



(<https://debug.globalseafood.org>)



## Potencial de edición del genoma para mejorar la cría y producción de acuicultura, Parte 2

14 October 2019

By Remi L. Gratacap, Ph.D. , Anna Wargelius, Ph.D. , Rolf Brudvik Edvardsen, Ph.D. and Prof. Ross D. Houston, Ph.D.

Acelerando las ganancias genéticas, los desafíos técnicos, la aceptación pública y reglamentaria, y las perspectivas



La tecnología de edición del genoma CRISPR / Cas9 ya se ha aplicado con éxito a varias especies cultivadas, incluida la tilapia (izquierda; foto de Darryl Jory) y el bagre de canal (derecha; foto de Ryan Somma, Wikimedia Commons).

*Nota del editor: este artículo es la parte 2 de la **publicación original** (<https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.06.006>), adaptada y resumida aquí. **La parte 1 se puede encontrar aquí** ([https://www.aquaculturealliance.org/advocate/edicion-del-genoma/?\\_hstc=236403678.9c20a14dfc751ac530a850121cb6ffa7.1680958467607.1680958467607.1680958467607.1&\\_hssc=236403678.1.1680958467608&\\_hsfp](https://www.aquaculturealliance.org/advocate/edicion-del-genoma/?_hstc=236403678.9c20a14dfc751ac530a850121cb6ffa7.1680958467607.1680958467607.1680958467607.1&_hssc=236403678.1.1680958467608&_hsfp)).*

### Arreglando alelos en QTL existente

La detección y utilización de variantes causales para un locus de rasgos cuantitativos [QTL; un locus (sección de ADN) que se correlaciona con la variación de un rasgo cuantitativo en el fenotipo de una población de organismos] a menudo es un primer paso para identificar y secuenciar los genes reales que causan la variación del rasgo. Efectuar los rasgos de producción es un objetivo fundamental de la mayoría de las investigaciones genéticas y de cría de animales, aunque con pocas historias de éxito hasta la fecha. Las simulaciones han demostrado que aprovechar la edición del genoma para alelos causales favorables en múltiples QTL como parte de un programa de reproducción tiene el potencial de acelerar la ganancia genética en comparación con el pedigrí o la selección genómica sola.

Sin embargo, un desafío importante para la aplicación efectiva de este enfoque es la identificación exitosa de la variación causal que sustenta los QTL, particularmente aquellos de pequeño efecto. Para lograr esto, se puede aplicar un conjunto de tecnologías genéticas y genómicas a la lista reducida de variantes candidatas identificadas a partir de estudios de asociación a gran escala del genoma (Fig. 1). El mismo enfoque podría usarse para eliminar las variantes perjudiciales que son inevitables en las poblaciones, tanto las variantes de gran efecto (por ejemplo, mutaciones letales recesivas) como las cargas perjudiciales más poligénicas. Sin embargo, un desafío para los rasgos poligénicos (un rasgo cuyo fenotipo está influenciado por más de un gen) es la necesidad de editar múltiples alelos simultáneamente en los mismos animales reproductores para lograr un impacto notable utilizando este enfoque y, por lo tanto, desarrollo y mejora. Se requieren enfoques de edición múltiple del genoma (donde se manipulan múltiples genes).

