

RNAI EM INSETOS: DESAFIOS NA UTILIZAÇÃO EM CONTROLE DE PRAGAS

GUSTAVO DE LIMA SANTANA¹; JULIANA WEGNER², BRUNO FREITAS FARIAS³,
JISSELA MORAYMA GAIBOR GAROFALO⁴, DANIEL ESTIVEN QUIROGA MURCIA⁵;
MOISES JOÃO ZOTTI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gut.santana2022@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juliana.wegner1@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bruno.f.far@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – jissegody@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – quirogaedaniel@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – moises.zotti@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O termo RNA de interferência, ou RNAi, descreve uma sequência de processos biológicos que utilizam a maquinaria celular conservada para silenciar a expressão de genes (AGRAWAL et al., 2003). A revelação do RNAi representou uma revolução para diversas áreas da ciência. Este mecanismo intracelular tem a capacidade de controlar a expressão de genes em uma variedade de organismos, incluindo insetos. (FIRE & MELLO, 1998), sendo assim, conquistando um importante uso na área da entomologia molecular.

A principal aplicação do RNAi no contexto de sua utilização em insetos é o controle de pragas agrícolas, além de permitir uma exploração mais eficaz do comportamento e da ecologia desses insetos (BAUM & ROBERTS, 2014). Embora a tecnologia assegure especificidade (BACHMAN et al., 2013), existe a preocupação de que as atuais estruturas de avaliação de risco para culturas geneticamente modificadas não sejam adequadas para aferir proativamente os riscos para organismos não-alvo (ROMEIS et al., 2008). Os riscos associados ao RNAi para organismos não-alvo incluem estimulação imunológica (LU & LISTON, 2009), saturação da maquinaria de RNAi de um organismo que pode interferir nos processos celulares normais (FLENNIKEN & ANDINO, 2013) e silenciamento gênico não intencional.

Portanto, o objetivo deste trabalho é destacar o RNAi como um mecanismo em relação ao seu uso em artrópodes da classe Insecta, respaldado por referências bibliográficas e evidências encontradas na internet que demonstram sua eficácia.

2. METODOLOGIA

A metodologia utilizada para conduzir este estudo foi, em sua maioria, fundamentada em uma revisão bibliográfica ampla e abrangente, na qual uma extensa pesquisa de literatura foi conduzida minuciosamente para obter informações relevantes e embasar as análises realizadas neste trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método de ação do RNAi inicia-se com a introdução das moléculas de RNAi no organismo-alvo por meio de várias estratégias, como ingestão, administração epidérmica ou outras abordagens eficazes (BAUM & ROBERTS, 2014). Uma vez dentro das células do inseto, essas moléculas de RNA interferência passam por um

processo de transformação pela enzima chamada Dicer, resultando em fragmentos menores, geralmente compostos por cerca de 21 a 23 nucleotídeos, conhecidos como pequenos RNAs de interferência (ou siRNAs em inglês). Posteriormente, esses fragmentos de siRNAs se associam a um complexo denominado RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA, traduzido para o português), o qual desempenha o papel de reconhecer alvos específicos. O complexo RISC é orientado pelos fragmentos de siRNAs para localizar moléculas de mRNA (RNA mensageiro) que contenham sequências complementares aos siRNAs. Quando essas moléculas-alvo são identificadas, os siRNAs promovem a clivagem, um processo que envolve a quebra ou corte do mRNA em segmentos mais curtos, com o propósito de degradá-lo. Isso resulta na interrupção da tradução do mRNA em proteína, levando assim ao silenciamento do gene-alvo (FIRE & MELLO, 1998).

