



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA BASADA EN NANOPARTÍCULAS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE dsRNA Y EL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Kovalovsky-Barreiro MD; García MM; Gallo Horue V; Bestercan L; Perelló AE; Consolo VF; Berón C; Romeo HE; Barreiro Arcos ML.

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina (FICA-UCA), Av. A. Moreau de Justo 1600, 4°Piso, CABA, Argentina. mlbarreiro@uca.edu.ar

DEVELOPMENT OF A NANOPARTICLE-BASED PLATFORM FOR THE CONTROLLED DELIVERY OF dsRNA AND GENE SILENCING IN *SPODOPTERA FRUGIPERDA*

Spodoptera frugiperda (fall armyworm) is one of the most destructive agricultural pests worldwide due to its high reproductive capacity, rapid geographic spread, and increasing resistance to chemical insecticides and *Bacillus thuringiensis* (Bt) crops. RNA interference (RNAi) represents a promising alternative for its sustainable control; however, its application in lepidopteran insects remains challenging due to the instability of double-stranded RNA (dsRNA) and its limited uptake by target cells. This study is part of a broader strategy aimed at developing a nanoparticle-based platform for the controlled delivery of dsRNA and gene silencing in *S. frugiperda*. As an initial stage of the project, dsRNAs targeting the *ATP6V1A* and *ATP6VOC* genes, which encode subunits of the vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase), were designed and successfully synthesized by *in vitro* transcription. The integrity of both dsRNAs was confirmed by agarose gel electrophoresis. In parallel, a laboratory rearing system for *S. frugiperda* was established and optimized, and the insect life cycle was characterized under different temperature conditions to identify suitable conditions for subsequent experimentation. Rearing at 20 °C significantly prolonged the larval stage, providing an extended experimental window that may facilitate future RNAi assays. These results establish the methodological foundations for the next stages of the project. Future work will focus on the formulation and characterization of hybrid chitosan–silica nanoparticles for dsRNA protection and controlled delivery, followed by bioassays to evaluate nanoparticle-mediated dsRNA uptake, gene silencing, and biological effects on *S. frugiperda*. Together, these advances provide the basis for the development of a nanoparticle-assisted RNAi platform for the sustainable management of the fall armyworm.

Palabras claves: *Spodoptera frugiperda*; ARN de doble cadena (dsRNA); Interferencia por ARN (RNAi); Nanopartículas híbridas; V-ATPasa

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; Double-stranded RNA (dsRNA); RNA interference (RNAi); Hybrid nanoparticles; V-ATPase



Introducción

La producción agrícola mundial enfrenta uno de sus principales desafíos en el desarrollo de estrategias eficaces y sustentables para el control de insectos plaga que afectan el rendimiento y la calidad de los cultivos. Entre ellos, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), conocido como gusano cogollero del maíz, constituye una de las especies de mayor impacto económico debido a su elevada capacidad reproductiva, su rápida expansión geográfica y su capacidad para afectar un amplio número de cultivos de importancia económica. Originaria del continente americano, durante la última década esta especie ha expandido rápidamente su distribución hacia África, Asia y Oceanía, transformándose en una amenaza para la seguridad alimentaria mundial y ocasionando pérdidas económicas de gran magnitud en cultivos de maíz, sorgo, arroz, algodón y soja (Tay, 2023).

El ciclo biológico de *S. frugiperda* comprende cuatro estadios -huevo, larva, pupa y adulto- cuya duración depende principalmente de la temperatura ambiental (Fig. 1). La fase larval representa el período de mayor importancia agronómica, ya que constituye el único estadio responsable del daño directo sobre el cultivo. Las larvas atraviesan seis estadios de desarrollo y presentan una elevada capacidad de consumo foliar, pudiendo destruir aproximadamente 180 cm² de tejido vegetal por individuo (Fig. 2). En maíz, los mayores daños se producen durante los estadios vegetativos tempranos (V2–V8), cuando las larvas penetran el cogollo y ocasionan una intensa defoliación que puede traducirse en pérdidas de rendimiento de entre 13 y 60 %, dependiendo del nivel de infestación y del momento en que ocurre el ataque.

