

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

FRANCISCO FERREIRA DUARTE JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE UM NOVO RNA
NÃO-CODIFICANTE, HOMÓLOGO AO SBRNA, NO GENOMA DE *Bombyx mori***

Maringá
2016

FRANCISCO FERREIRA DUARTE JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE ESTRUTURAL DE UM NOVO RNA
NÃO-CODIFICANTE, HOMÓLOGO AO SBRNA, NO GENOMA DE *Bombyx mori***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração - Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Maria Aparecida Fernandez

Maringá
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

D813i Duarte Junior, Francisco Ferreira
Identificação e análise estrutural de um novo RNA não-codificante, homólogo ao sbRNA, no genoma de *Bombyx mori* / Francisco Ferreira Duarte Junior. -- Maringá, 2016.
35 f. : il. color., figs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Fernandez.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, 2016.

1. sbRNA. 2. *Bombyx mori*. 3. RNA não-codificante. 4. Y RNAs. I. Fernandez, Maria Aparecida, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular. III. Título.

CDD 21.ed.572.8633

ECSL-1202/9

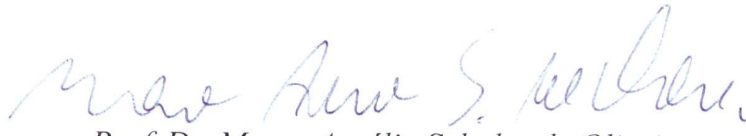
**ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
DO ALUNO FRANCISCO FERREIRA DUARTE JUNIOR**

Aos dezanove dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, sexta-feira, realizou-se na sala 201 do Bloco G-56, no campus universitário, a sessão pública de defesa da dissertação intitulada: “Identificação e análise estrutural de um novo RNA não codificante, homólogo ao sbRNA, no genoma de *Bombyx mori*”, apresentada pelo aluno **Francisco Ferreira Duarte Junior**, graduado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá, que concluiu os créditos exigidos para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas”. Os trabalhos foram instalados às 9:00h, pela Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Fernandez, Presidente da Banca Examinadora, constituído pelos seguintes professores: Dr.^a Nádia Monesi e Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira como membros. A Banca Examinadora, tendo se decidido a aceitar a dissertação, passou à arguição pública do candidato. Encerrados os trabalhos de arguição às 12:40 horas, os examinadores deram parecer final, considerando a dissertação Aprovada. Proclamado o resultado pela Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Maringá, 19 de fevereiro de 2016.


Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Fernandez


Prof.^a Dr.^a Nádia Monesi


Prof. Dr. Marco Aurélio Schuler de Oliveira

BIOGRAFIA

Francisco Ferreira Duarte Junior, filho de Francisco Ferreira Duarte e Anna Maria de Jesus, nasceu na cidade de Maringá, no Estado do Paraná, em 31 de Março de 1990. Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2013). Tem experiência na área de Biologia Celular e Bioquímica, atuando principalmente no seguinte tema: Identificação, expressão e modelagem estrutural de *non-coding* RNAs.

Dedico esta dissertação a todos que me ajudaram

mesmo com uma palavra de incentivo.

Aos meus pais, Francisco e Anna,

meus irmãos e a todos os meus amigos,

em especial ao meu amigo Leon... Que você descanse em paz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o presente da vida e a força para enfrentar cada dia.

À Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida Fernandez, minha orientadora, por sua confiança e por me dar a oportunidade de realizar esta etapa do meu sonho. Por me dar o direcionamento, conhecimento e compartilhar sua experiência comigo. A senhora é um grande exemplo de perseverança e amor à sua profissão.

Aos meus familiares, em especial à minha mãe e meu pai, meus grandes exemplos de dedicação, garra e trabalho. Obrigado por todo seu amor, apoio e compreensão, por todo investimento e dedicação para me tornarem uma pessoa melhor. Espero que tenham tanto orgulho de mim, quanto eu tenho de vocês.

A todos os meus colegas do Laboratório de Organização Funcional do Núcleo (LORF), por me auxiliarem e dedicarem uma porção de seu tempo comigo. Em especial aos meus amigos Quirino Alves de Lima Neto, Fabiana dos Santos Rando, Douglas Vinícius Bassalobre Freitas e José Renato Pattaro, que tiveram paciência para me aconselhar, disposição em me ajudar e pelo conhecimento compartilhado.

A todos os meus amigos, em especial, Denison Martins, Lucas Vieira e Ricardo Drozino, pelas conversas, camaradagem, apoio e incentivo.

Aos auxiliares de laboratório e colegas Marli Licero Schuete Silva e Valmir Peron, pelas diversas atividades que desempenham no laboratório e por sua disposição em nos ajudar na rotina laboratorial.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá.

À Fundação Araucária, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos os membros da banca examinadora, pelo tempo disponibilizado, conhecimento e conselhos, críticas e elogios.

RESUMO

Duarte Junior, F. F. **Identificação e análise estrutural de um novo RNA não-codificante, homólogo ao sbRNA, no genoma do bicho-da-seda *Bombyx mori*.** Tese (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.

A replicação do DNA é um fenômeno regulado por diversos fatores, tais como proteínas e até mesmo um grupo de RNAs especiais, dos RNAs não-codificadores de proteínas (ncRNAs). Dentre estes, estão os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs), cujo papel em *Caenorhabditis elegans* ainda não está claro, mas devido à homologia que apresentam com Y RNAs de vertebrados, é possível que tenham função semelhante, atuando no processamento de RNAs e na replicação do DNA. O bicho-da-seda (*Bombyx mori*) possui um vasto repertório de informações em mutações genéticas que influenciam seu desenvolvimento, morfologia e comportamento, sendo considerado um organismo modelo em estudos de biologia celular e molecular. Este trabalho objetivou caracterizar o primeiro gene, capaz de codificar uma molécula pertencente à classe dos sbRNAs, em *B. mori*. Para tal, utilizou-se um trecho de sequência conservada, encontrada em todos os sbRNAs de *C. elegans*, para comparar com o genoma de *B. mori*. As sequências obtidas tiveram as suas estruturas secundárias modeladas e comparadas à estrutura padrão dos sbRNAs de *C. elegans*. A partir de PCR com cDNA e sequenciamento, foi possível comprovar a expressão do gene de interesse. Para os experimentos de simulação de dinâmica molecular, foram utilizados Y5 RNAs de humano e hamster Chinês e um sbRNA de *C. elegans* como parâmetros de comparação. As análises apresentadas neste trabalho indicam a descoberta de um gene que é transcrito em um segmento de RNA equivalente aos segmentos de Y RNAs de humano e hamster e com o sbRNA de *C. elegans*. A similaridade e a dinâmica conformacional das estruturas em 3D, observadas durante as simulações de dinâmica molecular destas quatro moléculas de RNA, sugerem fortemente que o BmsbRNA atue como um sbRNA. Sendo assim, os resultados apresentados neste trabalho, sugerem fortemente indícios do primeiro sbRNA na ordem Lepidoptera e um dos primeiros em insetos.

Palavras-chave: sbRNA, *Bombyx mori*, RNA não-codificante, Y RNAs.

ABSTRACT

Duarte Junior, F. F. **Identification and molecular structure analysis of a new noncoding RNA, a sbRNA homolog, in the silkworm *Bombyx mori* genome.** Thesis (Master degree) - State University of Maringá, Maringá, 2016.

*DNA replication is a phenomenon regulated by several factors, such as proteins and even a group of special RNAs, of non-protein coding RNAs (ncRNAs). Among these, there are the stem-bulge RNAs (sbRNAs), whose role in *Caenorhabditis elegans* is still unclear. Due to their homology with vertebrate Y RNAs, it is possible that they have similar function, acting on RNA processing and replication of DNA. The silkworm (*Bombyx mori*) has a vast repertoire of information on genetic mutations that influence its development, morphology and behavior, being considered a model organism in studies of cellular and molecular biology. This work aimed to characterize the first gene, capable of encoding a molecule that belongs to the class of sbRNAs, in *B. mori*. For this, a conserved sequence, found in all sbRNAs from *C. elegans*, was used to search the *B. mori* genome. The resulting sequences had their secondary structures modeled and compared to the standard structure for *C. elegans* sbRNAs. By means of PCR with cDNA and sequencing, it was possible to prove the expression of the gene of interest. It was used Y5 human and Chinese hamster RNAs and a sbRNA of *C. elegans* as comparison parameters in the molecular dynamics simulation. The analyzes presented in this work indicate the discovery of a gene that is transcribed in an RNA segment equivalent to the human and hamster Y RNA segments and the sbRNA from *C. elegans*. The similarity and conformational dynamics of 3D structures, observed during the molecular dynamics simulations of these four RNA molecules, strongly suggest that *BmsbRNA* acts as a sbRNA molecule. Thus, the results presented in this work strongly suggest clues of the first sbRNA in *Lepidoptera* and one of the first ones in insects.*

Keywords: sbRNA, *Bombyx mori*, noncoding RNA, Y RNAs.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Material Biológico	15
3.2	Extração de RNA total e síntese de cDNA	15
3.3	Eletroforese	15
3.4	Análise <i>in silico</i> e construção dos primers	15
3.5	PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	17
3.6	Clonagem do fragmento	18
3.7	Sequenciamento de DNA	18
3.8	Dinâmica molecular (DM)	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Modelagem estrutural e expressão do novo fragmento de sbRNA	20
4.2	Dinâmica molecular (DM)	27
5.	CONCLUSÕES	30
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

Células eucarióticas possuem um genoma extenso, cuja duplicação deve ocorrer com extrema fidelidade e uma única vez, durante o período S do ciclo celular. Soma-se a isso o fato de que, em células de eucariotos, o DNA nuclear apresenta-se na forma de fibras de cromatina, formando um complexo com histonas. A ocorrência de erros durante a replicação do DNA é inerente à complexidade do processo, sendo a maior fonte de instabilidade genômica, levando ao aumento de anormalidades cromossômicas e aparecimento de distúrbios genéticos como o câncer (Alberts et al., 2011). Portanto, a atividade das origens de replicação necessita ser cuidadosamente regulada, para assegurar que o processo se inicie corretamente. Sabe-se que a replicação é regulada por diversos fatores, como proteínas e até mesmo um grupo de RNAs especiais, como os *non-coding* RNAs (ncRNAs).

