

Silenciamiento génico en insectos plaga que afectan la industria agrícola usando ARN de interferencia

Gene silencing in pest insects that affect the agricultural industry using interference RNA

Lizeth S. Ossa Toro¹, Dina A. Padilla Jarava², Ligia C. Sánchez Leal³, Luz Stella Fuentes Quintero⁴

Resumen

Los insectos plaga, son especies de organismos vivos que en forma constante se encuentran en poblaciones altas, ocasionando daños económicos en los cultivos. Generalmente, suele tratarse de especies puntuales, por lo general, sólo una o dos, que pueden causar gran afectación económica en el sector de la agricultura. En las últimas 3 décadas se ha venido desarrollando el concepto de un proceso biológico, detectado en eucariotas ampliamente, mediante el que se pueden silenciar genes, a partir de ARN de doble cadena (ARNdc). Esta maquinaria se ha investigado para conocer su funcionamiento y buscar potenciales aplicaciones que podrían tener en el campo de la biotecnología. En varios estudios se encontró que el silenciamiento de genes se debe a las interacciones enzimáticas intracelulares citoplasmáticas con moléculas de ARN pequeñas (ARNsi), que actúan sobre el ARN mensajero (ARNm) intracelular, impidiendo que este se traduzca a proteína. Mediante este mecanismo se busca silenciar genes específicos en insectos plaga, que sean esenciales para que el insecto pueda vivir y de esa manera evitar la proliferación de la plaga. Este artículo recopila los estudios realizados acerca del ARN de interferencia, referidos al mecanismo genético de los insectos, como alternativa para su control.

Palabras claves: silenciamiento genético, control de plagas, insectos plaga, ARNm endógeno, ARNm exógeno, complejo enzimático.

1. Estudiante del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2091-8487>

2. Estudiante del Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7201-7245>

3 Docente Investigador de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7796-1326>

4 Profesora Asociada. Universidad de Jorge Tadeo Lozano. Bogotá D.C., Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6618-870X>

Correo electrónico de correspondencia: lconsuelosanchez@unicolmayor.edu.co

Recibido: 17/02/2022
Aceptado: 02/06/2022

Abstract

Pest insects are species of living organisms that are constantly found in high populations, causing economic crops damage. Generally, it tends to be specific species, usually only one or two, which can cause great economic damage in the agricultural sector. In the last 3 decades, the concept of a biological process has been developed, widely detected in eukaryotes, by which genes can be silenced, from double-stranded RNA (dsRNA). This machinery has been investigated to understand its operation and to look for potential applications that it could have in the field of biotechnology. In several studies it was found that gene silencing is due to cytoplasmic intracellular enzymatic interactions with small RNA molecules (siRNA), which act on intracellular messenger RNA (mRNA), preventing it from translating a protein. Through this mechanism, the aim is to silence specific genes in pest insects, which are essential for the insect to live and thus prevent the proliferation of the pest. This article compiles the studies carried out on RNA interference, referring to the genetic mechanism of insects, as an alternative for its control.

Keywords: gene silencing, pest control, pest insects, endogenous mRNA, exogenous mRNA, enzyme complex.

Introducción

En las últimas décadas se ha venido desarrollando el concepto de ARN de interferencia en el ámbito científico; estudios soportados por las ramas de la biología celular y molecular abordan el ARN de interferencia como un mecanismo que promueve el silenciamiento genético, interrumpiendo la expresión de genes específicos en la célula, introduciendo ARN de doble cadena exógeno. Esto ha permitido descubrir la función de varios genes en diferentes seres vivos.

Una de las primeras señales de la presencia de este mecanismo intracelular para supri-

mir genes fue dilucidado por Napoli (1) en el año 1990, donde se evidenció que los genes que expresan la coloración en flores llamadas petunias que fueron modificadas genéticamente se suprimieron, otorgándole este proceso de silenciamiento al gen transgénico de Chalcona sintasa, que fue modificado. La investigación demostró que al introducir en el vegetal una copia adicional del gen que codifica para la enzima que participa en la producción de pigmentos de antocianina denominada chalcona sintasa, las flores que obtuvieron expresaban tonos desde púrpura a blanquecino. Después de esta investigación, en 1992 científicos de la Universidad de Roma le dieron el nombre de “Quelling”

(2) o supresión a la inactivación de la expresión de un gen al introducir una copia adicional de ese mismo gen, en su estudio con el hongo *Neurospora crassa*.

Luego se publicaron estudios realizados con un nemátodo llamado *Caenorhabditis elegans*, en el año 1995 por Guo et al (3) y en 1998 Fire et al (4), con los cuales pudieron dilucidar de una manera más detallada, la manera como ocurre el proceso de silenciamiento genético a través del ARN de interferencia, fundamentado en la degeneración del ARN mensajero (ARNm) intracelular, cuando se integra ARN exógeno de cadena doble (ARNdc), que es homólogo a la secuencia diana, por esta razón el ARNm específico es propenso a silenciarse. Fire et al, demostraron el efecto fenotípico de ARN y observaron que solo se produjeron cambios fenotípicos en el gusano cuando fue integrado el RNA consentido y anti-sentido en forma de ARN de cadena doble, mas no cuando cada ARN era integrado en presentación de cadena sencilla. Así mismo, ellos demostraron que la secuencia del ARN que se buscaba inactivar y la que el RNA bicatenario contenía debían ser complementarias, lo que agregaba especificidad al momento de producirse el silenciamiento y se evidenció que poca cantidad de moléculas se necesitaban para obtener silenciamiento, que era el objetivo.

