

## EXPRESSÃO RELATIVA DO GENE *BmsbRNA* EM TECIDOS LARVAIS DE *Bombyx mori* L.

Daniel Caligari (Bolsista CNPq), Francisco Ferreira Duarte Júnior (co-orientador), Maria Aparecida Fernandez (orientadora), e-mail: [aparecidafernandez@gmail.com](mailto:aparecidafernandez@gmail.com).

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

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

**Palavras-chave:** non-coding RNA, sbRNA, replicação.

### Resumo:

*Bombyx mori* L. é um inseto holometábolo da ordem Lepidóptera, conhecido popularmente como bicho-da-seda, que se destaca por ser um dos únicos insetos integralmente domesticado e antropicamente dependente até os dias atuais. Devido principalmente à cultura milenar de criação desse inseto e o beneficiamento do fio de seda, principal constituinte do casulo deste animal, o bicho-da-seda é um organismo modelo em estudos nas áreas de biologia celular e molecular, e um acervo genético representativo é estabelecido. Entre as análises de RNAs não-codificantes (ncRNA) de *B. mori*, o gene *BmsbRNA* foi detectado, pelo grupo de pesquisa desse trabalho, através de análises de bioinformática de seu genoma, e o mesmo foi clonado e descrito como o primeiro sbRNA de insetos. Os sbRNAs são RNAs não codificantes encontrados em invertebrados, homólogos aos Y RNAs de mamíferos, os quais possuem uma estrutura secundária tipo haste-loop característica, e atuam no processo de iniciação da replicação cromossomal. Neste trabalho, foi objetivado a análise quantitativa do gene *BmsbRNA*, por meio de RT-qPCR, em diferentes órgãos de lagartas do 5º dia do último instar. Os resultados obtidos sugerem que este ncRNA é pelo menos 100 vezes mais expresso em gônadas do que nos outros tecidos analisados, o que pode ser relacionado à função predita desse gene de participação nos processos replicativos, já que as gônadas deste período de desenvolvimento larval estão comprometidas com o processo de gametogênese.

### Introdução

*Bombyx mori* L. é um inseto da ordem Lepidóptera, conhecido popularmente como bicho-da-seda, devido à cultura milenar do cultivo de *B. mori* e obtenção de fios de seda – constituinte proteico do casulo deste animal –, atividade que visa, até os dias de hoje, a utilização destes fios na produção e comercialização de diversos produtos, como cordas e tecidos de alta resistência e maciez, como a seda. O ciclo de vida de *B. mori* é holometábolo, o que significa que realiza metamorfose completa, constituído

de estágio larval de 5 instares, um período de pupa, seguido de um processo de metamorfose que origina o adulto (mariposa), onde ocorre a fase reprodutiva. Durante a fase larval, as lagartas aumentam até 70X do seu tamanho inicial, se alimentando de folhas de amoreira até uma parte do 5º instar, período em que se inicia a formação do casulo. *B. mori* tem sido utilizado desde o século XIX como um organismo modelo em estudos biológicos, e hoje, conta com um grande acervo de informações genéticas, com um mapa de mutações economicamente importantes. Além disso, este inseto possui um potencial na biotecnologia e na elucidação de mecanismos moleculares e fisiológicos (Aruga, 1994; Hanada & Watanabe, 1986). RNA funcionais (*non-coding RNAs* - ncRNAs) estão envolvidos em diversos processos metabólicos, como por exemplo, na replicação de DNA. Os sbRNAs constituem uma família de pequenos ncRNAs de invertebrados, e com homologia estrutural e funcional aos Y RNAs de mamíferos. Essas moléculas exibem um padrão *haste-loop* na sua estrutura e são indispensáveis no processo de iniciação da replicação (Boria et al., 2010; Kowalski & Krude, 2015). O gene *BmsbRNA* codifica uma molécula de 57 pares de bases (pb), estável em testes de dinâmica molecular, além de apresentar uma sequência evolutivamente conservada para sbRNAs (Duarte Junior et al., 2015). Este trabalho buscou investigar como este gene é expresso em órgãos de lagartas de *B. mori* no 5º dia do 5º instar.

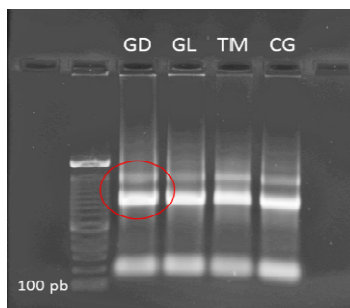
## Materiais e métodos

Lagartas da terceira muda de híbridos comerciais de *B. mori* (gentilmente cedidas pela empresa BRATAC) foram cultivadas no Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF-UEM) até o 5º dia do 5º instar. Quinze lagartas foram utilizadas para a dissecação dos seguintes órgãos: gônada (sem diferenciação de sexo), glândula sericígena, túbulos de Malpighi, e corpo gorduroso. Para a extração de RNA total, foi utilizado o reagente *TRIzol® LS (Invitrogen)*, em condições sugeridas pelo fabricante. Em seguida, as amostras foram analisadas em eletroforese em gel desnaturante de agarose 1%, e tratadas com *DNase I (Invitrogen)*, antes de sintetizar as fitas de cDNA com o kit *iScript™ cDNA synthesis kit (BIO-RAD)*. cDNA (1500 ng de cada amostra) foram utilizadas como *template* em reações de RT-qPCR. As reações foram realizadas com o reagente *TYPE-IT® HRM™ PCR kit (Qiagen)*, e as amostras foram aplicadas no equipamento *LightCycler® 96 (Roche)*. Para tal, o set de *primer* utilizado para amplificar o gene alvo, denominado *BmsbRNA*, foi o mesmo desenhado por Duarte Junior et al., 2015. Para a quantificação relativa, as mesmas amostras foram realizadas com *primers* para obtenção de um fragmento do gene do RNA ribossomal 5S (rRNA), e os resultados das análises estatísticas, calculados (descrita abaixo) e usados para plotagem de gráficos, com o software *GraphPad Prism versão 4*.