Os ncRNAs, RNAs não codificadores de proteínas, têm sido descritos como reguladores em diversos processos celulares (Mohammad et al., 2007; Norseen et al., 2008; Hall et al., 2013a). Dentre estes, os *stem-bulge* RNAs (sbRNAs) foram inicialmente descobertos através da construção de uma biblioteca específica para ncRNAs de *C. elegans* (Deng et al., 2006).

A estrutura secundária de padrão característico (Fig. 1) e a ausência de sequências homólogas a outros RNAs resultou em uma nova família de ncRNAs, os sbRNAs. Embora mais de uma dúzia de sbRNAs tenha sido descrita, estes ainda não possuem uma caracterização sólida sobre sua funcionalidade (Deng et al., 2006; Aftab et al., 2008; Boria et al., 2010). Alguns autores sugerem a possibilidade de genes de sbRNA, encontrados em *C. elegans*, serem homólogos aos Y RNAs, uma classe específica de ncRNAs presente em vertebrados (Perreault et al., 2007; Boria et al., 2010).

Os Y RNAs de humanos (hY RNAs), originalmente descobertos como partículas dos conjuntos denominados ribonucleoproteínas Ro (RNPs), são formados por Y RNAs e a proteína Ro 60. As RNPs podem ser detectadas através de anticorpos presentes no soro de pacientes com doença do tecido conjuntivo (Christov et al., 2006; Krude, 2010; Köhn et al., 2013). Elas estão ligadas ao processamento, controle de qualidade e estabilidade do RNA, e também atuam em respostas celulares ao estresse em diversos organismos (Sim & Wolim, 2011; Wolin et al., 2012; Hall et al., 2013b). A RNA polimerase III transcreve os Y RNAs a partir de quatro genes distintos em humanos e dois genes em roedores, com exceção de hamster Chinês, onde foram detectados quatro genes (Perreault et al., 2007; Krude et al., 2009; Lima Neto et al., 2016). O fato de ter sido comprovada a presença de fragmentos de Y

RNAs em células, tecidos, fluídos corporais de humanos e em outros mamíferos, além de uma variedade de tumores (Christov et al., 2008; Meiri et al., 2010; Nicolas et al., 2012; Dhahbi et al., 2014a; Vojtech et al., 2014), faz com que estes ncRNAs recebam notável interesse clínico e apresentem potencial para atuarem como biomarcadores moleculares de doenças (Dhahbi et al., 2014b) e até mesmo possíveis vacinas de interferência específicas para RNAs de organismos invasores (Kowalski et al., 2015a). O licenciamento da replicação do DNA é dependente da participação dos Y RNAs (Christov et al., 2006; Gardiner et al., 2009; Krude et al., 2009), de diversas proteínas que atuam como fatores tanto na sua inibição quanto na replicação (Méndez & Stillman, 2000; Bell et al., 2002), e como proposto anteriormente, podem sofrer influências de fatores relacionados à estrutura da cromatina.

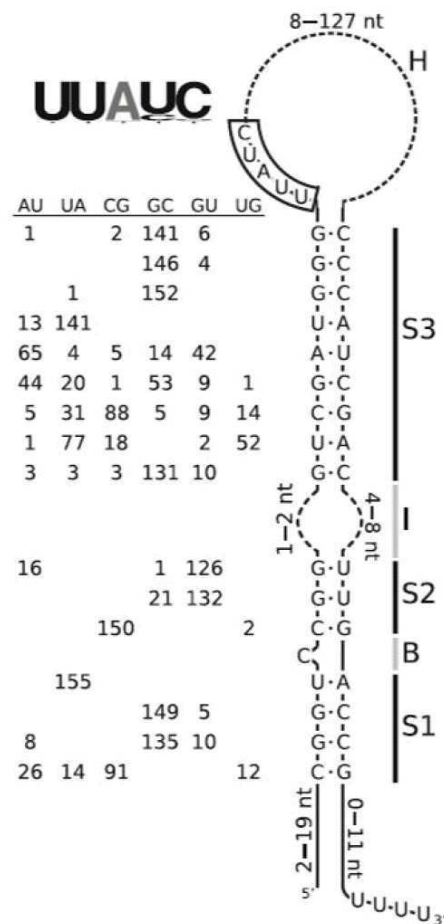


Figura 1. Modelo de estrutura secundária de sbRNA de *Caenorhabditis elegans* (original de Boria et al., 2010).

O *Bombyx mori* L., descrito por Linnaeus no ano de 1758, é popularmente conhecido como bicho-da-seda. Pertence ao reino Animalia, filo Artropoda, classe Insecta, ordem Lepidoptera, família Bombycidae e gênero *Bombyx*. Através de aspectos filogenéticos, é provável que *B. mori* tenha sua origem na China a partir de *Bombyx mandarina* Chinesa, há

cerca de 4.600 anos (Yoshitake, 1968). Este lepidóptero apresenta metamorfose completa, ou seja, passa por quatro estágios no seu ciclo de vida: ovo, larva, pupa e mariposa (Aruga, 1994). O bicho-da-seda é um inseto totalmente dependente dos seres humanos para sua reprodução e já não ocorre naturalmente em estado selvagem. Utilizado como sistema modelo em estudos de lepidópteros, o *B. mori* possui um rico repertório de informações genéticas sobre as mutações que afetam seu desenvolvimento, morfologia e comportamento (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004). Estima-se que nessa espécie ocorreram mais de quatrocentas mutações, gerando raças geneticamente aprimoradas (Holanda et al., 2004). Juntamente com as abelhas, o bicho-da-seda foi um dos únicos insetos domesticados com finalidade comercial (Kellogg, 1910). *B. mori* foi propagado e utilizado, em larga escala, para a produção de seda na China, Japão e Europa, chegando ao Brasil apenas no ano de 1740 (Inceoglu et al., 2001). Além de estudos de melhoramento genético, visando obter uma maior quantidade e melhor qualidade de seda (Zanatta et al., 2009; Pereira et al., 2013; Garay et al., 2014), *B. mori* vem sendo utilizado em diversas outras áreas de interesse científico como organismo modelo. Dentre estas podemos citar: expressão gênica (Barbosa et al., 2008; Tavares et al., 2011; Sreekumar, 2011; Ronqui et al., 2013), polimorfismo gênico (Barbosa et al., 2009; Wang et al., 2012; Bignotto et al., 2014; Fassina et al., 2014), estrutura celular (Ichikawa, 1995), estudos de infecção viral (Pereira et al., 2008; Brancalhão et al., 2009; Ribeiro et al., 2009a; 2009b; Santos et al., 2010; Dourado, 2011; Saez et al., 2014) e metabolismo do DNA (Zhang, 2012). Adicionalmente, este lepidóptero tem sido utilizado na produção de proteínas recombinantes (Tamura et al., 2000; Thomas et al., 2002; Tomita et al., 2003), utilizado como biorreator (Chen et al., 2006; Hofmann et al., 2006; Zhang et al., 2006), e como fonte na produção de materiais à base de seda (Altman et al., 2003). Quando em forma de pupa, pode ser utilizado na remoção de metais pesados presentes em águas contaminadas (Paulino et al., 2006).

A criação do *B. mori*, para a produção de seda, é uma importante atividade econômica brasileira, embora a produção de casulos seja afetada pela infecção do *Bombyx mori* *Nucleopolyhedrovirus* (Ribeiro et al., 2009a). A infecção pelo baculovírus e o envolvimento dos ncRNAs contam com a importância da replicação do DNA em ambos os sistemas (Rohrmann, 2013). A ausência de descrição sobre este tipo de sbRNA em insetos, resultou na procura por um novo ncRNA em *Bombyx mori*, uma vez que este lepidóptero é considerado um organismo modelo em estudos de biologia celular e molecular (Nagaraju, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral identificar e caracterizar o primeiro gene capaz de codificar uma molécula de RNA com sequência e estrutura secundária homólogas a sbRNAs ou Y RNAs em *B. mori*.

2.2. Objetivos específicos

- Através de ferramentas de bioinformática, detectar um possível gene para sbRNAs no genoma de *Bombyx mori*.
- Checar sua expressão utilizando RNA total de *B. mori*.
- Clonar o gene para sbRNAs.
- Testar se o produto expresso é estruturalmente estável em condições normais, utilizando métodos de análise *in silico*, tais como simulação de dinâmica molecular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Foram utilizadas larvas na quinta idade de híbridos de *Bombyx mori*, gentilmente cedidas pela empresa BRATAC de Nova Esperança, Paraná, Brasil.

3.2. Extração de RNA total e síntese da primeira fita de cDNA

O RNA total foi extraído a partir de um *pool* de tecidos larvais de *B. mori* e dosado no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo), a fim de estipular a quantidade de RNA que seria tratado com DNase I (Biolabs). Após o tratamento, a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) ocorreu utilizando a enzima M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen), juntamente com *random primers*, de acordo com as instruções do fabricante.

3.3. Eletroforese

A eletroforese foi realizada em géis de agarose com concentrações de 0,7% a 1%, utilizando tampão TBE 0,5x (Tris-HCl 40 mM; ácido bórico 45 mM; EDTA 1mM, pH 8,3). Caso as amostras fossem compostas por RNA, era feito um gel desnaturante, adicionando à receita acima, 1,2 mL de água sanitária comercial para cada 50 mL de tampão TBE 0,5x (Aranda et al., 2011). Após as migrações, os géis eram fotografados sob luz UV através do sistema de fotodocumentação UVP *Bio Imaging System*.

3.4. Análise *in silico* e construção dos primers

Um trecho de sequência conservada (GTGNNTTATC, na qual N pode variar entre qualquer base nucleotídica), encontrada em todos os sbRNAs de *Caenorhabditis elegans* (Fig.2), foi comparado ao genoma de *Bombyx mori* no banco de dados do NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio do Blastn. As sequências obtidas tiveram a sua estrutura secundária modelada utilizando o programa mfold Web Server (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) e as estruturas geradas foram comparadas à estrutura padrão dos sbRNAs de *C. elegans* (Figs. 1 e 2). Foi obtida apenas uma sequência com estrutura secundária validada, de acordo com o padrão descrito para sbRNAs

em *C. elegans* (Boria et al., 2010), a qual foi utilizada como molde para a construção de um par de primers específicos (BmsbRNA primer F, com 38 pares de base e BmsbRNA R, com 25 pares de base) utilizando o programa FAST PCR (versão 4.0.27 desenvolvida por Ruslan Kalendar). Os primers foram sintetizados pela empresa Síntese Biotecnologia. O primer BmsbRNA F foi construído juntamente com o promotor SP6 com o objetivo de utilizá-lo em experimentos futuros para expressão do sbRNA (Fig. 3).

