IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE sbRNAs EM *Pseudolycoriella hygida*

Giovana de Oliveira Gomes Kutschenko[1](PIBIC/CNPq/BALCÃO/UEM), Júlia Strey Bem[1], Guilherme da Costa Patzsch[1] (Co-orientador), Luiz Gustavo Gutierrez Ferreira[1], Daniel Caligari[1], Flávio Augusto Vicente Seixas[2] (Co-orientador), Nadia Monesi[3], Maria Albertina de Miranda Soares[4], Maria Aparecida Fernandez[1] (Orientadora) E-mail: mafernandez@uem.br

[1]Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá - UEM, 87020-900, PR. [2]Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Campus Umuarama, 87506-370, PR. [3] Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 14040-900 SP. [4]Universidade Estadual de Ponta Grossa, 84010-330, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Bioquímica/Biologia Molecular

Palavras-chave: ncRNAs; Amplificação gênica; Sciarídeo.

RESUMO

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) constituem uma classe de moléculas envolvidas em diferentes processos celulares. Entre esses, destacam-se os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs) em invertebrados, homólogos aos Y RNAs de vertebrados, sendo esses últimos associados ao processo de iniciação da replicação do DNA. *Pseudolycoriella hygida* é um inseto da família Sciaridae que apresenta replicação adicional do DNA (pufes de DNA), na glândula salivar, durante o desenvolvimento larval. Sendo assim, a identificação e caracterização de sbRNAs nesses insetos, no período de replicação reiterada do DNA, é importante para a compreensão da regulação desse processo. O presente trabalho teve como objetivo identificar possíveis sbRNAs no genoma dessa espécie por meio da análise de sequências e estruturas conservadas entre sbRNAs e Y RNAs previamente descritos. A técnica utilizada para a obtenção das sequências foi PCR em gradiente de temperatura com os primers para sbRNAs de *Drosophila melanogaster*, sbRNA Dm1 e Dm2, e de *Bombyx mori, BmsbRNA.* Dois fragmentos foram obtidos utilizando-se os primers de *D. melanogaster, sbRNA Dm2.* O fragmento maior, de 252 nucleotídeos, após alinhamento com o genoma de *Psl. Hygida*, levou à identificação de uma sequência interna de 100 nucleotídeos com domínio e estrutura 2D compatíveis com sbRNAs. Esses dados contribuirão para o estabelecimento de critérios objetivos de identificação de sbRNAS e construção de modelos de covariância para a busca de novos candidatos a sbRNAs no genoma de *Psl. hygida*.

INTRODUÇÃO

Pseudolycoriella hygida é um inseto, pertencente à família Sciaridae, utilizado como organismo modelo em estudos de biologia celular, molecular, genômica comparada e desenvolvimento (Menzel *et al*., 2024). Durante o desenvolvimento larval, as células das glândulas salivares apresentam cromossomos politênicos, nos quais são observados pufes de DNA e RNA, correspondentes a regiões de intensa atividade transcricional (Menzel *et al*., 2024). Os pufes de DNA são *loci* cromossômicos nos quais ocorre replicação adicional de DNA. A transcrição regulada no desenvolvimento dos genes amplificados leva à descompactação da cromatina e a consequente abertura dos pufes de DNA. O estudo de regiões formadoras de pufes de DNA é interessante pois permite entender como as maquinarias de transcrição e replicação atuam de modo regulado nestes *loci*. (Simon *et al*., 2016). Apesar dos avanços na caracterização dos mecanismos envolvidos nesses processos, os fatores responsáveis por sua regulação ainda não são completamente compreendidos. Uma possibilidade para ampliar a compreensão desses mecanismos é investigar a participação dos RNAs não codificantes (ncRNAs), os quais participam da regulação de diferentes processos celulares (Krude *et al*., 2015). Entre os ncRNAs, os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs) de invertebrados apresentam características estruturais semelhantes às dos Y RNAs de vertebrados, os quais são uma classe de ncRNAs envolvidos na iniciação da replicação do DNA. Os sbRNAs já foram identificados em *Bombyx mori* (Duarte Junior *et a*l., 2015) e *Drosophila melanogaster (*Duarte Junior *et al*., 2019). Um dos sbRNAs descritos em *D. melanogaster,* o Dm1, demonstrou capacidade de promover a iniciação da replicação do DNA, *in vitro,* em modelo de vertebrados (Duarte Junior *et al*., 2019). Esses resultados tornam os sbRNAs relevantes para a investigação de mecanismos relacionados à replicação, especialmente em um modelo como *Psl. hygida*. Desse modo, o presente projeto tem como objetivo identificar sbRNAs no genoma de *Psl hygida* por meio de uma abordagem exploratória comparativa, utilizando características das sequências e estruturas conservadas entre sbRNAs e Y RNAs previamente descritos (Krude *et al*., 2015).

