

AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *BmsbRNA* EM TECIDOS LARVAIS DE *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)

Daniel Caligari (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Francisco Ferreira Duarte Junior (co-orientador), Maria Aparecida Fernandez (orientadora), e-mail: mafernandez@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica.

Palavras-chave: ncRNAs funcionais, stem-bulge RNA, replicação do DNA.

Resumo

Estudos do metabolismo do bicho-da-seda (*Bombyx mori*), inseto muito importante economicamente e modelo biológico no estudo de biologia básica, têm evoluído de maneira importante nas últimas décadas, e a pesquisa de moléculas de RNA funcionais se destaca, revelando importantes funções regulatórias na fisiologia e metabolismo deste animal. Os stem-bulge RNAs (sbRNA), são non-coding RNAs (ncRNA) de invertebrados que desempenham função essencial na iniciação da replicação do DNA, sendo homólogos aos Y RNAs de vertebrados. Neste trabalho, por meio de RT-qPCR, avaliou-se a expressão gênica diferencial do *BmsbRNA*, primeiro gene de sbRNA descrito para *B. mori*. Para tal, foram utilizados como amostra cDNAs dos seguintes órgãos de lagartas do bicho-da-seda no 5º dia do 5º instar: testículos, ovários, glândulas sericígenas, túbulos de Malpighi e corpo gorduroso. Os resultados mostraram uma elevada expressão do *BmsbRNA* nas gônadas quando comparada com corpo gorduroso e expressão basal em glândulas sericígenas e túbulos de Malpighi. Adicionalmente, foi verificado em resultados parciais, que a expressão em testículos é cerca de 37 vezes maior do que em ovários nesse período do desenvolvimento larval. Em resumo, estas análises mostraram que o gene *BmsbRNA* é expresso, comparativamente com os dados de outros tecidos, mais acentuado nos tecidos gonadais, principalmente em testículos, tecidos os quais estão comprometidos com altas taxas de proliferação, devido aos processos de gametogênese que ocorrem expressivamente nestes órgãos, o que indica uma possível relação funcional de mesma natureza com o que já foi verificado para os sbRNAs de *Drosophila melanogaster* e Y RNAs de mamíferos.

Introdução

A sericicultura é um antigo processo, iniciado há mais de 5.000 anos na China, que compreende a criação do inseto *Bombyx mori* com a finalidade de se obter fios proteicos de seda provenientes de seus casulos. Estes fios de seda são usados para a confecção de tecidos e outros produtos de grande importância econômica no mundo. O bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), foi selecionado artificialmente ao longo de milênios, visando principalmente uma maior produção de seda aliada à resistência ambiental e a patógenos (ARUGA, 1994). Hoje, o

repertório de matrizes fornece híbridos altamente produtíveis e resistentes a doenças e a alterações do ambiente. Paralelamente, este animal tem sido usado como modelo em diversos estudos científicos, desde a pesquisa básica na elucidação de mecanismos moleculares e fisiológicos, até a utilização na área da biotecnologia, medicina e na fabricação de biomateriais (HUANG et al., 2018). A área de estudo dos *non-coding* RNAs (ncRNAs) funcionais, tem se destacado, principalmente, devido à diversidade de funções celulares com as quais estão envolvidos (HALL & DALMAY, 2013). Os *stem-bulge* RNAs (sbRNA) são ncRNAs, descritos em invertebrados como essenciais para a iniciação da replicação do DNA, e são homólogos aos Y RNAs de vertebrados (revisão em KOWALSKI & KRUDE, 2015). Em insetos, nosso grupo de pesquisa reportou dois genes putativos para sbRNAs em *Drosophila melanogaster*, sendo que um é expresso e funcional no processo de iniciação da replicação cromossomal em extrato nuclear de células humanas (DUARTE JUNIOR et al., 2019). Em *B. mori*, foi também descrito pelo nosso laboratório o gene *BmsbRNA*, o qual se mostrou expresso em *pool* de tecidos desse lepidóptero (DUARTE JUNIOR, et al., 2015). A proposta desse projeto foi determinar a ocorrência da expressão do gene *BmsbRNA* em diferentes órgãos de lagartas do bicho-da-seda do 5º dia do 5º instar larval. Os resultados obtidos determinaram que ocorre expressão diferencial deste gene de acordo com o órgão analisado.