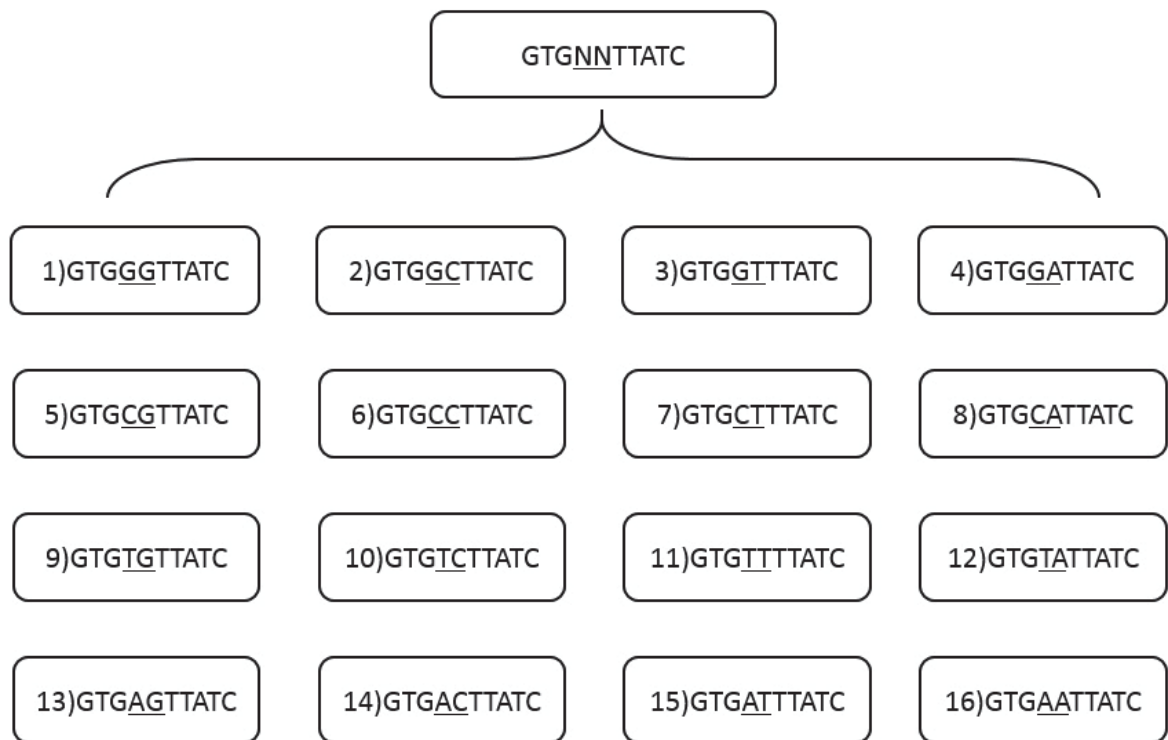


Figura 2. Sequência conservada de sbRNA, encontrada em *C. elegans* e suas possíveis variações. A letra N representa o local onde qualquer nucleotídeo pode ser empregado.

1. sbRNA de *Bombyx mori* - 57pb:

GCTTGAACGTCTCGTGGCTTATCCATATCGATGTCTTCAAAGATTCTTCTAGTTT

SP6 Promoter: 5'ATTTAGGTGACACTATAG3'

>BmsbRNA F: 38pb,

Tm=64,9°C Tm(10)=38,8°C CG%=44,7% MW=11715
PCR efficiency (quality)=105

5'-ATTTAGGTGACACTATAGGCTTGAACGTCTCGTGGCTT

>BmsbRNA R: 25pb,

Tm=50,5°C Tm(10)=25,9°C CG%=28 MW=7706
PCR efficiency (quality)=38,0

5'-AAACTAGAAGAATCTTTTGAAGAC

Length of PCR Product= 75pb

The Optimal Annealing Temperature of PCR = 53,2 - 59,2°C

Figura 3. Primers BmsbRNA construídos a partir da sequência encontrada no genoma de *B. mori* utilizando o programa FAST PCR (versão 4.0.27 desenvolvida por Ruslan Kalendar). Promotor SP6 em verde. Primer BmsbRNA F, com 38 pares de bases e suas características de anelamento em amarelo. Primer BmsbRNA R e suas características de anelamento em azul.

3.5. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

As reações foram preparadas contendo tampão de PCR 1X (Invitrogen); 0,2mM ddNTPs (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen); 0,5 µM de cada primer (BmsbRNA F e R); 100 ng de cDNA e 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) em um volume final de 20 µL. As amplificações foram realizadas no termociclador Eppendorf *Master cycler gradient* e o programa utilizado foi: temperatura inicial de desnaturação de 94°C por cinco minutos, seguida de 25 ciclos de 94°C por um minuto, temperatura de anelamento de 58°C por 30 segundos e temperatura de extensão de 72°C por um minuto, com 30 minutos de extensão final.

3.6. Clonagem do fragmento

O produto de 75 pares de base (pb) (18 pb do promotor da SP6 Polimerase + 57 pb do sbRNA), obtido por meio de PCR, foi clonado no vetor TOPO-TA (Thermo Fisher), de acordo com as especificações do fabricante. A transformação foi realizada em bactérias competentes DH5 α por meio do choque térmico (Sambrook e Russel, 2001). A extração do DNA plasmidial dos clones selecionados foi realizada pelo método do CTAB (Del Sal et al., 1989) e a presença do inserto foi confirmada por PCR utilizando o par de primers construído para a sequência obtida.

3.7. Sequenciamento de DNA

Os clones selecionados foram amplificados por PCR utilizando o par de primers M13, o produto resultante foi purificado com polietilenoglicol e sequenciado utilizando o kit DYEnamic™ ET Terminator (Amersham Biosciences) e o equipamento MegaBACE 1000 (Molecular Dynamics), de acordo com as especificações do fabricante.

3.8. Dinâmica molecular (DM)

Os pacotes de *software* VMD (Humphrey et al., 1990) e NAMD2 (Phillips et al., 2005) foram utilizados para simulações de dinâmica molecular. O equilíbrio de DM foi conduzido em etapas. Inicialmente, as estruturas 3D foram imersas em uma caixa d'água, simulando condições de ligações periódicas e contendo contra-íons de sódio suficientes para neutralizar as cargas do sistema. Em seguida, todos os sistemas foram minimizados em 20.000 passos de gradiente conjugado. Em um segundo passo, os átomos dos nucleotídeos foram fixados no espaço, então a água e os sais foram equilibrados em 60 picossegundos(ps). No terceiro passo, todos os átomos do sistema foram minimizados novamente por outros 20.000 passos. No quarto e último passo, todo o sistema foi equilibrado por 10 nanossegundos sob condições de constante pressão (1,0 atm) e temperatura (300 K) (Conjunto NPT).

As interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o algoritmo da Malha de Partículas de Ewald (*Particle-Mesh Ewald Algorithm*) com um espaço gradeado de 1,0 Å, e o raio de corte das interações de Van der Waals será configurado para 10,0 Å. O tempo de interação para as equações de movimento foi definido para 2,0 femtosegundos por passo. A

trajetória das dinâmicas foi gerada a partir de um arquivo onde as configurações do sistema foram extraídas a cada 2,0 ps durante todo o tempo de simulação.

As simulações foram analisadas a partir dos arquivos de trajetória por meio de RMSD e raio de rotação (R_{gyr}), com referência a todos os átomos de nucleotídeos comparados com a estrutura minimizada no terceiro passo.

As simulações foram realizadas em quatro nós de um SGI Altix ICE 8400 LX cluster, rodando em paralelo com dois processadores Intel 6-core 5680 3.33GHz (48 núcleos) e 36 GB RAM no CENAPAD/Unicamp, Brasil.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Modelagem estrutural e expressão do novo fragmento de sbRNA

A busca através do BLASTn, utilizando as sequências conservadas, resultou em apenas um segmento (GTGGGCTTATC), no genoma de *B. mori*, contendo uma das 16 sequências nucleotídicas esperadas (Fig. 2) que se conserva no sbRNA de *C. elegans* (gene CeN76) e nos Y RNAs de humano e hamster chinês (genes hY5 chY5 hamster, respectivamente) (Fig. 4B e C). A sequência encontrada no genoma de *B. mori* pertence a um gene de 57 pb identificado como *BmsbRNA*, que apresenta tanto sequência promotora e sequência de parada (Fig. 5), tal como descrito para outros genes (Schramm et al., 2002). O alinhamento múltiplo de sequências (Fig. 4D) apresenta os pontos de homologia, principalmente no domínio conservado.

Para gerar as estruturas 2D dos segmentos de RNA, primeiramente, um protocolo metodológico precisou ser validado. As configurações padrão do servidor MFOLD (Zuker et al., 2003) foram definidas para gerar uma representação idêntica do Y1 RNA de humano (Christov et al., 2006; Gardiner et al., 2009). Uma vez que o protocolo foi validado, todos os outros segmentos foram gerados utilizando o mesmo protocolo. As estruturas 2D de RNA, geradas a partir dos segmentos dos quatro genes apresentados, foram elaboradas usando o programa *Applet Visualization* para RNA (VARNA) (Darty et al., 2009), (Fig. 6). A sequência obtida através do genoma de *B. mori* foi comparada com o padrão descrito por Boria et al. (2010) (Fig. 7).

Os modelos 2D mostrados na Fig. 6 apresentam os seguintes valores teóricos de $\Delta G_{\text{folding}}$ em kcal mol⁻¹: -26,10 (Y5 RNA de humano), -25,10 (Y5 RNA de hamster Chines), -8,40 (*B. mori*) e -30,80 (*C. elegans*). O valor mais alto para o segmento de *B. mori* se deve pelo fato do seu tamanho diminuto (Zuker et al., 2003). A partir destes resultados, as estruturas foram geradas no formato 3D requerido para as simulações de dinâmica molecular.

