

PERFIL DA EXPRESSÃO DO GENE *BmsbRNA* EM TESTÍCULOS E OVÁRIOS DE *Bombyx mori* DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL

Lucas Ciorlin (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Daniel Caligari (PIBIC/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, PR

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica.

Palavras-chave: RNAs não-codificantes, bicho da seda, ncRNAs

Resumo

Os sbRNAs constituem uma classe de RNAs não codificantes reportados em invertebrados, cuja funcionalidade foi relacionada como essencial para o licenciamento do processo da replicação do DNA, sendo que esses ncRNAs foram primeiramente descritos no nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Em insetos, novos genes para sbRNAs foram descritos por nosso grupo de pesquisa um para *Bombyx mori*, *BmsbRNA* e dois para *Drosophila melanogaster*, *DmsbRNA1* e *DmsbRNA2*. Os homólogos para sbRNAs para vertebrados são os Y RNAs, os quais são amplamente demonstrados como participantes do licenciamento da replicação cromossomal. *B.mori* são insetos da ordem Lepidóptera, e são amplamente denominados como bicho-da-seda, pelo tradicional uso de seu casulo na produção de fios de seda, com produção importante referente ao valor comercial dos tecidos de seda. Neste trabalho, foi analisado o perfil de expressão do gene *BmsbRNA* em tecidos gonadais de lagartas de 5º instar larval por meio de PCR em tempo real. Os resultados confirmam superexpressão em testículos, e resultados adicionais ainda demonstram regulação do início para o final do 5º instar.

Introdução

O inseto *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), usualmente denominado de bicho-da-seda, é utilizado tanto economicamente, na produção de casulos, utilizados para a produção de fios de seda, quanto em diversas áreas da pesquisa. Dentre estas áreas, destaca-se os estudos de RNAs não-codificantes, ncRNAs (QIU-ZHONG et al., 2016). Nos invertebrados, foram descritos uma classe de ncRNAs denominada *Stem-bulge* RNAs (sbRNAs), homólogos aos Y RNAs de vertebrados, sendo primeiramente descrito em *Caenorhabditis elegans*, sendo que foi descrita sua expressão e atuação essencial no processo de licenciamento da replicação cromossomal (KOWALSKI et al., 2015). Em insetos, genes para sbRNAs foram descritos

somente por nosso grupo de pesquisa nesses últimos anos. Em *Bombyx mori*, clonamos um gene, denominado *BmsbRNA* (DUARTE JÚNIOR et al., 2015) e em *Drosophila melanogaster* foram descritos dois genes, o *DmsbRNA1* e *DmsbRNA2*, sendo que somente para o sbRNA DmRNA1 foi identificada sua essencialidade para o licenciamento do processo de replicação de DNA em ensaios *in vitro* de células de mamíferos (DUARTE JÚNIOR et al., 2019). Nessa área de atuação, este projeto teve como objetivo verificar a expressão do gene *BmsbRNA* em testículos e ovários de lagartas do 5º instar.

Materiais e métodos

Híbridos comerciais de *B. mori* (cedidas gentilmente pela empresa BRATAC) foram criados no Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF-UEM), sob condições controladas, até o momento da dissecação, onde foram coletados 15 pares de ovários e de testículos de lagartas do 1º e 5º dia do 5º instar. As amostras foram imediatamente imersas em *TRIzol*® LS (Invitrogen) para a extração de seus RNA totais, que após o processo foram dosados no equipamento *Nanodrop2000* e visualizados em eletroforese em gel desnaturante de agarose a 1%. O RNA extraído foi então tratado com *DNase I* (Invitrogen) e utilizado para a síntese de cDNA com o kit *iScript™ cDNA synthesis kit* (BIO-RAD). O cDNA sintetizado foi o molde em reações de RT-qPCR, que foram realizadas com o kit *Fast Sybr Green* (Invitrogen) e no equipamento *LightCycler 96* (Roche). Todas as reações possuíam o set de *primers* que amplificam o gene alvo, denominado *BmsbRNA*, desenhado por Duarte Junior et al, 2015. Primers para amplificar um fragmento do gene do RNA ribossomal 5S (rRNA) foi utilizado de controle da reação. O desvio padrão foi calculado sob três experimentos independentes (n=3) e o cálculo da expressão relativa do gene *BmsbRNA* foi obtida mediante a fórmula:

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

Resultados e Discussão

Conforme apresentado no EAIC 2018, resultados parciais indicavam que ocorre a superexpressão do gene *BmsbRNA* em testículos em relação a ovários de lagartas do 5º dia do 5º instar de desenvolvimento. Os resultados apresentados neste trabalho confirmam estatisticamente que o gene em questão possui uma expressão acentuada em testículos, na ordem de 40x, quando comparada a expressão deste gene em ovários (Gráfico 1). Como resultado adicional, os mesmos procedimentos metodológicos foram realizados para verificar a expressão do gene alvo em lagartas do 1º dia do 5º instar, possibilitando desta forma uma visão do perfil de expressão ao longo do desenvolvimento do 5º instar (Gráfico 2). Os resultados evidenciam que em ambos os períodos analisados a expressão verificada em testículos

