

CLONAGEM *IN SILICO* DO GENE α COP DE *EUSCHISTUS HEROS*: DESENVOLVIMENTO DE DSRNA PARA ESTUDO DE SILENCIAMENTO GÊNICO

YURE RODRIGUES NUNES¹; HUGO CARLOS BOLZON GONZALEZ²; AVILA
FERREIRA DE SOUSA³ MOISES JOÃO ZOTTI⁴

¹Nome da Instituição do Autor – ynr.agro@gmail.com

²Nome da Instituição do Autor – avilaferreira128@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – hugocarlos.bg@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – moises.zotti@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Euschistus heros, conhecido como percevejo neotropical, é um inseto da família Pentatomidae que passa por cinco estágios ninfais, com a duração de cada um influenciada pela temperatura. O ciclo de vida dura cerca de 34 dias a 24 °C, diminuindo em temperaturas mais altas, como 29,2 °C (VILLAS BÔAS; PANIZZI, 1980). O controle de *E. heros* é feito principalmente com inseticidas, mas já foi observada resistência a vários grupos, incluindo organofosforados e piretróides (BAUM et al., 2007). O silenciamento gênico mediado por RNA interferente (RNAi) é um mecanismo biológico que regula a expressão gênica, utilizando pequenas moléculas de RNA para inibir a tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) específicos (ZHANG et al., 2022). Isso ocorre quando essas pequenas moléculas se ligam aos mRNAs correspondentes, impedindo sua tradução em proteínas. Dado que esse é um mecanismo natural das células na defesa contra a replicação de vírus, é usado como tecnologia de silenciamento gênico e controle de processos celulares. Essa técnica tem sido adaptada para desenvolver soluções que visam diretamente genes essenciais em insetos pragas, proporcionando um método mais preciso e sustentável de controle (BAUM et al., 2007). Ao invés de afetar uma ampla gama de organismos, como muitos pesticidas tradicionais, os compostos baseados em RNAi podem ser projetados para atingir apenas as pragas alvo, garantindo assim uma especificidade alta. Isso reduz o impacto sobre insetos benéficos, polinizadores, decompositores e outras espécies não-alvo, promovendo um ecossistema mais equilibrado. Além disso, a diminuição do uso de produtos químicos agressivos pode contribuir para a saúde do solo e da água, além de reduzir a resistência das pragas aos pesticidas.

Os dsRNAs são uma categoria de RNAi que consiste em duas cadeias de RNA unidas por pares de bases. Quando os dsRNA são introduzidos em uma célula, ele é reconhecido e processado por enzimas do complexo Dicer, que os cortam em pequenos fragmentos chamados siRNAs (small interfering RNAs) (PINTO et al., 2011). Esses siRNAs se ligam a um complexo chamado RISC (RNA-induced silencing complex), que utiliza o RNA de fita dupla como guia para identificar e degradar mRNA complementar.

Nesse sentido, escolheu-se o gene alpha COP como referência para a produção de dsRNA considerando que este refere-se a uma subunidade extremamente importante de uma proteína que faz parte do complexo Coatomer, envolvido no transporte vesicular dentro das células e que é responsável pela retrotração de vesículas do aparelho de Golgi para o retículo endoplasmático

participando também de processos de secreção e manutenção da homeostase celular. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de desenhar iniciadores específicos do gene alpha COP com regiões de restrição passíveis de clonagem do fragmento gerado em vetor L4440.

2. METODOLOGIA

Foi identificada a sequência nucleotídica do gene Alpha COP no repositório de banco de dados genômicos National Center for Biotechnology Information (NCBI), número de acesso: XP_967472.1. Os iniciadores específicos para a sequência identificada foram desenhados através do programa Benchling, Inc. - Benchling® de modo que os amplicons tivessem em torno de 500 a 550 pares de base aproximadamente. A temperatura de melting (T_m) foi mantida entre 51-56°C e o conteúdo de GC de 50-55% (Tabela 1). A fim de possibilitar a clonagem posterior dos insertos no vetor de produção de dsRNA L4440, foram adicionadas às extremidades dos iniciadores as sequências nucleotídicas Over Hang reconhecidas pelas enzimas de restrição, compatíveis com o sítio de múltipla clonagem: MCS, do inglês “multiple cloning site” presente no vetor L4440, sendo elas KpnI (GGTACC) e SacI (GAGCTC) para os iniciadores Forward e Reverse respectivamente. Para garantir a estabilidade da enzima polimerase na fita de DNA foi adicionadas sequências nucleotídicas confirmadas nas extremidades 5' da porção Overhang dos iniciadores, no sítio de restrição da enzima de restrição KpnI foi adicionado o cap (GG) e para SacI o cap (C). Por fim, foi realizada uma clonagem *in silico* seguida de um digestão virtual (Figura 5) para avaliar a compatibilidade dos iniciadores com desenhados, avaliando assim a capacidade dos insertos produzidos de serem corretamente inseridos no MCS do vetor.

