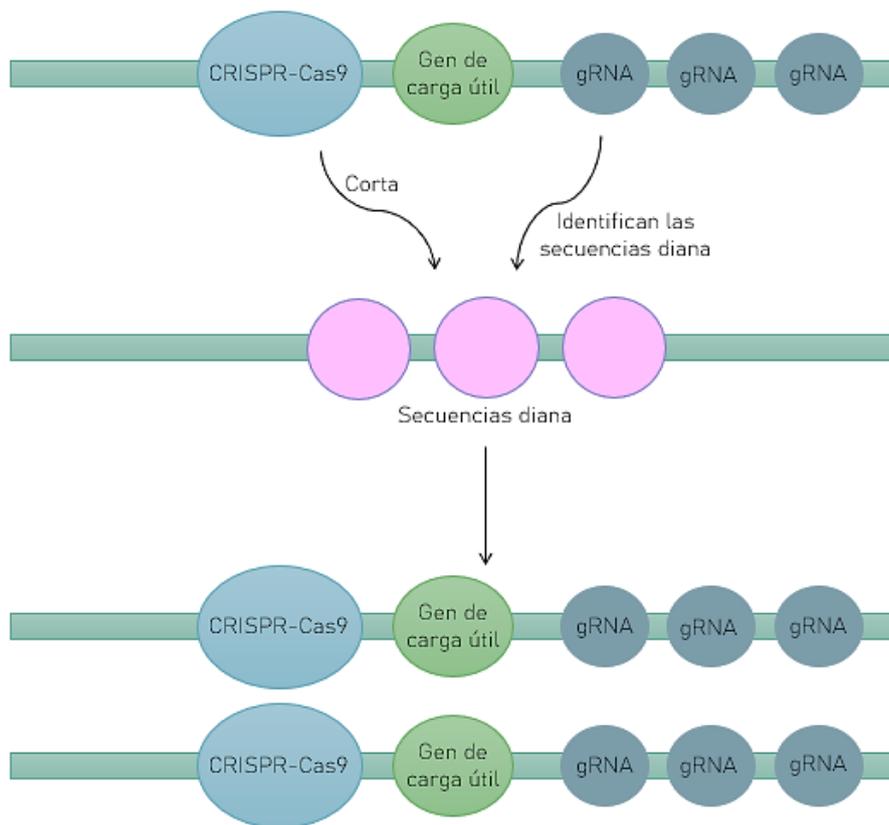


FUNDAMENTOS Y APLICACIONES DEL IMPULSO GÉNICO

BASIS AND APPLICATIONS OF GENE DRIVE



Iria Lorenzo Sánchez

Tutorizado por José Antonio Pérez Pérez

Grado en Biología (junio de 2021)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias a mi familia que siempre me ha apoyado y animado a seguir por el camino de la ciencia y perseguir uno de mis sueños, que es una vida dedicada a la investigación. Gracias a todos los profesores de genética por enseñarme lo impresionante que puede llegar a ser este campo y especialmente a José Antonio Pérez Pérez por toda la ayuda que me ha proporcionado y los debates tan interesantes que han surgido de este trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. OBJETIVOS	3
3. MECANISMOS DE ACCIÓN.....	3
3.1. IMPULSORES HOSPEDADORES (<i>HOMING DRIVES</i>).....	5
3.2. IMPULSORES GÉNICOS QUE ALTERAN LA PROPORCIÓN DE SEXOS.....	6
3.3. SISTEMA TOXINA-ANTÍDOTO	7
3.4. SISTEMAS DE SUBDOMINANCIA	8
3.4.1. <i>Sistema doble toxina-antídoto</i>	9
3.4.2. <i>Translocaciones cromosómicas recíprocas</i>	10
3.5. MECANISMOS DE HERENCIA GENÉTICA CITOPLASMÁTICA	11
3.6. OTROS SISTEMAS DE IMPULSO GÉNICO	12
4. APLICACIONES REALES Y POTENCIALES	12
5. DINÁMICA DE PROPAGACIÓN DE LOS GENOIMPULSORES	15
6. RIESGOS	19
6.1. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD.....	19
6.2. PROPAGACIÓN A POBLACIONES NO OBJETIVO	20
6.3. PROPAGACIÓN A ESPECIES NO OBJETIVO.....	20
6.4. RIESGOS PARA EL ECOSISTEMA.....	20
6.5. PROCEDIMIENTOS PARA MITIGAR LOS RIESGOS	21
6.6. REGULACIONES LEGISLATIVAS PARA LA APLICACIÓN DEL IMPULSO GÉNICO	23
7. CUESTIONES ÉTICAS	25
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	25
CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES.....	26
BIBLIOGRAFÍA.....	27

ABREVIATURAS

- Cas9: Proteína 9 asociada a CRISPR (del inglés *CRISPR associated system*).
- CRISPR: Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (del inglés *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*).
- gRNA: ARN guía.
- HDR: Reparación dirigida por homología (del inglés *homology-directed repair*).
- HEG: Endonucleasa hospedadora (del inglés *homing endonuclease*).
- miRNA: micro ARN.
- MMHJ: Microhomología (del inglés *microhomology-mediated end joining*).
- NHEJ: Unión de extremos no homólogos (del inglés *non-homologous end-joining repair*).

RESUMEN

El impulso génico es una técnica muy prometedora, pero de la que aún queda mucho por desarrollar en la práctica. Permite propagar un gen de forma rápida a través de una población, mediante diferentes elementos genéticos como los impulsores meióticos, los impulsores hospedantes, los cromosomas B o los elementos transponibles. Esta técnica se ha propuesto como solución a diferentes problemas actuales, tales como algunas enfermedades infecciosas que afectan a humanos o la protección de determinadas especies amenazadas. Una de las características más atractivas del impulso génico es que actúa de forma selectiva sobre una población o una determinada especie diana, todo a un bajo coste, a diferencia de otros métodos menos específicos como los insecticidas o venenos usados para el control de plagas. En este trabajo de revisión se va a describir el abanico de mecanismos de acción de los impulsores génicos, así como sus posibles aplicaciones y los riesgos a los que nos podemos enfrentar.

ABSTRACT

Gene drive is a very promising technique, but much remains to be developed in practice. It allows a gene to spread rapidly through a population, using different genetic elements such as meiotic drivers, homing drives, B chromosomes or transposable

elements. This technique has been proposed as a solution to different current problems, such as some infectious diseases affecting humans or the protection of certain endangered species. One of the most attractive characteristics of the gene drive is that it acts selectively on a population or a certain target species, all at a low cost, unlike other less specific methods such as insecticides or poisons used for pest control. This review paper will describe the range of action mechanisms of gene drives, as well as their possible applications and the risks we may face.