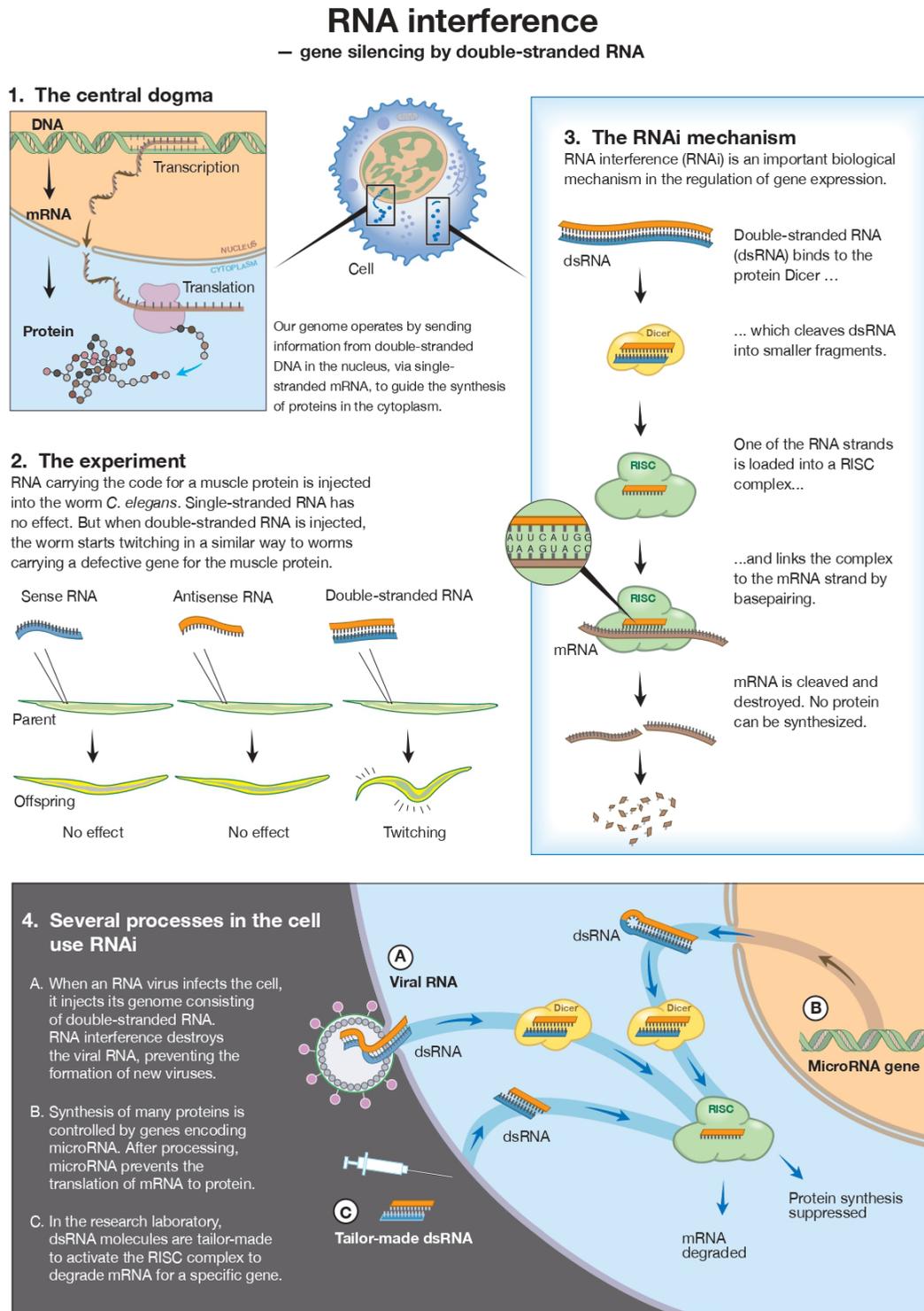
En el año 1999, Hamilton et al (5) realizaron un estudio que describe el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) como un

mecanismo de defensa específico de la secuencia de nucleótidos que puede dirigirse a los ARNm tanto celulares como virales. Para el año 2001, se publicó un artículo escrito por Bernstein et al (6) en donde se analiza que el ARN de interferencia en plantas puede ocurrir tanto a nivel transcripcional como post transcripcional; sin embargo, en animales, sólo lograron identificar ARNi posttranscripcional. El ARNi se caracteriza en animales y plantas por la presencia de ARN de aproximadamente 22 nucleótidos de largo que son homólogos al gen diana que esta siendo silenciado. Dichas secuencias de 22 nucleótidos son usadas como secuencias líder que ordenan e instruyen a enzimas nucleasas que componen el complejo RISC, para destruir los ARN mensajeros específicos del gen que se busca suprimir. Por ende, el ARNi se considera como un mecanismo que ha revolucionado la biología celular.

Caracterizando el RNA de interferencia

El ARNi fue caracterizado en el año 1998, cuando Fire y Mello demostraron que, si se introducía una secuencia de RNA de doble hebra en las células del gusano *Caenorhabditis elegans*, este RNA le ocasiona interferencia al RNA mensajero, suprimiendo la traducción de proteínas específicas. Este ARN bicatenario exógeno al ser integrado, se degrada en el citoplasma en pequeñas hebras de ARN de 20 a 25 nucleótidos, a lo que se le denominó ARN de interferencia.

Figura 1. Esquema donde se define el descubrimiento del silenciamiento génico inducido por ARNi cuando se concedió el premio Nobel a Fire-Mello (7).



Fuente: The Nobel Committee for Physiology or Medicine. Illustration: Annika Röhl
<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/press-release/>

En el estudio que se realizó *in vitro* utilizando extractos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (8), se describió el mecanismo del ARNi donde el ARN de doble cadena (ARNdc) por lo general más de 200pb, que es introducido en la célula, promueve la destrucción de la secuencia de intercambio de ARNm con el ARNdc. A este fenómeno se le denomina (ARNi). El ARNdc se convierte por escisión endonucleolítica que es dependiente de ATP, a través de un complejo enzimático, en pequeños ARN interferentes (ARNsi) de 21 a 23 nucleótidos, que en las regiones complementarias hibridan el ARNm intracelular imposibilitando que este codifique para proteínas específicas, hay otros mecanismos distintos por los cuales esto puede ser desarrollado. En el artículo que escribe Rana T. (9), define el RNAi como moléculas de ARN de cadena doble que consta de 20 nucleótidos aproximadamente cuyas cadenas muestran una complementariedad exacta y estas hebras son provenientes de unas escisiones enzimáticas citoplasmáticas. A continuación, procedemos a describir este complejo enzimático:

Componentes del silenciamiento génico

Tipos de ARNi

La molécula del ARN de interferencia, tienen una composición entre los 20 y 25 nucleótidos, siendo este una molécula pequeña que se produce por la segmentación de hebras más largas. Los ARNi pueden ser clasificados en tres grupos grandes:

1. Los ARNsi asociados a Piwi (piRNAs por sus siglas en inglés)

Estos pequeños ARNsi se originan desde unas hebras precursoras más largas de una sola cadena, en un proceso independiente de las enzimas Drossha y Dicer. Las proteínas piwi constituyen una subclase de la línea germinal de la familia argonaute, con el fin de generar complejos silenciadores que son inducidos por piRNAs. Los cuales ayudan a oprimir los transposones a través de mecanismos transcripcionales o postranscripcionales y así se mantiene la integridad del genoma de la línea germinal (10). Adicionalmente a que los piRNAs tienen funciones de silenciamiento génico, también contribuyen a la regulación de genes celulares. Este grupo de ARNsi integrantes de la supresión de genes ha sido identificado hace poco y por lo tanto no se tiene mucha información, de todas formas su estudio está permitiendo acoplar nuevos puntos de vista para lograr la comprensión de los mecanismos que maneja el ARNi(11).