Neste contexto, surge uma perspectiva fascinante representada pela técnica de RNAi. O potencial desta abordagem reside na sua capacidade inata de operar, nomeadamente, na degradação subsequente do RNA mensageiro alvo complementar após a introdução de uma dsRNA (double-stranded RNA - RNA fita-dupla) específica na célula (AGRAWAL et al., 2003). Portanto, ao fornecermos dsRNA destinada a qualquer transcrição genética endógena ao organismo praga desejado, podemos suprimir a expressão desse gene a nível pós-transcricional. Dessa forma, por meio da escolha criteriosa de um gene alvo essencial, esse mecanismo pode levar à mortalidade dos insetos. A natureza precisa da sequência e a capacidade teórica de atingir qualquer gene "letal" não conservado fazem do RNAi um candidato ideal para ser explorado ainda mais como um inseticida extremamente específico para uma determinada espécie (VOGEL et al, 2019).

É importante destacar que, apesar de o RNAi ser considerado uma ferramenta específica para atingir genes-alvo com grande precisão (KERSCHEN et al., 2004), pesquisas revelaram a possibilidade de afetar genes não-alvo, o que pode ser arriscado, principalmente quando se utiliza o RNAi como forma de pesticida, pois há o risco de afetar organismos benéficos em determinados ambientes agrícolas (VOGEL et al., 2018). O silenciamento não intencional de genes em organismos não-alvo é o principal risco representado por RNAi; dentro de uma espécie não-alvo, este silenciamento de gene não intencional pode ser devido ao silenciamento do gene pretendido em um organismo não intencional (ligação não-alvo) ou silenciamento de um gene diferente com similaridade de sequência suficiente com o dsRNA (ligação fora do alvo) (FIFRA-SAP, 2014).

Adicionalmente, assim como os insetos podem desenvolver resistência a pesticidas químicos, também existe a possibilidade de adquirirem resistência às moléculas de RNAi. Esse fenômeno ocorre devido a mutações que impedem que o RNA de interferência se ligue de forma eficaz às sequências-alvo, tornando-os incapazes de cumprir sua função (ZHANG, 2020).

Outro desafio enfrentado no uso dessa tecnologia para o controle de pragas agrícolas, é em virtude da degradação do RNAi quando este é ingerido (por meio da alimentação). Alguns insetos possuem enzimas que metabolizam rapidamente o RNAi, tornando o processo ineficaz. Além disso, alguns insetos têm a capacidade de excretar o RNAi (ZHANG et al., 2020). Esses fatores contribuem para a resistência das pragas contra o RNAi, tornando-o um desafio significativo para sua aplicação sustentável no controle de pragas agrícolas (BACHMAN et al., 2013). Para enfrentar esse desafio, é necessário implementar estratégias de manejo de resistência, como a rotação de diferentes moléculas de RNAi (BAUM & ROBERTS, 2014).

Atualmente, as análises bioinformáticas que comparam RNAs de pesticidas com genomas não-alvo, tem auxiliado na avaliação de risco mais extensos para prever alguns riscos (HEINEMANN et al., 2013). O perigo para organismos não-alvo deve ser

previsível se o genoma funcional de um organismo não-alvo for conhecido, reconhecendo que inúmeras circunstâncias influenciam o silenciamento do gene, mesmo quando a sequência é idêntica entre um pequeno RNA e o genoma não-alvo (KERSCHEN et al., 2004). As análises bioinformáticas têm sido, portanto, preconizadas como uma verificação inicial dos riscos potenciais apresentados pelo RNAi (ROBERTS et al., 2015). Devido a isso, as pesquisas estão direcionadas em busca de métodos mais eficazes para a aplicação em larga escala do RNAi na agricultura, levando em consideração o tipo de praga que está sendo tratada (BAUM & ROBERTS, 2014).