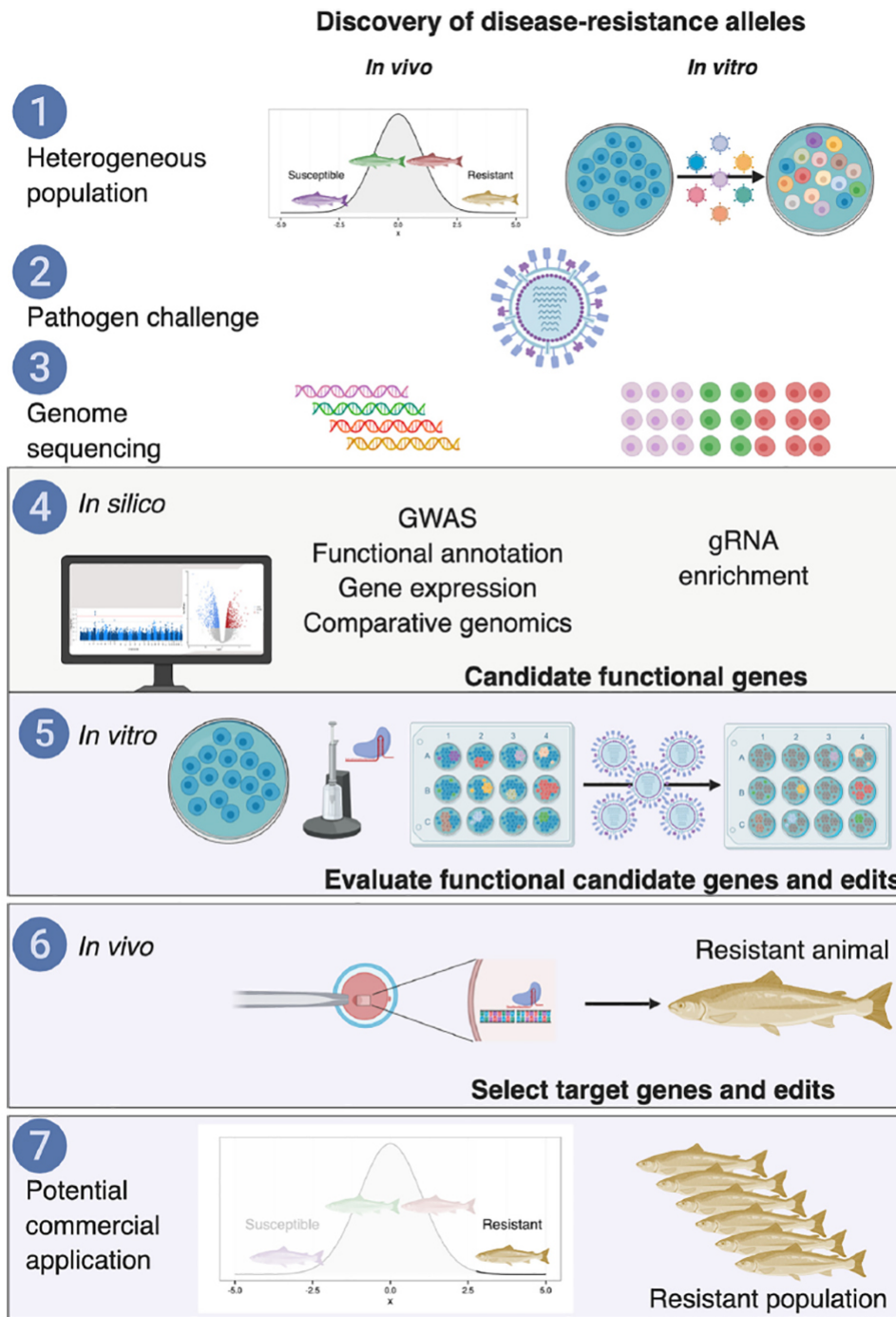


Fig. 1: Combinando enfoques de cribado in vivo e in vitro para identificar, probar y aplicar alelos resistentes a enfermedades en especies de acuicultura. Pantallas in vivo: (1) comience con una población heterogénea de peces; (2) desafiar con un patógeno de interés; (3) secuenciación y / o genotipado de animales resistentes y susceptibles; (4) enfoques de estudio de asociación de genoma a gran escala (GWAS) combinados con genómica funcional y comparativa para detectar alelos de resistencia a enfermedades naturales en poblaciones de acuicultura comercial. Exámenes in vitro: (1) enfoques agrupados de eliminación de CRISPR (GeCKO) que dan como resultado una población heterogénea de células; (2) seguido de una selección positiva o negativa después de un desafío de patógeno y; (3) secuenciación a; (4) pantalla para (g)RNA o (g)ARN enriquecidos que pueden descubrir nuevos alelos de resistencia a enfermedades. Los genes funcionales candidatos identificados por uno o ambos enfoques se llevan adelante para la prueba y caracterización in vitro (5) e in vivo (6), y luego la aplicación potencialmente comercial, lo que resulta en una población de animales con una resistencia a la enfermedad notablemente aumentada (7).

**Un canal para el descubrimiento de variantes causales de rasgos complejos relevantes para la producción acuícola**

La preselección de las supuestas variantes funcionales que subyacen a QTL como objetivos potenciales para CRISPR / Cas9 in vivo requerirá un esfuerzo de investigación considerable, y puede incluir: (i) comparación de la expresión génica de animales con fenotipos dispares para los rasgos de interés; (ii) anotación funcional de polimorfismos (la aparición de dos o más formas o morfos claramente diferentes, también llamados fenotipos alternativos, en la población de una especie) dentro de las regiones genómicas de interés; (iii) genómica comparativa, incluida la conservación filogenética (evolutiva) de la región; y (iv) detección de variantes que afectan la expresión génica de loci candidatos dentro de estas regiones (por ejemplo, expresión QTL o expresión específica de alelo).

