

EXPRESSÃO DO GENE *BmsbRNA* EM TECIDOS GONADAIS DE LAGARTAS DE *Bombyx mori* INFECTADAS COM O BACULOVIRUS *BmNPV*

Katharina Tanaka (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Beatriz Benedette Pessoa, Daniel Caligari (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, Genética/Genética Animal

Palavras-chave: *Bombyx mori*; sbRNA de inseto; expressão tecidual.

RESUMO

O gene *BmsbRNA* de *Bombyx mori* é um ncRNA descrito como um *stem-bulge* RNA (sbRNA). Os sbRNAs foram descritos em invertebrados sendo homólogos em estrutura e função aos Y RNAs de vertebrados. A interação dos sbRNAs no processo de iniciação da replicação do DNA leva à hipótese de uma possível atividade de supressão e/ou ativação da expressão desses genes quando a célula é infectada por vírus que utilizam a maquinaria de replicação de DNA dessas células. Em criações de lagartas da espécie *B. mori*, o bicho da seda, o baculovirus *BmNPV* é o principal causador de mortalidade, ocasionando perda da produção do sericicultor. O processo de replicação de DNA das células infectadas é interrompido pelo vírus, liberando poliedros com vírions no balcão de criação, levando à morte todas as lagartas. O projeto aqui descrito teve como objetivo determinar o nível de expressão do *BmsbRNA* nos tecidos gonadais (testículos e ovários) de lagartas de *B. mori* infectadas com *BmNPV*. Através da análise por PCR quantitativo a expressão do gene *BmsbRNA* teve redução significativa após 48 horas da infecção, de 6X em testículos e de 13X em ovários. Esses resultados, corroboram com resultados prévios obtidos em corpo gorduroso e confirmam a hipótese de que a infecção pelo baculovirus *BmNPV* ocasiona alteração na expressão do *BmsbRNA*.

INTRODUÇÃO

Bombyx mori é um Lepidóptera, também conhecido como bicho-da-seda, utilizado historicamente na sericultura, além de ser um organismo modelo em áreas como biologia molecular, virologia e biotecnologia. O baculovirus *Bombyx mori nucleopolyedrovirus* (*BmNPV*) é o principal patógeno de *B. mori*. Neste contexto, o mecanismo de controle do ciclo celular do hospedeiro exercido pelos baculovirus é um importante alvo para a compreensão da relação vírus-hospedeiro e para demonstrar a funcionalidade do gene *BmsbRNA*. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) desempenham diversas funções em vários processos biológicos como a

regulação da expressão gênica, estrutura da cromatina, replicação, maturação de mRNAs, papéis especializados no desenvolvimento e diferenciação celular, apesar da função de muitos ainda ser desconhecida (Boivin et al., 2019). Dentre as famílias de pequenos ncRNAs, foram descritos os Y RNAs em vertebrados, os quais estão envolvidos com o início da replicação do DNA *in vitro* (Kowalski e Krude 2015). Os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs), são encontrados em invertebrados e são homólogos aos Y RNA em termos da conservação de estrutura e função (Kowalski e Krude, 2015). Foram descritos pela primeira vez no genoma de *Caenorhabditis elegans* e demonstrados essenciais na progressão da fase S, desenvolvimento embrionário e proliferação celular (Kowalski e Krude, 2015). Para insetos foram descritos os genes *BmsbRNA* de *B. mori* (Duarte Junior et al., 2015), *DmsbRNA1* (*Dm1*) e *DmsbRNA2* (*Dm2*) de *Drosophila melanogaster*, sendo o *Dm1* verificado funcionalmente ativo para a replicação do DNA (Duarte Junior et al., 2019). O gene *BmsbRNA*, por sua vez, não teve sua função confirmada, porém resultados preliminares não publicados sugerem que possa ser um alvo do vírus BmNPV. Desta forma, buscou-se verificar por meio de RT-qPCR o nível de expressão gênica em tecidos gonadais de lagartas contaminadas por este baculovirus.

MATERIAIS E MÉTODOS

Lagartas híbridas de *B. mori* de 3º instar foram obtidas da empresa Fiação de Seda BRATAC S/A e criadas no Laboratório de Melhoramento Genético do bicho-da-seda (UEM), em temperatura e umidade de 26 °C e 70%, respectivamente. As lagartas foram alimentadas sob demanda ao dia com folha de amoreira até a coleta das amostras. No 5º instar foram divididas em grupo controle e infectado e separadas para o experimento de contaminação com o BmNPV, o qual foi realizado com concentração do inóculo determinada previamente em experimentos de DL50 [8×10^8 COPS/mL (COPS=corpos de oclusão virais poliédricos por mililitro)]. As coletas de testículos (TC) e ovários (OV) foram realizadas por dissecação das lagartas 48 horas pós infecção (hpi), sendo os tecidos homogeneizados em TRIzol LS® (Invitrogen), os RNAs purificados e dosados em Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). A verificação da qualidade do RNA extraído foi realizada eletroforese em agarose a 1%. As amostras validadas foram submetidas à reação com DNase I (Biolabs) e em seguida utilizadas para síntese de cDNA com o kit *Iscrip cDNA synthesis* (BIO-RAD). Para quantificar o gene alvo, foi realizado ensaios de RT-qPCR (QuantStudio 3, Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do kit SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Primers para os seguintes genes foram utilizados: *BmrRNA5S* (gene normalizador do gene-alvo), *BmsbRNA* (gene alvo), *BmRP49* (gene codificante), *BmNPVEC27* (gene viral como marcador da infecção e correlação com a parada do ciclo celular). Os dados gerados no experimento foram analisados na linguagem R com diversos pacotes auxiliares, incluindo o *qPCRtools*, com o qual foram calculados os níveis de expressão gênica [baseado no método: $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$], análise estatística (t-test com nível de confiança $p < 0,05$, $n=9$) e geração dos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios de RT-qPCR mostraram redução no nível da expressão do gene *BmsbRNA* de 6 vezes em TC e 13 vezes em OV de lagartas infectadas como *BmNPV* (Figura 1). Esses resultados corroboram com dados ainda não publicados onde foi verificada que ocorre redução (20 vezes com 48 hpi) em corpo gorduroso. Vale ressaltar que a redução encontrada foi mais evidente e estatisticamente significativa em OV do que em TC (Figura 1).