Fig. 1: Ciclo biológico de *S. frugiperda*

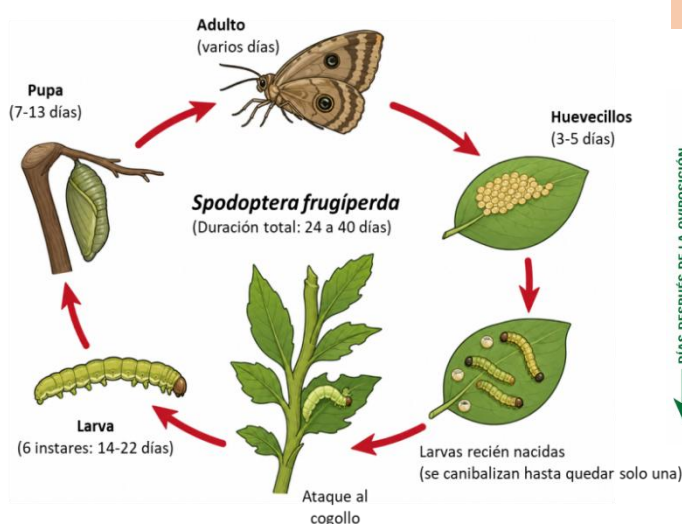


Fig. 2: Estadios larvales de *S. frugiperda* durante el desarrollo



El manejo de esta plaga se basa principalmente en la aplicación de insecticidas químicos y en el cultivo de variedades transgénicas que expresan proteínas insecticidas derivadas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Sin embargo, la presión de selección ejercida por el uso continuado de estas tecnologías ha favorecido la aparición y expansión de poblaciones resistentes, reduciendo progresivamente su eficacia y evidenciando la

necesidad de desarrollar herramientas de control más específicas, sostenibles y compatibles con los programas de manejo integrado de plagas.

En este contexto, la interferencia por ARN (RNAi) ha emergido como una de las estrategias biotecnológicas más prometedoras para el control selectivo de insectos plaga. Este mecanismo fisiológico, altamente conservado entre eucariotas, se basa en la introducción de moléculas de ARN de doble cadena (dsRNA) capaces de inducir el silenciamiento específico de genes esenciales para la supervivencia del organismo (Kebede y Fite, 2022). A diferencia de los insecticidas convencionales, el RNAi permite actuar exclusivamente sobre la especie objetivo, disminuyendo el impacto sobre organismos benéficos y reduciendo los riesgos ambientales asociados al control químico (Kebede y Fite, 2022). No obstante, la aplicación del RNAi en lepidópteros continúa representando un desafío. Después de su aplicación sobre el tejido vegetal, el dsRNA puede degradarse rápidamente por efecto de factores ambientales y de nucleasas presentes en el intestino medio y la hemolinfa del insecto, reduciendo significativamente su estabilidad y biodisponibilidad. A ello se suma la baja eficiencia de internalización celular característica de este orden de insectos, lo que limita la magnitud del silenciamiento génico y, en consecuencia, su eficacia biológica (Cooper, 2019; Kebede y Fite, 2022). Estas limitaciones constituyen actualmente uno de los principales obstáculos para la implementación del RNAi como herramienta de control de *S. frugiperda* en condiciones de campo.

En los últimos años, la nanotecnología ha surgido como una estrategia innovadora para superar estas limitaciones mediante el desarrollo de sistemas capaces de proteger el dsRNA frente a la degradación y favorecer su liberación controlada en el sitio de acción. Entre las distintas plataformas disponibles, las nanopartículas híbridas de quitosano y sílice representan una alternativa particularmente atractiva (Kaarow, 2026). El quitosano, un polisacárido catiónico biocompatible y biodegradable, interactúa electrostáticamente con los grupos fosfato del ARN formando complejos estables que aumentan la protección del material genético. La sílice, por su parte, aporta estabilidad estructural, elevada capacidad de carga y propiedades que permiten modular la liberación del dsRNA. La combinación de ambos materiales permite desarrollar nanoestructuras con potencial para incrementar la estabilidad del ARN, mejorar su transporte hacia las células del intestino medio y aumentar la eficiencia del silenciamiento génico (Arjunan, 2024) (Fig. 3).