A descoberta de um sbRNA promissor no genoma *B. mori* nos levou a investigar a expressão deste sbRNA nas amostras de RNA total a partir de um *pool* de tecidos larvais. Utilizando cDNA feito com random primers, foram realizadas reações de PCR utilizando os primers específicos (Fig. 8A). O produto de PCR proveniente desta amostra foi clonado no vetor TOPO-TA (Thermo Fisher). Foram selecionados dois clones (clones I e II), os quais foram utilizados para a extração do DNA plasmidial pelo método do CTAB (Del Sal et al.,

1989). As amostras de DNA plasmidial extraídas foram utilizadas como molde para amplificação por PCR com o par de primers BmRNA para a confirmação do inserto, e com o par de primers M13 (Fig. 9). Confirmada a presença do inserto, o produto de amplificação com os primers M13 foi purificado com polietilenoglicol para ser utilizado como molde para a reação de sequenciamento. Após a clonagem e sequenciamento, houve confirmação da sequência esperada (Fig. 8B), o que indica que o gene *BmsbRNA* realmente é expresso em tecidos larvais *B. mori*.

O papel dos sbRNAs em *C. elegans* ainda não está claro, mas devido à homologia que estes apresentam aos Y RNAs de vertebrados, é possível que os sbRNAs apresentem função semelhante, atuando no processamento de RNA (Stein et al., 2005) e na replicação do DNA (Christov et al., 2006; 2008) em *B. mori* e possivelmente em outros invertebrados. Em insetos, a presença dos Y RNAs é pouco provável, sendo possível formular a hipótese de que uma classe alternativa de RNAs não codificantes substitua as funções dos Y RNAs em insetos. A sequência obtida neste trabalho apresentou homologia estrutural aos sbRNAs e é uma possível candidata a obter tal classificação.

Em *C. elegans*, foram encontradas 18 sequências de sbRNA (Boria et al., 2010), e a análise computacional realizada neste trabalho resultou em apenas uma sequência válida, a qual apresenta um possível promotor e o potencial de codificar um RNA com estrutura secundária semelhante ao padrão descrito para sbRNAs. Embora a sequência possa representar um homólogo dos sbRNAs em *B. mori*, é provável que uma classe diferente de RNAs não codificantes tenha um papel funcional semelhante aos sbRNAs neste organismo, de modo a compensar a escassez deste tipo de RNA.

Para comprovar a hipótese de que tal sequência é um sbRNA, será necessário realizar um estudo funcional. Para tal, o primer BmsbRNA F foi construído com um promotor para a RNA polimerase SP6, para que o fragmento seja, posteriormente, clonado em um vetor de expressão para células eucarióticas. Com isto, será possível determinar se tal sequência é capaz de codificar um RNA que participe de processos de transcrição e/ou replicação em sistemas livres de células (*in vitro*) ou em experimentos funcionais *in vivo*, como por exemplo, transfecção de RNA de interferência contra esses ncRNAs e/ou superexpressão dos mesmos em diferentes etapas do seu ciclo de vida.

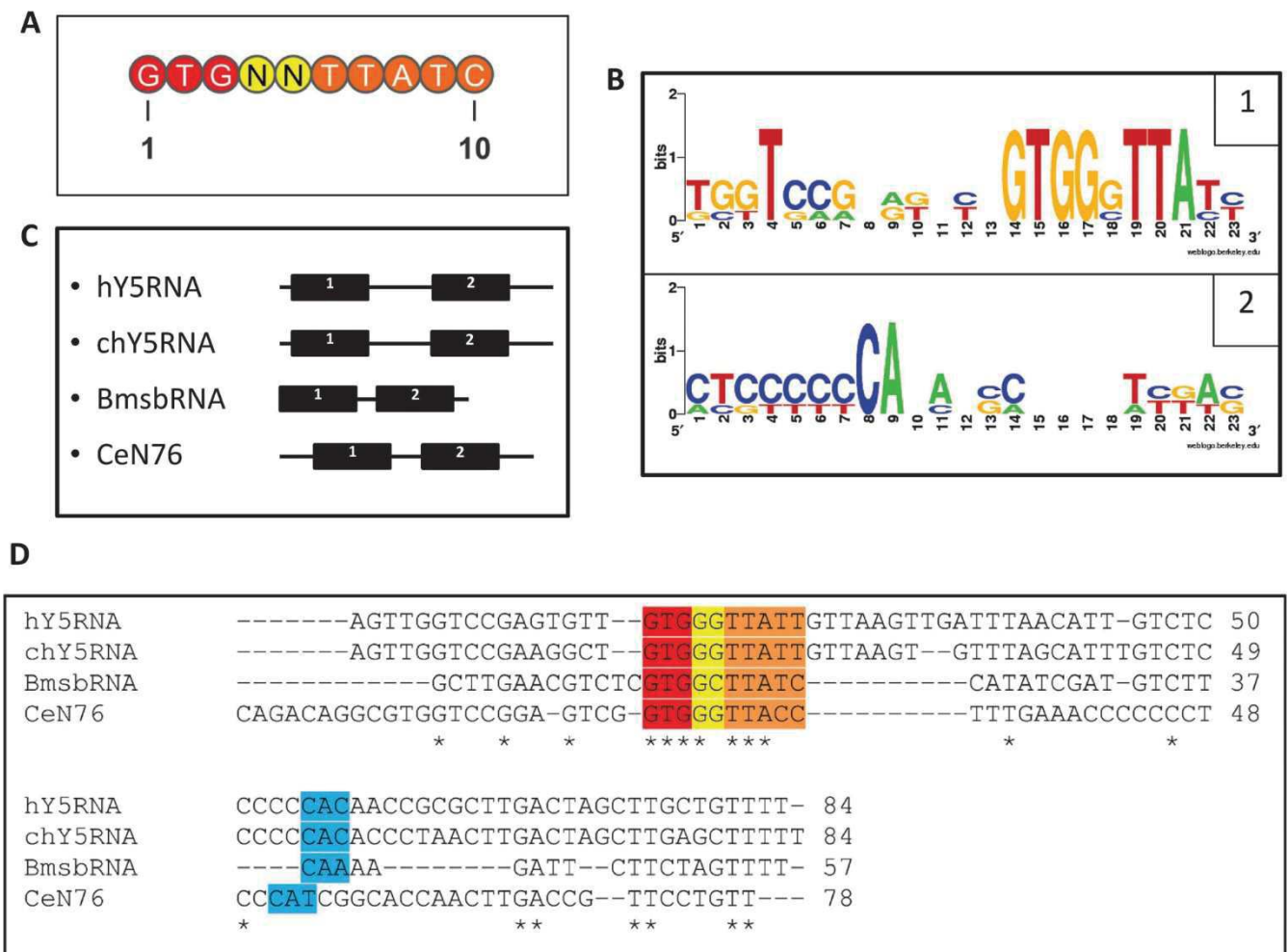


Figura 4. Busca por homologia de um novo *non-coding* RNA em *Bombyx mori*. (A) Sequência conservada encontrada em Y RNAs e sbRNAs, onde “N” pode variar entre qualquer nucleotídeo. Motivo conservado para Y RNAs (Gardiner et al., 2009) em vermelho. Região variável em amarelo. Sequência conservada para sbRNAs em laranja (Boria et al., 2006). (B) Comparação e (C) posição relativa da sequência conservada, localizada na extremidade 5’ (1) e trecho pareado da extremidade 3’ (2) entre as sequências dos genes de Y5 RNAs de humano e hamster Chinês, *BmsbRNA* e CeN76 sbRNA de *C. elegans*. (D) Alinhamento entre o Y5 RNA de humano e hamster Chinês, *BmsbRNA* e CeN76 sbRNA de *C. elegans*. As cores dos nucleotídeos são descritas em (A), juntamente com os nucleotídeos pareados da extremidade 3’, em azul.

```

> gi|185050365|dbj|AP009009.1| Bombyx mori genomic DNA,
chromosome 4, partial sequence
GAAACGATCTCACGGTTTTATGTGATGATTTTCTATTAATATCGTCTTTGTCACAATATA
ACTCATTATTTTCTAGAGGTAACATTCTGTCAGTACAGTTACTACTGT TATAAAACCGTT
TTAATTTCTTCAATACA GCTTGAACGTCTCGTGGCTTATCCATATCGATGTCTTCAAAG
ATTCTTCTAGTTTTATATTTCCCTTTATAGAAATAATCGTGAGGTACAGGAAAACCTTTAA
CTATAAAATCAGCAGCTCCGCCGTAGTTAGGTGTGGTTATTGTCTGTCGGTATGCACATT
CGAAATTGCCGGTCGAAGCATTTTTGTCAGCAGCATAATCTATCACAAC

```

Figura 5. Gene para sbRNA em *Bombyx mori* e suas sequências regulatórias. A região promotora, apresentando o TATA-box, é mostrado em azul, a sequência do gene *BmsbRNA* em amarelo, e a região de término, composta por resíduos de Timina, em verde. O promotor e o códon de parada para a RNA polimerase III de acordo com o descrito (Darty et al., 2009).