1. INTRODUCCIÓN

El impulso génico también conocido como genética dirigida, consiste en modificar la probabilidad con la que se hereda un gen, para así propagarlo por una población en pocas generaciones. Según la ley de segregación descrita por Mendel, cada uno de los dos alelos de un heterocigoto se transmitirán con igual probabilidad a la siguiente generación, es decir, cada alelo se heredará con una probabilidad del 50%. Con el impulso génico esta probabilidad aumenta, permitiendo una rápida propagación del gen (Figura 1).

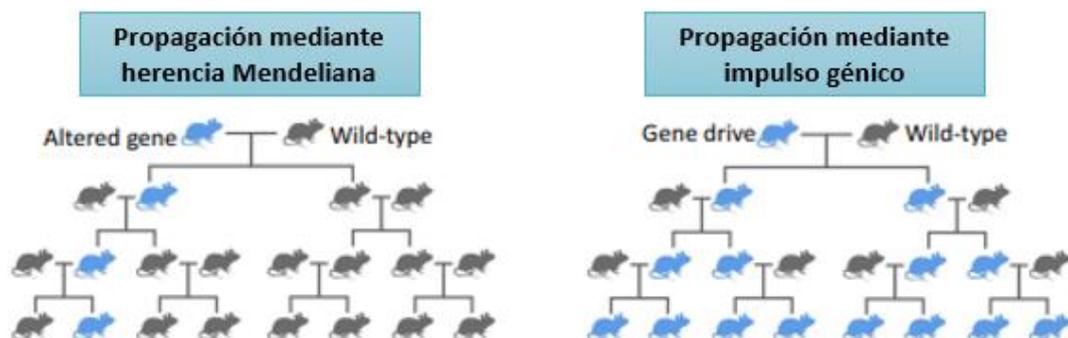


Figura 1. Acción general de un genoimpulsor. En el esquema de la izquierda se observa la transmisión de una variante genética en heterocigosis (azul) al 50% de la descendencia, mediante herencia mendeliana simple. En el esquema de la derecha el genoimpulsor se transmite con una frecuencia mayor del 50%, y en pocas generaciones el 100% de la población portará el impulsor. Adaptado de McFarlane et al., 2018.

El concepto de poder propagar un gen de interés (gen de carga útil) a través de una población se postuló hace décadas, pero los conocimientos en genética y las técnicas que se usaban no eran lo suficientemente flexibles para ser capaces de construir un sistema de impulso génico eficaz (Burt and Crisanti, 2018). Sin embargo, con los avances recientes en biología molecular, existe un interés renovado por intentar llevar a

cabo el impulso génico y, a pesar de que su desarrollo es principalmente teórico, en algunos laboratorios ya se ha implementado. Por el momento, los avances prácticos no son tan alentadores, ya que hay un abanico grande de consecuencias indeseables que podrían afectar a las poblaciones naturales, e incluso a ecosistemas completos (Devos et al., 2020).

Sorprendentemente, el impulso génico permite que una población adquiera el mismo gen o variante de este sin que represente una ventaja selectiva, es decir, se puede propagar sin hacer nada útil para los organismos que lo portan e incluso siendo perjudicial, siempre que el efecto de la distorsión de transmisión sea mayor que el efecto de la reducción de la supervivencia y la reproducción. Por esta razón, a menudo se les llaman genes o elementos genéticos egoístas (Burt and Crisanti, 2018).

Las aplicaciones de esta técnica incluyen, entre otras, el control de las especies invasoras, volver a sensibilizar a los organismos que han desarrollado resistencia a insecticidas y herbicidas, y reducir o eliminar muchos tipos de enfermedades transmitidas por vectores, todo a un bajo coste (Esvelt et al., 2014). No obstante, para el desarrollo y aplicación de esta técnica se plantean diversas cuestiones éticas sobre la conveniencia de modificar el destino de las poblaciones según nuestras necesidades. Además, aún no se tiene una visión completa de las aplicaciones y riesgos del impulso génico, por lo que son necesarias regulaciones que controlen su puesta en escena.

2. OBJETIVOS

Proporcionar una visión general e integrada de los posibles mecanismos para el desarrollo del impulso génico y de sus potenciales aplicaciones, así como concienciar de los riesgos que se deberían tener en cuenta antes de trasladar esta tecnología del laboratorio a la naturaleza concreta.

3. MECANISMOS DE ACCIÓN

El primer paso para aplicar el impulso génico en una población es construir un genoimpulsor o impulsor que permita la propagación de un gen de carga útil generación tras generación. El diseño de estos impulsores está basado en fenómenos genéticos que se dan en la naturaleza, como los mencionados elementos genéticos egoístas. Un

ejemplo de estos son los elementos P en *Drosophila melanogaster*, elementos transponibles que pueden moverse dentro y entre genomas. Otro ejemplo es un distorsionador de la segregación que se ha encontrado en determinadas poblaciones de *D. melanogaster*, es decir, un impulsor meiótico que da lugar a una representación desigual de los alelos de un determinado locus entre los gametos. Los elementos genéticos egoístas probablemente ocurren en todas las especies y pueden tener un impacto importante en la evolución y la ecología de sus huéspedes (Burt and Trivers, 2006).

Basándose en estos elementos se han desarrollado dos estrategias principales para diseñar impulsores que permitan la propagación de ciertos genes de interés a la descendencia. La primera consiste en un impulsor que sea capaz de copiarse a sí mismo en el cromosoma opuesto, lo que resulta en que la mayoría o toda la descendencia herede el alelo portador del impulsor (Champer et al., 2016); la segunda implica reducir la viabilidad de los gametos o los individuos que heredan el alelo de tipo salvaje, lo que le confiere a este una desventaja de aptitud en comparación al alelo portador del genoimpulsor.

En la mayoría de las aproximaciones, es necesaria la presencia de una endonucleasa capaz de reconocer una secuencia diana específica. En este sentido, se debe mencionar a las endonucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN) y las endonucleasas de dedos de zinc (ZFN), no obstante, la utilización de estas nucleasas para el diseño de impulsores génicos es menos eficiente, ya que están codificadas por genes excepcionalmente grandes y repetitivos, hecho que conlleva una menor estabilidad genética (Simoni et al., 2014). Más recientemente se han empezado a emplear endonucleasas guiadas por ARN como CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas). Este sistema está formado por un ARN guía (gRNA) y una endonucleasa no específica como Cas9 (proteína 9 asociada a CRISPR). El gRNA incluye una secuencia de 89 nucleótidos que se une a Cas9, y una secuencia definida por el usuario de 20 nucleótidos que, mediante complementariedad de bases, dirige a la endonucleasa al sitio de interés para producir una rotura de doble cadena en el ADN (McFarlane et al., 2018). Esta es una herramienta más simple y eficaz para la propagación de impulsores génicos en una población, porque se puede

aplicar a una gran variedad de secuencias diana y organismos, y es más estable que otros genes codificadores de endonucleasas.