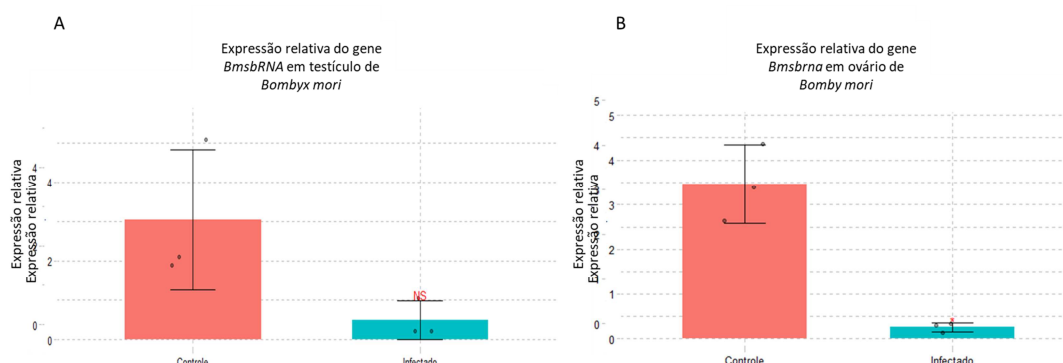


Figura 1–“Nível de expressão do gene *BmsbRNA* em tecidos de lagartas infectadas pelo *BmNPV*. Resultados observados em amostras de testículos (A) e ovários (B)”.

Entretanto, mesmo que a redução do nível de expressão do gene-alvo, *BmsbRNA*, tenha sido menos pronunciada em TC do que em OV, o comprometimento em proliferação viral em TC foi 50 vezes maior (Figura 2).

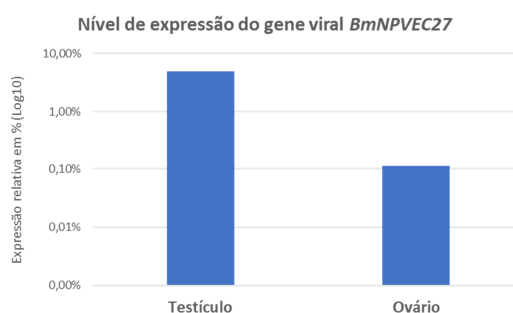


Figura 2–“Nível de expressão do gene viral *BmNPVEC27* em TC e OV do grupo infectado (n=3, experimento único com replicatas técnicas). Os valores estão em escala log”.

Desta forma, pode-se inferir que: devido ao gene-alvo ser superexpresso em TC do que em todos os outros órgãos analisados previamente (resultados anteriores não publicados), o nível de expressão do gene *BmsbRNA*, de algum modo desconhecido é mantido (pelo menos de forma relativa ao verificado em OV) pela fisiologia do órgão em questão, mesmo com intensa presença viral. Possivelmente isso está relacionado com algum mecanismo molecular que as células proliferativas exerçam que dependa da presença do *BmsbRNA*. Estes resultados abrem um leque de

estudos que podem ser realizados para uma melhor compreensão sobre a atuação funcional deste sbRNA e determinar qual relação eles possuem com a infecção viral. Uma hipótese que pode explicar esta relação é a de que os baculovírus são conhecidos por causarem uma parada no ciclo celular do hospedeiro, e desta forma o *BmsbRNA* - que potencialmente possui função apenas no início da fase S - seja degradado pela própria célula quando param em S e G2 (Davy e Doorbar, 2007). Outrossim, pode-se inferir que o vírus tenha mecanismos de inibição de certos genes do hospedeiro como parte de sua estratégia de proliferação.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados é possível concluir que o gene *BmsbRNA* sofre redução de seu nível de expressão em testículos e ovários de lagartas de *B. mori* contaminadas pelo baculovírus BmNPV. Ademais, é possível inferir que o gene avaliado possui função ímpar na fisiologia de ambos os órgãos analisados, e que deva ser um alvo molecular da estratégia de proliferação deste patógeno.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^a Dr^a Maria Aparecida Fernandez e Daniel Caligari, pela orientação e co-orientação, ao CNPq e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

Boivin, V.; Faucher-Giguère, L.; Scott, M.; Abou-Elela, S. The cellular landscape of mid-size noncoding RNA. **WIREs RNA**, 10: e1530, 2019. <https://doi.org/10.1002/wrna.1530>

Davy C and Doorbar J. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. **Virology**, v. 368, p. 219-26, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.043>

Duarte Junior F. F; Lima Neto Q. A, et al. 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. <https://doi.org/10.1039/c4mb00595c>

Duarte Junior F. F; Bueno P. S. A; Pedersen S. L; Rando F. S; Pattaro Júnior J. R; Caligari D, et al. Identification and characterization of stem-bulge RNAs in *Drosophila melanogaster*. **RNA Biology**, v. 16, p. 330-339, 2019. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572439>

Kowalski M. P and Krude T. Functional roles of non-coding Y RNAs. **The Int J of Bioch & Cell Biol**, v.66, p. 20–29, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.003>