Material e métodos

As lagartas, gentilmente cedidas pela empresa BRATAC, foram criadas com folhas de amoreira até o 5º dia do 5º instar, e utilizadas para dissecação dos órgãos, os quais foram testículos, ovários, glândulas sericígenas, túbulos de Malpighi, e corpo gorduroso. Os órgãos dissecados foram submetidos à extração de RNA total com o reagente *TRIzol® LS* (Invitrogen). A dosagem foi realizada no equipamento Nanodrop 2000, e a integridade do RNA foi verificada por eletroforese. Dessas amostras, 1500ng do RNA foram tratados com *DNase I* (Invitrogen), e submetidos à síntese de cDNA com o kit *iScript™ cDNA synthesis kit* (BIO-RAD). Os cDNAs sintetizados foram utilizados como amostras em reações de RT-qPCR, com o Kit *Fast SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific). Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações dos respectivos fabricantes. Os *primers* utilizados para amplificar o gene *BmsbRNA* foram os mesmos utilizados por Duarte Junior et al., 2015. Para controle de expressão, utilizou-se um conjunto de primers para o gene 5S ribossomal. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *LightCycler® 96* (Roche), e o cálculo da expressão relativa foi obtido pela expressão $Ar: 2^{-(\Delta CT)}$. A média e o desvio padrão foram calculados a partir de 2 ou 3 experimentos diferentes com amostras em triplicata.

Resultados e Discussão

As análises demonstraram que o gene *BmsbRNA* é expresso, de maneira diferencial no 5º dia do 5º instar, entre os órgãos selecionados para a análise (Gráfico 1). Em gônadas, foi identificada uma quantidade elevada deste ncRNA, em comparação aos outros tecidos. Em glândula sericígena e túbulos de Malpighi, foi verificado uma

taxa basal, não ultrapassando 0,0001%. Já em corpo gorduroso, foi verificada uma expressão aproximada a 0,001%. Os resultados parciais provenientes das amostras gonadais separadas por sexo, devem ser repetidos para a determinação da expressiva diferença entre a quantidade deste sbRNA em testículos, como podemos observar quando comparado com ovários, na ordem de 37 vezes superior no período de desenvolvimento larval analisado (Gráfico 2).

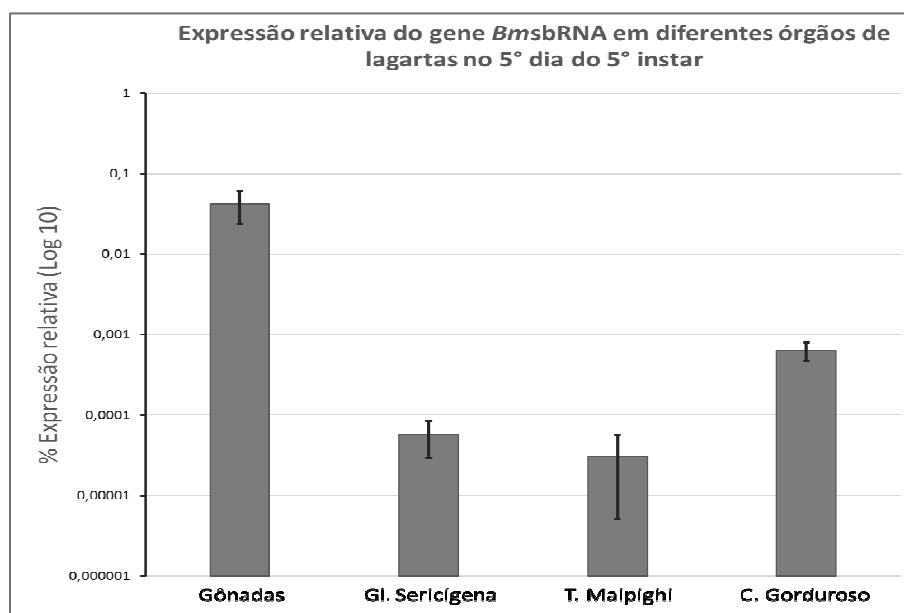


Gráfico 1. Expressão relativa do gene *BmsbRNA* em diferentes órgãos de lagartas de *Bombyx mori* no 5º dia do 5º instar. A média e o desvio padrão foram calculados a partir de três experimentos independentes, com amostras em triplicata (n=3).

