

ANÁLISE QUANTITATIVA DA EXPRESSÃO DO GENE KIN EM GLÂNDULAS SALIVARES DE *BRADYSIA HYGIDA* NO 4º INSTAR LARVAL

Nivaldo Natalino Banho Junior (PIBIC/CNPq/FA/UEM), José Renato Pattaro Junior (Coautor) (PBC/UEM), Maria Aparecida Fernandez (Orientador)
E-mail: aparecidafernandez@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas /
Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular / Maringá-PR

Ciências Biológicas/Bioquímica/Biologia Molecular

Palavras-chave: Pufes de DNA, Ribogênese, Sciaridae.

Resumo:

As glândulas salivares de larvas de *Bradysia hygida* é composta de células com núcleos politênicos cujos cromossomos apresentam, através do processo denominado amplificação gênica, pufes de DNA em domínios específicos. Essa amplificação diferencial permite a transcrição elevada de genes de proteínas essenciais para eventos metabólicos no final da fase larval desse sciarídeo. Nessa área de estudo, nosso objetivo foi determinar a possível expressão da proteína KIN em *B. hygida* em glândulas salivares no período de desenvolvimento larval. A KIN é descrita em mamíferos associada a inúmeros eventos metabólicos como o da replicação de DNA e da ribogênese. A presença do gene KIN no genoma de *B. hygida* foi determinado pela clonagem e sequenciamento de gene homólogo ao gene humano e o mesmo foi denominado *BhKIN*. A determinação da expressão quantitativa do gene *BhKIN* foi realizada em extratos de glândulas salivares nas idades larvais E1 e E5 no 4º instar larval, períodos nos quais, respectivamente, antecede e ocorre o processo de replicação adicional de DNA. A análise, através da metodologia de RT-qPCR, apresentou maior expressão na ordem de 3X do gene *BhKIN* em amostras da idade E1 do que em E5. Os resultados propõem que a proteína *BhKIN* possa estar envolvida nos processos metabólicos adicionais de replicação e/ou ribogênese nas células politênicas dessas glândulas salivares. São propostos para esse projeto a realização de experimentos em idades larvais anteriores e posteriores às analisadas, afim de confirmar se a superexpressão do gene *BhKIN* está relacionado com os eventos moleculares diferenciados no tecido analisado.

Introdução

Bradysia hygida é um inseto que pertence à Ordem Diptera e à Família Sciaridae, apresenta ciclo de vida holometábolo com duração de

aproximadamente 36 dias a 20 °C, e seu estágio larval é composto por quatro instares larvais delimitados por muda. Atualmente esse inseto é utilizado como modelo em diversos estudos que envolvem eventos moleculares como amplificação gênica e politenia (SIMON et al., 2016). *B. hygida* possui um par de glândulas salivares, constituídas de três regiões, S1, S2 e S3, formadas por uma única camada de células, as quais passam pelo processo de endomitose, e apresentam quatro cromossomos politênicos, A, B, C e X (SIMON et al., 2016). A partir da idade E3, no quarto instar larval, se inicia, além de pufes de RNA, a formação de pufes de DNA, os quais se intensificam em E5 e mostram sua expansão máxima em E7. Os pufes de DNA são regiões cromossômicas onde ocorre a replicação adicional e reiterada do DNA, iniciada em idade anterior à E3, idade E1, estando associado com a síntese de proteínas específicas, com consequente elevação da transcrição do RNA (SIMON et al., 2016). Seguindo este contexto, se têm a proteína KIN, descrita como atuante no processo de replicação, recombinação e reparo de DNA, tumorigênese e ribogênese em mamíferos (DESPRAS et al., 2003; GASPARG et al., 2021), a análise da expressão da KIN é indispensável para o estudo do efeito da amplificação gênica em *B. hygida*. A presença do gene da proteína KIN em *B. hygida* foi identificado, clonado, sequenciado e denominado *BhKIN* por nosso grupo de pesquisa (MONTANHEIRO et al., 2018), sendo o primeiro e único gene da proteína KIN clonado em insetos. Entretanto, como ainda não se têm dados sobre a expressão do gene *BhKIN*, o presente estudo objetivou analisar a expressão de *BhKIN* em glândulas salivares na idade anterior à amplificação gênica, E1, e na idade durante a qual ocorre o processo de replicação adicional e a abertura de pufes de DNA, idade E5.