MATERIAIS E MÉTODOS

As culturas de *Psl. hygida* foram mantidas em caixas contendo terra peneirada, sob temperatura de 22°C. As larvas foram alimentadas com erva-mate fermentada, farinha de aveia e amido de milho. Os indivíduos adultos foram coletados e macerados em cadinho com nitrogênio líquido e o RNA foi extraído com o reagente NZYol (NZYtech). Para a identificação de sbRNAs, foram utilizadas duas abordagens concomitantemente: a) extração de RNA de indivíduos adultos seguida por PCR em gradiente de temperatura com os primers dos sbRNAs Dm1 e Dm2 de *D. melanogaster* (Duarte Junior *et al*., 2019), e BmsbRNA de *B. mori* (Duarte Junior *et a*l., 2015). Os amplicons foram sequenciados e alinhados com o genoma de *Psl. hygida*. b) análise das sequências e estruturas conservadas entre sbRNAs e Y RNAs já descritos para obtenção dos parâmetros termodinâmicos. Com base nisso, foram

estabelecidos critérios objetivos de análise. Os critérios estruturais foram avaliados a partir das estruturas secundárias preditas através do pacote RNAfold do ViennaRNA, em ambiente Linux. Foram consideradas as estruturas de energia livre mínima (MFE), sem estruturas alternativas favorecidas, presença do motivo trinucleotídeo característico dessa classe de RNAs (GUG), bem como do comprimento e da posição relativa de hastes, *bulges* e *loops*. Os critérios termodinâmicos compreendem a anotação da energia livre mínima e z-score, a fim de avaliar a estabilidade e a significância da estrutura predita. As sequências e estruturas caracterizadas foram utilizadas na construção de alinhamentos múltiplos e de uma estrutura consenso, que servirá de base para a construção de modelos de covariância, os quais serão utilizados na busca e identificação de possíveis sbRNAs no genoma de *Psl. hygida*. Os candidatos serão filtrados e avaliados de acordo com os critérios previamente estabelecidos e validados através de PCR e sequenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois fragmentos, um de aproximadamente 50 nucleotídeos e outro de 252 nucleotídeos, foram amplificados com a utilização dos primers do sbRNA Dm2 de *D. melanogaster*. Apenas o fragmento maior e com 245 nucleotídeos foi identificado no genoma de *Psl. hygida*, nas coordenadas do cromossomo B:109.852.304–109.852.059. Uma sequência de 100 nucleotídeos foi identificada dentro desse fragmento, a qual possuí características de sbRNAs (Figura 1, em negrito) e contém o trinucleotídeo GTG na posição 53 a 55 (Figura 1). A estrutura 2D da sequência de 100 nucleotideos do sbRNA putativo de *Psl. hygida* foi obtida com o programa RNAfold (Figura 2). A sequência candidata a sbRNA será submetida a outras análises.