3.1. IMPULSORES HOSPEDADORES (*HOMING DRIVES*)

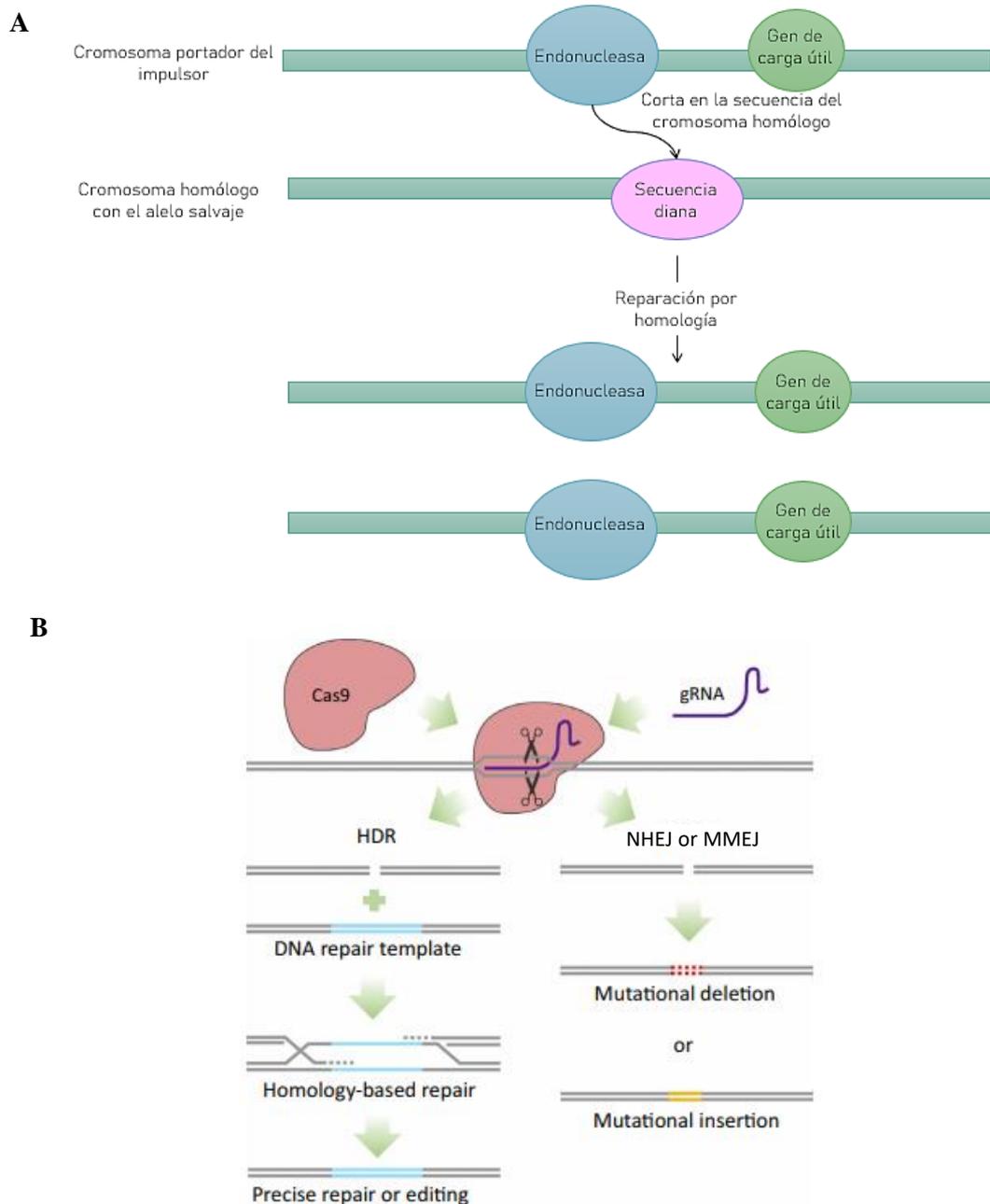


Figura 2. Mecanismo de acción de los impulsores hospedadores. A. El impulsor génico, formado por una endonucleasa hospedadora y el gen de carga útil, es copiado en el cromosoma homólogo. La endonucleasa reconoce la secuencia diana del cromosoma homólogo y provoca una doble rotura, la cual es reparada mediante HDR. Finalmente se obtienen dos cromosomas portadores del mismo alelo que contiene el gen de carga útil. Adaptado de Champer et al., 2016. B. Reparación de la doble rotura por los diferentes mecanismos. La reparación por HDR usa como molde la cadena portadora del impulsor, mientras que en la reparación por NHEJ o MMEJ generan pequeñas inserciones o deleciones. Tomado de McFarlane et al., 2018.

La estrategia subyacente a este sistema consiste en crear una copia exacta del impulsor génico, a veces acompañado de un gen de carga útil (*payload gene*), en el cromosoma homólogo, para que el individuo pase a ser homocigótico para la construcción artificial. El impulsor génico, ubicado en un determinado locus cromosómico, debe incluir una endonucleasa hospedadora (*homing endonuclease*; HEG), la cual reconoce una secuencia diana específica de la cadena de ADN del cromosoma homólogo y provoca una doble rotura (Figura 2A). Esta rotura puede ser reparada de distintas formas (Figura 2B): 1) reparación mediante la unión de extremos no homólogos (*non-homologous end joining*; NHEJ); 2) reparación mediada por microhomología (*microhomology-mediated end joining*; MMEJ); 3) reparación dirigida por homología (*homology-directed repair*; HDR). Este último tipo de reparación usa como cadena molde la portadora del impulsor génico, lo cual resulta en una célula que es homocigótica para el genoimpulsor, es decir, se produce un fenómeno de conversión génica (Stoddard, 2011). En este sentido, se debe mencionar que los sistemas de reparación NHEJ y MMEJ son contraproducentes para la propagación del genoimpulsor, además de implicar la aparición de alelos de resistencia. La figura 2B también ilustra el uso del sistema de CRISPR-Cas9 como endonucleasa hospedadora.