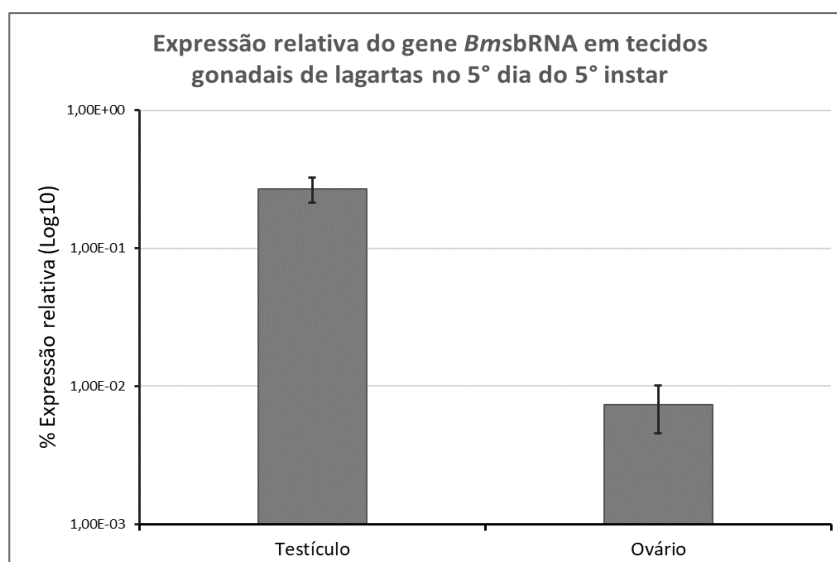


Gráfico 2. Expressão relativa do gene *BmsbRNA* em tecidos gonadais de lagartas de *Bombyx mori* no 5º dia do 5º instar. A média e o desvio padrão foram calculados a partir de dois experimentos independentes, com amostras em triplicata (n=2).

Os dados apresentados acima corroboram com a literatura já descrita para sbRNAs já descritos, embora experimentos funcionais para verificar sua participação na iniciação da replicação do DNA ainda não tenham sido realizados. Desta forma, o gene *BmsbRNA* se expressa de maneira diferencial e acentuada em tecidos específicos, o que por si só é de importância ímpar no estabelecimento do perfil de expressão deste sbRNA. Ainda tendo em vista que tais tecidos, de elevada presença deste ncRNA, são comprometidos com intensa proliferação celular – representada pela produção contínua de gametas masculinos nos testículos e maturação de folículos nos ovários –, a inferência deste gene como participante dos processos de replicação do DNA, assim como já demonstrado experimentalmente para os sbRNAs de *D. melanogaster*, pode ser sustentada de uma maneira mais acurada e coerente com os fatos fisiológicos apresentados neste trabalho.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam uma expressão gênica diferencial do *BmsbRNA*, de acordo com os tipos de tecidos analisados, mostrando que o mesmo possui regulação de maneira relacionada ao comprometimento fisiológico de cada órgão.

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.

DUARTE JUNIOR, F. F; BUENO, P. S. A. B; PEDERSEN, S. L; RANDO, F. S; PATTARO JUNIOR, J. R; CALIGARI, D; RAMOS, A. C; POLIZELLI, L. G; LIMA, A. F. DOS S; LIMA NETO, Q. A; KRUDE, T; 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.

HALL, A. E; DALMAY T. Discovery of novel small RNAs in the quest to unravel genome complexity. **Biochem. Soc. Trans**, UK, v. 41, p. 866-870, 2013a.

HUANG, W; LING, S; LI, C; OMENETTO, G. F; KAPLAN, L. D. Silkworm silk-based materials and devices generated using bio-nanotechnology. **Chem. Soc. Rev**, USA, v. 47, p. 6486-6504, 2018.

KOWALSKI, M. P; BAYLIS, H. A; KRUDE, T. Non-coding stem-bulge RNAs are required for cell proliferation and embryonic development in *C. elegans*. **J Cell Sci**, UK, v. 128, p. 2118-29, 2015.