

RNAi COMO FERRAMENTA NO CONTROLE DE PRAGAS

Diana Stefani Everling¹; Vilson José Gabriel²; Larissa Botezini³; Milena Borges dos S. Moreira⁴

Palavras-chave: Biotecnologia. Interferência. Especificidade.

INTRODUÇÃO

A área da pesquisa agrícola leva sempre em consideração a produção de alimentos, no qual seja suficiente para fornecer toda a demanda que a população exige. Na área da fitossanidade de planta, a melhor solução além do controle químico, é trabalhar com melhoramento genético no que se refere à resistência genética. No contexto de proteção de plantas, a descoberta científica do mecanismo RNA de interferência (RNAi) foi uma das mais importantes dos últimos 20 anos. Essa tecnologia destaca-se como uma ferramenta versátil e eficiente com potencial aplicação no manejo fitossanitário das lavouras, e na supressão de genes envolvidos em mecanismos de resistência. (ZOTTI, 2017).

O RNAi é um mecanismo que ocorre naturalmente dentro das células de organismos eucariotas, em que controla a expressão de genes e também a defesa contra as infecções causadas por vírus. Quando um gene é ativado ele é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) e em seguida é transportado do núcleo para o citoplasma e traduzido em proteína, a célula realiza o controle da expressão de seus genes desligando ou reduzindo a expressão no qual é realizada através do mecanismo de RNAi levando o gene ao silêncio (ANDRADE, 2018).

O silenciamento gênico é pós-transcricional (*post transcription gene silencing*, PTGS) por atuar sobre o RNA mensageiro (mRNA), em outras palavras possibilita “desligar” a função de genes em qualquer organismo vivo. Para que o processo ocorra pequenas RNAs de fita dupla (*double stranded RNA*, dsRNAs) fazem o reconhecimento de uma sequência de mRNA-alvo (messenger RNA) e desagregam ou reprimem genes específicos. Quando o dsRNA é absorvido pelas raízes das plantas, o mecanismo de silenciamento permite que este acione o RNAi sistêmico e silencie o gene alvo em toda a planta (COLEMAN *et al.*, 2014).

Com o RNAi controlando a expressão de genomas virais torna-se significativo o desenvolvimento de pesquisas voltados à demonstrar o poder da tecnologia que confere a resistência de plantas a diversas pragas e patógenos de forma específica.

¹ Acadêmica do Curso de Agronomia, Centro Universitário FAI, Itapiranga/SC. Email: diana.everling01@gmail.com

² Engenheiro Agrônomo, Mestre em Agronomia. Professor do Curso de Agronomia, Centro Universitário FAI, Itapiranga/SC. Email: vilsongabriel@yahoo.com.br

³ Acadêmica do Curso de Agronomia, Centro Universitário FAI, Itapiranga/SC. Email: laribotezini@hotmail.com

⁴ Acadêmica do Curso de Agronomia, Centro Universitário FAI, Itapiranga/SC. Email:

borges_milena2013@hotmail.com

uceff.edu.br

Centro Universitário FAI • |49| 3678.8700

Rua Carlos Kummer, 100

Bairro Universitário

Itapiranga - SC • 89896-000

Centro Politécnico • |49| 3319.3800

Av. Irineu Bornhausen, 2045 E

Bairro Quedas do Palmital

Chapecó - SC • 89814-650

Unidade Central • |49| 3319.3838

Rua Lauro Müller - 767 E

Bairro Santa Maria

Chapecó - SC • 89812-214

DESCOBERTA DO MECANISMO RNAi

A interferência de RNA foi catalogado pela primeira vez em petúnias na década de 1990. Pesquisadores buscavam produzir flores com cores muito intensas, mas para isso ocorrer precisavam aumentar a expressão da enzima chalcona-sintase (CHS), que é responsável pela coloração. Contudo, o resultado obtido foi petúnias de coloração branca, o que não fazia sentido. Assim observaram que ao aumentar a expressão da enzima CHS, o RNA formava fitas duplas, levando as células da planta reconhece-lo como genes virais, deste modo silenciando-o. Determinaram que ocorria uma resposta auto-imune com o bloqueio por excesso, em que o próprio corpo ataca suas células, achando que são agentes patológicos. Mas neste caso seria algo como uma resposta auto-molecular. O fenômeno foi observado em outras espécies de organismo, contudo o silenciamento gênico ainda era desconhecido. Foi só em 2006 que os pesquisadores norte-americanos Andrew Z. Fire e Craig C. Mello, trabalhando com nematoides, elucidaram o fenômeno do silenciamento gênico por RNAi ganhando o Nobel (de Medicina ou Fisiologia). Atualmente a técnica é usada por praticamente todas as linhas de pesquisa como forma de inativar genes (SUGIMOTO, 2017).