3.2. IMPULSORES GÉNICOS QUE ALTERAN LA PROPORCIÓN DE SEXOS

Este tipo de genoimpulsores causan una distorsión en la transmisión de cromosomas sexuales del sexo heterogamético, de tal manera que se modifica la proporción de sexos 1:1 que se da en la población natural. Uno de los sistemas más usados para la distorsión de la proporción de sexos induce la degradación del cromosoma X durante la gametogénesis en los machos (XY) (Deredec et al., 2008). En estos casos, el genoimpulsor codifica una endonucleasa que reconoce y corta varias secuencias específicas del cromosoma X durante la espermatogénesis, en consecuencia, el cromosoma queda fragmentado, y al no poder ser reparado es degradado por la célula (Figura 3). Todos los espermatozoides generados por el individuo que porta el genoimpulsor tendrán el cromosoma Y. Por tanto, toda la descendencia de dicho individuo será masculina. Así, con el paso de las generaciones, en la población habrá una mayor proporción de machos, lo que conducirá, eventualmente, a la desaparición de la población (Champer et al., 2016).

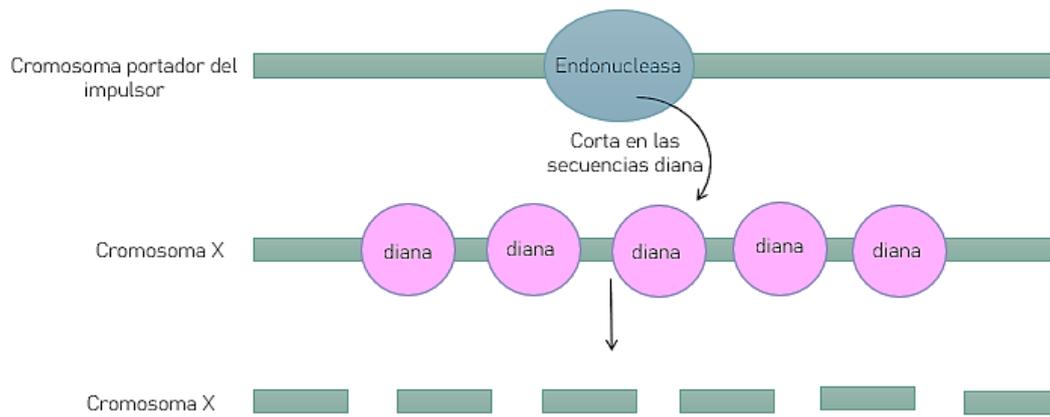


Figura 3. Sistema degradador del cromosoma X. El impulsor tiene como diana múltiples secuencias del cromosoma X, el cual, una vez escindido por la endonucleasa, es degradado. Adaptado de Champer et al., 2016

3.3. SISTEMA TOXINA-ANTÍDOTO

El sistema natural de toxina-antídoto mejor conocido es el denominado *Medea*, descrito en los escarabajos de la harina (*Tribolium castaneum*) (Beeman et al., 1992; Lorenzen et al., 2008). En este sistema el gen que codifican la toxina es de expresión materna, mientras que el gen que codifica el antídoto tiene expresión cigótica, de tal manera que la toxina mata a la descendencia que no ha heredado el gen antídoto. En concreto la toxina es un micro ARN (miRNA) expresado durante la oogénesis y dirigido contra un ARNm necesario para sintetizar una proteína esencial en el desarrollo embrionario. El antídoto consiste en un gen cuya secuencia de nucleótidos está alterada, de tal manera que es inmune a la acción del miRNA (Champer et al., 2016).

El fundamento por el que el sistema *Medea* se propaga por una población, comportándose como un elemento egoísta, es el siguiente (Figura 4A). Aquellos cigotos cuyo progenitor femenino sea portador del sistema *Medea* recibirán la toxina a través del citoplasma del óvulo. Ahora bien, si dicho cigoto además hereda el sistema *Medea* de uno de los dos progenitores será inmune a la toxina, de lo contrario no se desarrollará el cigoto. El éxito de la propagación del sistema *Medea* depende de su frecuencia inicial en la población, es decir, cuanto más abundante sea el sistema *Medea* en la población, más probable es que un individuo de genotipo salvaje se cruce con otro portador del sistema *Medea* (Champer et al., 2016; Burt and Crisanti, 2018; Price et al., 2020). Un ejemplo de un sistema análogo diseñado en *Drosophila*, es un genoimpulsor basado en

un miRNA dirigido contra el gen de expresión cigótica esencial *myd88* (Burt and Crisanti, 2018).