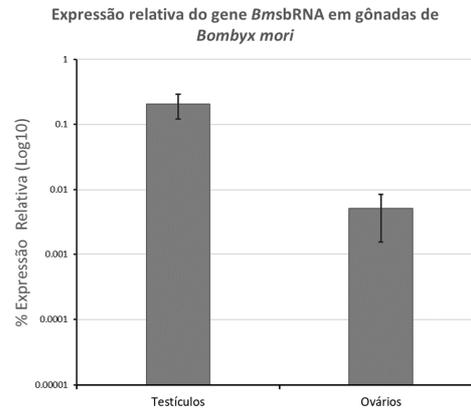


Gráfico 1. Expressão gênica de *Bmsb*RNA em testículos e ovários de lagartas de 5º dia do 5º instar larval (n=3).

foi maior do registrado para ovários. A maior relação da expressão testículo/ovário foi obtida em lagartas do 1º dia, diferença de 400x maior em testículos. Estes resultados demonstram que o gene alvo teve redução de expressão ao longo do 5º instar tanto em ovários como em testículos, o que demonstra que possivelmente exista nestes órgãos uma relação negativa da expressão deste gene conforme a progressão do 5º instar. É importante ressaltar, que o 5º instar é o período de maior crescimento da lagarta em massa, assim como de produção intensiva de espermatozoides nos testículos, maturação dos ovócitos, além de ser o estágio preparatório para a metamorfose, requerendo grande armazenamento de tecido gorduroso e produção de seda. A evidência de superexpressão em testículos corrobora a hipótese de que este sbRNA seja funcionalmente relacionado com os processos de replicação cromossomal, como já foi descrito e publicado para o *Dmsb*RNA1 de *D. melanogaster* (DUARTE JÚNIOR et al., 2019). A produção de espermatozoides nos testículos de *Bombyx mori* e outros insetos holometábolos, é acentuada e ininterrupta da metade do quarto instar até a fase de pupa, já que a fase adulta do bicho-da-seda é comprometida exclusivamente com o acasalamento (SAKAGUCHI, 1978).

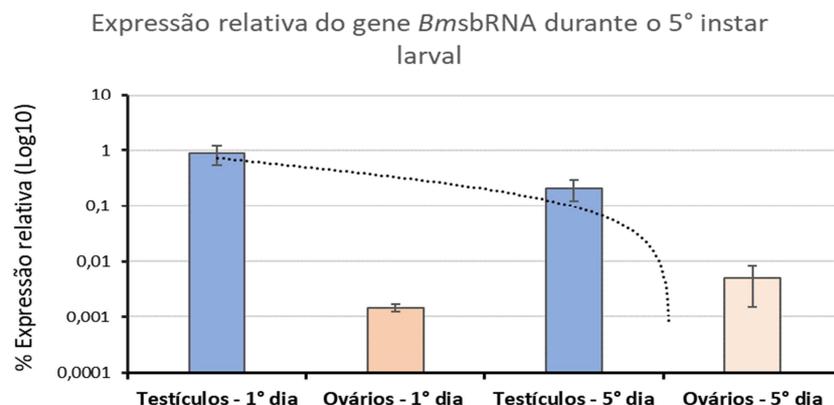


Gráfico 2. Expressão relativa do gene *Bmsb*RNA em testículos e ovários de lagartas do 1º e 5º dia do 5º instar (n=3). Em pontilhado, a linha de tendência em logaritmo.

Conclusões

A relação expressão-desenvolvimento larval obtido nesse trabalho é de suma importância para elucidar os detalhes relativos à função do gene *BmsbRNA* em *B. mori*. A superexpressão em testículos em um período de elevada atividade replicacional indica que este ncRNA seja funcionalmente relacionado com atividades descritas para outros sbRNA.

Agradecimentos

Fundação Araucária pelo auxílio financeiro; Fiação de Seda BRATAC pela doação de lagartas de *Bombyx mori*; ao meu coorientador Francisco Ferreira Duarte Jr. e a minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez por toda orientação e auxílio na realização do trabalho.

Referências

DUARTE JUNIOR F. F; BUENO P.S.A; PEDERSEN S.L; RANDO F.S; PATTARO JUNIOR J.R; CALIGARI D; RAMOS A.C; POLIZELLI L.G; LIMA A.F.S; LIMA NETO Q.A; KRUDE T.; SEIXAS F.A.V; FERNANDEZ M.A. Identification and characterization of stem-bulge RNAs in *Drosophila melanogaster*. **RNA Biology**, v. 16, n.3, p. 330-339, 2019.

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

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**, v. 128, n.11,p. 2118-29, 2015.

QIU-ZHONG, Z.; BINDAN Z.; QUAN-YOU Y.; ZE Z. BmncRNadb: a comprehensive database of non-coding RNAs in the silkworm, *Bombyx mori*. **BMC Bioinformatics**, v. 17 p. 370 ,2016.

SAKAGUCHI, B. Gametogenesis, fertilization and embryogenesis of the silkworm. In: TAZIMA, Y. (Org). **The silkworm: an important laboratory tool**. Kodansha, Tokyo, 1978. p. 5–29.