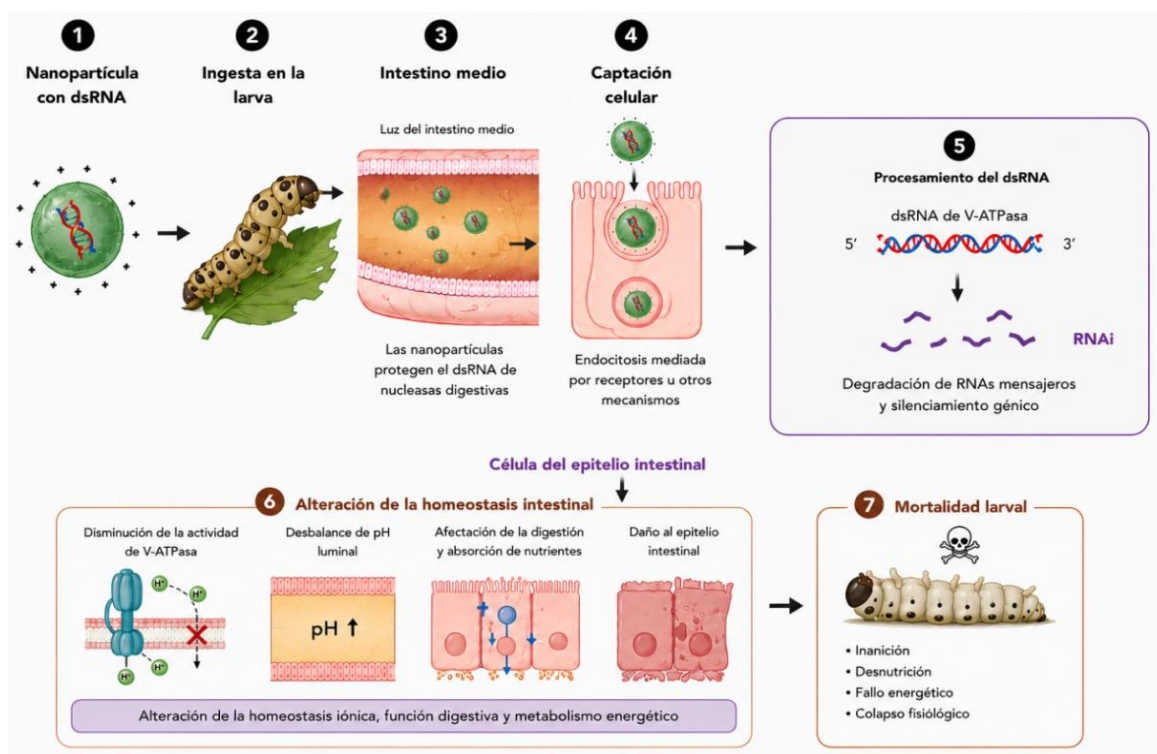
En este escenario, la integración entre nanotecnología e interferencia por ARN representa una estrategia innovadora para el desarrollo de bioinsumos de nueva generación destinados al manejo sustentable de plagas agrícolas. La obtención de plataformas de liberación controlada de dsRNA no solo podría incrementar la eficacia del RNAi frente a *S. frugiperda*, sino también establecer una tecnología adaptable a otras especies de importancia agrícola, contribuyendo al desarrollo de sistemas productivos más eficientes y ambientalmente responsables.



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

Fig. 3: Mecanismo de acción propuesto de las nanopartículas híbridas quitosano-sílíce para la liberación de dsRNA dirigido contra la V-ATPasa y sus efectos biológicos en *S. frugiperda*



Luego de su ingestión por las larvas, las nanopartículas híbridas protegen los dsRNA frente a la degradación por nucleasas y favorecen su internalización en las células del epitelio intestinal. Los dsRNA son posteriormente procesados para generar RNAi, promoviendo el silenciamiento de los genes *ATP6V1A* y *ATP6VOC* y la degradación específica de sus respectivos ARNm. El silenciamiento simultáneo de ambas subunidades comprometería la actividad de la V-ATPasa, alterando el transporte de protones, la homeostasis iónica y el pH intestinal, con potenciales efectos sobre la absorción de nutrientes, el crecimiento, la alimentación y la supervivencia larval.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una estrategia biotecnológica basada en RNAi y nanotecnología para el control sustentable de *S. frugiperda*, orientada al silenciamiento de genes esenciales de la ATPasa vacuolar de H^+ (V-ATPasa) mediante dsRNA y a su futura vehiculización en nanopartículas híbridas de quitosano-sílíce.