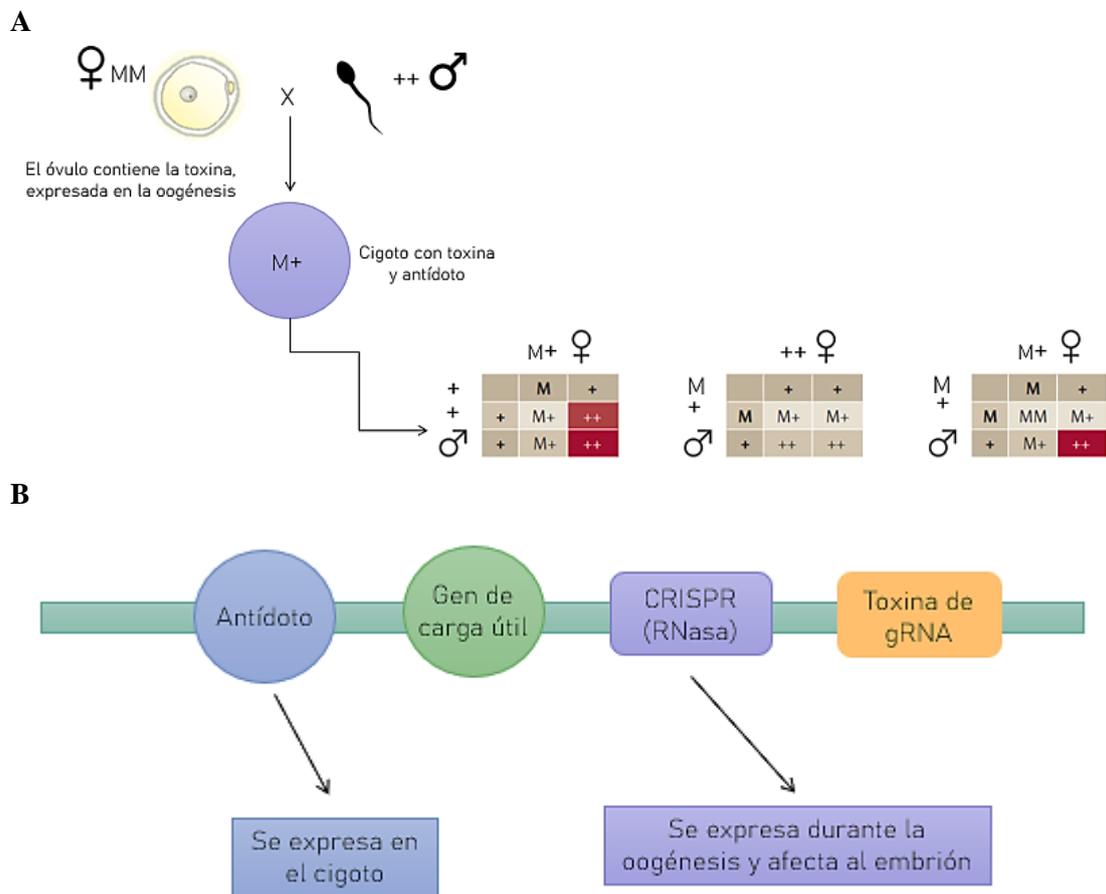


Figura 4. Funcionamiento del sistema toxina-antídoto basado en *Medea*. **A.** Se introducen en la población hembras homocigotas para el sistema *Medea*, que, al cruzarse con machos de genotipo salvaje, generan una descendencia heterocigótica para *Medea*. En las tablas se muestran los resultados de los cruces de estos individuos entre sí o con otros individuos salvajes en la población. Los cuadros resaltados en rojo indican el aborto de los cigotos correspondientes. **B.** Adaptación del sistema CRISPR a la estrategia subyacente a *Medea*. Adaptado de Champer et al., 2016.

La estrategia que se acaba de describir ha sido adaptada en genoimpulsores artificiales basados en CRISPR (Figura 4B). En concreto se ha utilizado como toxina una nucleasa con actividad RNasa, dirigida por un gRNA contra un ARNm de un gen esencial de expresión cigótica. El genoimpulsor puede incluir un gen de carga útil íntimamente ligado para que se herede como una unidad.

3.4. SISTEMAS DE SUBDOMINANCIA

Se dice que existe subdominancia cuando los individuos heterocigóticos poseen menor eficacia biológica que los homocigóticos. La evolución de un sistema

subdominante a nivel poblacional depende de que los homocigóticos para el alelo salvaje o el impulsor supere una frecuencia umbral, es decir, aunque las dos variantes subdominantes confieran la misma eficacia biológica en homocigosis, la variante genética que tiene la frecuencia inicial más baja se perderá, mientras que la otra se fijará en la población (Huang et al., 2011). Se aprovechan dos mecanismos diferentes para la construcción de genoimpulsores basados en la subdominancia: sistema doble toxina-antídoto y las translocaciones cromosómicas recíprocas (Burt and Crisanti, 2018).

3.4.1. Sistema doble toxina-antídoto

En estos sistemas se emplean dos toxinas y los dos antídotos correspondientes, pero los componentes genéticos de cada par toxina-antídoto se localizan en diferentes cromosomas, es decir, en configuración trans (Figura 5). Esto implica que los dos pares de elementos tienen que estar presentes para que un organismo sea viable. En un cromosoma están, íntimamente ligados, el antídoto 1 y la toxina 2, además de un gen de carga útil, y en un cromosoma distinto está el antídoto 2 y la toxina 1. Si los cigotos heredan ambos cromosomas modificados, podrán desarrollarse y el gen de carga útil pasará a la descendencia, mientras que, si heredan solo uno de los cromosomas, la toxina provocará el aborto del cigoto, al no estar presente su antídoto (Champer et al., 2016).

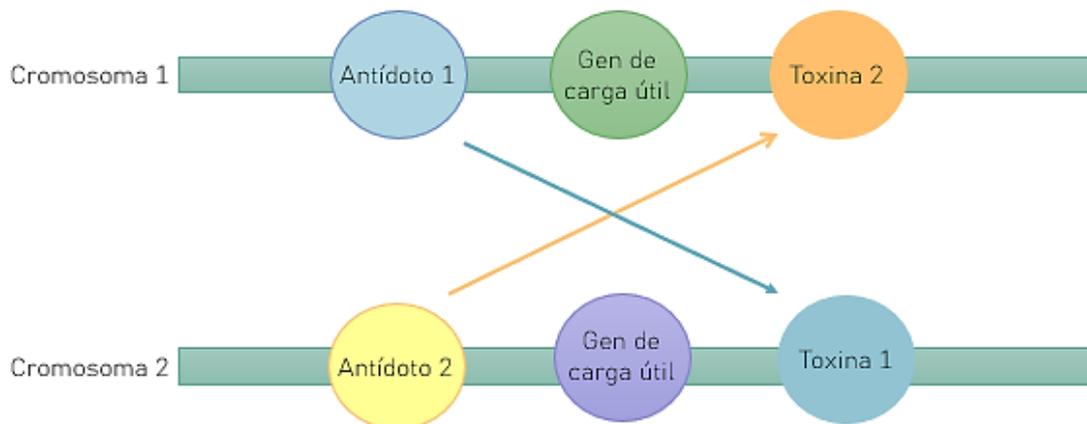


Figura 5. Sistema de doble toxina-antídoto. El antídoto contrarresta el efecto de la toxina 1 y el antídoto 2 hace lo correspondiente con la toxina 2, por lo que para que el individuo sea viable, ambos cromosomas deben presentar el impulsor. Adaptado de Champer et. al., 2016

Teniendo en mente el funcionamiento del sistema doble toxina-antídoto, se puede comprender el menor éxito reproductivo de los individuos doble heterocigóticos. El cruce de estos individuos con otros de la población implica el aborto de al menos la

mitad de los cigotos resultantes, porque carecen de uno de los antídotos (Figura 6). Por tanto, estos cruces serán más frecuentes cuanto mayor sea el número de individuos homocigóticos para el sistema de doble toxina-antídoto que se producen en la población.

