



Foto: Pedro Costa Campos



Foto: Anderson Saravia



Foto: Rossina Novas

BIOTECNOLOGÍA DE PRECISIÓN PARA EL CONTROL DE LA MOSCA DE LA BICHERA: primeros avances en Uruguay

Lic. Biol. PhD Tatiana Basika^{1-2*}, Lic. Biol. PhD Rossina Novas^{1-2*}, Lic. Lab. MSc. Anderson Saravia¹, Lic. Biol. PhD Braulio Bonilla^{1,2}, Lic. Lab. Mirela Guglielmini¹, Lic. Bioq. PhD María Victoria Veroli¹⁻³, Lic. Biol. PhD Pablo Fresia^{1-2**}, DMV PhD Alejo Menchaca^{1-4**}

*Igual contribución

**Responsables científicos

¹Laboratorio de Biotecnología para el Control de Artrópodos (BioCart), Plataforma de Salud Animal - INIA

²Unidad Mixta Pasteur + INIA (UMPI) - Institut Pasteur de Montevideo

³Unidad de Ingeniería de Proteínas - Institut Pasteur de Montevideo

⁴Plataforma de Salud Animal - INIA

En la Plataforma de Salud Animal en INIA La Estanzuela, investigadores de la Unidad Mixta Pasteur e INIA (UMPI) están usando CRISPR/Cas9 para editar el genoma de la mosca de la bichera y lograr un linaje que pueda ser usado para reducir su población silvestre en Uruguay.

RESUMEN

Avances recientes en ingeniería genética, en particular el desarrollo de CRISPR/Cas9, han permitido la generación de herramientas genéticas de alta precisión para el control de artrópodos plaga. CRISPR/Cas9 permite editar genomas, es decir, modificar el ADN de un organismo, de forma específica y generar modificaciones heredables

de ciertas características deseadas, como una reducción en la fecundidad de la hembra. Así, es posible controlar la reproducción de una especie considerada plaga. En la Plataforma de Salud Animal (PSA) en INIA La Estanzuela, investigadores de la Unidad Mixta Pasteur e INIA (UMPI) están usando CRISPR/Cas9 para editar el genoma de la mosca de la bichera y lograr un linaje que pueda ser usado para reducir su población silvestre en Uruguay.

LA HERRAMIENTA EN DESARROLLO

La mosca de la bichera, *C. hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), es el agente principal de las miasis primarias en nuestro país y la región. La miasis, o bichera, ocurre cuando las larvas de dípteros se alimentan de tejidos y fluidos de animales vivos de sangre caliente. Es un parásito obligatorio con tres fases larvianas que se desarrollan en cualquier tipo de lesión, por ejemplo, lesiones causadas por pietín, picaduras de garrapatas, prácticas convencionales en bovinos y ovinos (ej. descorne, castración, descole en corderos, esquila, señalada), además de ombligos de neonatos o cualquier orificio con exceso de fluidos, como la vulva luego del parto. Este parásito tiene un gran impacto en la economía de nuestro país; recientemente, las pérdidas totales, incluyendo horas de trabajo, curabicheras y muertes, se estimaron en 40 millones de dólares anuales [1].

C. hominivorax habita las regiones tropicales y subtropicales de América, y ha sido erradicada de América del Norte y Central usando la Técnica del Insecto Estéril (TIE). En América del Sur, el método de control más usado son los insecticidas químicos que permiten tratar las miasis, pero no controlan la población de moscas. Sin embargo, los recientes avances en edición génica han permitido diseñar nuevas herramientas para el control de plagas. La implementación de estas herramientas requiere la eficiente manipulación del genoma para generar ciertas características en la especie que permitan su control. CRISPR/Cas9 ha revolucionado la ingeniería genética, simplificando y aumentando radicalmente la eficiencia y especificidad de la edición génica. Se basa en una molécula de ARN guía (ARNg), que por medio de complementariedad de secuencia, dirige a la proteína Cas9, la cual realiza un corte en el ADN facilitando la introducción de cambios. Esto permite dirigir controladamente la edición a cualquier región del genoma.

CRISPR/Cas9 también se ha utilizado para generar impulsores genéticos (i.e. gene drives). La técnica se basa en un elemento genético que se hereda de forma super-mendeliana, lo que lleva a su rápida dispersión en una población (Figura 1A). En esta estrategia, los componentes del sistema pueden ser introducidos en el genoma de forma tal que su incorporación confiera una característica deseada, como ser la disminución de fertilidad (Figura 1B).