Materiais e métodos

Bradysia hygida foi mantida em cultura no Laboratório de Organização funcional do Núcleo, em caixas de terra devidamente peneiradas em temperatura de 20 °C, sendo que a alimentação larval foi a base de erva mate fermentada, amido de milho e farinha de aveia. 40 glândulas salivares das idades E1 e E5 foram dissecadas e imersas, separadamente, em tubos eppendorf de 2 mL com 0,75 mL do reagente TRIzol LS (*Invitrogen*), para a extração de RNA total seguindo as instruções do fabricante. As concentrações das amostras foram determinadas no equipamento *Nanodrop2000* (Thermo Fisher), em 260 nm. Subsequentemente, a integridade das amostras foi analisada em gel de agarose desnaturante a 1% corado com brometo de etídio a 1 µg/mL. Adicionalmente, foi acrescentado no gel o padrão de marcador molecular para ácidos nucleicos *100 bp DNA Ladder* (*Invitrogen*) e a aquisição da imagem obtida no equipamento *ImageQuant LAS 500* (GE Healthcare). Sucessivamente, as amostras de RNA total foram tratadas com *DNase I* (*Invitrogen*) e para uma concentração final de 1 µg foram submetidas a síntese de cDNA, o qual foi conduzido com o *kit iScript™ cDNA synthesis kit* (BIO-RAD) conforme as instruções do fabricante. Após a síntese de cDNA, cada amostra foi submetida

a reações de RT-qPCR com o reagente *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher), conduzidas ao termociclador Rotor-Gene Q (QIAGEN) com uma concentração final de cDNA de 5 µg/µL. A reação foi ajustada para 40 ciclos com temperatura de anelamento de 60 °C, otimizados para primers específicos ao gene KIN (F 5' - GGGACGCCTAAGTATCTGGC – 3' e R 5' - GGTGGTGTGACATTTGAAGCC – 3') descrito por Montanheiro (2018) e primers para o gene *BheEF1A-F1* (GQ119627) descritos por Candido-Silva et al., (2010), sendo esse último usado como gene de referência. O cálculo da expressão relativa do gene *BhKIN* no quarto instar larval, nas amostras de E1 e E5, foi determinada a partir da equação: $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{-((\Delta CT E1) - (\Delta CT E5))}$. Os valores de Cts de cada amostra foram obtidos de reações em triplicatas.

Resultados e Discussão

Foi determinada uma concentração de 595,3 ng. µL⁻¹ para as larvas da idade E1 e para as larvas da idade E5 492,0 ng. µL⁻¹. Essas concentrações foram ajustadas a concentrações iguais para as reações de cDNA e RT-qPCR. A análise anterior em gel mostrou a presença de *smear* de mRNA e duas bandas a 1000 e de 2000 pares de bases de RNAs ribossomais, indicando alta integridade das amostras. Os resultados da análise quantitativa em RT-qPCR apresentou a expressão do gene *BhKIN* três vezes maior em E1 do que em E5 (Figura 1).