		Homocigote 1*1*2*2*				Heterocigote 1*1+2*2+				Wild type 1+1+2+2+			
		1*2*	1*2*	1*2*	1*2*	1*2*	1*2*	1+2+	1+2+	1+2+	1+2+	1+2+	1+2+
Heterocigote 1*1+2*2+	1*2*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*
	1*2+	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*
	1+2*	1*1+	1*1+	1*1+	1*1+	2*2*	2*2*	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+
	1+2+	2*2+	2*2+	2*2+	2*2+	2*2*	2*2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*
Heterocigote 1*1+2*2+	1*2*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1*1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*
	1*2+	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2*2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*
	1+2*	1*1+	1*1+	1*1+	1*1+	2*2*	2*2*	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+
	1+2+	2*2+	2*2+	2*2+	2*2+	2*2*	2*2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*
Heterocigote 1*1+2*2+	1*2*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*	1+1*
	1*2+	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*
	1+2*	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	2+2*	2+2*	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+	1+1+
	1+2+	2+2+	2+2+	2+2+	2+2+	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*	2+2*

Figura 6. Posibles cruces que implican a individuos dobles heterocigóticos para el sistema de doble toxina-antídoto. El símbolo + indica que el cromosoma es de tipo salvaje, mientras que el símbolo * indica que el cromosoma contiene el genotipo impulsor. Las casillas en rojo indican los cigotos que son abortados por carecer de uno de los antídotos. Tomado de Champer et al., 2016.

3.4.2. Translocaciones cromosómicas recíprocas

Las endonucleasas CRISPR guiadas por ARN pueden utilizarse para introducir translocaciones cromosómicas recíprocas. En un primer paso se provoca una doble rotura en secuencias de ADN específicas de dos cromosomas diferentes, que han sido modificados genéticamente para que ocurra este fenómeno (Figura 7). Estas modificaciones incluyen, además de un gen que codifica una nucleasa Cas y otro que codifica un gRNA, una secuencia diana de corte flanqueada por otras dos secuencias (*payload* 1 y 2 en la figura 7) específicas. Estas secuencias promueven la translocación recíproca cuando los sistemas dirigidos por homología intentan reparar las lesiones producidas (Egli et al., 2004). El siguiente paso sería introducir en la población objetivo un número suficientemente alto de individuos homocigóticos para la translocación recíproca. Cuando estos individuos se cruzan con los individuos salvajes de la población, la descendencia será heterocigótica para la translocación recíproca. Estos individuos heterocigóticos tienen fertilidad reducida, como mínimo, en un 50%.

Estos impulsos génicos subdominantes son específicos de la especie y evolutivamente muy estables, sin la necesidad de depender continuamente de una proteína Cas para su funcionalidad (Champer et al., 2016).

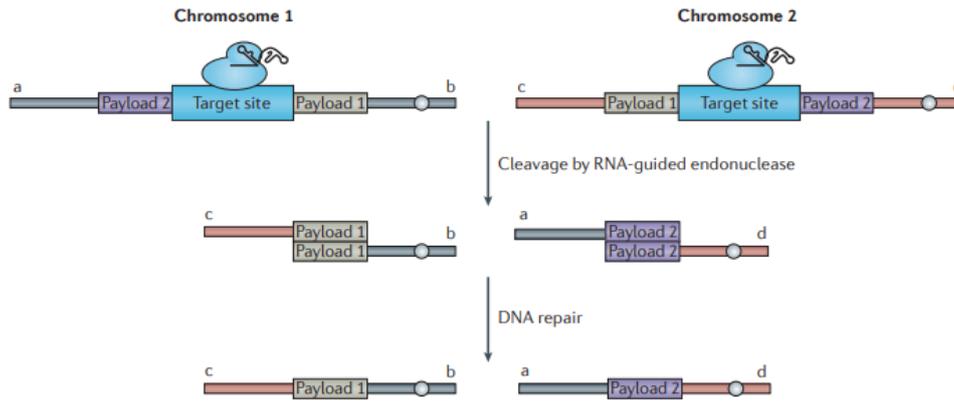


Figura 7. Translocaciones cromosómicas recíprocas inducidas mediante el sistema CRISPR. Tras las roturas de doble cadena por acción de una nucleasa Cas los sistemas de reparación de lesiones en el ADN de la célula conducen al intercambio de brazos cromosómicos no homólogos. Tomada de Champer et al., 2016

3.5. MECANISMOS DE HERENCIA GENÉTICA CITOPLASMÁTICA

Todos los mecanismos de impulso génico descritos hasta ahora implican loci genéticos localizados en el genoma nuclear del individuo, pero existe al menos un impulsor natural dirigido por genes de localización citoplasmática. Este es el caso de la bacteria *Wolbachia*, un parásito intracelular obligado, que se hereda (herencia infecciosa) a través del citoplasma del óvulo (Serbus et al., 2008). Al tratarse de un caso de herencia citoplasmática, las hembras infectadas por *Wolbachia* transmitirán la bacteria a toda su descendencia. Por otro lado, los machos infectados por *Wolbachia* no producen descendencia a menos que se hayan apareado con una hembra infectada con la misma cepa de *Wolbachia* (Figura 8) (Wedell et al., 2019). Se desconocen los mecanismos moleculares mediante los que actúa este sistema.

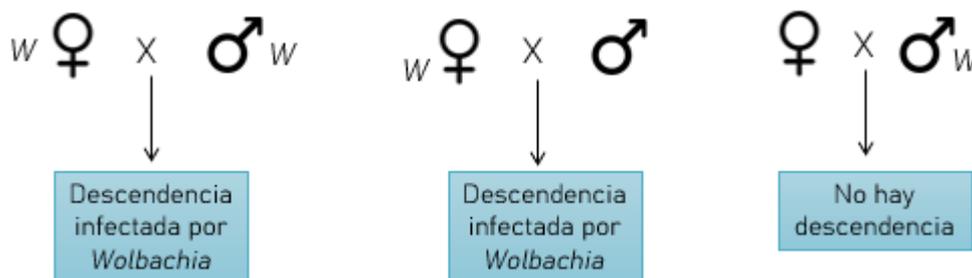


Figura 8. Propagación de Wolbachia en la población. W: individuos infectados por *Wolbachia*. Adaptado de Champer et al., 2016

Se ha descubierto una cepa de *Wolbachia* que, de manera natural, evitan que los mosquitos sean hospedadores del virus del dengue. Estas cepas ya se han desplegado con éxito en Australia y otros lugares, extendiéndose por las poblaciones naturales y reduciendo de manera significativa la amenaza del dengue (Ryan et al., 2020).

3.6. OTROS SISTEMAS DE IMPULSO GÉNICO

Se conocen, a parte de los ya descritos, otros sistemas naturales que podrían ser aprovechados para el diseño de impulsores, pero existen demasiadas dudas acerca de su utilidad o conveniencia. Uno de los más mencionados son los elementos transponibles, los cuales podrían ser ligados a un gen de carga útil que aumentaría su frecuencia en el genoma de un organismo objetivo y, finalmente, en la población (Rasgon and Gould, 2005). Sin embargo, los elementos transponibles a menudo tienen tasas de transposición que son demasiado bajas para ser usados como impulsores génicos (Sinkins and Gould, 2006). Además, es un sistema con consecuencias impredecible debido a la falta de control sobre los sitios de integración en el genoma y se ha demostrado que son difíciles de eliminar después de ser liberados en una población (Smith and Atkinson, 2011).