MECANISMO

A interferência mediada por RNA é um mecanismo natural de defesa em plantas, animais e fungos, contra a invasão de patógenos. O processo de interferência causada pelo RNA é desencadeada no citoplasma da célula pela presença de moléculas ativadoras de RNA fita dupla (*double stranded* RNAs ou dsRNAs), que pode estar expressa ou ser inserida na célula, culminando na degradação sequência-específica de RNAs homólogos (com a mesma origem dos dsRNAs ativadores). As moléculas ativadoras, dsRNAs longos, são processadas pela enzima ribonuclease III, chamada Dicer, resultando em dsRNAs menores, com 20 a 24 nucleotídeos, sendo denominadas de pequenos RNAs de interferência (*small interfering* RNAs ou siRNAs). uma das fitas do siRNA é removida e a fita que permanece (chamada de fita guia) é incorporada a um complexo proteico conhecido como RISC (*RNA-induced silencing complex* ou complexo de silenciamento induzido por RNA). Incorporado ao RISC, apenas uma das fitas siRNA fica intacta, sendo a sequência complementar reconhecida e degradada impedindo a tradução de RNAs mensageiros em proteína ou degradando genomas de RNA virais (RÊGO, 2016).

O mecanismo RNAi garante alta especificidade, pois em teoria, qualquer mRNA de uma célula pode ser degradado de forma específica via RNAi. Após ser ativado na célula, um sinal é “transmitido” para as outras células fazendo o mecanismo ter caráter sistêmico.

APLICAÇÃO DA TECNOLOGIA RNAi NA AGRICULTURA

A aplicação da tecnologia de RNAi na agricultura tem como alvo o controle de pragas, tanto diretamente com o efeito do RNAi sobre a praga, como indiretamente com o efeito do RNAi sendo sobre o hospedeiro. O controle de pragas de forma direta está voltado ao controle de insetos-praga, fungo ou planta daninha, enquanto o controle de pragas de forma indireta tem enfoque no controle de vírus, neste último caso o dsRNA funciona como uma vacina, ativando o RNAi na célula hospedeira para degradar o genoma viral. Ao usar o RNAi no controle de pragas (Figura 1) é necessário ter a informação genômica, sequência de genes, utilizada para selecionar os genes alvos potenciais. Com ensaios em laboratório se determina a sequência de dsRNA a ser utilizado. O emprego da tecnologia devem ser através de gerações de plantas que produzam o dsRNA via transgenia ou moléculas do dsRNA para aplicação direta via pulverização (ANDRADE, 2018).

Figura 1 - Funcionamento da técnica no inseto alvo.



Fonte: Souza e Garcia (2018).

SILENCIAMENTO GÊNICO PARA CONTROLE DE PRAGAS

O direcionamento da maquinaria de RNAi para trabalhar ao nosso favor é mediado pelas moléculas de dsRNA, portanto ao desejar que um gene específico seja silenciado, é necessário designar a ela um dsRNA que contenha a sequência homóloga ao do gene. Com o silenciamento de um gene essencial a célula, o organismo como um todo irá perecer. Assim, o RNAi irá estabelecer um novo patamar no controle de pragas com uma ampla especificidade, pois será possível controlar uma espécie determinada sem afetar os inimigos naturais por exemplo. O fato da especificidade do mecanismo de RNAi ser mediado pela sequência contida no dsRNA, torna a tecnologia versátil, segura e duradoura. Uma vez que o dsRNA pode ser modelado para uma

