1* e/ou *BmsbRNA* está presente no genoma de *B. hygida*; um gene homólogo ao *DmsbRNA1* e/ou *BmsbRNA* pode ocorrer, mas ser expresso em quantidades reduzidas; ainda cogitando sua existência, este gene pode possuir uma sequência muito divergente da utilizada para construção dos *primers*.

*Primer DmsbRNA2* - As reações de PCR com este *primer* resultaram na amplificação de dois fragmentos (Figura 1B, amostra **b**), os quais foram clonados e sequenciados (Figura 2). O primeiro fragmento, de 264pb, identificado como clone 1, possui em suas extremidades, a sequência idêntica do *primer* utilizado. Também foi constatado, comparando com o banco de dados *BLASTn*, que segmentos desta sequência são encontrados em outros insetos da ordem Diptera, incluindo a mosca do trigo *Mayetiola destructor*, que faz parte da superfamília Sciaroidea. A partir destas análises, é possível inferir que o fragmento denominado clone 1 possa ser um pseudogene de um sbRNA, embora sejam necessárias maiores análises para corroborar esta inferência. O segundo fragmento amplificado, identificado como clone 2, é menor (possuindo 50pb), e também possui suas extremidades idênticas à sequência do *primer* utilizado. Ao analisar a estrutura secundária do clone 2, nota-se uma semelhança à forma genérica para sbRNAs (descrita por Boria et al., 2010), porém, não foi identificado os principais motivos da estrutura. Possivelmente, a sequência do clone 2 seja um fragmento do um gene funcional, para sbRNA em *B. hygida*.



**Figura 1.** Detecção de sbRNAs em *Bradysia hygida*. **A:** *Bmsb* + H<sub>2</sub>O (**a**); *Bmsb* + cDNA (**b**); *Dm1* + H<sub>2</sub>O (**c**); *Dm1* + cDNA (**d**); (**M**), 100bp Invitrogen. **B:** *BheEF1* + cDNA (**a**); *Dm2* + cDNA (**b**); (**M**) 25bp, NEB. Circulado preto (Figura 1A), os *primers* da reação; em vermelho (Figura 1B), os fragmentos amplificados de 264 e 50 bp.

## Conclusões

Os resultados alcançados neste trabalho sugerem a possibilidade da presença de genes homólogos aos sbRNAs em sciarídeos. Através do sequenciamento de dois fragmentos amplificados, identificou-se um possível pseudogene e um provável segmento, que possa fazer parte de um gene maior para *BhsbRNA2*.

```
Sequência do clone 1 (DmsbRNA2)  
5'ATTTAGGTGACACTATAGGGCCATGGTTAGCGACGCGACGAATATAGAGTGGCAACAATTTCATTATGGTAATC  
GTTTTCATTTTCAGTGCATGCATGAGGAAAATTAGATAGTTCTGTAATGTGAAATCAAATTTCCAGCAGCCCAATTA  
AAAATGAGAAACAATGACGTAGCATTTTATGACGCCAAATCCGTTGTGAAGACGGGATAATGTTATTGCAATTACGAA  
ACTAACTCATCAGGCTTGGTGAGGTTTTGGCGGGGGTCATAGTCTTTTTT  
Sequência do clone 2 (DmsbRNA2)  
5'ATTTAGGTGACACTATAGGGCCATGGTTAGCGACGCGGGGGTCATAGCGGGGGTCATAGTCTTTTTT
```

**Figura 2.** Prováveis genes de sbRNAs de *Bradysia hygida*. Em verde, a sequência promotora da RNA polimerase III do vetor, em vermelho, as sequências alinhadas com o primer *DmsbRNA2*. Os segmentos alinhados com sequências de *M. destructor* no clone 1 estão sublinhados.

## Agradecimentos

Agradeço antes de tudo ao criador do universo, pela oportunidade de estudar a vida. Aos meus pais, que são a base de tudo. À professora Cida e aos demais alunos do laboratório pelo aprendizado diário, confiança e motivação – sem os quais não seria possível este trabalho. Agradeço à Fundação Araucária por ter financiado este projeto.

## Referências

- BORIA, I; GRUBER, A. R; TANZER, A; BERNHAR, S. H; LORENZ, R; MUELLER, M. M; HOFACKER, I. L; STADLER, P. F. Nematode sbRNAs: Homologs of Vertebrate Y RNAs. **J Mol Evol**, Novara, v. 70, n. 4, p. 346-358, 2010.
- DUARTE JUNIOR, F. F; LIMA NETO, Q. A; RANDO, F. S; FREITAS, D. V. B; PATTARO JUNIOR, J. R; POLIZELLI, L. G; MUNHOZ, R. E. F; SEIXAS, F. A. V; FERNANDEZ, M. A. Identification and molecular structure analysis of a new noncoding RNA, a sbRNA homolog, in the silkworm *Bombyx mori* genome. **Mol BioSyst**, Maringá, v. 11, n. 3, p. 801-808, 2014.
- KOWALSKI, M. P and KRUDE, T. Functional roles of non-coding Y RNAs. **The Int J of Bioch & Cell Biol**, Cambridge, v. 66, p. 20–29, 2015.
- PERREAULT, J; PERREAULT, J. P; BOIRE, G. Ro-Associated Y RNAs in Metazoans: Evolution and Diversification. **Mol Biol Evol**, Quebec, v. 24, n. 8, p. 1678–1689, 2007.
- SAUAIA, H; ALVES, M. A. R. A description of a new species of *Bradysia* (Diptera, Sciaridae). **Pap Avul Zool**, São Paulo, v. 22, p. 85-88, 1968.
- SIMON, C. R; SIVIERO, F; MONESI, N. Beyond DNA Puffs: What can we learn from Studying Sciarids? **Genesis**, Uberaba, v. 54, n. 7, p. 361–378, 2016.