5’GTTATGCGACGCG**ACGAATATAGAGTGGCAACAATTTGCATTATTGGTAATCGTTTTC**
ATTTTCAGTGATGCATGAGGAAAATTAGATAGTTCTGTAATGTAAATCAAATTTTCCAG
CACGCCAATTTAAAAATGAGAAACAATGACGTAGCATTTTATGACGCAAATCCGTTGTGA
AGACGGGATAATGTTATTGCAATTACGAAACTAACTCATCAGGCTTGGTGAGGTTTTGG
GCGGGGGTC3’

Figura 1. Fragmento de 245 nucleotídeos detectado no genoma *Pseudolycoriella hygida*. Em vermelho, somente a sequência de 13 nucleotídeos da sequência forward e 8 nucleotideos da sequência reverso. dos primers sbRNA Dm2 de *D. melanogaster* estão presentes no genoma de *Psl. hygida*. Adicionalmente em verde, um nucleotídeo de timina foi detectado no genoma que não está na sequência do primer forward de *D. melanogaster*. Em negrito, a sequência de 100 nucleotídeos do sbRNA putativo de *Psl. hygida* e grifado o motivo GTG na posição 53 a 55.

CONCLUSÕES

A sequência e a estrutura secundária obtidas do fragmento de 100 nucleotídeos do sbRNA putativo de *Psl. hygida* permitem definir critérios objetivos para diferenciar sbRNAs verdadeiros de falsos positivos e melhorar a caracterização de sbRNAs.

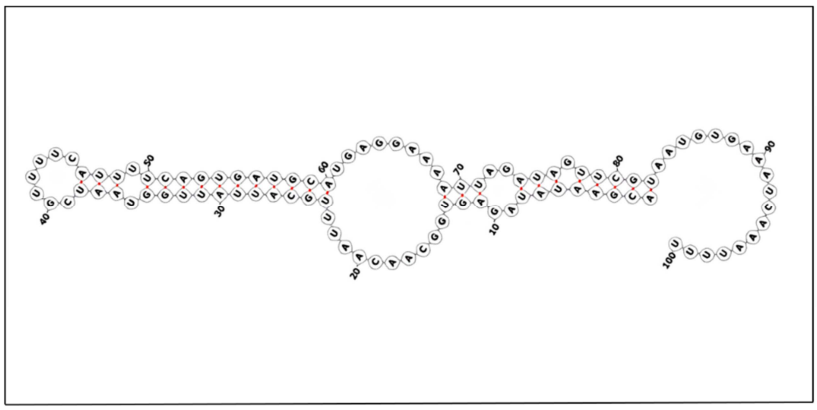


Figura 2 - Estrutura secundária de 100 nucleotídeos de ncRNA que constitui um sbRNA putativo de *Pseudolycoriella hygida.*

AGRADECIMENTOS

O CNPq apoia para o desenvolvimento desse projeto de pesquisa com recursos do Processo de Chamada Universal (406316/2025-2) e a bolsa de Iniciação Científica CNPq/Balcão (112395/2026-0). Os autores agradecem o suporte do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá, COMCAP/UEM.

REFERÊNCIAS

DUARTE JUNIOR, F. F. et al. Identification and molecular structure analysis of a new noncoding RNA, a sbRNA homolog, in the silkworm *Bombyx mori* genome. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 3, p. 801–808, 2015. https://doi: 10.1039/c4mb00595c

DUARTE JUNIOR, F. F. et al. Identification and characterization of stem-bulge RNAs in *Drosophila melanogaster*. **RNA Biology**, v. 16, n. 3, p. 330–339, 2019. https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1572439

KOWALSKI, M. P.; KRUDE, T. Functional roles of non-coding Y RNAs. *The* **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 66, p. 20–29, 2015. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.003

MENZEL, F. et al. *Pseudolycoriella hygida* (Sauaia and Alves): an overview of a model organism in genetics, with new aspects in morphology and systematics. **Insects,** v. 15, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/insects15020118.

SIMON, C. R.; SIVIERO, F.; MONESI, N. Beyond DNA puffs: what can we learn from studying sciarids? **Genesis**, v. 54, p. 361–378, 2016. DOI: https://doi.org/10.1002/dvg.22946.