2. siRNA (ARN de interferencia pequeño)

Estas moléculas están constituidas por dos cadenas de ARN, con una longitud aproximada de 20 nucleótidos, cuyas hebras presentan complementariedad. estas moléculas se forman debido a la enzima Dicer la cual corta el RNA bicatenario exógeno de cadenas largas en diferentes siRNA (12). Estos productos fragmentados se incorporan después en el complejo silenciador inducido por

ARN (RISC), el cual utiliza la hebra anti sentido como una guía para poder identificar el ARNm que es complementario. Después el complejo RISC cataliza los ARNm los cuales son degradados por la maquinaria celular, y así produciendo el silenciamiento génico. Estos ARNs de interferencia pequeños son introducidos en las células, lo cual provoca el silenciamiento de diferentes genes, suprimiendo así diferentes funciones en la célula (9).

3. RNAmi (microARN)

Los microARN se clasifican como ARN monocatenario de aproximadamente 22 nucleótidos, los cuales se pueden encontrar en diversidad de organismos, desde gusanos, humanos y plantas (13). Estos se originan en el núcleo de las células y son sintetizados como pioneros en el núcleo; y se les denomina microARN primarios. Después del desarrollo nuclear, estos salen al citoplasma mediante los poros nucleares. Los microARN ya desarrollados se llaman inmaduros y estos necesitan un procesamiento posterior para formar la parte activa o madura (14).

Cuando los microARN se encuentran en el citosol, son escindidos con la enzima Dicer, que es la misma que hace los cortes para los ARNm en el fenómeno de ARNi. El proceso es parecido al de ARNsi, la cadena anti sentido se adhiere al complejo parecido a RISC, esto depende del grado de complementariedad con el ARNm, o puede inducir

su degeneración o no permite que se dé la traducción (15).

Otros componentes en esta reacción son:

1. Enzima Dicer.

El Silenciamiento génico se da después que la enzima Dicer fracciona el ARN de doble cadena (dsRNA) en pequeños ARN interferentes (6) 16 . Dicer también se encarga de procesar ARN pequeños endógenos, también conocidos como microRNA (16). Esta pertenece a la familia de las nucleasas ARNsi, estas enzimas se conservan en diferentes especies como son moscas, gusanos, plantas, hongos y mamíferos. La enzima Dicer tiene 4 dominios: unión a ARNdc, motivos dobles de RNAsa III, helicasa, y un dominio de actividad endonucleasa(7) .

2. RISC.

Es el complejo ribonucleoproteico siglas en inglés de RNA-induced silencing complex, la cual contiene diversos factores celulares; Gracias a esta se reconoce y se degradan los mRNA diana. Lo primero que hace es desenrollar y desnaturaliza los siRNA, esto permite que la hebra anti- sentido guíe el complejo RISC hacia el ARN mensajero que tiene secuencia homóloga, mientras tanto es degradada la cadena con sentido. Esto se da debido al acoplamiento de las bases nitrogenadas. El complejo RISC presenta actividad de las endonucleasas, esto debido a que al igual que la enzima Dicer

contiene algunas proteínas miembros de la familia Argonaute (7).

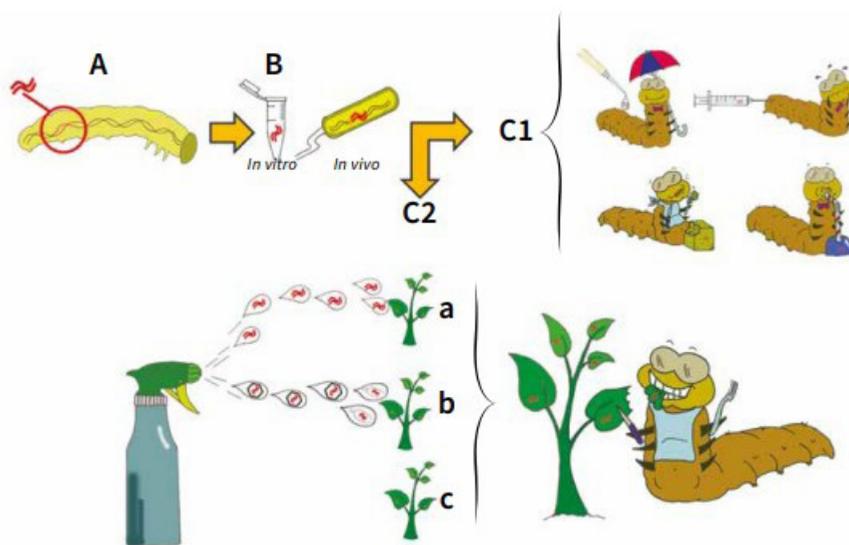
Hoy en día las investigaciones realizadas, muestran que el uso del ARNi que se activa con el ARNdc, es una metodología antigua, que precede de la variación evolutiva de las plantas y los gusanos. Así mismo se ha inferido que funciona de manera natural en el silenciamiento de virus y elementos genéticos móviles que producen ARNdc intermedarios, que son un tipo de ARN no producidos a nivel celular usualmente (16).

Utilizando el ARNi se ha logrado silenciar genes que se encuentra en células de cultivo y es posible silenciar el gen diana en un organismo con eficiencia. El ARNi se puede utilizar para

silenciar RNAm los cuales codifican proteínas que están implicadas en la ruta endocítica para el desarrollo de moléculas. A través del ARN interferente es posible separar la parte del mecanismo endocítico necesario para dar paso a la morfogénesis, como también se puede aplicar este proceso en el biocontrol de plagas en la agricultura (17). El silenciamiento, se presentaba debido a que el gen introducido como el homólogo endógeno son interrumpidos, y se llamó a este proceso (18) co-supresión génica o silenciamiento génico post transcriptional.

En poco tiempo, la presencia del RNAi se registró de una forma veloz, en muchas otras especies, como la planaria, hidra, el pez cebrá, mosca del vinagre (19), tripanosomas y plantas.

Figura 2. Esquema de la estrategia de control de insectos plaga mediante ARNi. A. Selección del gen blanco; B. Producción de moléculas desencadenantes; C. Vías de aplicación; C1. Métodos utilizados en laboratorio: aplicación tópica e inyectada y aplicación oral mediante dietas artificiales y método de la gota; C2. Estrategias de liberación en campo; C2a. Aplicación de moléculas desencadenantes formuladas; C2b. Aplicación a través de vectores (bacterias y virus); C2c. Uso de plantas hospederas transgénicas (20).



Fuente: Correal *et al.*, (2018). Nuevas estrategias para el control biológico en: Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: Aplicaciones y perspectivas. Vol 2. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria -AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.investigacion.7402544>

El ARNi tiene al menos tres propósitos esenciales en los organismos eucariotas, la protección de agentes virales, la regulación génica específica y defender el organismo de elementos genéticos transponibles o transposones, no obstante, no solo estas funciones están asociadas al ARNi. El descubrimiento del mecanismo usado por el RNAi por Fire y Mello les otorgó la concesión del premio Nobel de medicina, a los dos investigadores de nacionalidad estadounidense para el año 2006 (21).

