

REVOLUCIONANDO LA ENTOMOLOGÍA:

EL IMPACTO DE LA TECNOLOGÍA CRISPR EN INSECTOS

/// MARIANA LIZBETH JIMÉNEZ-MARTÍNEZ¹, ADRIANA E. FLORES-SUÁREZ², BEATRIZ LÓPEZ-MONROY², JESÚS A. DAVILA-BARBOZA², EDUARDO A. REBOLLAR-TÉLLEZ², ILDEFONSO FERNÁNDEZ-SALAS³, IRAM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ^{1*}

¹Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Fisiología Molecular y Estructural. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. mariana.jimenez80@gmail.com, iramrodriguez@gmail.com

²Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Zoología de Invertebrados, Laboratorio de Entomología Médica. Av. Universidad, S/N CD. Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. adriana.floressr@uanl.edu.mx, beatriz.lopezmr@uanl.edu.mx, jdavilab@uanl.edu.mx, eduardo.rebollartl@uanl.edu.mx

³Laboratorio de Entomología Médica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. ildefonso.fernandez@uanl.edu.mx

*Correspondencia: iramrodriguez@gmail.com

Palabras clave: CRISPR, Entomología, Edición genómica



Keywords: CRISPR, Entomology, Genomic editing

RESUMEN

El desarrollo del sistema CRISPR ha marcado un hito en la entomología, al proporcionar una herramienta poderosa para la edición genómica precisa. Esta tecnología ha revolucionado la investigación en insectos, permitiendo estudios detallados sobre funciones genéticas y facilitando el desarrollo de nuevas estrategias de control de plagas. CRISPR ha sido clave en la mutagénesis dirigida de varios insectos, revelando aspectos cruciales de su biología, como la pigmentación, el desarrollo y la metamorfosis. Además, ha abierto nuevas posibilidades para el manejo de plagas mediante la creación de insectos genéticamente modificados capaces de reducir poblaciones de plagas de manera efectiva. La expansión del uso de CRISPR a especies no tradicionales ha permitido avances significativos en su estudio y manejo, mostrando su potencial en áreas como la conservación y el control de artrópodos de importancia médica, veterinaria y agrícola.

ABSTRACT

the development of the CRISPR system has marked a milestone in entomology by providing a powerful tool for precise genomic editing. This technology has revolutionized insect research, enabled detailed studies of genetic functions and facilitating the development of new strategies for pest control. CRISPR has been key in targeted mutagenesis in several insect species, revealing crucial aspects of their biology, such as pigmentation, development, and metamorphosis. Additionally, it has opened new possibilities for pest management by creating genetically modified insects capable of effectively reducing pest populations. The expansion of CRISPR to non-traditional species has led to significant advances in their study and management, demonstrating its potential in areas such as conservation and the control of arthropods of medical, veterinary, and agricultural control.

INTRODUCCIÓN

Los avances recientes en el campo de la biotecnología han transformado profundamente diversas disciplinas científicas, incluida la entomología. Entre estos desarrollos, destaca el sistema CRISPR/Cas9, una herramienta de edición genómica que ha abierto nuevas fronteras en la investigación biológica (Sternberg y Doudna, 2015).

El sistema CRISPR, cuyo nombre proviene del inglés *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas), es una herramienta revolucionaria en biología molecular que permite modificar el ADN con gran precisión. Fue descubierto en bacterias y arqueas como parte de su sistema inmunológico, funcionando como una especie de “memoria biológica” contra virus. Cuando un virus invade nuevamente, la bacteria activa este mecanismo con la ayuda de la proteína Cas9, que actúa como una “tijera molecular” para cortar el ADN del invasor y desactivarlo.

Este proceso ha sido adaptado por los científicos para la edición genética en otros organismos. Para ello, se diseña un ARN guía que dirige a la enzima Cas9 hacia una secuencia específica del ADN objetivo, donde realiza el corte. Durante la reparación natural del ADN, los investigadores pueden aprovechar para insertar, eliminar o modificar genes con gran precisión, lo que ha revolucionado el estudio y manipulación de los genes en una amplia variedad de organismos, incluidos los insectos (Figura 1) (Jinek et al., 2012; Barrangou y Doudna, 2016).