El impacto de las ediciones específicas en los genes candidatos se puede probar in vivo e in vitro utilizando una combinación de genes inactivados y, en última instancia, experimentos de "intercambio de alelos" mediante reparación dirigida por homología (HDR; un mecanismo en las células para reparar lesiones de ADN de doble cadena) como una plantilla para cambiar la versión desfavorable de un alelo en un QTL a una versión favorable antes de evaluar el impacto en el fenotipo objetivo. Esta gama de tecnologías puede incluir en la lista los miles de variantes candidatas dentro de las regiones QTL hasta la probable variante causal. El rápido desarrollo de las tecnologías genómicas en peces ayudará en gran medida a este proceso. Por ejemplo, los ensamblajes del genoma de referencia ahora están disponibles para la mayoría de las especies acuícolas, y el enfoque ahora está en mejorar estos ensamblajes y, en particular, en la anotación funcional para descubrir regiones funcionalmente relevantes (por ejemplo, cromatina abierta, promotores, potenciadores, etc.).

#### **Introgresión por edición: acceso a alelos de diferentes cepas o especies**

Una de las posibilidades emocionantes de la edición del genoma es acceder a la variación genética fuera de las poblaciones reproductoras cerradas, sin la necesidad de una introgresión costosa y que consume mucho tiempo [el movimiento de un gen (flujo de genes) de una especie al acervo genético de otra especie a través del repetido retrocruzamiento de un híbrido interespecífico con uno de sus programas parentales], o en casos donde la introgresión es imposible.

Es común que una cepa particular de animales de granja, o una especie estrechamente relacionada, tenga una característica deseable. Si se pueden identificar los alelos responsables de esa variación intra o interespecífica en el fenotipo, entonces la tecnología CRISPR potencialmente permite editar el alelo desfavorable en la cepa y / o especie objetivo para que corresponda a la secuencia del alelo favorable encontrado en la cepa relacionada o especies (es decir, introgresión por edición). En otras palabras, ofrece nuevas oportunidades para evitar la introgresión tradicional, evitando así las desventajas asociadas con el arrastre de enlace (por ejemplo, los efectos negativos sobre la tasa de crecimiento asociados con la introgresión de alelos de cepas salvajes), y permite el acceso a la variación genética en otras cepas y especies eso no sería posible utilizando métodos convencionales de cría selectiva.

Desde un punto de vista pragmático, las primeras aplicaciones de tales enfoques de introgresión por edición deberán ser prometedoras para los impactos transformadores en la producción para justificar el extenso esfuerzo de investigación y desarrollo requerido. En el salmón del Atlántico, los copépodos parásitos piojos marinos (*Lepeophtheirus salmonis* en el hemisferio norte y *Caligus rogercresseyi* en el hemisferio sur) tienen un impacto devastador en la acuicultura sostenible, con un impacto económico de más de \$ 880 millones por año a nivel mundial. Un aspecto único de la acuicultura es la proximidad de las especies cultivadas a las especies y poblaciones silvestres existentes que pueden tener características deseables. Por ejemplo, ciertas especies de salmón del Pacífico, como el salmón coho y el salmón rosado, son en gran medida resistentes a los piojos de mar y pueden montar una respuesta inmune exitosa contra el parásito. Esto aumenta la atractiva posibilidad de transferir mecanismos de resistencia al salmón del Atlántico, y se han realizado importantes esfuerzos de investigación para identificar los factores subyacentes a las diferencias relativas en los mecanismos de resistencia del huésped.

Debido a su resistencia significativa a los piojos de mar y su desarrollo de una respuesta inmune exitosa contra los piojos de mar, el salmón coho ha recibido importantes esfuerzos de investigación sobre la posibilidad de transferir los mecanismos de resistencia al salmón del Atlántico. Foto de la Oficina de Administración de Tierras de Oregón y Washington. Dominio público.