Uso del ARNi para control en insectos plaga

Se había descrito que Fire et al, demostraron que el ARNi podía degradar ARNm y bloquear la expresión de genes de insectos, como se investigó en el experimento con *C. elegans* (4). La manera de activar el ARNi en *C. elegans* se promueve sumergiendo el nematodo directamente en soluciones que contienen ARNdc, alimentándolo con bacterias que expresan el ARNdc o en la cavidad del cuerpo del nematodo se inyecta ARNdc. En alguna de estas situaciones, el efecto ARNi actúa de manera sistémica y transitoria, esto demuestra que el ARNi tiene actividad de corta duración y ocurre en el animal completo, así mismo el ARNdc que toma la vía RNAi es amplificado por la enzima ARN polimerasa que es dependiente de ARN derivada del huésped (RdRp). En insectos, el desarrollo del proceso cambia, ya que parecen carecer de un RdRp en-

dógeno. En ausencia de RdRp, es probable que los ARNdc en los insectos no se amplifiquen y, para que sean efectivos, se deben enviar directamente a las células y tejidos donde se va a producir la supresión de la expresión del gen diana (22) .

Debido a que el ARNi tiene un gran potencial para silenciar genes específicos, la biotecnología nos permite usarlo en el campo del control de plagas en la agricultura (23) , en el caso de Colombia, el café es uno de los productos más importantes, ya que alrededor de 500.000 familias tienen cultivos cafeteros en 869.000 hectáreas aproximadamente y sus ingresos provienen de la venta de la semilla, se busca promover el manejo integrado de insectos plaga en los cafetales, para su control y evitar la propagación de enfermedades de una manera menos nociva para el ambiente, que marque una diferencia al uso de pesticidas (24). Mantener las características sanitarias del cultivo, es uno de los puntos clave en los cafetales, para salvaguardar la productividad, la excelente calidad y asegurar sus ingresos. En este tipo de cultivos, se encuentra la Broca del café, o barrenador del café, *Hypothenemus hampei Ferrari*, apareció en Colombia un insecto en el año 1988, el control de este insecto se ha mostrado como un gran reto ya que tiene un hábito de integrarse en los frutos de café y permanecer oculto, ya allí logra alimentarse y reproducirse causando daños que influyen en varios factores como: el peso de la semilla, la disminución de la calidad del café

y por último la pérdida total del fruto (25). El uso de insecticidas no es una solución viable para la erradicación de este insecto, por el impacto ambiental que tiene y por qué cuando el insecto se encuentra dentro de la semilla del café, ya ningún insecticida tiene efectividad sobre él, así que el ARNi es un mecanismo fundamental para silenciar genes post transcripcionales que permitan el control de este insecto.

El insecto debe ser capaz de integrar de manera autónoma las moléculas de ARNdc para desencadenar el mecanismo de ARNi y esto es posible realizarlo por medio de alguno de estos mecanismos:

- 1) A través de la proteína SID-I, que es una proteína transmembrana que se caracterizó en *Caenorhabditis elegans* *Maupas*, en el año 1990 (Rhabditida, Rhabditidae), se ha evidenciado que esta proteína interviene en el proceso de captura de ARNdc citoplasmático.
- 2) Existe una vía donde la enzima ATPasa H + vacuolar tiene un papel importante para el transporte de solutos intermembranales (26).

Baum *et al.* publicaron un estudio donde se evidencia la importancia del ARNi como uso para el control de insectos, como respuesta a la protección de los cultivos y reportaron en ese estudio una disminución en el perjuicio causado por el gusano de la

raíz del maíz *Diabrotica virgifera* (Coleoptera, Chrysomelidae) en plantas de maíz que a nivel genómico fueron modificadas con ARNdc del gen ATPasa H⁺(27). Por otra parte otros estudios (28), que implican el suministro de ARNdc por vía ingestión oral, demuestran que hay una vasta gama de organismos diana de diferentes familias de insectos, y encontraron múltiples genes que son candidatos para demostrar el amplio espectro de aplicación integrando ARNdc y el potencial que tiene la técnica que usa ARNi (29). Durante los últimos años, Bayer ha desarrollado y aprobado el evento de transporte de maíz denominado SmartStax PRO MON 87411 celebrado en Canadá en 2016 y los Estados Unidos de América en el 2017 que promueve el control de *Diabrotica virgifera virgifera* este se ha considerado un acontecimiento significativo en el uso de la biotecnología RNAi en el campo agrícola (30). Esta tecnología ahora está disponible para el uso en la producción agrícola.

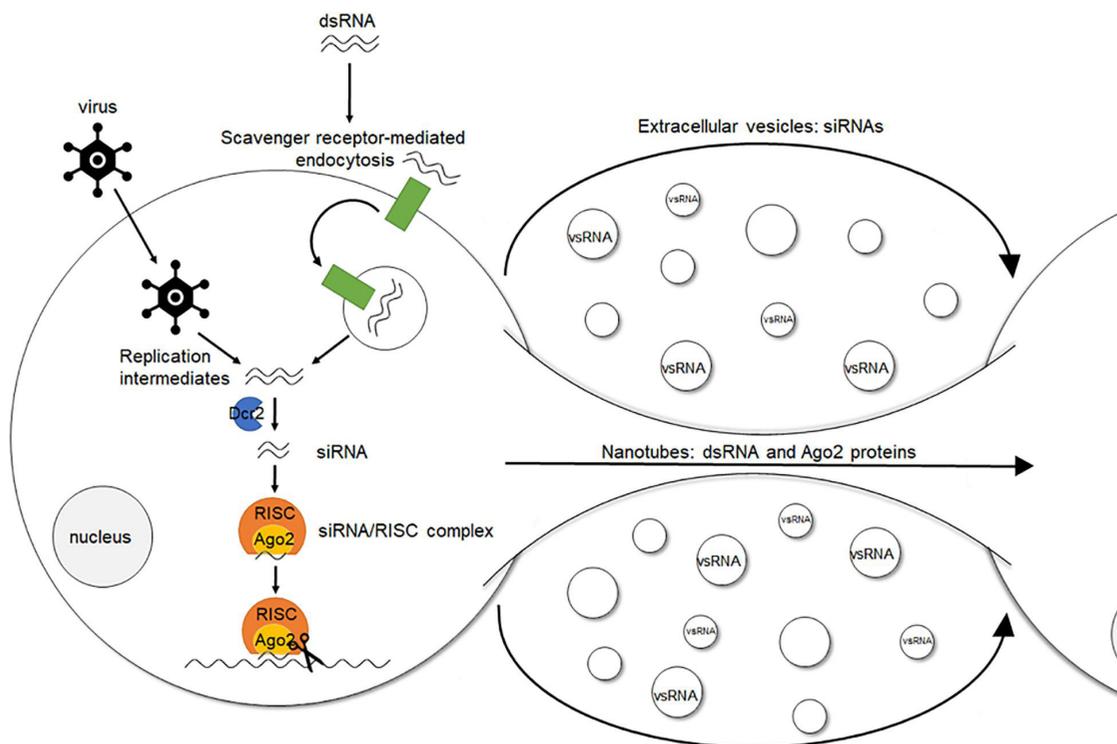
Algo particular en los insectos, es que ellos son capaces de generar una respuesta de ARNi completa o sistémica frente a la introducción de ARNdc; la absorción celular de dsRNA en los insectos, se efectúa a través de endocitosis mediada por el receptor de la célula captadora al igual que en células cultivadas, como *in vivo* (31). Adicional a esto, se conoce que la captación de ARNdc desnudo depende de su longitud y ocurre eficientemente para moléculas de ARNdc largas de alrededor de 200–500 pares de