Otra clave del éxito de CRISPR/Cas9 reside en sus costos, actualmente accesible a una gran proporción de la comunidad científica global. Esto nos permite desarrollar localmente herramientas biotecnológicas orientadas a controlar la mosca de la bichera, como otras plagas y/o vectores, que afectan el sector productivo y sanitario de Uruguay. Con este objetivo fue conformado el grupo de investigación BioCart (Biotecnología para el

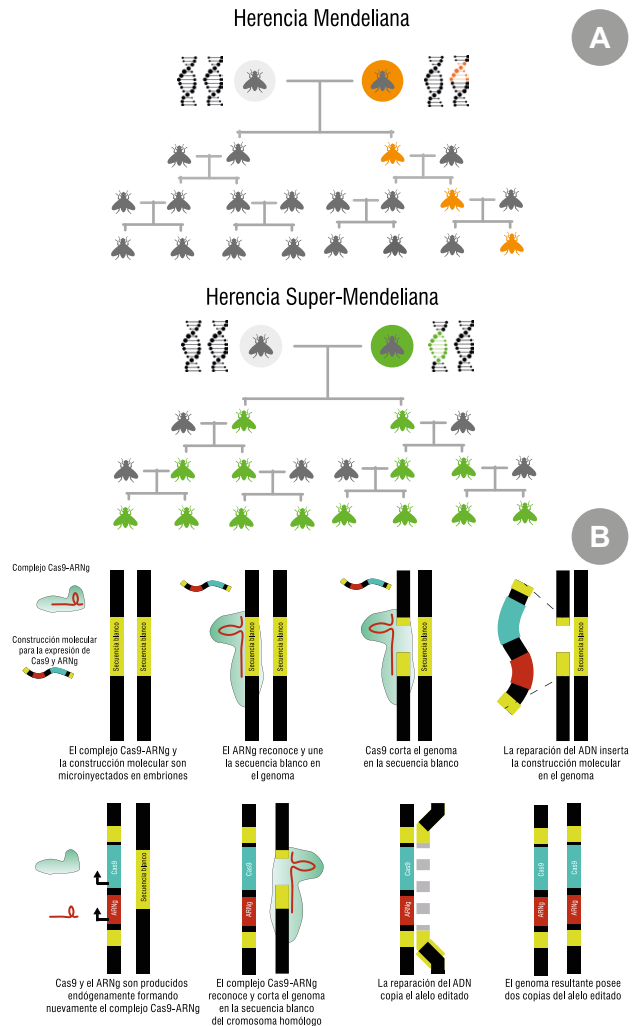


Figura 1 - Impulsores genéticos. A) En Herencia Mendeliana, un alelo en heterocigosis (naranja) es heredado por el 50 % de la descendencia. Un alelo con herencia super-Mendeliana (verde) es heredado por el 100 % de la descendencia. B) Representación esquemática del uso de CRISPR/Cas9 para la generación de un impulsor genético y su mecanismo de acción.

Control de Artrópodos), que funciona en la Plataforma de Salud Animal (PSA) INIA y que está conformado por investigadores de ambas instituciones, INIA e Institut Pasteur de Montevideo.

RESULTADOS

Para avanzar en este desarrollo se elaboró un proyecto de investigación y desarrollo tecnológico, que ha recibido apoyo financiero del BID, de INIA y de INAC. El proyecto se encuentra en su primera fase, que consiste en desarrollo de capacidades y diseño de la herramienta para generar moscas con el potencial de suprimir la población silvestre.



Foto: Tatiana Basika

Figura 2 - Instalaciones para el trabajo con insectos: plano del bioterio.

Instalaciones de bioseguridad para edición génica de artrópodos

En el marco de este proyecto, se diseñó y construyó un edificio que alberga el bioterio y los laboratorios equipados para la microinyección y criopresevación de embriones de moscas (Figura 2). El edificio cumple con las normas de bioseguridad ALC2+ (Arthropod Contention Level 2+) que permite el manejo en condiciones adecuadas y la contención de artrópodos genéticamente editados (Figura 3). Esta estructura, junto con un laboratorio de biología molecular, fue montada en la Plataforma de Salud Animal, INIA La Estanzuela.

En estas instalaciones se reproduce el ciclo de la especie en condiciones de laboratorio con procesos estandarizados desarrollados en este proyecto, logrando mantener en el laboratorio una colonia sin necesidad de utilizar animales vivos, como normalmente ocurre en la naturaleza. Actualmente se mantienen colonias de moscas colectadas en cinco localidades del país.

Se reproduce el ciclo de la especie en condiciones de laboratorio con procesos estandarizados desarrollados en este proyecto, logrando mantener en el laboratorio una colonia sin necesidad de utilizar animales vivos.

Capacitación de los investigadores y técnicos

Este proyecto se inició con un año de entrenamiento en el laboratorio del Dr. Maxwell J. Scott (NCSU, Carolina del Norte, Estados Unidos), referente en el uso de herramientas de ingeniería genética para el control de insectos plaga. Allí, nuestros investigadores llevaron a cabo un entrenamiento en la edición génica, manejo del ciclo de vida y condiciones de cría de otras especies de mosca presentes en Estados Unidos. Al mismo tiempo, otros técnicos de nuestro equipo se entrenaron en la cría y el manejo de la mosca de la bichera en Uruguay y en Panamá donde existe una planta de producción de moscas para el uso de la TIE. Este entrenamiento permitió que, actualmente, Uruguay pueda contar con una colonia bien establecida de estas moscas para poder desarrollar todas las actividades.