Es plausible que haya genes reguladores clave en las vías que sustentan la resistencia diferencial entre las especies que podrían modificarse en el salmón del Atlántico para imitar la respuesta a los piojos de mar exhibidos por el salmón coho. Esto puede ser una edición dirigida de la secuencia de codificación y / o la modulación de la secuencia reguladora para mejorar o suprimir la expresión de estos genes clave de respuesta del huésped. Sin embargo, las diferencias temporales y / o espaciales en la expresión génica a menudo tienen un impacto significativo en un rasgo dado, y la modificación general de la expresión puede no lograr el efecto deseado.

#### **Crear variantes de novo basadas en el conocimiento del rasgo**

Si bien la edición del genoma basada en la variación genética existente (ya sea dentro de la cepa cultivada, o mediante introgresión por edición) da lugar a posibilidades de mayores beneficios en la producción animal, creando alelos favorables de novo (es decir, aquellos que son distintos de los que ocurren naturalmente alelos, a lo mejor de nuestro conocimiento) es otra vía emocionante y ya ha dado lugar a posibles soluciones para la producción animal y los problemas de bienestar. En este enfoque, se pueden crear nuevos alelos utilizando CRISPR / Cas9 basado en el conocimiento a priori de la biología del rasgo de interés, o de enfoques de perturbación genética del genoma para identificar genes candidatos que influyen en el rasgo. Un ejemplo de lo primero es el desarrollo de la resistencia al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) en cerdos, donde se utilizó la edición del genoma para eliminar el gen CD163, lo que resultó en un animal viable que le falta el receptor completo, o creó un receptor modificado mediante la eliminación de un exón específico y su dominio de proteína asociado.

Se han utilizado enfoques similares en acuicultura, incluida la modificación de un alelo para inducir la esterilidad en el salmón del Atlántico y el objetivo del gen *mstn1* en varias especies de peces para aumentar el crecimiento. Alternativamente, las pantallas genéticas inversas pueden facilitar el descubrimiento de alelos de novo que afectan los rasgos de interés. Tales pantallas CRISPR / Cas9 de todo el genoma se pueden realizar en líneas celulares y pueden proporcionar objetivos de novo para pruebas posteriores y edición potencial in vivo, en particular para rasgos de resistencia a enfermedades.

#### **Pantallas CRISPR agrupadas para resistencia a enfermedades**

Una de las técnicas más poderosas que surgieron del advenimiento de la edición CRISPR / Cas9 es el enfoque de eliminación de CRISPR en todo el genoma (GeCKO). Esto comprende crear una biblioteca de decenas de miles de ARN de guía objetivo (ARNg; uno de los dos componentes de los sistemas CRISPR diseñados) para apuntar a cada gen en el organismo objetivo, seguido de síntesis, empaquetamiento en un vector lentivirus y transducción de la línea celular expresando Cas9 con una dosis baja con el objetivo de aproximadamente una integración de ARNg por célula. La línea celular luego se analiza (por ejemplo, usando un desafío de patógeno) y las células seleccionadas (sobrevivientes, marcadas con fluorescencia u otro marcador de selección) se secuencian. Después de la selección, el enriquecimiento o el agotamiento de los ARNg informa el papel de los genes diana en el fenotipo bajo investigación.

Un importante cuello de botella para la investigación en acuicultura es la falta de líneas celulares adecuadas, bien probadas y caracterizadas para muchas especies de interés. De hecho, para muchas especies de crustáceos y moluscos, no hay líneas celulares inmortalizadas bien establecidas. El desarrollo de tales plataformas hará que los enfoques de detección en todo el genoma sean una posibilidad más realista en las principales especies de acuicultura. En la actualidad, CRISPR / Cas9 en cultivo celular se encuentra en una etapa formativa en especies de peces, aunque con resultados tempranos prometedores.

Es necesario optimizar varios aspectos de la edición del genoma in vitro en especies acuícolas, incluidos los métodos para la integración genómica de insertos grandes y la optimización de qué promotor utilizar para impulsar la expresión del ARNg en las diferentes especies y sistemas. Las infecciones virales (y la resistencia a esas infecciones) son rasgos objetivo de alta prioridad para los estudios in vitro que utilizan CRISPR / Cas9, porque los mecanismos innatos de respuesta del huésped suelen ser intrínsecos a las células y, por lo tanto, susceptibles de ser interrogados en líneas celulares inmortalizadas existentes.