bases (pb) e incluso de hasta alrededor de 1000 pb. Pero para construcciones más cortas como los ARNsi, esta eficacia disminuye (32). En este estudio, se demostró que las lipoforinas pueden adherirse a los fragmentos de ARNdc en la hemolinfa del insecto, lo que permite inferir que estas proteínas tienen un rol en la protección, el transporte o las dos, en todo el cuerpo del insecto (33).

Adicionalmente, se han informado dos hallazgos principales para *Drosophila mela-*

nogaster. Primero, la infección viral de las células de *Drosophila* cultivadas aumentó la formación de estructuras similares a nanotubos a través de las cuales puede ocurrir el transporte a corta distancia de los componentes ARNdc y RISC (34). En segundo lugar, se ha demostrado que las moscas usan vesículas similares a exosomas derivadas de hemocitos para diseminarse sistémicamente una señal de ARNsi antiviral en la hemolinfa (35).

Figura 3. Modelo simplificado de ARNi (antiviral) en insectos (36)



Fuente: Vogel et al., Front. Physiol., (2019) <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01912>

Al integrar ARNdc en el insecto, encaminado a bloquear la transcripción de un gen endógeno específico en el organismo de la plaga objetivo, se puede eliminar la expresión de este gen a nivel postranscripcional.

Teniendo en cuenta esta información, realizando un proceso de selección de un gen objetivo esencial para la sobrevivencia de la plaga o que le permita generar patogenicidad, este mecanismo puede conducir a la

mortalidad de insectos. La condición puntual de especificidad que tiene la secuencia y la posibilidad de apuntar a cualquier gen que afecte la sobrevivencia de la plaga y que sea no conservado, evocan al ARNi como un candidato ideal, para ser aplicado como insecticida específico de la especie.

Wuriyangan *et al* en el año 2011 realizaron un experimento administrando ARN de doble cadena, y siRNAs de forma oral, en el psílido de la papa/tomate *Bactericerca cockerelli*, quien es un vector para la bacteria *Candidatus liberibacter* sp, la cual se asocia con la enfermedad del chip de cebrá de la papa, y *Diaphorina citri* es el vector de *Ca. Liberibacter asiaticus*, asociado con el reverdecimiento de los cítricos o denominado la enfermedad de Huanglongbing (HLB), que en el momento es una de las mayores amenazas en la industria de los cítricos. La semejanza biológica entre el chip de cebrá con la HLB, sus agentes causal de la enfermedad y sus vectores psílicos sugieren que el éxito con una especie de insecto, *B. cockerelli*, tendrá una aplicación potencial en la otra, *D. citri*. El suministro de RNA de interferencia ocasiona un porcentaje de muerte alto en los insectos (37).

En el año 2013 Xiong *et al*, publicaron un estudio donde se silenció el gen de la muda HaHR3, del gusano de la cápsula del algodón (*Helicoverpa armigera*) cuando *H. armigera* se alimentaba de *E. coli* o plantas transgénicas las cuales contenían el RNA de doble ca-

dena, se observó una reducción significativa de la expresión del gen HaHR3, lo que llevó a la larva a tener una mala formación y un alto porcentaje de muerte (38). En la revista Science en el 2008, Wu KM *et al* realizaron una investigación donde se utilizaban plantas transgénicas de algodón con toxina insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), la cual ayuda a combatir y resistir la plaga del gusano *H. armigera*, y también evita la presencia en otros cultivos (39). Así mismo se podría usar ANRi en conjunto con la toxina tipo Cry de *Bacillus thuringiensis* (Bt), Lo que podría ser un gran potencial para combatir los insectos que afectan cada día la economía agrícola, se puede suponer que la resistencia de algunas plagas a la toxina Cry de *B. thuringiensis* (Bt), podría disminuir con el uso de RNA de interferencia indicados directamente con los genes que están involucrados en dicha resistencia (40).

El uso de plantas transgénicas con ARN de interferencia sigue siendo una fuente de ayuda para combatir diversidad de plagas, en el estudio realizado por Kumar *et al.* (2012), Utilizaron la planta *N. attenuata* las cuales tenían un fragmento del gen CYP6B46 de una forma invertida para producir ARNdc, el gen diana está en el intestino de *Maduzca sexta*, después que estos se alimentarán de dicha planta, se observó una reducción significativamente la expresión del gen (41). Una evidencia del silenciamiento de genes mediante el uso de RNAi en insectos plaga y su uso exitoso para detener la expresión

de genes Diana vitales, abrió una puerta al desarrollo de una variedad de enfoques novedosos y amigables con el medioambiente (42). Realizaron experimentos donde usaban RNA de interferencia para controlar la polilla del dorso de diamante, *Plutella xylostella*, donde este iba actuar directamente al gen diana acetilcolinesterasa AchE2, la tasa de mortalidad fue bastante elevada cuando estas se alimentaron de la planta *Brassica* spp (43).

Hasta el momento solo hemos revisado el enfoque transformador para entregar ARNdc, que implica la utilidad de plantas transgénicas, usándolas como herramienta para el biocontrol de insectos plagas. Esta es una forma atractiva de inducir el silenciamiento génico en una plaga específica (27), sin embargo, no es práctico para todos los organismos o cultivos de destino. Adicional a esto, una de las principales desventajas de las plantas y semillas transgénicas es que ellas llevan un proceso de aprobación regulatoria por parte de las entidades responsables, que requiere de años de estudio y es costosa (44), teniendo en cuenta esto los estudios actuales están enfocados en encontrar técnicas que impliquen una disminución constante en el costo de producción de ARNdc, para así mismo obtener mayor atracción de las empresas hacia el desarrollo de técnicas mejoradas de producción de ARNdc (45).