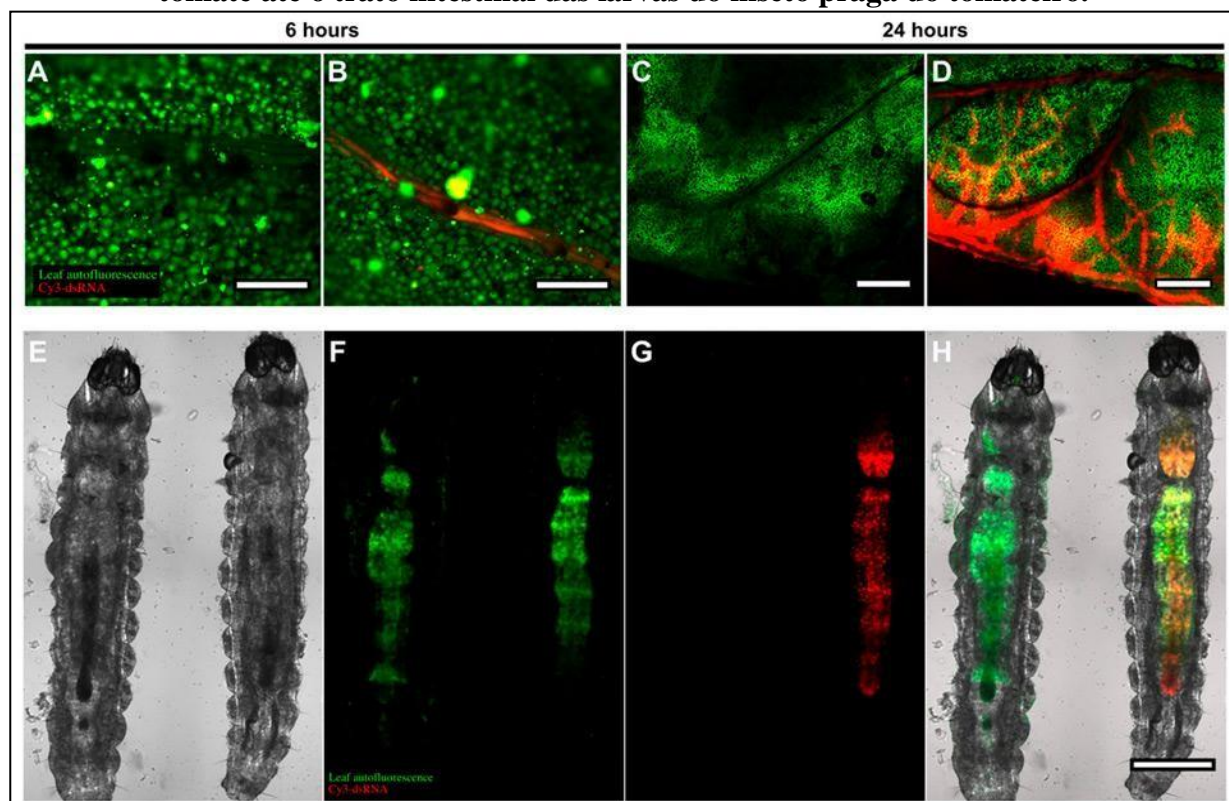
praga específica, sendo possível sua comparação com os genes no banco de dados mundial, assim estimando quais espécies poderão ser afetadas, deste modo, apresentando baixa probabilidade de surgimento de populações resistentes, pois para escapar do mecanismo é necessário uma alteração profunda no gene alvo (ANDRADE, 2018).

Na cultura do algodão, por exemplo, o controle de pragas mais usado é o químico que pode aumentar substancialmente os custos de produção, contudo, atualmente o Manejo Integrado de Pragas (MIP) tem ganho força, assim modificando aos poucos a ideia dos agricultores em relação ao uso indiscriminado de inseticida. Deste modo a utilização de ferramentas biotecnológicas e a transformação genética de plantas estão sendo uma estratégia para a obtenção de cultivares mais produtivas e resistentes. Com base nessa situação, a prospecção de novos genes e proteínas e desenvolvimento de plantas transgênicas é uma estratégia para o controle de pragas. As plantas modificadas geneticamente que contenham genes de resistência, toxinas proteicas de *Bacillus thuringiensis* ou expressando dsRNA dirigindo o RNA interferente tem uma resistência de defesa maior que sucessivamente vai auxiliar no controle de pragas (COELHO, 2013).

Nos citros, o psílídeo *Diaphorina citri* tornou-se nos últimos anos um dos mais importantes insetos, em função dos crescentes prejuízos causados às plantas por ser vetor das bactérias *Candidatus Liberibacter americanus* e *Candidatus Liberibacter asiaticus*, causadoras do greening. O manejo adotado seria o uso de mudas saudáveis, erradicação de plantas infectadas e pelo controle químico. Mas o uso intenso de inseticidas é problemático, para reduzir os altos custos no desenvolvimento de novos inseticidas e tornar o controle mais eficiente e específico, o silenciamento gênico por RNAi está sendo estudado e aplicado como novas tecnologias utilizadas no controle de pragas e vetores. Os pesquisadores realizam testes in vitro compostos por diferentes concentrações de sacarose para avaliar a sobrevivência de *D. citri* nos estágios de ninfa e adultos durante cinco dias (GALDEANO, 2016).