4. CONCLUSÕES

Essas descobertas tiveram um impacto profundo em nossa compreensão da regulação da expressão gênica e forneceram uma ferramenta poderosa para conduzir pesquisas sobre a função dos genes. Em síntese, a utilização do RNAi em insetos revela-se altamente promissora, sobretudo em contextos de controle de pragas agrícolas. Este método se destaca por sua abordagem conservacionista, uma vez que não recorre a produtos químicos em seu mecanismo de ação. Entretanto, é essencial reconhecer que ele enfrenta desafios que precisam ser superados para garantir sua eficácia no campo. Entre essas complicações, destacam-se: a possibilidade de variações na eficiência da aplicação em cultivos, devido à degradação das moléculas de RNAi no ambiente; a capacidade dos insetos de metabolizar o RNAi; a necessidade de assegurar que o método não prejudique os insetos benéficos para a cultura em questão; além da análise do processo de aplicação em grande escala.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, N., DASARADHI, P.V.N., MOHMED, A., MALHOTRA, P., BHATNAGAR, R.K., MUKHERJEE, S.K. RNA interference: Biology, mechanism, and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** Vol. 67: 657–685. 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14665679/>

BACHMAN, P.M., BOLOGNESI, R., MOAR, W.J., MUELLER, G.M., PARADISE, M.S., RAMASESHADRI, P., TAN, J., UFFMAN, J.P., WARREN, J., WIGGINS, B.E., LEVINE, S.L. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). **Transgenic Res.** 1207-1222. 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3835954/>

BAUM, J. A., & ROBERTS, J. K.; Progress towards RNAi-mediated insect pest management. **Advances in Insect Physiology**, Amsterdã v.47, p.249-295, 2014.

FIFRA-SAP. RNAi technology: program formulation for human health and ecological risk assessment. **FIFRA Scientific Advisory Panel Minutes** No. 2014-2. 2014. Disponível em: <https://www.thecre.com/premium/wp-content/uploads/2012/04/RNAi-White-Paper.pdf>

FIRE, A., & MELLO, C.; RNA interference: double-stranded RNA directs the ATPdependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. **Nature**, Inglaterra v101, n1, p. 25-33, 1998

FLENNIKEN, M.L., ANDINO, R. Non-Specific dsRNA-Mediated Antiviral Response in the Honey Bee. **PLoS ONE**. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077263>

HEINEMANN, J.A., AGAPITO-TENFEN, S.Z., CARMAN, J.A. A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. **Environment International**. Vol.55:43–55. 2013. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.envint.2013.02.010>.

KERSCHEN, A., NAPOLI, C.A., JORGENSEN, R.A., MÜLLER, A.E. Effectiveness of RNA interference in transgenic plants. **FEBS Letters**. Vol.566:223–228. 2004. Disponível em: <http://doi:10.1016/j.febslet.2004.04.043>.

LU, L.F., LISTON, A. MicroRNA in the immune system, microRNA as an immune system. **Immunology**. 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19538248/>

ROBERTS, A.F., DEVOS, Y., LEMGO, G.N.Y., ZHOU, X. Biosafety research for non-target organism risk assessment of RNAi-based GE plants. **Frontiers in Plant Science**. Vol. 6 Article 958. 2015.

ROMEIS, JÖRG. Non-target arthropod risk assessment of insect-resistant GM crops.. **IOBC/WPRS Bulletin**. Vol. 33. 149-155. 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/272503035_Non_target_arthropod_risk_assessment_of_insect-resistant_GM_crops

VOGEL, E. et al. RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. **Frontiers in physiology**, v. 9, n. January, p. 1912, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>

VOGEL, E., SANTOS, D., MINGELS, L., VERDONCKT, T.W., BROECK, J.V. RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests. **Front Physiol**. 2019 Jan 11;9:1912. doi: 10.3389/fphys.2018.01912. PMID: 30687124; PMCID: PMC6336832.

ZHANG K., WEI J., HUFF HARTZ K.E., LYDY M.J., MOON T.S., SANDER M., PARKER K.M. Analysis of RNA Interference (RNAi) Biopesticides: Double-Stranded RNA (dsRNA) Extraction from Agricultural Soils and Quantification by RT-qPCR. **Environ Sci Technol**. 2020 Apr 21;54(8):4893-4902. doi: 10.1021/acs.est.9b07781. Epub 2020 Apr 9. PMID: 32212649.