El silenciamiento génico mediado por ARNi se puede inducir de dos maneras en un or-

ganismo, liberando moléculas de ARNdc o administrando directamente ARN pequeños (ARNs). En el momento se han encontrado dos tipos principales de ARN pequeños que actúan sobre la vía del ARNi: Los microARN (miARN) y los ARN de pequeña interferencia (ARNip). Los ARNmi surgen de forma intracelular e intervienen en la regulación de la expresión de los genes, mientras que los ARNsi pueden ser de origen exógeno, pueden provenir de un virus o suministro artificial (46). O de origen endógeno de transposones (47).

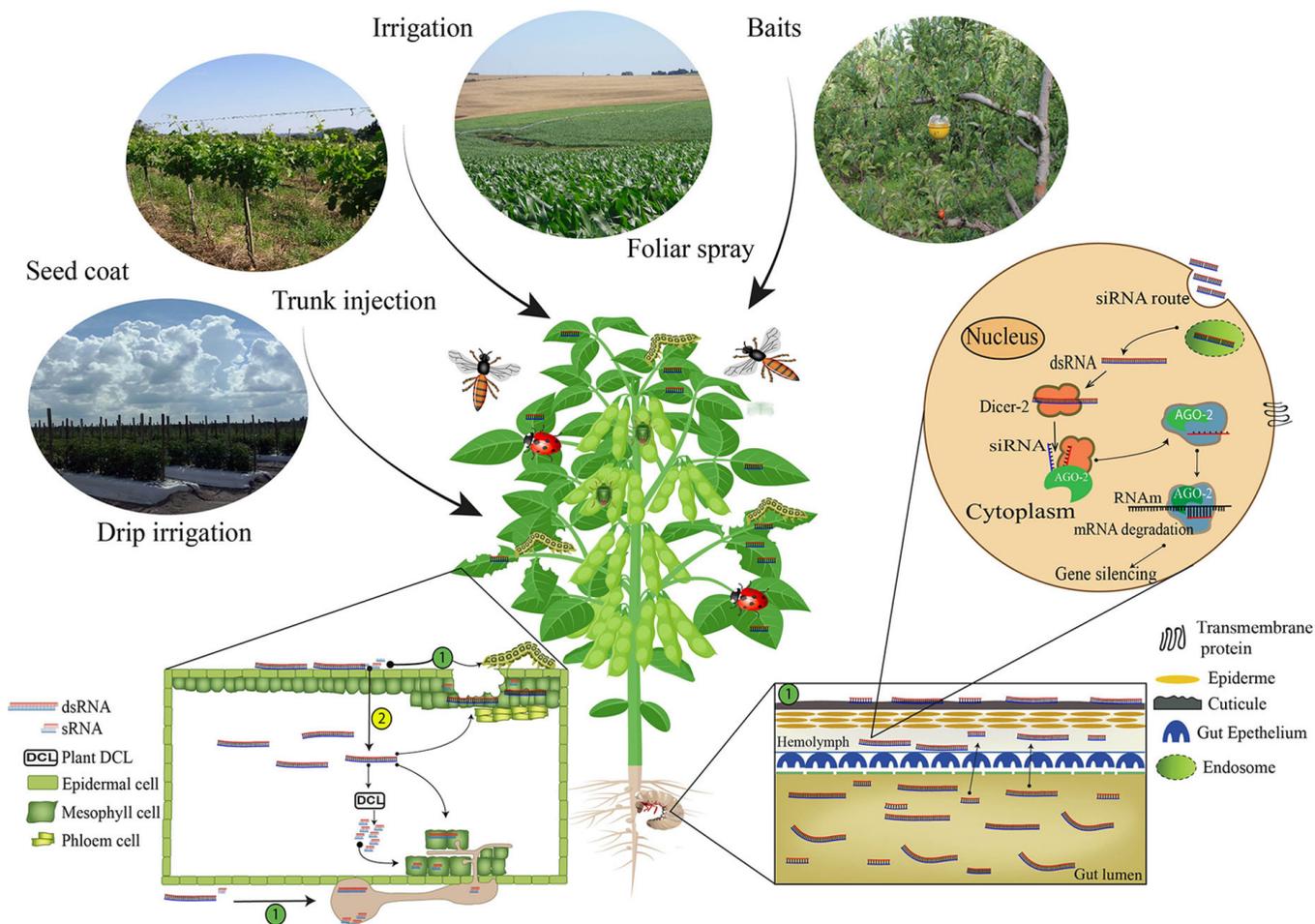
En la mayoría de los casos, los insectos captan ARNdc de más de 50 pb, pero no captan ARNs (48), aunque algunos estudios han demostrado que el ARNs puede desencadenar el silenciamiento de genes (49). Sin embargo, otros organismos como los hongos y las plantas absorben tanto ARNdc como ARNs (50), lo que sugiere que estos organismos tienen un mecanismo de absorción diferente (51).

Cuando las moléculas de ARN son agregadas al campo de acción (puede ser a través de plantas transgénicas, pulverización foliar o inyección en el tronco), deben buscar una ruta de ingreso a nivel celular en el organismo objetivo para desencadenar el silenciamiento génico. Existen dos procesos por los cuales puede ocurrir: (a) absorción directa o (b) indirecta. La absorción directa ocurre en el momento en que las moléculas de ARNdc son absorbidas por medio del contacto tópico o cuando los insectos se alimentan

de las plantas o tejidos vegetales. En sentido contrario, la captación indirecta de moléculas de ARN es un proceso que implica

ingresar primero en el sistema vascular de la planta y después ser captadas por el insecto/patógeno (46).

Figura 4. Opciones de entrega de ARNi no transformadoras para la activación del silenciamiento génico endógeno. (52)



Fuente: Cagliari *et al.*, *Front. Plant Sci.*, (2019) <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.0131>

Los costos de producción de ARNdc disminuyeron de una manera muy marcada en los últimos años, de 12,500 USD por gramo en el año 2008 a 60 USD por gramo (cifras calculadas aproximadamente) en 2018 (52), esto incrementa la expectativa de precios para los productores agrícolas que son el mercado objetivo, esperando que estos bajen significa-

tivamente en los próximos años. La amplia producción sistemática de ARNdc, se puede dar de manera in vivo o in vitro, y esto permite una elevada producción de ARNdc con la disminución de costes. Se trata de estrategias basadas en la hibridación de dos ARN monocatenarios (ssARNs), que son sintetizados enzimáticamente, que pueden realizarse

in vitro o in vivo (utilizando células bacterianas deficientes en la enzima RNasa III que degrada los ARNdc) (50). Aunque un sistema in vivo permite la producción masiva de ARNdc comparada con la síntesis in vitro, aún reporta resultados con costos elevados, una purificación dura y una alta demanda de mano de obra (20) y adicional a esto sigue siendo ARNdc desnudo que en condiciones de práctica, presenta una vida media más corta. Por eso mismo, la entrega de ARNdc es una opción eficaz para aumentar la estabilidad y rendimiento del silenciamiento génico en especies recalcitrantes en *Lepidóptera* y *Hemíptera*, permitiendo que las plantas estén protegidas por más tiempo.