Para melhor entender o funcionamento do mecanismo de RNAi no interior da praga, faz-se uso do trabalho publicado no Jornal da UNICAMP que demonstra o silenciamento via RNAi com a introdução de cianina (Cy3), pigmento orgânico, para reconhecimento da trajetória do dsRNA. A trajetória das moléculas de RNAi marcadas com Cy3 é demonstrada na figura 2, com o caminhar partindo das folhas de tomate até o trato intestinal das larvas do inseto-praga. É possível analisar na figura 2G e H, a coloração avermelhada a qual nos remete ao silenciamento de um gene o qual foi tido como alvo na larva (SUGIMOTO, 2017).

Figura 2 - Trajetória de moléculas de RNAi marcadas com Cy3 através das folhas de tomate até o trato intestinal das larvas do inseto praga do tomateiro.



Fonte: UNICAMP (2018).

RISCOS E NORMA

De acordo com Vasconcelos (2018), Fernando Luís Cônsoli, do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq) da USP, em Piracicaba, alerta que a seleção de moléculas de RNAi pode apresentar o risco de afetarem a própria planta ou organismos não alvo da tecnologia, esta preocupação pode ser contornada com a seleção de genes-alvo de forma criteriosa e com cuidado para que a sequência gênica complementar não seja idêntica a um gene da planta ou qualquer organismo que se alimente dela. Se este procedimento for efetuado de forma correta, o silenciamento apenas ocorrerá no organismo-alvo, porém apenas com muito se terá a certeza que a tecnologia RNAi não afetará humanos. A tecnologia se baseia em sequência de RNA, o qual todos os seres vivos possuem, sendo que alguns são em comuns, contudo as espécies possuem inúmeras sequências únicas que permitem sua diferenciação, o que permite atenção especial apenas a espécie-alvo.

No início do ano 2018 a CTNBio publicou uma normativa definindo a tecnologia como um método que não envolve transgenia, classificando-a de Técnica Inovadora de Melhoramento de Precisão (Timp). Assim, a tecnologia do RNAi não estará sujeita aos mesmos critérios de aprovação exigidos para os OGMs, organismos geneticamente modificados (VASCONCELOS, 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a bibliografia pesquisada, evidencia-se que atualmente a única estratégia utilizada para o controle de pragas com a tecnologia de RNAi é o emprego da transgenia para a geração de plantas resistentes.

A alta especificidade alcançada através de RNAi é uma característica única desta tecnologia, podendo, inclusive, ser racionalizada para atuar apenas em grupos/ordens de organismos como hemípteros e/ou lepidópteros.

O RNAi é atraente pela possibilidade de ser adaptado a um problema específico, ao contrário dos agroquímicos que matam organismos nocivos e benéficos similarmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E. C. Interferência por RNA (RNAi) para o controle de pragas e doenças. **Mais Soja**. On-line, jan. 2018.

COELHO, R. **Uso de ferramentas biotecnológicas para o controle de pragas agrícolas**. Tese de Pós Graduação Stricto Sensu em Biologia Molecular da Universidade de Brasília DF. Agosto de 2013.

COLEMAN, A. D.; WOUTERS, R.H.M.; MUGFORD, S.T.; HOGENHOUT, S.A. Persistence and transgenerational effect of plant-mediated RNAi in aphids. *Journal of Experimental Botany*, v. 66, n. 2, fev. 2015, p. 541–548, 2014.

GALDEANO, D.,M. **Avaliação de expressão de genes candidatos em sistema de rna interferente (RNAi) em Diaphorina Citri (Kuwayama) (hemiptera: Liviidae), vetor do Huanglongbing dos citros**. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2016.

RÊGO, C.; INOUE-NAGATA, A.; NAKASU, E. Y. T.; **Uma estratégia a ser explorada para a indução de resistência a viroses em tomateiro**. p2. Embrapa Hortaliças Brasília/DF.

SUGIMOTO, L. Silenciamento gênico é a nova arma contra pragas agrícolas. **Jornal da UNICAMP**. Campinas, 24 abr. 2017.

VASCONCELOS, Y. Genes em silêncio. **Revista pesquisa FAPESP**. On-line. jun. 2018.

ZOTTI, M. J. *et al.* RNA interference technology in crop protection against arthropod pests, pathogens and nematodes. **Pest Management Science**, v. 74, n. 6, nov. 2017.