La precisión y eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 lo ha convertido en una herramienta invaluable en diversas áreas de la biología y la medicina, permitiendo desde la corrección de mutaciones genéticas hasta el estudio de funciones génicas específicas (Hsu et al., 2014).

La aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 en entomología tiene un amplio potencial, ya que permite a los investigadores manipular los genomas de los insectos con una precisión y eficiencia sin precedentes. Esta herramienta puede revelar funciones genéticas clave, corregir defectos genéticos y ofrecer soluciones innovadoras a varios de los desafíos que enfrenta el campo de la entomología.

APLICACIONES DEL SISTEMA CRISPR EN EL ESTUDIO DE INSECTOS

La capacidad de CRISPR/Cas9 para realizar mutagénesis dirigida ha revolucionado la investigación genética en insectos, permitiendo estudios detallados sobre la función de genes específicos. Este sistema ha sido ampliamente utilizado en estudios funcionales de genes en diversos insectos, proporcionando información valiosa sobre los roles de genes específicos y facilitando el desarrollo de nuevas estrategias de control.

ESTUDIOS FUNCIONALES DE GENES

Utilizando como modelo de estudio al gusano oriental de la hoja (*Spodoptera litura*), Zhu et al. (2017), aplicaron la edición genética mediante CRISPR/Cas9 para estudiar el gen *BLOS2*, relacionado con la coloración del tegumento. La mutagénesis de *BLOS2* resultó en la pérdida de las franjas amarillas y manchas blancas

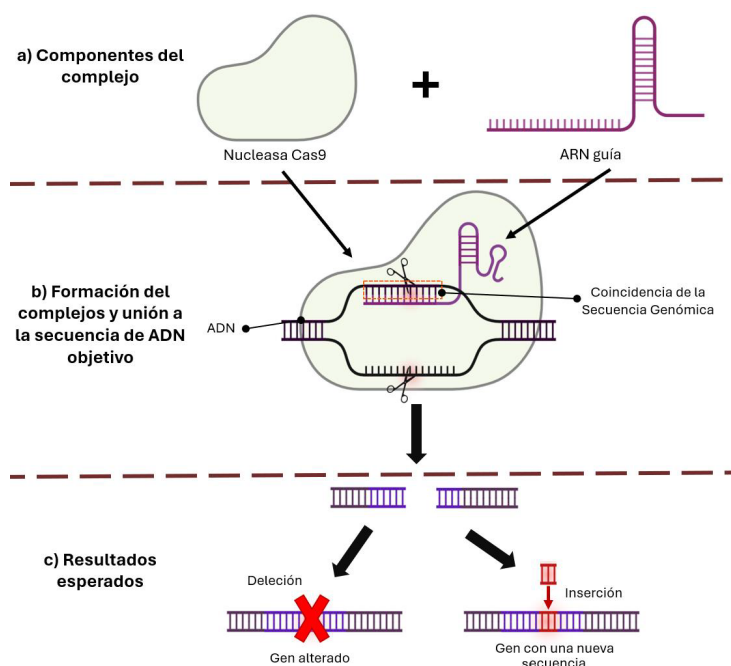


Figura 1. Mecanismo de edición genómica mediante CRISPR-Cas9. Ilustración del proceso de edición genética con CRISPR-Cas9. (a) Componentes del complejo: la nucleasa Cas9 y el ARN guía. (b) Formación del complejo y unión a la secuencia de ADN objetivo, donde Cas9 realiza un corte específico. (c) Resultados esperados: el ADN puede repararse mediante deleciones, inserciones o modificaciones, permitiendo la edición precisa de genes. Una herramienta fundamental en la investigación genética y la biotecnología moderna.

en las larvas, demostrando su papel crucial en la pigmentación. Este hallazgo subraya la importancia de *BLOS2* en la determinación de los patrones de color en esta especie de polilla.