Conclusiones

Aunque el ARN de interferencia es un hallazgo científico que cuenta con pocas décadas, ha tenido muchos avances en los últimos años y tiene un gran potencial para ser utilizado en el campo biotecnológico y en otros campos. En la agricultura, puede usarse como control de insectos plaga que acechan los cultivos y representa una técnica amigable con el medio ambiente, siendo un reemplazo a los pesticidas y otros químicos utilizados a diario para el control de plagas, que no siempre son eficaces y dañan el medio ambiente.

Aunque el uso de insecticidas es un procedimiento frecuente, del 18 al 20% de la cosecha que se cultiva es pérdida, debido a

que los insectos plaga la infestan; uno de los problemas es la resistencia que generan los insectos ante los insecticidas, situación que hace inminente buscar una solución más eficaz para mejorar las estrategias de protección vegetal.

Referencias

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* [Internet]. 1990 [cited 2020 Apr 25];2(4):279–89. Available from: <http://www.plantcell.org/content/2/4/279>
2. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* [Internet]. 1992 [cited 2020 Apr 25];6(22):3343–53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1484489>
3. Guo S, Kemphues KJ. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* [Internet]. 1995 May [cited 2020 Apr 25];81(4):611–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758115>
4. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* [Internet]. 1998 Feb [cited 2020 Apr 25];391(6669):806–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9486653/>
5. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* (80-) [Internet]. 1999 Oct 29 [cited 2020 Apr 25];286(5441):950 LP – 952. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/286/5441/950.abstract>

6. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* [Internet]. 2001 Jan [cited 2020 Apr 25];409(6818):363–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11201747/>
7. Barrón C. Implicaciones Fisiopatológicas De Los Rna De Interferencia [Internet]. Universidad Complutense. 2020-04-29; 2017. Available from: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/55569/1/CARMEN%20BARRON%20GARCIA.pdf>
8. Haley B, Tang G, Zamore PD. In vitro analysis of RNA interference in *Drosophila melanogaster*. *Methods* [Internet]. 2003 [cited 2020 Apr 29];30(4):330–6. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046202303000525>
9. Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Jan [cited 2020 Apr 29];8(1):23–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17183358/>
10. Iwasaki YW, Siomi MC, Siomi H. PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2015 Jun 2 [cited 2020 Apr 29];84(1):405–33. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258>
11. Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen C-CG, Tolia NH, et al. Analysis of the *C. elegans* Argonaute Family Reveals that Distinct Argonautes Act Sequentially during RNAi. *Cell* [Internet]. 2006 Nov 17 [cited 2020 Apr 29];127(4):747–57. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.033>
12. & Wolfman LSBA. Small interfering RNA induced knockdown of green fluorescent protein using synthetic RNA molecules. *J Chem Inf Model* [Internet]. 2013;53(9):1689–99. Available from: <http://elfosscentiaae.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol Apl/2007/24/1/BA002401OL049-052.pdf>
13. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* [Internet]. 2004/03/10. 2004 Mar 1 [cited 2020 Apr 29];18(5):504–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15014042>
14. Guerra JJJL, Arjona LG. ARN interferente: una herramienta y un novedoso mecanismo de regulación génica. *Científico Estud las Ciencias Médicas Cuba* [Internet]. 2008 [cited 2020 Apr 29]; Available from: <http://www.16deabril.sld.cu/rev/235/04.html>
15. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, et al. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* [Internet]. 2003 [cited 2020 Apr 29];35(3):215–7. Available from: <https://doi.org/10.1038/ng1253>
16. Novina CD, Sharp PA. The RNAi revolution. [Internet]. Vol. 430, *Nature*. England; 2004 [cited 2020 Apr 29]. p. 161–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15241403/>
17. Sijen T, Vijn I, Rebocho A, van Blokland R, Roelofs D, Mol JNM, et al. Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Curr Biol* [Internet]. 2001 [cited 2020 Apr 29];11(6):436–40. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982201001166>
18. Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2012 Jan [cited 2020 Apr 30];11(2):125–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22262036/>
19. Ahmed I, Ahmed Tipu S, Ishtiaq S. Malignant mesothelioma. *Pakistan J Med Sci* [Internet]. 2013 Nov [cited 2020 Apr 30];29(6):1433–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24550969>
20. Cotes AM. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros [Internet]. Vol. 1. 2018 [cited 2020 Apr 30]. Available from: <http://editorial.agrosavia.co/index.php/publicaciones/catalog/download/23/14/313-1?inline=1>
21. Sen GL, Blau HM. A brief history of RNAi: the silence of the genes. *FASEB J* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2020 Apr 30];20(9):1293–9. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.06-6014rev>
22. Röther S, Meister G. Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* [Internet]. 2011 Nov [cited 2020 Apr 30];93(11):1905–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21843590/>

23. Borovsky D. Insect peptide hormones and RNA-Mediated interference (RNAi): Promising technologies for future plant protection. *Phytoparasitica* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2020 Apr 30];33:109–12. Available from: https://www.researchgate.net/publication/298552487_Insect_peptide_hormones_and_RNA-Mediated_interference_RNAi_Promising_technologies_for_future_plant_protection
24. Chaves B, Riley J. Determination of factors influencing integrated pest management adoption in coffee berry borer in Colombian farms. *Agric Ecosyst Environ* [Internet]. 2001 [cited 2020 Apr 30];87(2):159–77. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880901002766>
25. Baker, P. La broca del café en Colombia; informe final del proyecto MIP para el café DFID-Cenicafé-CABI BioScience. *Colomb Entomol* [Internet]. 1999 [cited 2020 May 1];32(2):101–16. Available from: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:YKIKNgR49LcJ:www.scielo.org.co/pdf/rcen/v32n2/v32n2a01.pdf+%&cd=2&hl=es&ct=clnk&gl=co> 25
26. Huvenne H, Smagghe G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2020 May 1];56(3):227–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837076/#:~:text=Abstract,and digestion in its midgut.>
27. Baum JA, Bogaert T, Clinton W, Heck GR, Feldmann P, Ilagan O, et al. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2007 [cited 2020 May 1];25(11):1322–6. Available from: <https://doi.org/10.1038/nbt1359>
28. Bautista MAM, Miyata T, Miura K, Tanaka T. RNA interference-mediated knockdown of a cytochrome P450, CYP6BG1, from the diamondback moth, *Plutella xylostella*, reduces larval resistance to permethrin. *Insect Biochem Mol Biol* [Internet]. 2009 [cited 2020 May 1];39(1):38–46. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174808001732>
29. Aguilera G. C, Padilla H. BE, Flórez R. CP, Rubio G. JD, Acuña Z. JR. ARN interferente: Potenciales usos en genómica funcional y control genético de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytinae) [Internet]. Vol. 37, *Revista Colombiana de Entomología*. scieloco; 2011 [cited 2020 May 1]. p. 167–72. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882011000200001&lng=es
30. Head GP, Carroll MW, Evans SP, Rule DM, Willse AR, Clark TL, et al. Evaluation of SmartStax and SmartStax PRO maize against western corn rootworm and northern corn rootworm: efficacy and resistance management. *Pest Manag Sci* [Internet]. 2017 Sep [cited 2020 Aug 24];73(9):1883–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28195683/>
31. Turner CT, Davy MW, MacDiarmid RM, Plummer KM, Birch NP, Newcomb RD. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol Biol* [Internet]. 2006 Jun [cited 2020 May 1];15(3):383–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16756557/>
32. Saleh M-C, van Rij RP, Hekele A, Gillis A, Foley E, O'Farrell PH, et al. The endocytic pathway mediates cell entry of dsRNA to induce RNAi silencing. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2006 [cited 2020 May 1];8(8):793–802. Available from: <https://doi.org/10.1038/ncb1439>
33. Wynant N, Santos D, Vanden Broeck J. Biological mechanisms determining the success of RNA interference in insects. *Int Rev Cell Mol Biol* [Internet]. 2014 [cited 2020 May 1];312:139–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25262241/>
34. Karlikow M, Goic B, Mongelli V, Salles A, Schmitt C, Bonne I, et al. *Drosophila* cells use nanotube-like structures to transfer dsRNA and RNAi machinery between cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016 [cited 2020 May 1];6(June):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep27085>
35. Tassetto M, Kunitomi M, Andino R. Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*. *Cell* [Internet]. 2017 Apr [cited 2020 May 1];169(2):314–325.e13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28388413/>