Objetivos específicos

- Establecer y validar moléculas de dsRNA dirigidas contra los genes *ATP6V1A* y *ATP6VOC* de *S. frugiperda*, como herramientas moleculares para el silenciamiento de componentes esenciales de la V-ATPasa.
- Establecer las condiciones experimentales de cría de *S. frugiperda* que permitan obtener poblaciones biológicamente homogéneas y definir el estadio larval más adecuado para la evaluación posterior de estrategias de RNAi.

- Desarrollar, como siguiente etapa del proyecto, una plataforma de nanoformulación basada en nanopartículas híbridas de quitosano-sílice capaz de proteger los dsRNA frente a la degradación y favorecer su liberación e incorporación por las células epiteliales del intestino de *S. frugiperda*.
- Evaluar posteriormente la capacidad de las nanoformulaciones para inducir el silenciamiento simultáneo de los genes ATP6V1A y ATP6V0C, así como su efecto sobre el desarrollo, supervivencia y consumo foliar de *S. frugiperda*, con miras al desarrollo de una plataforma nanotecnológica para el manejo sustentable del gusano cogollero del maíz.

Materiales y métodos

Cría y mantenimiento de *S. frugiperda*

Se estableció una colonia de *S. frugiperda* mantenida en condiciones controladas de laboratorio con el objetivo de disponer de un sistema biológico estandarizado para el desarrollo de los ensayos moleculares y biológicos. Las larvas fueron criadas individualmente para evitar fenómenos de canibalismo y mantenidas sobre una dieta artificial formulada a base de leguminosas y fuentes proteicas, suplementada con vitaminas y antibióticos (Kaarow, 2026). Los adultos emergidos fueron alojados en recipientes provistos de una solución de agua y miel como fuente de alimento y papel como sustrato para la oviposición. Las masas de huevos fueron recolectadas periódicamente para asegurar la renovación continua de la colonia. Como parte de la estandarización del modelo experimental, se evaluó la duración del ciclo biológico del insecto bajo diferentes condiciones de temperatura con el propósito de establecer las condiciones de cría más apropiadas para los futuros bioensayos y determinar el estadio larval óptimo para la aplicación de tratamientos sobre hojas de maíz.

Diseño bioinformático y síntesis de dsRNA

Las secuencias de dsRNA dirigidas contra las subunidades ATP6V1A y ATP6V0C de la V-ATPasa fueron diseñadas utilizando las secuencias génicas depositadas en GenBank (NCBI). Para la obtención de los moldes de ADN se extrajo ARN total a partir de intestinos medios de larvas utilizando TRIzol® (Invitrogen), seguido de la síntesis de ADN complementario (cDNA) mediante transcriptasa reversa. A partir del cDNA se amplificaron fragmentos específicos correspondientes a los genes ATP6V1A y ATP6V0C empleando cebadores que incorporaron la secuencia promotora T7 en ambos extremos. Los productos de PCR fueron utilizados como moldes para la síntesis *in vitro* de ARN utilizando el sistema TranscriptAid™ T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific). Posteriormente, las hebras sentido y antisentido fueron purificadas, cuantificadas e hibridadas para generar las correspondientes moléculas de dsRNA. La integridad de los productos obtenidos fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa y su concentración determinada por espectrofotometría. Como control negativo se sintetizó un dsRNA no específico, ausente en el genoma de *S. frugiperda*.



50 AÑOS
PENSANDO
EL FUTURO

XIII
CONGRESO
NACIONAL
DE MAÍZ

Desarrollo de nanopartículas híbridas para la liberación controlada de dsRNA

Como siguiente etapa del estudio, actualmente en desarrollo, se plantea la obtención de nanopartículas híbridas de quitosano-sílice destinadas a la encapsulación simultánea de los dsRNA dirigidos contra ATP6V1A y ATP6V0C.

La estrategia de formulación se basa en un proceso de ensamblaje secuencial en el cual las moléculas de dsRNA serán complejadas con quitosano mediante interacciones electrostáticas entre los grupos amino protonados del polímero y los grupos fosfato del ARN. Posteriormente, estos nanocomplejos serán incorporados a una matriz de sílice obtenida mediante síntesis sol-gel utilizando tetraetilortosilicato como precursor, dando origen a nanopartículas híbridas quitosano-sílice (Yan, 2009). La co-encapsulación de ambos dsRNA en una misma nanopartícula busca favorecer el silenciamiento simultáneo de dos componentes funcionalmente complementarios de la V-ATPasa y aumentar la eficiencia global de la respuesta de RNAi.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