Por otro lado, en el gusano de seda (*Bombyx mori*), se utilizó CRISPR/Cas9 para realizar un análisis funcional del gen *Wnt1*. La mutagénesis de *Wnt1* demostró su papel esencial en la segmentación y pigmentación durante la embriogénesis, lo que es vital para el desarrollo adecuado del organismo (Zhang *et al.*, 2015).

Asimismo, en el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), se aplicó la edición dirigida del gen *E93* utilizando CRISPR/Cas9, revelando que este gen afecta la expresión de otros genes cruciales para la metamorfosis. Este estudio mostró cómo *E93* regula la transición de pupa a la etapa adulta (Zhu, *et al.*, 2020).

CONTROL DE INSECTOS PLAGAS

La tecnología CRISPR ha abierto nuevas posibilidades en el manejo de plagas al permitir la creación de insectos genéticamente modificados que pueden controlar o reducir las poblaciones de plagas.

En el escarabajo de la papa, *Leptinotarsa decemlineata*, se llevó a cabo la mutagénesis dirigida del gen *vest* utilizando CRISPR/Cas9. Los resultados mostraron fenotipos claros de alas deformadas, proporcionando una metodología útil no solo para el estudio de la biología del escarabajo sino también para desarrollar estrategias innovadoras para el manejo de plagas en la agricultura (Gui *et al.*, 2020).

Otro ejemplo de aplicación de CRISPR en el control de plagas es el caso del gusano de la hoja del algodón (*Spodoptera littoralis*). En este insecto, el knockout del gen *Orco* mediante CRISPR/Cas9 resultó en una anosmia, es decir, la pérdida del sentido del olfato. Esta modificación afectó la detección de olores de plantas y feromonas sexuales, lo cual tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevas estrategias de control de plagas al interferir con la capacidad de los insectos para localizar recursos y parejas (Koutroumpa *et al.*, 2016).

CONTROL EN INSECTOS VECTORES DE ENFERMEDADES

Dada la alta carga de enfermedades asociadas a vectores en diversas regiones del mundo, existe una necesidad urgente de avanzar en el uso de técnicas de edición genética, como CRISPR. Países como Arabia Saudita, Turquía, Corea, Filipinas, India,

Estados Unidos, Europa, China y Japón ya están utilizando estas técnicas para combatir de manera más efectiva las enfermedades transmitidas por vectores, particularmente en mosquitos como *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* y *Anopheles gambiae* (Alphey, 2016; Paulraj *et al.*, 2016; Wickramasinghe *et al.*, 2021).

En el mosquito *An. gambiae*, la implementación de un sistema de impulso genético CRISPR/Cas9 ha permitido la edición de genes que inducen esterilidad en las hembras. Esta intervención ha demostrado ser eficaz en reducir las poblaciones de mosquitos transmisores de malaria, lo cual es crucial para controlar la propagación de esta enfermedad mortal (Hammond, *et al.*, 2015; Dong, *et al.*, 2018).

Además, Dong *et al.* (2018) utilizaron una versión modificada del sistema CRISPR/Cas9 para generar la mutación de FREP1 en mosquitos *An. gambiae*. FREP1 desempeña un papel importante en la invasión de oocinetos de *Plasmodium* sp. a las células epiteliales del intestino medio. Los mosquitos mutantes transgénicos con la mutación de FREP1 mostraron una reducción significativa en la tasa de infectividad por *Plasmodium berghei* en roedores y *P. falciparum* en humanos. Sin embargo, este éxito en el control de la infección, conllevó un considerable costo de adaptación, incluyendo una reducción en las tasas de alimentación con sangre, fecundidad y eclosión de huevos. También se observó una menor supervivencia tras la alimentación con sangre y un retraso en el desarrollo larvario.

De manera similar, estudios dirigidos a otros mosquitos vectores como *Ae. aegypti* han sido pioneros en demostrar el potencial de la edición genética mediada por CRISPR/Cas9. Basu *et al.* (2015) utilizaron el enfoque multiplexado con CRISPR/Cas9, apuntando a seis genes diferentes (*kmo*, *loqs*, *r2d2*, *ku70*, *lig4* y *nix*) en *Ae. aegypti*. Para ello, diseñaron 40 ARN guía pequeños (sgRNA, por sus siglas en inglés: *single guide RNA*) adicionales y evaluaron su capacidad de edición en ensayos con embriones, logrando generar diversas mutaciones somáticas y de línea germinal en el mosquito.