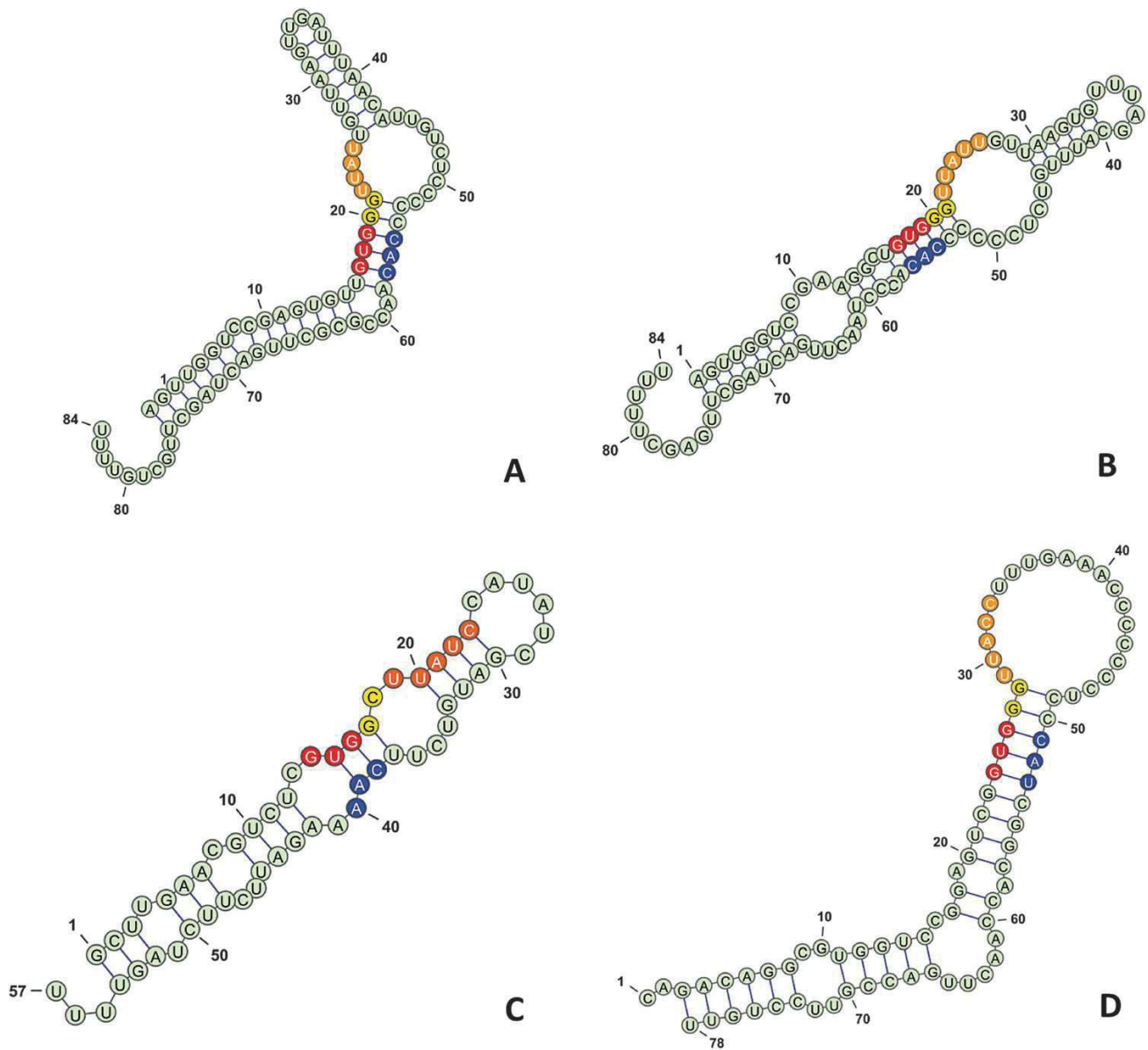


Figura 6. Estruturas 2D de ncRNAs. Y5 RNA de humano (A) e de hamster Chinês (B), sbRNA de *Bombyx mori* (C) e sbRNA de *Caenorhabditis elegans* (D), desenhados utilizando o *software* Varna (Darty et al., 2009). Motivo conservado descrito como necessário para seu envolvimento em iniciação da replicação do DNA para Y e sbRNAs em vermelho e azul, região variável em amarelo, e sequência conservada para sbRNAs em laranja.

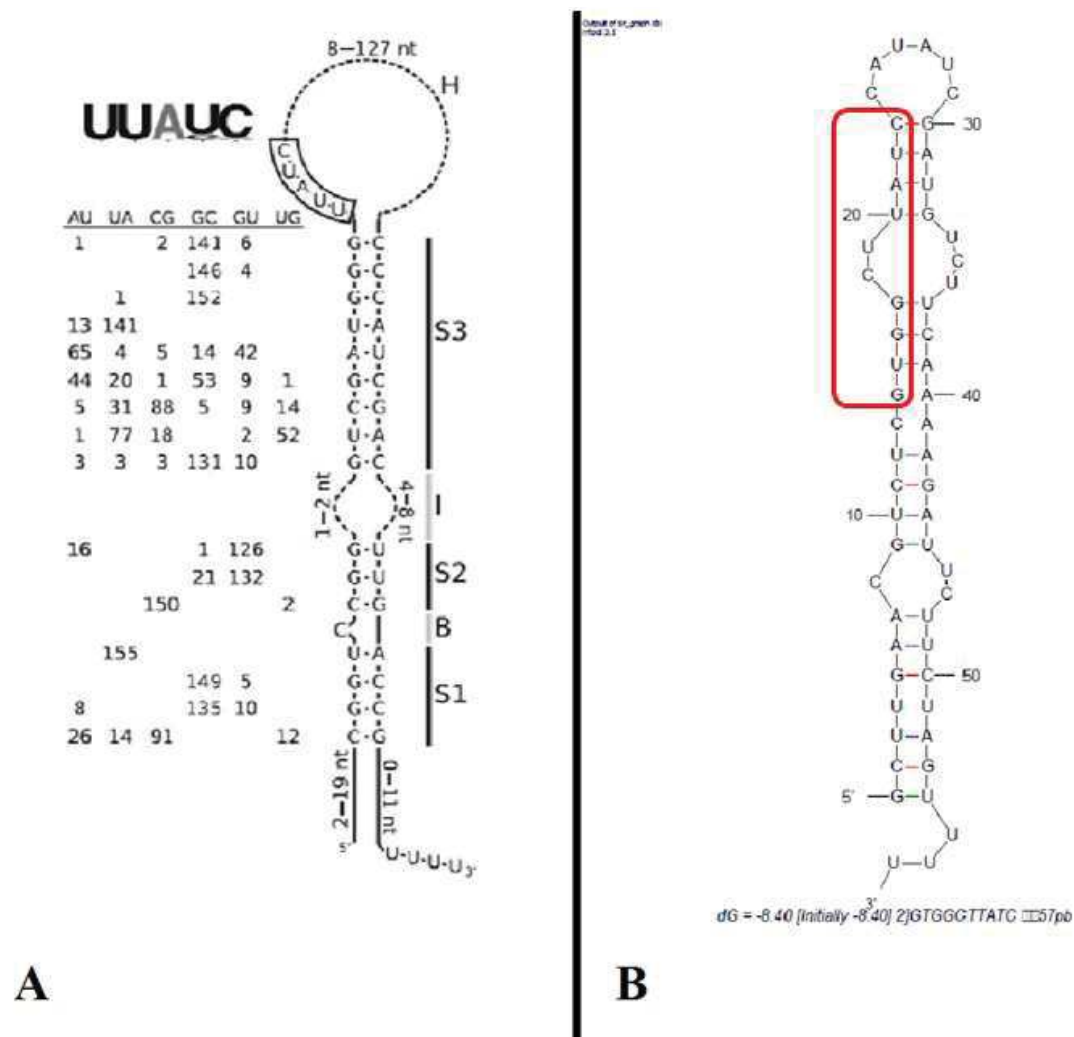


Figura 7. Comparação entre o padrão estabelecido para sbRNAs e estrutura obtida no genoma de *Bombyx mori* (A) Estrutura secundária de sbRNA de *Caenorhabditis elegans* (original de Boria et al., 2010). (B). Estrutura secundária da sequência obtida em *B. mori*, modelada a partir do programa mfold Web Server. Em vermelho, se encontra a sequência conservada (GTGGGCTTATC).

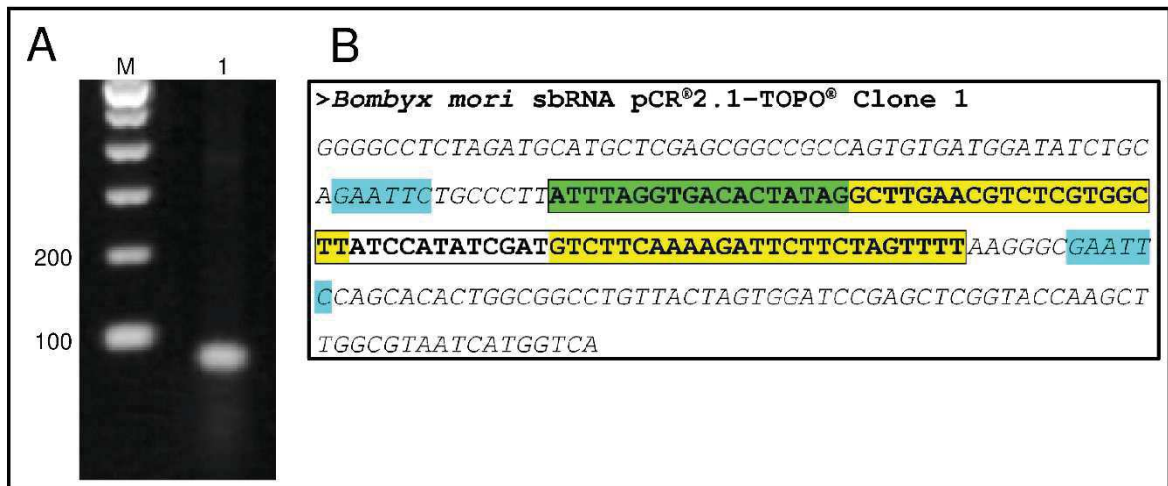


Figura 8. Análise da expressão do sbRNA de *Bombyx mori*. (A) sbRNA expresso em um *pool* de tecidos larvais, (M) 100 bp DNA Ladder (Invitrogen), (1) sbRNA de *B. mori*. (B) Sequência amplificada do sbRNA de *B. mori*, apresentada em (A). O sítio de localização da enzima de restrição *EcoRI* é mostrado em azul; Sequência do promotor SP6 em verde; E primers BmsbRNA F e R para sbRNA de *B. mori* em amarelo. A sequência do plasmídeo está em itálico e o inserto em negrito.

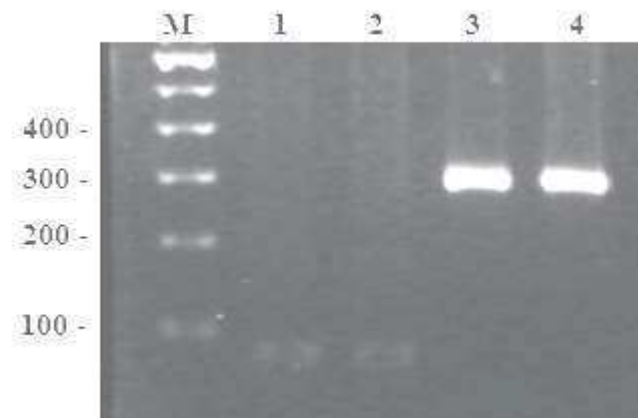


Figura 9. Identificação da clonagem do gene BmsbRNA. Gel de agarose 1,5% dos produtos das reações de amplificação por PCR a partir do DNA plasmidial de clones positivos. **1-2.** Reações de PCR utilizando o par de primers BmsbRNA. **1.** Clone I e **2.** Clone II. **3-4.** Reações de PCR utilizando os primers M13. **3.** Clone I e **4.** Clone II. **(M)** Marcador de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen).