Una vez obtenidas las nanopartículas, se determinarán su tamaño hidrodinámico, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta utilizando dispersión dinámica de luz (DLS) (Danaei, 2018). La morfología será evaluada mediante microscopía electrónica de transmisión y la eficiencia de encapsulación (EE%) será determinada cuantificando espectrofotométricamente el dsRNA libre presente en el sobrenadante luego de la separación de los nanocomplejos por centrifugación, mediante la siguiente ecuación: $EE\ (%) = [(dsRNA\ total - dsRNA\ libre) / dsRNA\ total] \times 100$. Asimismo, se evaluará la estabilidad fisicoquímica de las nanoformulaciones y su capacidad para proteger el dsRNA frente a condiciones que simulan el ambiente intestinal de *S. frugiperda* (Ioannidis, 2022).

Evaluación biológica

En las etapas posteriores del proyecto se realizarán bioensayos utilizando hojas de maíz tratadas con las diferentes formulaciones experimentales. La selección del estadio larval para estos ensayos se realizará a partir de la información obtenida durante la caracterización del ciclo biológico, priorizando las condiciones que permitan maximizar el tiempo de exposición al tratamiento.

La eficacia del silenciamiento génico será evaluada mediante RT-qPCR determinando la expresión relativa de los genes ATP6V1A y ATP6V0C. Además, se analizarán parámetros biológicos, como consumo foliar, incremento de peso, duración de los estadios larvales, supervivencia y mortalidad, con el propósito de establecer la relación entre la respuesta molecular inducida por el RNAi y sus efectos fisiológicos.

Resultados

Diseño y síntesis de dsRNA dirigidos contra la V-ATPasa de *S. frugiperda*

Como primera etapa del estudio, se diseñaron mediante herramientas bioinformáticas moléculas de dsRNA dirigidas contra las subunidades ATP6V1A y ATP6V0C de la V-ATPasa de *S. frugiperda*. Para la selección de las regiones blanco se priorizaron secuencias específicas de la especie y con baja homología con otros

organismos, con el propósito de favorecer la especificidad del silenciamiento génico y reducir el riesgo de potenciales efectos *off-target*.

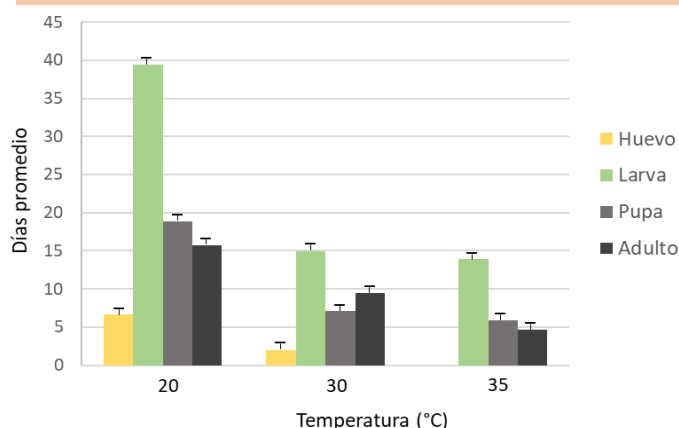
A partir de los moldes de ADN obtenidos mediante RT-PCR, ambas moléculas de dsRNA fueron sintetizadas mediante transcripción *in vitro*. La integridad y el tamaño esperado de los productos obtenidos se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa, confirmándose la obtención de los dsRNA correspondientes a ATP6V1A y ATP6VOC. Estos resultados permitieron disponer de las moléculas de dsRNA necesarias para las etapas posteriores de evaluación de la estrategia de RNAi.

La selección de estos dos genes se fundamenta en su participación en la función de la V-ATPasa, un complejo proteico esencial para el transporte de protones y el mantenimiento de la homeostasis ácido-base celular. En particular, la alteración de componentes de esta ATPasa ha sido propuesta como una estrategia potencial para interferir con procesos fisiológicos esenciales en insectos. La evaluación del silenciamiento génico y de sus consecuencias sobre el desarrollo y la supervivencia de *S. frugiperda* será abordada en etapas posteriores del proyecto.