El desarrollo de esta tecnología ayudaría a facilitar la integración de pantallas genéticas a gran escala para informar la biología que sustenta la resistencia a las enfermedades y proporcionar una tubería de alelos candidatos para su aplicación a la cría comercial de acuicultura. La generación de animales objetivo estables Cas9 puede facilitar las líneas celulares primarias que son susceptibles de edición, y el desarrollo futuro de líneas celulares inmortalizadas (una población de células de un organismo multicelular que normalmente no proliferaría indefinidamente, pero debido a la mutación ha evadido la senescencia celular normal y en cambio puede seguir sufriendo división. Por lo tanto, las células pueden crecer durante períodos prolongados in vitro) a partir de tejidos objetivo y / o tipos de células que amplían la aplicabilidad de los enfoques de GeCKO a una gama más amplia de especies acuícolas.

#### **Desafíos técnicos a superar**

Hay varios obstáculos técnicos importantes que deben abordarse para maximizar las posibilidades de aplicar enfoques de edición del genoma en especies acuícolas. Primero, en especies donde CRISPR / Cas9 ya se ha aplicado, se requiere la optimización de métodos para maximizar la eficiencia de edición, minimizar los efectos fuera del objetivo y reducir el problema del mosaicismo (la presencia de dos o más poblaciones de células con genotipos diferentes en un individuo que se ha desarrollado a partir de un solo huevo fertilizado) en la generación F0. La edición fuera del objetivo, que puede dar lugar a modificaciones inespecíficas y no específicas del genoma, también puede provocar impactos no deseados en el organismo. Un mejor conocimiento de las secuencias del genoma de las especies acuícolas ayudará con el diseño de ARNg específicos para una sola región objetivo, y el costo relativamente modesto de la resecuenciación de todo el genoma puede facilitar la detección de rutina para eventos de edición fuera del objetivo.

Para seleccionar rápidamente los ARNm óptimos, las construcciones se pueden probar en cultivo celular antes de la edición in vivo. Particularmente para especies donde el acceso a embriones recién fertilizados es difícil, como ciertas especies de camarones, podrían probarse métodos alternativos de suministro de CRISPR / Cas9, que incluyen transferencia mediada por espermatozoides, microinyección de óvulos no fertilizados y edición de células germinales primordiales. Otro enfoque para enriquecer los alelos editados de interés es el trasplante de células germinales de animales con una edición deseada, en múltiples sustitutos estériles. Los enfoques análogos se están utilizando con éxito para la edición en pollos, y la transferencia de habilidades y tecnologías del ganado terrestre y los organismos modelo a las especies acuícolas será clave para el éxito de este enfoque.

Para algunas especies de camarones donde el acceso a embriones recién fertilizados es difícil, podrían probarse métodos alternativos de suministro de CRISPR / Cas9, como la transferencia mediada por esperma, la microinyección de óvulos no fertilizados y la edición de células germinales primordiales. Foto de Fernando Huerta.

### Factores que afectan la aceptación pública y regulatoria

La innovación en tecnología es esencial para avanzar en la producción de alimentos para abordar la creciente demanda mundial. La tecnología CRISPR / Cas9 tiene el potencial emocionante de contribuir a la mejora en la cantidad, calidad y sostenibilidad de la producción de productos de mar a nivel mundial. Sin embargo, la aceptación pública y reguladora son clave para que su potencial se realice.

Existe un debate considerable sobre la definición de modificación genética (GM) y si los enfoques de edición del genoma deben considerarse por separado. Si la edición del genoma se considera por separado, las diferentes aplicaciones discutidas anteriormente pueden estar sujetas a diferentes regulaciones. Por ejemplo, los animales de edición del genoma podrían crearse con solo cambios de una sola base en su genoma que correspondan a los polimorfismos existentes en las poblaciones de cultivo y / o silvestres. Alternativamente, se pueden crear alelos de novo que están ausentes en la naturaleza a lo mejor de nuestro conocimiento. El primero puede ser más aceptable para el público y podría estar sujeto a procedimientos regulatorios menos estrictos. Sin embargo, la decisión del Tribunal de Justicia de las Comunidades Europeas de que los cultivos editados con genoma deberían considerarse organismos modificados genéticamente probablemente dificultará la aplicación a escala comercial de la edición del genoma en especies cultivadas en la UE.

Sin embargo, es notable que un salmón GM (el salmón AquaBounty con un gen de hormona de crecimiento transgénico) haya sido aprobado para consumo humano por la FDA y la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos. Además, una línea de tilapia derivada de la edición del genoma por la misma compañía ha quedado exenta de la regulación de GM en Argentina. Está claro que habrá una larga incertidumbre sobre la regulación de los animales editados, y el proceso variará considerablemente en diferentes países.