4.2. Dinâmica molecular (DM)

Executar simulações de dinâmica molecular em segmentos de RNA não é uma prática muito comum. Uma das razões se deve ao fato da diversidade conformacional que estas moléculas apresentam, fator que é capaz de gerar aleatoriedades, complicando a interpretação dos resultados. Entretanto, uma vez que os ncRNAs utilizados neste trabalho apresentam conformações similares e padrões de formas definidos (Fig. 6), foi possível estabelecer um protocolo para simular e analisar estas moléculas.

A figura 11A mostra a raiz quadrada média da distância (RMSD), calculada para cada um dos quatro RNAs ao longo da DM, onde todas as moléculas alcançaram o ponto de equilíbrio após quatro nanossegundos de simulação. A figura 11B mostra que os segmentos de RNA exibem valores de raio de giro com flutuações significantes, durante a trajetória. Entretanto, estas flutuações foram concentradas dentro de uma média, indicando que os RNAs não desnaturaram durante a simulação. O padrão contínuo da formação de pontes de hidrogênio, ao longo da simulação, sinaliza a estabilidade dos segmentos de RNA (Fig. 12). Através da figura 11B, é possível notar que os comportamentos dos RNAs de *B. mori* e *C. elegans* foram os mais estáveis, fato este atribuído aos seus tamanhos reduzidos.

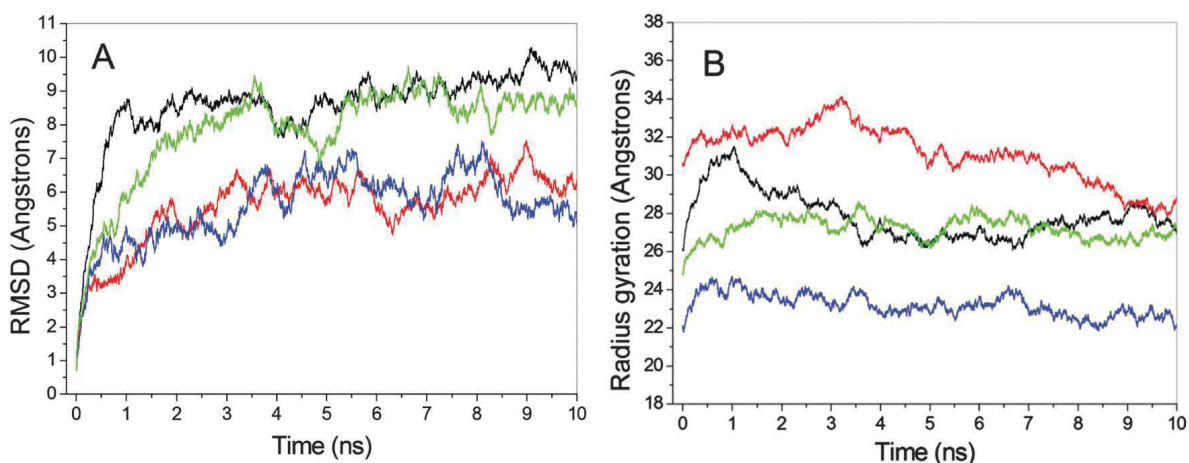


Figura 10. Comportamento dos segmentos de RNA ao longo da simulação de dinâmica molecular. As cores indicam os segmentos de RNA: **Preto:** Y5 RNA de humano. **Vermelho:** Y5 RNA de hamster Chinês. **Azul:** sbRNA de *Bombyx mori*. **Verde:** sbRNA de *C. elegans*.

A análise da flutuação da raiz quadrada média (RMSF) dos carbonos C_1' de cada nucleotídeo (Fig. 13) demonstra que as regiões contendo a sequência funcional GUG, conhecida como domínio mínimo e responsável pela funcionalidade dos Y RNAs durante o

licenciamento da replicação do DNA, foram os mais estáveis durante o período em que o sistema estava em equilíbrio (últimos dois nanosegundos). Esta estimativa foi recentemente confirmada por análise espectroscópica da desnaturação dos segmentos de Y RNAs (Wang et al., 2014).

A análise da figura 13 mostra um comportamento similar em todos os segmentos de RNA. A maior flutuação surgiu a partir dos resíduos localizados no centro de cada gráfico, sendo uma região que corresponde com o *loop* central observado nas estruturas 2D (Fig. 6). As outras regiões de alta flutuação coincidem com as regiões despareadas dos segmentos de RNA, um fato que causa um maior grau de liberdade de movimento nestas regiões ao longo da simulação.

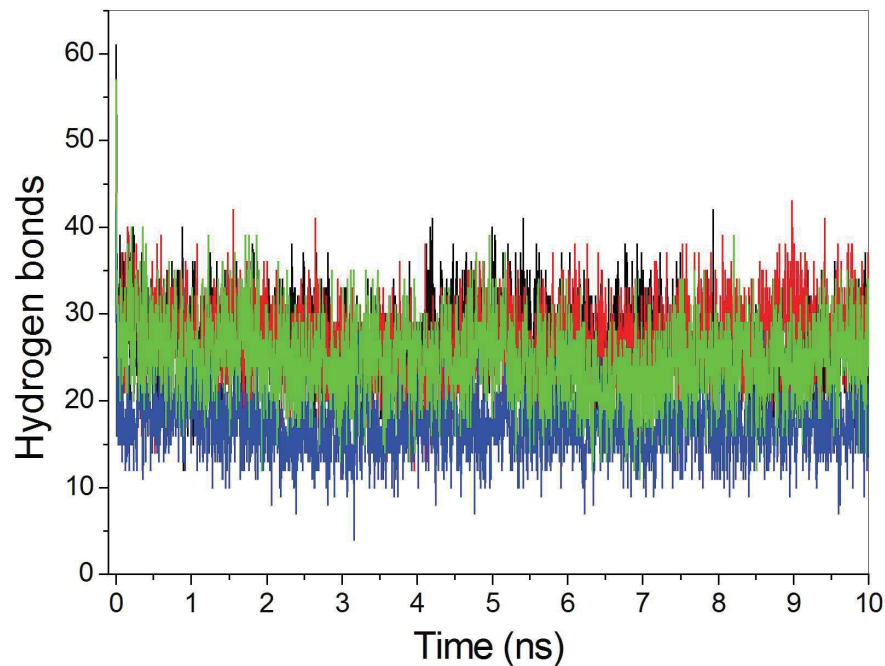


Figura 11. Número de pontes de Hidrogênio ao longo de 10 nanosegundos de simulação. As cores indicam os segmentos de RNA: **Preto:** Y5 RNA de humano. **Vermelho:** Y5 RNA de hamster Chinês. **Azul:** sbRNA de *Bombyx mori*. **Verde:** sbRNA de *C. elegans*. O padrão contínuo da formação de pontes de hidrogênio, ao longo da simulação, sinaliza a estabilidade destas moléculas.

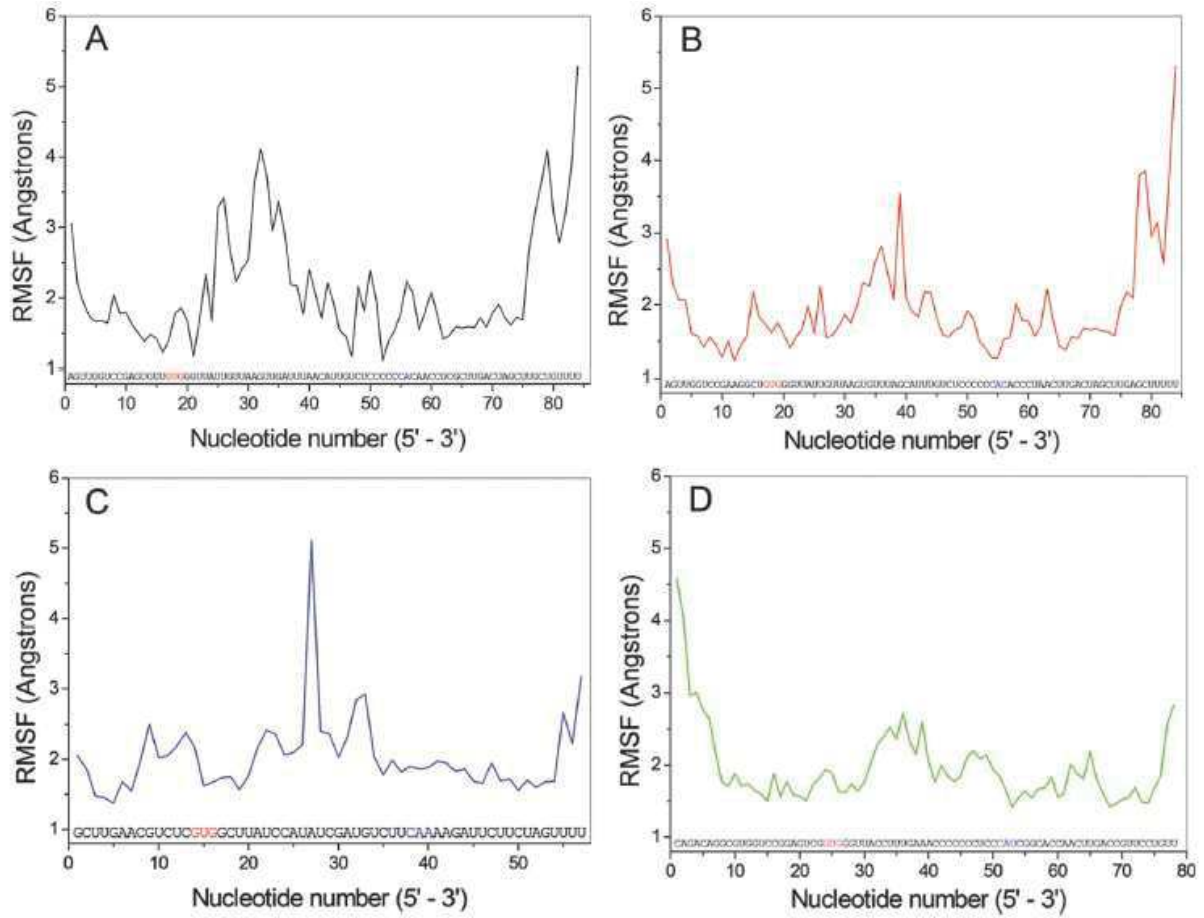


Figura 12. RMSF do movimento do Carbono C₁' avaliado de cada nucleotídeo. Cada gráfico representa os diferentes segmentos de RNA de cada espécie. **(A)** Y5 RNA de humano. **(B)** Y5 RNA de hamster Chinês. **(C)** sbRNA de *Bombyx mori*. **(D)** sbRNA de *C. elegans*.