36. Vogel E, Santos D, Mingels L, Verdonck T-W, Broeck J Vanden. RNA Interference in Insects: Protecting Beneficials and Controlling Pests [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Physiology*. 2019 [cited 2020 May 1]. p. 1912. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01912>
37. Wuriyangan H, Rosa C, Falk BW. Oral Delivery of Double-Stranded RNAs and siRNAs Induces RNAi Effects in the Potato/Tomato Psyllid, *Bactericera cockerelli*. *PLoS One* [Internet]. 2011 Nov 16 [cited 2020 Aug 24];6(11):e27736. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027736>
38. Xiong Y, Zeng H, Zhang Y, Xu D, Qiu D. Silencing the HaHR3 gene by transgenic plant-mediated RNAi to disrupt *Helicoverpa armigera* development. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2020 Aug 24];9(4):370–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23630449>
39. Wu K-M, Lu Y-H, Feng H-Q, Jiang Y-Y, Zhao J-Z. Suppression of Cotton Bollworm in Multiple Crops in China in Areas with Bt Toxin-Containing Cotton. *Science* (80-) [Internet]. 2008 Sep 19 [cited 2020 Aug 24];321(5896):1676 LP – 1678. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/321/5896/1676.abstract>
40. Noriega D, Valencia A, Villegas B. ARN de interferencia (ARNi): una tecnología novedosa con potencial para el control de insectos plaga. *Rev UDCA Actual Divulg Científica* [Internet]. 2016 [cited 2020 Sep 10];19(1):25–35. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v19n1/v19n1a04.pdf>
41. Kumar P, Pandit SS, Baldwin IT. Tobacco Rattle Virus Vector: A Rapid and Transient Means of Silencing *Manduca sexta* Genes by Plant Mediated RNA Interference. *PLoS One* [Internet]. 2012 Feb 1 [cited 2020 Sep 10];7(2):e31347. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031347>
42. Gong L, Chen Y, Hu Z, Hu M. Testing Insecticidal Activity of Novel Chemically Synthesized siRNA against *Plutella xylostella* under Laboratory and Field Conditions. *PLoS One* [Internet]. 2013 May 7 [cited 2020 Sep 10];8(5):e62990. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062990>
43. Sáenz A. Susceptibilidad de *Plutella xylostella* a *Heterorhabditis* sp. SL0708 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Rev Colomb Entomol* [Internet]. 2012 [cited 2020 Sep 10];38(1):94–6. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v38n1/v38n1a16.pdf>
44. Deise Cagliari, Ericmar Avila dos Santos, Naymã Dias GS and MZ. Nontransformative Strategies for RNAi in Crop Protection. In 2018 [cited 2020 Sep 10]. p. 1–18. Available from: <https://www.intechopen.com/books/modulating-gene-expression-abridging-the-rnai-and-crispr-cas9-technologies/nontransformative-strategies-for-rnai-in-crop-protection>
45. Šafářová D, Brázda P, Navrátil M. Effect of artificial dsRNA on infection of pea plants by pea seed-borne mosaic virus. *Czech J Genet Plant Breed* [Internet]. 2014 [cited 2020 Sep 10];50(2):105–8. Available from: https://www.agriculturejournals.cz/publicFiles/120_2013-CJGPB.pdf
46. Preall JB, Sontheimer EJ. RNAi: RISC Gets Loaded. *Cell* [Internet]. 2005 [cited 2020 Sep 10];123(4):543–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867405011645>
47. Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* [Internet]. 2004 [cited 2020 Sep 10];431(7006):364–70. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature02875>
48. Feinberg EH, Hunter CP. Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science* [Internet]. 2003 Sep [cited 2020 Sep 12];301(5639):1545–7. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12970568/#:~:text=Here%2C we demonstrate that SID,that systemic RNAi in C](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12970568/#:~:text=Here%2C%20we%20demonstrate%20that%20SID,that%20systemic%20RNAi%20in%20C)
49. Borgio JF. RNAi mediated gene knockdown in sucking and chewing insect pests. *J Biopestic* [Internet]. 2010 [cited 2020 Sep 12];3(1):386–93. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20133182520>
50. Koch A, Biedenkopf D, Furch A, Weber L, Rossbach O, Abdellatif E, et al. An RNAi-Based Control of *Fusarium graminearum* Infections Through Spraying of Long dsRNAs Involves a Plant Passage and Is Controlled by the Fungal Silencing Machinery. *PLOS Pathog* [Internet]. 2016 Oct 13 [cited 2020 Sep 12];12(10):e1005901. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005901>

51. Wang M, Thomas N, Jin H. Cross-kingdom RNA trafficking and environmental RNAi for powerful innovative pre- and post-harvest plant protection. *Curr Opin Plant Biol* [Internet]. 2017/05/29. 2017 Aug [cited 2020 Sep 12];38:133–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28570950>
52. Cagliari D, Dias NP, Galdeano DM, dos Santos EÁ, Smaghe G, Zotti MJ. Management of Pest Insects and Plant Diseases by Non-Transformative RNAi [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Plant Science*. 2019. p. 1319. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.01319>