Tabela 1. Iniciadores obtidos

Gene	Iniciador	T° m	% CG	N° pb	OH	Sequência	Amplicon
Alpha COP	F	55,6	50	20	GGGGT ACC	CTGACGCTGT TGCAAGCAT	508 pb*
	R	53,3	47,37	19	cGAGC TC	CTTACCACTC CCACGCATT	

*pb = pares de base.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A temperatura de anelamento, ou temperatura melting (T_m) dos iniciadores foi de ~56 °C (Tabela 1), sendo essa a estimativa da estabilidade da hibridização do DNA a DNA, e sendo também o valor crítico na determinação da temperatura de anelamento. Dado que, uma T_m muito elevada (acima de 55 °C) produzirá hibridação insuficiente do iniciador resultando num baixo rendimento do produto de PCR. Entretanto, se a T_m for muito baixa (abaixo de 52°C) pode possivelmente levar a produtos não específicos causados por um elevado número de incompatibilidades de pares de bases.

Pode-se observar que a medida da espontaneidade da reação dos iniciadores obtidos mantiveram a estabilidade do grampo representada pelo valor

de ΔG obtido, ou seja, é a energia necessária para quebrar a estrutura secundária no caso da formação de uma (Figura 1, 2, 3 e 4).

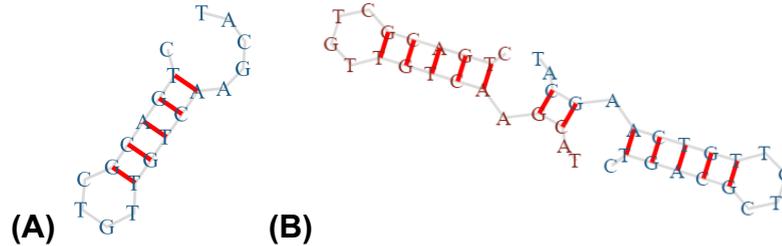


Figura 1: Avaliação de formação de estruturas secundárias do iniciador forward do alvo α COP. (A) formação de autodímero e (B) formação de dímero cruzado. Fonte: Yure Rodrigues Nunes, 2024.

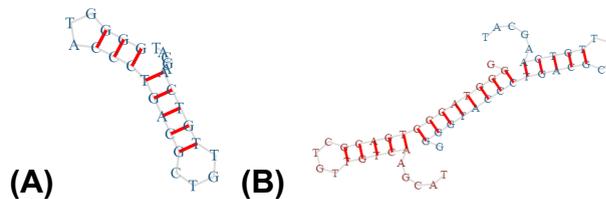


Figura 2: Avaliação de formação de estruturas secundárias do iniciador forward do alvo com Overhang α COP. (A) formação de autodímero e (B) formação de dímero cruzado. Fonte: Yure Rodrigues Nunes, 2024.

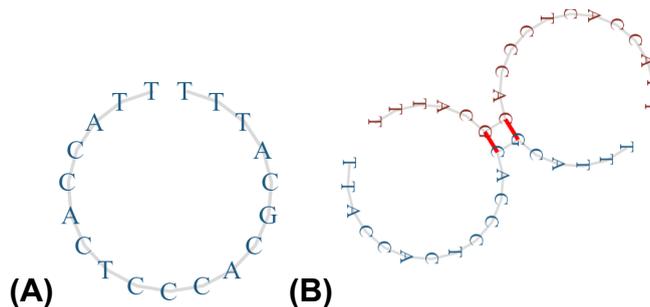


Figura 3: Avaliação de formação de estruturas secundárias do iniciador reverse do alvo α COP. (A) formação de autodímero e (B) formação de dímero cruzado. Fonte: Yure Rodrigues Nunes, 2024.

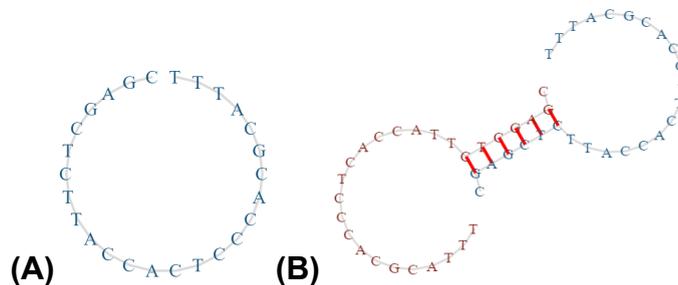


Figura 4: Avaliação de formação de estruturas secundárias do iniciador reverse com Overhang do alvo α COP. (A) formação de autodímero e (B) formação de dímero cruzado. Fonte: Yure Rodrigues Nunes, 2024.