5. CONCLUSÕES

Segmentos de DNA altamente conservados, dos genes codificantes do Y5 RNA de humano e Y5 RNA de hamster Chinês, juntamente com o gene codificante do sbRNA em *C. elegans*, foram utilizados na procura por genes homólogos em *B. mori*, sugerindo que o gene *BmsbRNA* pode ser um possível sbRNA ou Y RNA.

A similaridade das estruturas em 3D e do comportamento observado durante as simulações de dinâmica molecular, destas quatro moléculas de RNA, sugerem fortemente que o *BmsbRNA* pode atuar como um sbRNA. A caracterização funcional e o papel metabólico deste novo ncRNA serão alvos de estudos posteriores. Sendo assim, os resultados apresentados neste trabalho, sugerem fortes indícios do primeiro sbRNA na ordem Lepidoptera e um dos primeiros em insetos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFTAB, M. N., HE, H., SKOGERBO, G., CHEN, R., Microarray analysis of ncRNA expression patterns in *Caenorhabditis elegans* after RNAi against snoRNA associated proteins, *Bmc Genomics*, 2008, **9**.
- ALBERTS, B., BRAY, D., HOPKIN, K., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., *Fundamentos da Biologia Celular.*, Editora Artmed, Porto Alegre – RS, **3**, 2011, pp 843.
- ALTMAN, G. H., DIAZ, F., JAKUBA, C., CALABRO, T., HORAN, R. L., CHEN, J., LU, H., RICHMOND, J., KAPLAN, D. L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 2003, **24**, 401-416.
- ARANDA, P. S., LAJOIE, D. M., JORCYK, C. L., Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality, *Electrophoresis*, 2012, **33**, 366-369.
- ARUGA, H., Silkworm and its Strains, In: Principles of Sericulture, *CRC Press*, 1994, 97-111.
- BARBOSA, J. F., BRAVO, J. P., TAKEDA, K. I., ZANATTA, D. B., SILVA, J. L. C., BALANI, V. A., FIORINI, A., FERNANDEZ, M. A., Intrinsic bent DNA colocalizes with the sequence involved in the Nd-sD mutation in the *Bombyx mori* fibroin light chain gene, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (Cessou em 2007. Cont. ISSN 1976-6696 BMB Reports (Print))., 2008, **41**, 394 – 399.
- BARBOSA, J. F., BRAVO, J. P., ZANATTA, D. B., SILVA, J. L. C., FERNANDEZ, M. A., Allelic variability in the third intron of the fibroin light chain gene in *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *Genetics and Molecular Research (Online)*, 2009, **8**, 197 - 206.
- BELL, S. P., DUTTA, A., DNA Replication in Eukaryotic Cells, *Annual Review of Biochemistry*, 2002, **71**, 333–374.
- BIGNOTTO, T. S., MUNHOZ, R. E. F., PEREIRA, N. C., BESPALHUK, R., SAEZ, C. R. N., FASSINA, V. A., FERNANDEZ, M. A., Allelic Variability in the Intronic Region of the Fibroin Heavy-Chain Gene in *Silkworm Bombyx mori* L. Strains of Brazilian Germplasm Bank, *Neotropical Entomology (Impresso)*, 2014, **43**, 252 - 259.
- BORIA, I., GRUBER, A. R., TANZER, A., BERNHART, S. H., LORENZ, R., MUELLER, M. M., HOFACKER, I. L., STADLER, P. F., Nematode sbRNAs: homologs of vertebrate Y RNAs, *Journal of Molecular Evolution*, 2010, **70**, 346-358.
- BRANCALHÃO, R. M. C., TORQUATO, E. F. B., FERNANDEZ, M. A., Cytopathology of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) silk gland caused by multiple nucleopolyhedrovirus, *Genetics and Molecular Research.*, 2009, **8**, 162 - 172.
- CHEN, J., WU, X. F., ZHANG, Y. Z., Expression, purification and characterization of human GM-CSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor, *Journal of Biotechnology*, 2006, **123**, (2):236-247.
- CHRISTOV, C. P., GARDINER, T. J., SZUTS, D., KRUDE, T., Functional requirement of noncoding Y RNAs for human chromosomal DNA replication, *Molecular and Cellular Biology*, 2006, **26**, 6993-7004.
- CHRISTOV, C.P., TRIVIER, E., KRUDE, T., Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation, *British Journal of Cancer*, 2008, **98**, 981-988.
- DARTY, K., DENISE, A., PONTY, Y., VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure, *Bioinformatics*, 2009, **25**, 1974–1975.
- DEL SAL, G., MANFIOLETTI, G., SCHNEIDER, C., The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing, *Biotechniques*, 1989, **7**, 514-520.

DENG, W., ZHU, X. P., SKOGERBO, G., ZHAO, Y., FU, Z., WANG, Y.D., HE, H.S., CAI, L., SUN, H., LIU, C. N., LI, B., BAI, B. Y., WANG, J., JIA, D., SUN, S. W., HE, H., CUI, Y., WANG, Y., BU, D. B., CHEN, R. S., Organization of the *Caenorhabditis elegans* small non-coding transcriptome: Genomic features, biogenesis, and expression, *Genome Research*, 2006, **16**, 20-29.

DHAHBI, J. M., Circulating small noncoding RNAs as biomarkers of aging, *Ageing Research Reviews*, 2014b, **17**, 86–98.

DHAHBI, J. M., SPINDLER, S. R., ATAMNA, H., BOFFELLI, D., MARTIN, D. I., Deep Sequencing of Serum Small RNAs Identifies Patterns of 5' tRNA Half and YRNA Fragment Expression Associated with Breast Cancer, *Biomarkers in Cancer*, 2014a, **6**, 37–47.

DOURADO, L. A., RIBEIRO, L. F. C., BRANCALHAO, R. M. C., TAVARES, J., BORGES, A. R., FERNANDEZ, M. A., *Genetics And Molecular Research*, 2011, **10**, (1):335-339.

FASSINA, V. A., BIGNOTTO, T. S., MUNHOZ, R. E. F., FULAN, B., BRAVO, J. P., GARAY, L. B., BESPALHUK, R., SAEZ, C. R. N., PEREIRA, N. C., FERNANDEZ, M. A., Low Genetic Polymorphism at the Cytochrome C Oxidase I in Silkworm Strains of the Brazilian Germplasm Bank, *Open Journal of Genetics.*, 2014, **04**, 202 - 209.

GARAY, L. B., NEMBRI, A., ORO, A. L., FASSINA, V. A., SAEZ, C. R. N., CHIARELLO, A. S., PEREIRA, N. C., PESSINI, G. M., MUNHOZ, R. E. F., FERNANDEZ, M. A., New Technique to Produce Large Amount of Flat Silk by Biospinning, *Agricultural Sciences.*, 2014, **05**, 1483 - 1490.

GARDINER, T. J., CHRISTOV, C. P., LANGLEY, A. R., KRUDE, T., A conserved motif of vertebrate Y RNAs essential for chromosomal DNA replication, *Rna*, 2009, **15**, 1375-85.

HALL, A. E., DALMAY, T., Discovery of novel small RNAs in the quest to unravel genome complexity, *Biochemical Society Transactions*, 2013a, **41**, 866–870.

HALL, A. E., TURNBULL, C., DALMAY, T., Y RNAs: recent developments, *Biomolecular Concepts*, 2013b, **4**, 103–110.

HOFMANN, S., FOO, C.T., ROSSETTI, F., TEXTOR, M., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., KAPLAN, D.L., MERKLE, H.P., MEINEL, L., Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery, *Journal of Controlled Release*, 2006, **111**, (1-2):219-227.

HOLANDA, P. R. H., MATA, S. F., LIMA, A. G. B., Propriedades físicas e secagem de casulos do bicho-da-seda em leito fixo: uma investigação teórica e experimental. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 2004, **2**, 101-114.

HUMPHREY, W., DALKE, A., SCHULTEN, K., VMD: visual molecular dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14**, 33-38, 27-28.

ICHIKAWA, T., HASEGAWA, K., SHIMIZU, I., KATSUNO, K., KATAOKA, H., SUZUKI, A., Structure of Neurosecretory Cells with Immunoreactive Diapause Hormone and Pheromone Biosynthesis Activating Neuropeptide in the Silkworm, *Bombyx mori*, *Zoological Science*, 1995, **12**, (6):703-712.

INCEOGLU, A. B., KAMITA, S. G., HINTON, A. C., HUANG, QIHONG., SEVERSON, T. F., KANG, KYUNG-DON., HAMMOCK, B. D., Recombinant baculoviruses for insect control, *Pest Management Science*, 2001, **57**, (10):981-987.

J. SAMBROOK, D. W. RUSSELL, in *The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2006, pp 800.

KELLOGG, V., Insect Breeding, *Journal of Heredity*, 1910, **1**, 133-135.

KÖHN, M. , PAZAITIS, N., HÜTTELMAIER, S., Why YRNAs? About Versatile RNAs and Their Functions, *Biomolecules*, 2013, **3**, 143-156.