$$Ar = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ da amostra} - Ct \text{ do gene 5S})}$$

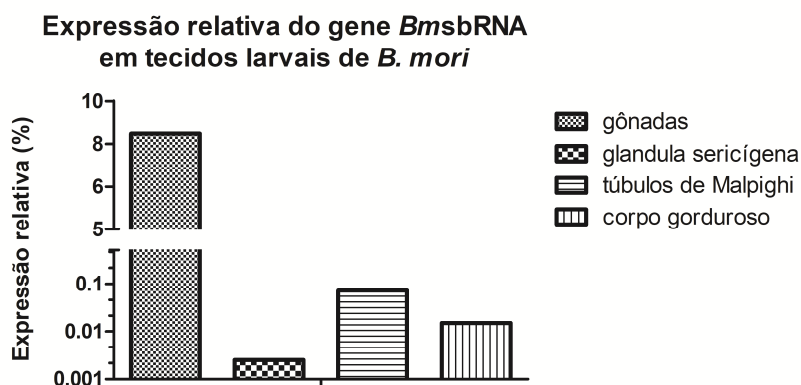
## Resultados e Discussão

As amostras de RNA total de cada órgão analisado apresentaram alta integridade e o círculo vermelho mostra a região onde o bandeamento de RNAs ribossomais é observado, Figura 1.



**Figura 1** – RNA total extraído de órgãos analisados de lagartas no 5º dia do 5º instar. GD: gônada; GL: glândula sericígena; TM: túbulos de Malpighi; CG: corpo gorduroso. O círculo vermelho destaca a região das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S, que evidenciam a integridade de todas as amostras. Padrão de tamanho molecular: 100 pb (Invitrogen).

Os resultados obtidos nas reações de RT-qPCR, mostraram que o gene *BmsbRNA* é expresso de forma significativa em gônadas de lagartas do 5º dia do 5º instar e, de forma basal, nos outros tecidos analisados (Gráfico 1). Em gônadas, houve 8,36% de expressão relativa ao gene rRNA 5S; glândula sericígena, 0,0025%; túbulos de Malpighi, 0,072% e corpo gorduroso, 0,015%.



**Gráfico 1** – Expressão relativa do gene *BmsbRNA* em diferentes órgãos de *Bombyx mori* no 5º dia do 5º instar. Os resultados em % foram calculados de acordo com a expressão do gene 5S. Valores obtidos por experimentação por RT-qPCR.

No tecido gonadal, o gene foi expresso mais de 100 vezes em relação aos outros tecidos analisados, e quase 5.000 vezes a mais do que em glândula sericígena. Esta expressão acentuada indica a função predita para este gene, que é a participação no processo de iniciação da replicação de DNA cromossomal, pois neste tecido, durante este período do desenvolvimento

das lagartas, ocorre a gametogênese, com elevadas taxas de proliferação celular. Já para os outros tecidos, foi observada uma taxa basal, porém, a expressão do gene *BmsbRNA* foi praticamente nula em glândula sericígena, mostrando, que este gene não está sendo expresso neste órgão em lagartas deste período. A glândula sericígena está comprometida com processos relacionados à síntese proteica nesse período, e os ciclos de endomitose neste órgão estão já praticamente finalizados nesse período. Em túbulos de Malpighi e corpo gorduroso, a quantidade de sbRNAs detectados foi nível basal, possivelmente, o necessário para a manutenção desses tecidos. Esses resultados são iniciais e pelo menos mais duas reações independentes devem ser realizadas para confirmar estes resultados.

## Conclusões

*BmsbRNA* é um gene que expressa um ncRNA pertencente ao grupo dos sbRNAs, moléculas que atuam no processo de iniciação da replicação do DNA. Os resultados mostram que este gene foi detectado pelo menos 100 vezes mais expresso em gônadas do que nos outros tecidos analisados. Nas gônadas de *B. mori*, neste período, está ocorrendo um intenso processo de proliferação celular, que ocorre devido à gametogênese e a maturação do órgão. Por isso, este trabalho indica que, como previsto, este gene esteja mais expresso em tecidos com altas taxas de replicação.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES, Fundação Araucária, COMCAP/UEM e a equipe do LORF.

## Referências

ARUGA, H. Principles of sericulture. **CRC Press**, USA, p. 97-111, 1994.

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**, USA, v. 70, 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**, USA, v. 11, p. 801-808, 2015.

HANADA, Y & WATANABE, J.K. Manual de criação do bicho-da-seda. **Cocamar**, Curitiba, p. 224, 1986.

KOWALSKI, M. P., KRUDE, T., Functional roles of non-coding Y RNAs. **Inter. J of Biochem & Cell Biol**, USA, v. 66, 20–29, 2015.