En otro estudio, Dong *et al.* (2015) utilizaron CRISPR/Cas9 para modificar un gen en *Ae. aegypti* y lograr la expresión de la proteína fluorescente cian mejorada (ECFP, *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*), permitiendo el uso de dos marcadores fluorescentes en los ojos de los mosquitos. Junto con Cas9, se utilizaron dos sgRNA dirigidos a diferentes regiones del gen ECFP, con ARNm transcritos in vitro para la transformación de la línea germinal. Como resultado, se obtuvieron cuatro grupos de mosquitos cuyos descendientes heredaron la modificación genética, con una eficiencia de knockout del 5.5%.

EDICIÓN GÉNICA EN MODELOS NO TRADICIONALES

El uso de CRISPR en insectos que no suelen ser empleados como modelos de estudio ha ampliado significativamente la investigación genética en una gran diversidad de especies. Esta tecnología no solo ha mejorado nuestro entendimiento de organismos ampliamente estudiados, sino que también ha permitido editar el ADN de especies menos exploradas. Esto ha abierto nuevas oportunidades en el control de plagas y en la comprensión de funciones genéticas específicas en diversos insectos.

Por ejemplo, en la chinche roja (*Pyrrhocoris apterus*), se estableció un protocolo eficiente para la edición genética con CRISPR/Cas9, optimizando la técnica de microinyección de embriones y el manejo de huevos, lo que incrementó considerablemente la eficiencia en la producción de mutantes. Este avance facilita el estudio funcional de genes en esta especie, mejorando nuestra comprensión de su biología y sus posibles aplicaciones en el manejo de plagas (Kotwica-Rolinska et al., 2019).

En la chinche marrón (*Euschistus heros*), se utilizó una combinación de CRISPR/Cas9 y ARN de interferencia (RNAi) para estudiar genes implicados en el desarrollo de las alas y la pigmentación de la cutícula. Este enfoque permitió desarrollar un método eficiente para analizar la función de genes en esta especie, proporcionando una herramienta útil para futuras investigaciones (Cagliari et al., 2020).

Asimismo, en la langosta migratoria (*Locusta migratoria manilensis*), se implementó la tecnología CRISPR-Cas13a junto con tiras de flujo lateral para la detección rápida

de ADN. Este método mostró alta especificidad y sensibilidad en la identificación de esta plaga, ofreciendo una herramienta eficaz para la vigilancia y el control de plagas agrícolas (Zhang et al., 2023).

CONCLUSIÓN

La integración de la tecnología CRISPR en el campo de la entomología ha transformado el panorama, abriendo nuevas vías para la exploración científica, el manejo de plagas y la conservación de la biodiversidad de artrópodos. La capacidad de esta tecnología para editar genes con precisión ha permitido avances significativos en el estudio de los insectos, desde explorar la comprensión de los roles de genes específicos hasta el desarrollo de métodos innovadores para el manejo y detección de plagas. Su implementación en el control de plagas representa una alternativa prometedora a los métodos convencionales, ofreciendo soluciones más específicas y efectivas,

Además, la expansión del uso de CRISPR a insectos no modelos ha ampliado las posibilidades de investigación en mayor número de especies, enriqueciendo nuestro conocimiento sobre la biodiversidad y proporcionando nuevas herramientas para el estudio de los ecosistemas.

A medida que continuamos explotando y refinando las aplicaciones de esta tecnología, es esencial considerar las implicaciones éticas y ecológicas de la edición genética en poblaciones naturales, garantizando un uso responsable y sostenible de CRISPR en el futuro.