Optimización del ciclo biológico de *S. frugiperda*

En paralelo al desarrollo de las herramientas moleculares, se establecieron y optimizaron las condiciones de mantenimiento de la colonia experimental mediante la caracterización del ciclo biológico de *S. frugiperda* bajo diferentes condiciones de temperatura. Los resultados obtenidos demostraron que el mantenimiento de las larvas a 20°C prolonga significativamente la duración del estadio larval respecto de temperaturas superiores (Fig. 4). Este comportamiento resulta particularmente relevante desde el punto de vista metodológico, ya que incrementa la ventana temporal disponible para la aplicación de tratamientos sobre hojas de maíz y facilita el seguimiento de los efectos biológicos inducidos por el RNAi durante el período de mayor actividad alimentaria del insecto. La caracterización del desarrollo bajo diferentes condiciones térmicas permitió, asimismo, establecer condiciones reproducibles de cría y generar una base experimental para seleccionar el estadio larval más apropiado para la aplicación de tratamientos con dsRNA y, posteriormente, con las nanoformulaciones. En este sentido, la optimización del sistema de cría constituye un componente metodológico fundamental para garantizar condiciones experimentales homogéneas durante las etapas siguientes del proyecto.

Fig. 4: Efecto de la temperatura sobre la duración de los estadios de desarrollo de *S. frugiperda*



Efecto de la temperatura de cría sobre la duración de los distintos estadios del ciclo biológico de *S. frugiperda*. La cría a 20°C incrementó la duración del estadio larval en comparación con 30 y 35°C, constituyendo la condición seleccionada para los futuros bioensayos de alimentación con hojas de maíz tratadas con nanoformulaciones.

Discusión y Conclusiones

La obtención de dsRNA dirigidos contra ATP6V1A y ATP6V0C, junto con la optimización de las condiciones de cría de *S. frugiperda*, establece las bases moleculares y experimentales para la implementación de la estrategia propuesta. La prolongación del estadio larval permite ampliar la ventana experimental para la aplicación de futuras nanoformulaciones. Como siguiente etapa, se desarrollarán y caracterizarán nanopartículas híbridas de quitosano-sílice para proteger y liberar los dsRNA de manera controlada, y se evaluará su capacidad para promover el silenciamiento génico y afectar el desarrollo y la supervivencia de *S. frugiperda*. Esta plataforma podría, a futuro, adaptarse al control de otras especies de insectos plaga de importancia agrícola.

Apoyo financiero

Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias (FICA), Universidad Católica Argentina (UCA)

Bibliografía

- Arjunan N.; Thiruvengadam V.; Sushil S.N. (2024). Nanoparticle-mediated dsRNA delivery for precision insect pest control: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 355.
- Cooper A.M.; Silver K.; Zhang J.; Park Y.; Zhu K.Y. (2019). Molecular mechanisms influencing efficiency of RNA interference in insects. *Pest Management Science*, 75(1), 18–28.
- Danaei M.; Dehghankhold M.; Ataei S.; Hasanzadeh Davarani F.; Javanmard R.; Dokhani A.; Khorasani S.; Mozafari M.R. (2018). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2), 57.
- Ioannidis P.; Buer B.; Ilias A.; Kaforou S.; Aivaliotis M.; Orfanoudaki G.; Douris V.; Geibel S.; Vontas J.; Denecke S. (2022). A spatiotemporal atlas of the lepidopteran pest *Helicoverpa armigera* midgut provides insights into nutrient processing and pH regulation. *BMC Genomics*, 23(1), 75.
- Kaarow M.; Graser L.; Knorr E.; Windfelder A.; Geisler P.; Steiniger F.; Oberpaul M.; Vilcinskis A.; Hellmann C. (2026). Enhancing the delivery and stability of lipid nanoparticle-dsRNA formulations in the RNAi-recalcitrant fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *Frontiers in Insect Science*, 6, 1770055.
- Kebede M.; Fite T. (2022). RNA interference (RNAi) applications to the management of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Its current trends and future prospects. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 944774.
- Tay W.T.; Meagher R.L.; Czepak C.; Groot A.T. (2023). *Spodoptera frugiperda*: Ecology, evolution, and management options of an invasive species. *Annual Review of Entomology*, 68, 299–317.
- Yan E.; Ding Y.; Chen C.; Li R.; Hu Y.; Jiang X. (2009). Polymer/silica hybrid hollow nanospheres with pH-sensitive drug release in physiological and intracellular environments. *Chemical Communications*, 19, 2718–2720.