Por lo tanto, es clave un amplio compromiso con el público y otras partes interesadas para facilitar decisiones basadas en el conocimiento sobre los beneficios y riesgos de las tecnologías. Desde el punto de vista de la aceptación pública, es importante considerar la naturaleza de los rasgos objetivo y si los beneficios potenciales van más allá de la producción y las ganancias sostenibles. Por ejemplo, los rasgos como la esterilidad también tienen beneficios aguas abajo para el medio ambiente y las poblaciones silvestres, y los rasgos como la resistencia a las enfermedades tienen beneficios concurrentes sustanciales para el bienestar animal.

### Perspectivas

La acuicultura es el sector de producción de alimentos de más rápido crecimiento, está asumiendo rápidamente una mayor importancia que la pesca de captura, y se considera un componente esencial de la seguridad alimentaria y nutricional, particularmente en el mundo en desarrollo. El uso de la genética y las tecnologías de mejoramiento en la acuicultura está aumentando rápidamente, con el desarrollo de programas de mejoramiento de alta tecnología para muchas de las especies acuícolas más importantes del mundo. La mayoría de las especies acuáticas cultivadas están cerca de los ancestros salvajes, y esto ofrece un recurso importante sin explotar para mejorar la producción sostenible de mariscos de la acuicultura. Además, la fertilización externa y la alta fecundidad de las especies acuícolas ofrecen oportunidades interesantes para estudios genéticos de alta resolución para comprender y mejorar rasgos complejos.

Las tecnologías de edición del genoma, como CRISPR / Cas9, tienen un potencial significativo para acelerar la ganancia genética para los rasgos de producción. Las enfermedades infecciosas son una de las principales limitaciones para la producción acuícola y, por lo tanto, un objetivo importante para los enfoques selectivos de reproducción y edición del genoma. La resistencia del huésped a ciertos patógenos es un rasgo adecuado para el uso de tecnologías de edición del genoma debido a la dificultad en la medición no destructiva del rasgo en los candidatos de reproducción, la plausibilidad de utilizar pantallas CRISPR agrupadas en todo el genoma del cultivo celular y la disponibilidad frecuente de precoces vida en vivo modelos de desafío establecidos.

Las diferentes categorías de aplicaciones de edición del genoma incluyen: (i) descubrimiento de variantes causales subyacentes a QTL individuales o múltiples que afectan a los rasgos de interés, y la posterior fijación de los alelos favorables mediante la edición; (ii) introgresión por edición de alelos favorables en sistemas de reproducción cerrados de otras poblaciones, cepas o especies; y (iii) creación y uso de alelos de novo con efectos positivos sobre el rasgo de interés. La edición del genoma junto con los enfoques genéticos y genómicos establecidos permite la detección y la preselección de variantes funcionales candidatas para la validación in vivo aguas abajo y la posible aplicación comercial.

Si bien varias prioridades de investigación pendientes requieren un gran esfuerzo, el alto rendimiento reproductivo de la mayoría de las especies acuícolas permitiría que los alelos potencialmente favorables introducidos en el germoplasma de un programa de mejoramiento bien administrado se difundan a una escala y ritmo no factibles en la producción de animales de granja terrestre. Por lo tanto, sujeto a las percepciones reguladoras y públicas favorables, la tecnología de edición del genoma tiene el potencial de transformar significativamente la producción sostenible de mariscos a través de la acuicultura.

## Authors

---



**REMI L. GRATACAP, PH.D.**

The Roslin Institute, University of Edinburgh  
Easter Bush Campus  
Midlothian, EH25 9RG, UK



**ANNA WARGELIUS, PH.D.**

Institute of Marine Research  
P.O. Box 1870  
Nordnes, NO-5817 Bergen, Norway



**ROLF BRUDVIK EDVARSEN, PH.D.**

Institute of Marine Research  
P.O. Box 1870  
Nordnes, NO-5817 Bergen, Norway



**PROF. ROSS D. HOUSTON, PH.D.**

Corresponding author  
The Roslin Institute, University of Edinburgh  
Easter Bush Campus, Midlothian, EH25 9RG, UK

[ross.houston@roslin.ed.ac.uk](mailto:ross.houston@roslin.ed.ac.uk) (<mailto:ross.houston@roslin.ed.ac.uk>).

Copyright © 2023 Global Seafood Alliance

All rights reserved.