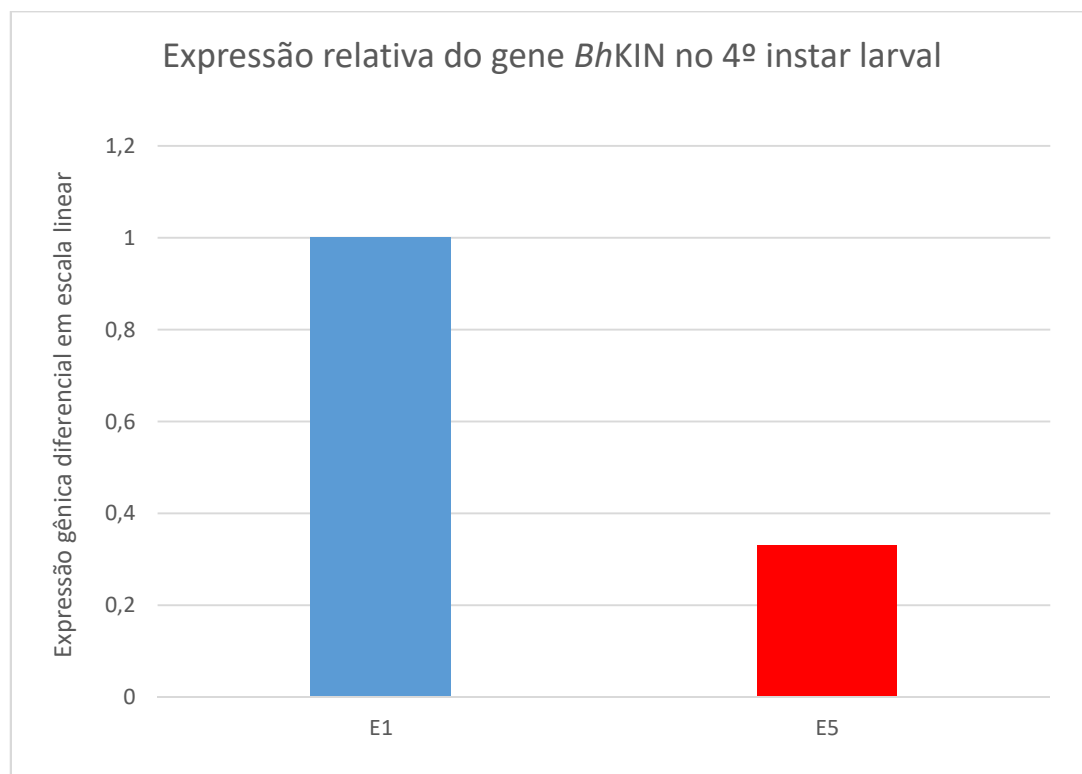


Figura 1 – Expressão relativa do gene *BhKIN* em glândulas salivares nos períodos larvais de desenvolvimento E1 e E5 no quarto instar larval.

Esses dados permitem propor a hipótese de que a alta expressão de *BhKIN* em E1 possa estar envolvida em processos metabólicos nas células politênicas como da iniciação da replicação adicional do DNA e, possivelmente também, da ribogênese. Esses dados estão de acordo das publicações sobre a proteína KIN em mamíferos nos processos de replicação (DESPRAS et al., 2003) e ribogênese (GASPAR et al., 2021) e, em suporte em *B. hygida*, é descrito que em E1 intensas modificações metabólicas ocorrem nas células politênicas, como o processo de iniciação da amplificação adicional e ribogênese (SIMON et al., 2016).

Conclusões

Por meio da metodologia aplicada verificou-se a expressão do gene *BhKIN*, os quais são resultados inéditos para *B. hygida* e em insetos. A determinação do alto nível de expressão na idade E1 pode indicar sua participação na replicação adicional de DNA e na ribogênese nas células politênicas. Novas análises serão realizadas em outras idades do 4º instar larval, afim de relacionar a formação de outros pufes de DNA e a expressão de *BhKIN*.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro, ao meu coorientador José Renato Pattaro Júnior e a minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez por toda orientação e auxílio na realização do trabalho.

Referências

CANDIDO-SILVA J. A.; MONESI N. *Bradysia hygida* (Diptera, Sciaridae) presents two eukaryotic Elongation Factor 1A gene homologues: partial haracterization of the eukaryotic Elongation Factor 1A-F1 gene. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.43, p.437-444, 2010.

DESPRAS, E.; MICCOLI, L.; CREMINON, C. ; ROUILLARD, D.; ANGULO, J. F.; BIARD, D. S. Depletion of KIN17, a human DNA replication protein, increases the radiosensitivity of RKO cells. **Radiation Research**, v.159, p.748-58, 2003.

GASPAR, V. P.; RAMOS, A. C.; CLOUTIER, P.; PATTARO JR, J. R.; DUARTE JR, F. F.; BOUCHARD, A.; SEIXAS, F. A. V.; COULOMBE, B.; FERNANDEZ, M. A. Interactome Analysis of KIN (Kin17) Shows New Functions of This Protein. **Current Issues in Molecular Biology**, v.43, p.767-781, 2021.

MONTANHEIRO, I. R. **Clonagem e sequenciamento do gene KIN em *Bradysia hygida* (Diptera:Sciaridae)**. 2018. 27f. Trabalho de Conclusão de

Curso (Tecnologia em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

SIMON C. R; SIVIERO F.; MONESI N. Beyond DNA Puffs: What Can We Learn From Studying Sciarids? **Genesis**, V.54, n.7, p. 361-378, 2016.