Utilizando dos iniciadores descritos acima, foi possível simular in silico a extração do inserto de interesse, a digestão enzimática e a montagem do vetor L4440 clonado, comprovando a correta construção dos iniciadores com as respectivas enzimas de restrição, compatíveis com o vetor de destino, resultando em uma clonagem bem sucedida. O vetor clonado está representado na Figura 5.

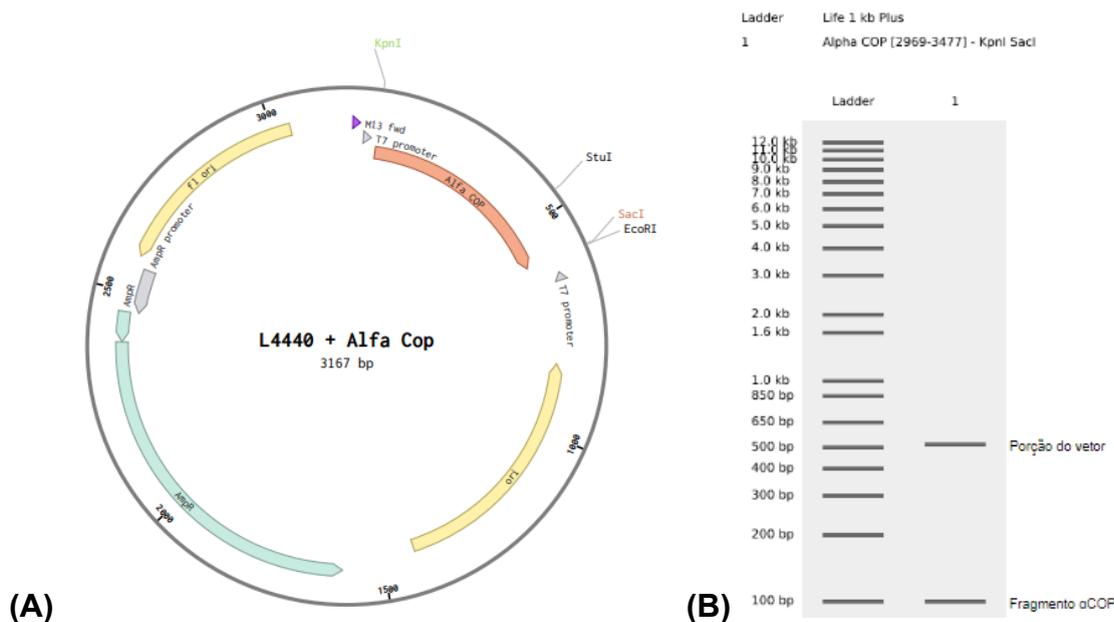


Figura 5: (A) Ilustração representando o vetor L4440 clonado com o inserto correspondente ao gene α COP. (B) Ilustração do bandejamento em gel de eletroforese dos produtos de PCR gerados após a amplificação.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu realizar a clonagem *in silico* do vetor de produção de dsRNA por círculo rolante (L4440) utilizando o promotor T7 induzido por IPTG com um fragmento da sequência do gene alpha COP de *Euschistus heros*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUM JA, BOGAERT T, CLINTON W, HECK GR, FELDMANN P, ILAGAN O, ROBERTS J (2007) Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* 25(11):1322–1326.

DUAN, S., WANG, G. **Inducible Expression of dsRNA in *Escherichia coli***. In: Cheng, X., Wu, G. (eds) *Double-Stranded RNA. Methods in Molecular Biology*, vol 2771. Humana, New York, NY. (2024). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3702-9_9.

PITINO M, COLEMAN AD, MAFFEI ME, RIDOUT CJ, HOGENHOUT SA (2011) Silencing of aphid genes by dsRNA feeding from plants. *PLoS One* 6(10):e25709.

VILLAS BÔAS, G. L., & PANIZZI, A. R. *Biologia de Euschistus heros* (Fabricius, 1798) em soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Anais Da Sociedade Entomológica Do Brasil*, 9(1), 105–113. (1980). <https://doi.org/10.37486/0301-8059.v9i1.210>.

ZHANG, X., FAN, Z., WANG, Q., KONG, X., LIU, F., FANG, J., ZHANG, S., & ZHANG, Z. **RNAi Efficiency through dsRNA Injection Is Enhanced by Knockdown of dsRNA Nucleases in the Fall Webworm, *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae)**. *International Journal of Molecular Sciences* 2022. (2022). Vol. 23, Page 6182, 23(11), 6182. <https://doi.org/10.3390/IJMS23116182>