Literatura citada



- Alphey L. 2016. Can CRISPR/Cas9 gene drives curb malaria? *Nature Biotechnology*, 34: 149-150. <https://doi.org/10.1038/nbt.3473>
- Barrangou, R. y Doudna, J. A. 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology*, 34(9): 933-941. <https://doi.org/10.1038/nbt.3659>
- Basu, S., Aryan, A., Overcash, J. M., Samuel, G. H., Anderson, M. A. E., Dahlem, T. J., Myles, K. M. y Adelman, Z. N. 2015. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 4038-4043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502370112>
- Cagliari, D., Smagghe, G., Zotti, M., y Taning, C. 2020. RNAi and CRISPR/Cas9 as Functional Genomics Tools in the Neotropical Stink Bug, *Euschistus heros*. *Insects*, <https://doi.org/10.3390/insects11120838>
- Dong, S., Lin, J., Held, N. L., Clem, R. J., Passarelli, A. L. y Franz, A. W. 2015. Heritable CRISPR/Cas9-mediated genome editing in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLOS ONE*, 10: 0122353. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122353>
- Dong, Y., Simoes, M. L., Marois, E. y Dimopoulos, G. 2018. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout of *Anopheles gambiae* FREP1 suppresses malaria parasite infection. *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006898>
- Gui, S., Taning, C., Wei, D. y Smagghe, G. 2020. First report on CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Insect Physiology*, 104013. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104013>
- Hammond, A., Galizi, R., Kyrou, K., Simoni, A., Siniscalchi, C., Katsanos, D., Gribble, M., Baker, D., Marois, E., Russell, S., Burt, A., Windbichler, N., Crisanti, A. y Nolan, T. 2015. A CRISPR/Cas9 Gene Drive System Targeting Female Reproduction in the Malaria Mosquito vector *Anopheles gambiae*. *Nature Biotechnology*, 34, 78-83. <https://doi.org/10.1038/nbt.3439>
- Hsu, P. D., Lander, E. S. y Zhang, F. 2014. Development and applications of CRISPR/Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. y Charpentier, E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kotwica-Rolinska, J., Chodáková, L., Chvalová, D., Křištofová, L., Fenclova, I., Provazník, J., Bertolutti, M., Wu, B. y Doležel, D. 2019. CRISPR/Cas9 Genome Editing Introduction and Optimization in the Non-model Insect *Pyrrhocoris apterus*. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00891>
- Koutroumpa, F. A., Monsempes, C., François, M. C., de Cian, A., Royer, C., Concordet, J. P. y Jacquín-Joly, E. 2016. Heritable genome editing with CRISPR/Cas9 induces anosmia in a crop pest moth. *Scientific Reports*, 6(1), 29620. <https://doi.org/10.1038/srep29620>
- Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S. y Reagan, A. D. 2016. Gene silencing and gene drive in dengue vector control: A review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 7, 1-8.
- Sternberg, S. H. y Doudna, J. A. 2015. Expanding the biologist's toolkit with CRISPR/Cas9. *Molecular Cell*, 58(4), 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
- Wickramasinghe, P. D., Silva, G. N., Silva Gunawardene, Y. I. y Dassanayake, R. S. 2021. Advances in *Aedes* mosquito vector control strategies using CRISPR/Cas9. *Genetically Modified and Other Innovative Vector Control Technologies*. Singapore: Springer; pp. 67-87. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2964-8_4
- Zhang, L., Yang, L., Li, H., Yu, Y. y Zhai, J. 2023. Rapid detection of insect pest with CRISPR-Cas13a-Based Lateral Flow Strip: Using *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Applied Entomology*, 147(6), 416-422. <https://doi.org/10.1111/jen.13121>
- Zhang, Z., Aslam, A., Liu, X., Li, M., Huang, Y. y Tan, A. 2015. Functional analysis of *Bombyx* Wnt1 during embryogenesis using the CRISPR/Cas9 system. *Journal of Insect Physiology*, 79, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.06.004>
- Zhu, G., Chereddy, S., Howell, J. y Palli, S. 2020. Genome editing in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: Multiple sgRNA/Cas9 method for identification of knockouts in one generation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 103373. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103373>
- Zhu, G., Peng, Y., Zheng, M., Zhang, X., Sun, J., Huang, Y., y Dong, S. 2017. CRISPR/Cas9 mediated BLOS2 knockout resulting in disappearance of yellow strips and white spots on the larval integument in *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Physiology*, 103, 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.09.008>