Edición del genoma de la mosca de la bichera por CRISPR/Cas9 en Uruguay

Utilizando como referencia genes involucrados en reproducción y fertilidad de hembras de otras especies de insecto como la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, y el mosquito *Aedes aegypti*, se identificaron en el genoma de *C. hominivorax* tres genes involucrados en la fertilidad de la hembra. Estos genes son candidatos promisorios para el control de la mosca de la bichera.

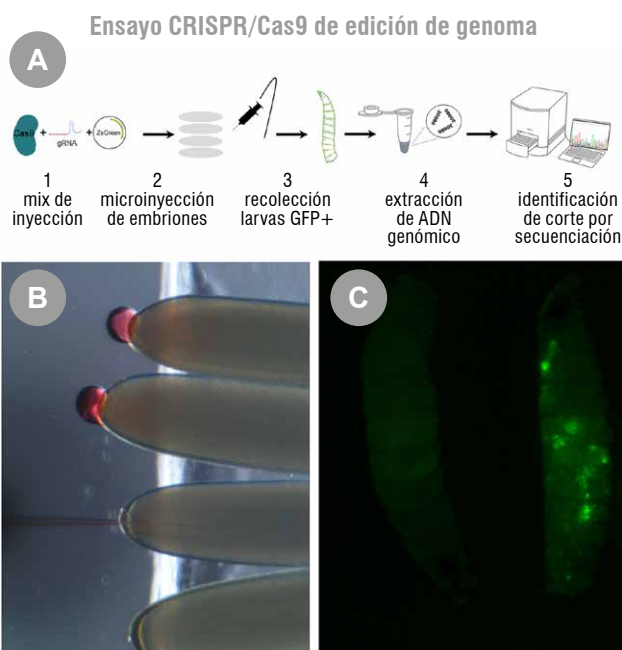


Figura 3 - Edición del genoma de *C. hominivorax* por CRISPR/Cas9. A) Esquema del ensayo de CRISPR/Cas9. B) Microinyección de embriones de *C. hominivorax*. C) Obtención de embriones editados (derecha) en comparación de un individuo salvaje (izquierda).



Foto: Tatiana Basika

Figura 4 - Instalaciones para el trabajo con insectos editados: moscas adultas en cajas entomológicas.

Para lograr la edición génica, la proteína Cas9 junto con los ARNg específicos para su genoma son microinyectados en embriones tempranos. Las larvas resultantes son colectadas para extraer su ADN genómico y mediante el secuenciado de los genes blanco, evaluar la eficiencia de edición génica (Figura 4 y 5).

En esta etapa, se evaluó la funcionalidad *in vivo* de múltiples componentes del sistema diseñados para los genes candidatos. En una siguiente etapa, la edición se realizará incluyendo también las construcciones moleculares con los elementos génicos a ser incorporadas en el genoma.

Este avance ha permitido que la técnica CRISPR/Cas9 esté funcionando de manera exitosa, habiendo logrado nacimientos de moscas cuyo genoma se encuentra editado.

Esta tecnología –aún en desarrollo– pretende contribuir a que Uruguay cuente con las capacidades y herramientas que le permitan controlar esta especie considerada plaga en toda América.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados constituyen la primera edición génica de la mosca de la bichera reportada en América del Sur y nos acercan a la generación de una herramienta biotecnológica que podría reducir el impacto de este parásito en el sector productivo. Los avances logrados en infraestructura y recursos humanos pueden contribuir a posicionarnos como un centro biotecnológico para el control de plagas y vectores en la región. Esta tecnología –aún en desarrollo– pretende contribuir a que Uruguay cuente con las capacidades y herramientas que le permitan controlar esta especie considerada plaga en toda América, así como aplicarla en otras especies que representen una amenaza para la ganadería, la agricultura y la salud pública.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Fresia P, Pimentel S, Iriarte V, Marques L, Durán V, Saravia A, Novas R, Basika T, Ferenczi A, Castells D, Saporiti T, Cuore U, Losiewicz S, Fernández F, Ciappesoni G, Dalla-Rizza M, Menchaca A. (2021) Historical perspective and new avenues to control the myiasis-causing *Cochliomyia hominivorax* fly in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*. 25(2).
- 2 - Novas R, Basika T, Williamson ME, Fresia P, Menchaca A, Scott MJ. (2023) Identification and functional analysis of *Cochliomyia hominivorax* U6 gene promoters. *Insect Mol Biol*. 2023 Dec;32(6):716-724.



Foto: Tatiana Basika

Figura 5 - Instalaciones para el trabajo con insectos editados: laboratorio de microinyección.