- KOWALSKI, M. P., KRUDE, T., Functional roles of non-coding Y RNAs, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2015a, **66**, 20–29.
- KRUDE, T., CHRISTOV, C. P., HYRIEN, O., MARHEINEKE, K., Y RNA functions at the initiation step of mammalian chromosomal DNA replication, *Journal of Cell Science*, 2009, **122**, 2836–2845.
- KRUDE, T., Non-coding RNAs: New Players in the Field of Eukaryotic DNA Replication, *Subcellular Biochemistry*, 2010, **50**, 105–118.
- LIMA NETO, Q. A., DUARTE JUNIOR, F. F., BUENO, P. S. A., SEIXAS, F. A. V., KOWALSKI, M. P., KHEIR, E., KRUDE, T., FERNANDEZ, M. A., Structural and functional analysis of four non-coding Y RNAs from Chinese hamster cells: identification, molecular dynamics simulations and DNA replication initiation assays, *BMC Molecular Biology*, 2016, **17**, 1–9.
- MEIRI, E., LEVY, A., BENJAMIN, H., BEN-DAVID, M., COHEN, L., DOV, A., DROMI, N., ELYAKIM, E., YERUSHALMI, N., ZION, O., LITHWICK-YANAI, G., SITBON, E., Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid tumors, *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**, 6234–6246.
- MÉNDEZ, J., STILLMAN, B., Chromatin Association of Human Origin Recognition Complex, Cdc6, and Minichromosome Maintenance Proteins during the Cell Cycle: Assembly of Prereplication Complexes in Late Mitosis, *Molecular And Cellular Biology*, 2000, **20**, 8602–8612.
- MITA, K., KASAHARA, M., SASAKI, S., NAGAYASU, Y., YAMADA, T., KANAMORI, H., NAMIKI, N., KITAGAWA, M., YAMASHITA, H., YASUKOCHI, Y., ODUKA, K. K., YAMAMOTO, K., AJIMURA, M., RAVIKUMAR, G., SHIMOMURA, M., NAGAMURA, Y., SHIN-I, T., ABE, H., SHIMADA, T., MORISHITA, S., SASAKI, T., The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*, *DNA Research*, 2004, **11**, 27–35.
- MOHAMMAD, M. M., DONTI, T. R., YAKISICH, J. S., SMITH, A. G., KAPLER, G. M., *Tetrahymena* ORC contains a ribosomal RNA fragment that participates in rDNA origin recognition, *Embo Journal*, 2007, **26**, 5048–5060.
- NAGARAJU, J., Recent advances in molecular genetics of the silk moth, *Bombyx mori*, *Current Science*, 2000, **78**, 151–161.
- NICOLAS, F.E., HALL, A.E., CSORBA, T., TURNBULL, C., DALMAY, T., Biogenesis of Y RNA-derived small RNAs is independent of the microRNA pathway, *FEBS Letters*, 2012, **586**, 1226–1230.
- NORSEEN, J., THOMAE, A., SRIDHARAN, V., AIYAR, A., SCHEPERS, A., LIEBERMAN, P. M., RNA-dependent recruitment of the origin recognition complex, *Embo Journal*, 2008, **27**, 3024–3035.
- PAULINO, A. T., MINASSE, F. A., GUILHERME, M. R., REIS, A. V., MUNIZ, E. C., NAZAKI, J., Novel adsorbent based on silkworm chrysalides for removal of heavy metals from wastewaters, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2006, **301**, 479–487.
- PEREIRA, E. P., CONTE, H., RIBEIRO, L. F. C., ZANATTA, D. B., BRAVO, J. P., FERNANDEZ, M. A., BRANCALHÃO, R. M. C., Cytopathological process by *multiple nucleopolyhedrovirus* in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae), *Journal of Invertebrate Pathology*, 2008, **99**, 1 – 7.
- PEREIRA, N. C., MUNHOZ, R. E. F., BIGNOTTO, T. S., BESPALHUK, R., GARAY, L. B., SAEZ, C. R. N., FASSINA, V. A., NEMBRI, A., FERNANDEZ, M. A., Biological and molecular characterization of silkworm strains from the Brazilian germplasm bank of *Bombyx mori*, *Genetics and Molecular Research*, 2013, **12**, 2138 – 2147.
- PERREAULT, J., PERREAULT, J. P., BOIRE, G., Ro-associated Y RNAs in metazoans: evolution and diversification, *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**, 1678–89.

- PHILLIPS, J. C., BRAUN, R., WANG, W., GUMBART, J., TAJKHORSHID, E., VILLA, E., CHIPOT, C., SKEEL, R. D., KALE, L., SCHULTEN, K., Scalable molecular dynamics with NAMD, *Journal of Computational Chemistry*, 2005, **26**, 1781-1802.
- RIBEIRO, L. F. C., BRANCALHÃO, R. M. C., TORQUATO, E. F. B., FERNANDEZ, M. A., Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to *Nucleopolyhedrovirus*, multiple subgroup, BmMNPV, *Journal of Invertebrate Pathology (Print)*, 2009a, **100**, 195 – 198.
- RIBEIRO, L. F. C., ZANATTA, D. B., BRAVO, J. P., BRANCALHÃO, R. M. C., FERNANDEZ, M. A., Molecular markers in commercial *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) hybrids susceptible to multiple *nucleopolyhedrovirus*, *Genetics and Molecular Research*, 2009b, **8**, 144 - 153.
- ROHRMANN, G. F., *Baculovirus Molecular Biology: Third Edition* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/> (acesso em Outubro de 2015).
- RONQUI, L., FERNANDEZ, M. A., TAKASUSUKI, M. C. C. R., Genetic Analysis of Izoenzymes Polymorphisms in Silkworm (*Bombyx mori* L.) Strains, *Biological Sciences (Impresso)*, 2013, **35**, 249 - 254.
- SAEZ, C. R. N., PEREIRA, N. C., MUNHOZ, R. E. F., BIGNOTTO, T. S., FASSINA, V. A., PESSINI, G. M., GARAY, L. B., RIBEIRO, L. F. C., BRANCALHÃO, R. M. C., FERNANDEZ, M. A., Detection of Contamination and Analysis of Vertical Transmission of BmNPV in Eggs and Moths of *Bombyx mori*, *Open Journal of Genetics*, 2014, **04**, 370 – 377.
- SANTOS, S. A., SILVA, J. L. C., BALANI, V. A., SEIXAS, F. A. V., FERNANDEZ, M. A., Conserved baculoviral ORFs 10 and 14 from *Bombyx mori* multiple *nucleopolyhedrovirus*, *Genetics and Molecular Research*, 2010, **9**, 457 - 470.
- SCHRAMM, L., HERNANDEZ, N., Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters, *Genes & Development*, 2002, **16**, 2593-2620.
- SIM, S., WOLIN, S.L., Emerging roles for the Ro 60-kDa autoantigen in noncoding RNA metabolism, *Rev. RNA*, 2011, **2**, 686–699.
- SREEKUMAR, S., ASHWATH, S. K., SLATHIA, M., KUMAR, S. N., QADRI, S. M. H., Detection of a single nucleotide polymorphism (SNP) DNA marker linked to cocoon traits in the mulberry silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae), *European Journal of Entomology*, 2011, **108**, (3):347-354.
- STEIN, A. J., FUCHS, G., FU, C. M., WOLIN, S. L. AND REINISCH, K. M., Structural insights into RNA quality control: the Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity, *Cell*, 2005, **121**, 529–539.
- TAMURA, T., THIBERT, C., ROYER, C., KANDA, T., ABRAHAM, E., KAMBA, M., KOMOTO, N., J. L. THOMAS, B. MAUCHAMP, G. CHAVANCY, P. SHIRK, M. FRASER, J. C. PRUDHOMME, P. COUBLE, T. TOSHIKI, T. CHANTAL, R. CORINNE, K. TOSHIO, A. EAPPEN, K. MARI, K. NATUO, T. JEAN-LUC, M. BERNARD, C. GERARD, S. PAUL, F. MALCOLM, P. JEAN-CLAUDE, C. PIERRE, Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector, *Nature Biotechnology*, 2000, **18**, 81-84.
- TAVARES, J., BRAVO, J. P., GIMENES, F., LIMA NETO, Q. A., FIORINI, A., FERNANDEZ, M. A., Differential structure of the intronic promoter of the *Bombyx mori* A 3 actin gene correlated with silkworm sensitivity/resistance to *nucleopolyhedrovirus*, *Genetics and Molecular Research*, 2011, **10**, 471 - 481.
- THOMAS, J. L., DA ROCHA, M., BESSE, A., MAUCHAMP, B., CHAVANCY, G., Electroporation, an alternative to biolistics for transfection of *Bombyx mori* embryos and larval tissues, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, **32**, 247–253.
- TOMITA, M., MUNETSUNA, H., SATO, T., ADACHI, T., HINO, R., HAYASHI, M., SHIMIZU, K., NAKAMURA, N., TAMURA, T., YOSHIKATO, K., Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons, *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 52–56.

- VOJTECH, L., WOO, S., HUGHES, S., LEVY, C., BALLWEBER, L., SAUTERAUD, R.P., STROBL, J., WESTERBERG, K., GOTTARDO, R., TEWARI, M., HLADIK, F., Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions, *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**, 7290–7304.
- WANG, I., KOWALSKI, M. P., LANGLEY, A. R., RODRIGUEZ, R., BALASUBRAMANIAN, S., SANG-TE, D., HSUAND, D. AND KRUEDE, T., Nucleotide Contributions to the Structural Integrity and DNA Replication Initiation Activity of Noncoding Y RNA, *Biochemistry*, 2014, **53**, 5848–5863.
- WANG, W., GAO, J., WANG, J., Cloning, expression and enzymatic properties analysis of dihydrofolate reductase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, *Molecular Biology Reports*, 2012, **39**, (12)10285-10291.
- WOLIN, S.L., SIM, S., CHEN, X., Nuclear noncoding RNA surveillance: is the end in sight?, *Trends in Genetics*, 2012, **28**, 306–313.
- XIA, Q., ZOU, Z., LU, C., CHENG, D., DAI, F., LI, B., ZHAO, P., ZHA, X., CHENG, T., CHAI, C., PAN, G., XU, J., LIU, C., LIN, Y., QIAN, J., HOU, Y., WU, Z., LI, G., PAN, M., LI, C., SHEN, Y., LAN, X., YUAN, L., LI, T., XU, H., YANG, G., WAN, Y., ZHU, Y., YU, M., SHEN, W., WU, D., XIANG, Z., A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*), *Science*, 2004, **36**, 1937-1940.
- ZANATTA, D. B., BRAVO, J. P., BARBOSA, J. F., MUNHOZ, R. E. F., FERNANDEZ, M. A., Evaluation of economically important traits from sixteen parental strains of the silkworm *Bombyx mori* L (Lepidoptera: Bombycidae), *Neotropical Entomology (Impresso)*, 2009, **38**, 327 - 331.
- ZHANG, Y., CHEN, J., LV, Z., NIE, Z., ZHANG, X., WU, X., Can 29 kDa rhGM-CSF expressed by Silkworm pupae bioreactor bring into effect as active cytokine through orally administration?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, **28**, (3):212-223.
- ZHANG, Y., ZHAO, P., LIU, H., The synthesis, transportation and degradation of BmLP3 and BmLP7, two highly homologous *Bombyx mori* 30K proteins, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, **42**, (11):827-834.
- ZUKER, M., Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Research*, 2003, **31**, 3406-3415.