Por otro lado, los cromosomas B se han propuesto como vehículos para transportar genes de carga útil, ya que estos pequeños cromosomas se heredan a tasas mayores que las tasas mendelianas y en algunos casos incluyen regiones de cromatina que pueden transcribirse (Houben et al., 2014). Sin embargo, no se entiende bien su mecanismo de propagación, hecho que dificulta su uso como impulsor génico.

Otro posible sistema natural para el desarrollo de genoimpulsores es el denominado *Merea*. Su funcionamiento es similar al sistema *Medea*, pero en este caso el antídoto contra la toxina materna es recesivo (Marshall, 2011). En el denominado sistema *Semele*, por el contrario, la toxina pasa al cigoto a través del progenitor masculino y el antídoto se hereda del progenitor femenino (Marshall et al., 2011). Por último, el sistema *Medusa* induce un colapso de las poblaciones de insectos al utilizar un par de antídoto-toxina ligados al sexo (Marshall and Hay, 2014).

4. APLICACIONES REALES Y POTENCIALES

Con el impulso génico se pretende modificar el destino de una población, mediante la liberación de individuos genéticamente modificados, para propagar una variante

genética deseada o un gen de carga útil en poblaciones naturales. Dependiendo del efecto del impulsor génico sobre estas poblaciones, podemos distinguir tres tipos: impulsores de erradicación, de supresión y de rescate (Rode et al., 2019).

Los genoimpulsores de erradicación y supresión están diseñados para suprimir o reducir el tamaño de una población, respectivamente. Los primeros dependen de la introducción de una mutación con un efecto deletéreo fuerte, mientras que en las segundas la acción de la carga genética introducida es más moderada (Rode et al., 2019). Se diseñan principalmente para eliminar o reducir posibles vectores transmisores de enfermedades en humanos y para el control de plagas agrícolas, aunque también se pueden usar para el manejo de los ecosistemas en la conservación, dirigiéndolos a especies invasoras que amenazan la biodiversidad de la zona (Esvelt et al., 2014). Los impulsores de rescate, por el contrario, podrían diseñarse para recuperar o conservar poblaciones en peligro mediante la introducción de mutaciones beneficiosas o mediante la eliminación de aquellas dañinas. Este tipo de impulsor permite un flujo genético asistido en un locus específico, proporcionando alelos beneficiosos para algunos rasgos adaptativos, mientras se mantienen alelos a altas frecuencias para otros rasgos adaptativos. Además de su potencial aplicación en biología de la conservación, los impulsores de rescate pueden ser de gran utilidad en agricultura, por ejemplo, proporcionando a las abejas algún rasgo hereditario que las haga menos susceptibles a los insecticidas (Rode et al., 2019); y en la salud humana, evitando que los vectores de enfermedades parasitarias hospeden a ciertos patógenos.

Los impulsores de rescate representan una pequeña fracción de las aplicaciones potenciales del impulso génico en biología de la conservación, puesto que la mejora genética de un sistema biológico requiere un mayor grado de conocimiento que lo que se necesita para perjudicar la eficacia biológica de los individuos.

A continuación, se describen algunos experimentos que se han realizado aplicando el impulso génico con distintos fines:

- Erradicación de una población de mosquitos

Anopheles gambiae es uno de los vectores más importante de la malaria en África y, por tanto, una de las especies objetivo con mayor interés dentro de este campo. En esta

especie de mosquito los genes de ARNr se encuentran en un solo grupo de cientos de copias en el cromosoma X, lo que lo convierte en un objetivo ideal (Windbichler et al., 2007). Se consiguió en esta especie producir un sesgo en las proporciones de sexo (hasta el 95% de machos), mediante la expresión de una nucleasa dirigida a dicha secuencia durante la espermatogénesis, utilizando tanto una meganucleasa modificada (Galizi et al., 2014) como con el sistema CRISPR-Cas9 (Galizi et al., 2016). La reducción del número de hembras en la población es de gran interés porque los machos no pican a las personas y, por lo tanto, no transmiten la enfermedad. Por otro lado, la capacidad reproductiva de la población de mosquitos disminuye si la mayoría de los individuos son machos (Deredec et al., 2011), pudiendo llegar a eliminarla por completo. Las construcciones genéticas diseñadas hasta la fecha aún no constituyen un sistema de impulso génico completamente funcional, porque el impulsor ha sido insertado en un autosoma, que se transmiten de forma mendeliana. El siguiente paso es insertarlo en el cromosoma Y, lo cual es un desafío, porque tiene una estructura muy repetitiva y se suprime, en gran medida, la expresión de los genes ligados al Y durante la meiosis.

En otro experimento realizado también en jaulas con el mosquito *Anopheles gambiae* se diseñó un impulsor que anulaba un gen que afecta a la fecundidad, el gen *doublesex*. Las hembras portadoras del impulsor ni picaban ni ponían huevos, por lo que al cabo de 8 a 12 generaciones la población de las jaulas no producía huevos. Como el gen *doublesex* es primordial para la reproducción, su nivel de variación genética en poblaciones naturales es muy bajo, lo que hace más improbable la aparición de alelos de resistencia contra el genoimpulsor (Scudellari, 2019). Gracias a la propagación de este genoimpulsor en la población de mosquitos, las hembras serían incapaces de producir descendencia por lo que se acabaría erradicando la población. Por tanto, si se aplicara en el campo podría reducir en gran medida la transmisión de enfermedades por estos mosquitos.

- Eliminación de plagas de ratones

Los ratones tienen un genoimpulsor natural llamado haplotipo *t*. Los machos heterocigotos para este impulsor lo transmiten a más de la mitad de su descendencia, de modo que casi todos los descendientes de un macho heterocigoto heredan el haplotipo *t*. El proyecto *t-Sry* se planteó como objetivo insertar un gen clave de determinación del

sexo de los mamíferos, el gen *Sry* del cromosoma Y del ratón, en el haplotipo *t* que está en el cromosoma 17, creando así *t-Sry*, un impulsor génico autosómico que convierte a todos los individuos que lo heredan en machos. La finalidad es introducir *t-Sry* en las poblaciones de ratones que se comportan como plagas en las islas, convirtiendo así a toda la población en machos y eliminándola por completo (Backus and Gross, 2016; Leitschuh et al., 2018).

- Introducción de alelos de resistencia a infecciones fúngicas en especies de anfibios amenazadas

El hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* ha surgido como una amenaza global para aproximadamente el 50% de las especies de anfibios (Fisher et al., 2009). El hongo se reproduce generalmente mediante reproducción asexual y, por lo tanto, no se puede atacar con un impulsor génico. El complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) juega un papel importante en el sistema inmunológico innato de vertebrados, presentando antígenos a los linfocitos. Se ha demostrado que un alelo MHC específico aumenta la posibilidad de supervivencia de los individuos infectados en la rana *Lithobates yavapaiensis* (Savage and Zamudio, 2011). El uso de CRISPR-Cas9 para el desarrollo de un genoimpulsor que propague alelos MHC de resistencia podría ser una estrategia para proteger o recuperar las poblaciones de anfibios amenazadas por el hongo *B. dendrobatidis*. A pesar de que el reemplazo de un gen MHC endógeno por un alelo MHC resistente aumentaría la resistencia a este hongo, también reduciría la diversidad alélica en el locus MHC, que a su vez podría aumentar la susceptibilidad de la población a otros patógenos. Una alternativa sería la introducción de un impulsor génico, que incluya un alelo MHC de resistencia, en un locus diferente. Esta estrategia podría preservar la variabilidad del MHC, por lo que la población estaría más protegida frente a otros patógenos, pero es probable que afectara a la estabilidad del genoimpulsor debido a los riesgos de recombinación con el locus MHC endógeno (Rode et al., 2019).

5. DINÁMICA DE PROPAGACIÓN DE LOS GENOIMPULSORES

La propagación de un impulsor puede llegar a ser muy rápida en condiciones ideales. Por ejemplo, en el caso de un impulsor que no conlleve coste sobre la eficacia biológica y tenga una eficiencia de transmisión del 100%, se conseguiría un aumento de frecuencia del genoimpulsor en la población del 1% al 99%, en tan sólo 9 generaciones

(Burt and Crisanti, 2018). Sin embargo, la dinámica de propagación de un genoimpulsor se ve condicionada por diferentes factores: unos dependen del diseño del impulsor, como, por ejemplo, su efecto sobre la eficacia biológica y el momento de expresión; otros dependen de la especie objetivo, como su sistema de reproducción y la estructura poblacional (Rode et al., 2019).

- Sistema de reproducción de la especie diana

Para que un impulsor se propague a través de una población es necesario que exista reproducción sexual, idealmente mediante fecundación cruzada. En aquellas especies que puedan autofecundarse o reproducirse tanto sexualmente como asexualmente habrá más complicaciones para propagar el genoimpulsor, al no tener como único la reproducción sexual (Pannell et al., 2015).

- Tiempo de generación de la especie diana

Los impulsores pueden invadir poblaciones en unas pocas generaciones, pero este proceso podría llevar varios siglos en especies longevas. Por ejemplo, en el pino blanco, con un tiempo de generación de 30 años (Nijensohn et al., 2005), se tardaría 300 años aproximadamente en aumentar la frecuencia de un genoimpulsor del 1% al 99%, asumiendo una eficiencia de transmisión del 100%. Por esto, un organismo diana ideal debería tener un tiempo de generación relativamente corto, de lo contrario se tardaría demasiado tiempo en propagar el genoimpulsor en toda la población y sería improbable que éste surtiera el efecto deseado.

- Momento de expresión del genoimpulsor

El momento adecuado de expresión del impulsor es distinto según si este se quiere propagar para erradicar/suprimir una población o como impulsor de rescate. Cuando se propaga con el fin de erradicar o suprimir una población, se debe expresar en la línea germinal. Si un impulsor de erradicación se expresara en el cigoto, es posible que este no llegue a la madurez sexual debido a un coste de aptitud para el organismo, por lo que no se transmitiría a la descendencia, de modo que la conversión génica tardía en las gónadas favorece la propagación de este tipo de genoimpulsor. Por el contrario, la conversión temprana en el cigoto favorece la propagación de los impulsores de rescate, ya que estos benefician al organismo. Cabe destacar que el momento en el que se

expresa el impulsor se puede ajustar experimentalmente utilizando promotores que permiten la expresión en las diferentes etapas (Hammond et al., 2020).

- Estructura y dispersión de la población diana

En poblaciones estructuradas espacialmente, la dispersión es un parámetro que considerar para predecir la propagación del impulso génico. La fragmentación de una población con bajas tasas de dispersión entre subpoblaciones afectaría a la dinámica del impulso génico, ralentizando la propagación de un impulsor, esto es frecuente por ejemplo en especies en peligro de extinción. Por otro lado, encontramos poblaciones estructuradas en el tiempo debido a la existencia de etapas de reposo, como el reservorio de semillas en dormancia. Esta estructuración resultaría en una aparición constante de individuos de tipo salvaje durante años, que podría reducir la propagación de los genoimpulsores (Rode et al., 2019). Su efecto sería similar al del flujo génico entre poblaciones.

- Densidad de la población en el momento de liberación de un impulsor

Dependiendo del número de individuos que haya en una población cuando se libera el impulsor, la propagación puede verse afectada. Si el número de individuos es muy bajo la propagación será más lenta, porque la probabilidad de reproducción sexual de un determinado individuo disminuye.

- Resistencias

Actualmente, la aparición de resistencias es una de las principales causas de fracaso en los estudios experimentales sobre impulso génico, ya que suelen dificultar la propagación de un impulsor. Las resistencias pueden aparecer a nivel molecular, por ejemplo, cuando un cromosoma no es reconocido o no es escindido por la proteína Cas; o a nivel de comportamiento, cuando los individuos de tipo salvaje evitan aparearse con individuos portadores del impulsor génico (Rode et al., 2019; Price et al., 2020). El alelo resistente que impide la propagación del impulsor podría estar por naturaleza en la población u originarse una vez es reparada la doble rotura que se produce en el cromosoma homólogo (McFarlane et al., 2018).

A diferencia de las endonucleasas naturales, que toleran cierta variación en los nucleótidos de la secuencia diana, el corte por CRISPR-Cas9 requiere una coincidencia

casi perfecta entre la secuencia del ARN guía de aproximadamente 20 pares de bases y el sitio diana. Por lo tanto, las diferencias de un solo nucleótido en los sitios objetivo pueden conferir resistencia (Price et al., 2020). Asimismo, es más probable que aparezca un alelo resistente si la rotura es reparada mediante NHEJ o MMEJ debido a la aparición de mutaciones de inserción o deleción. Sin embargo, la reparación por HDR también tiene un pequeño porcentaje de error y, si no se lleva a cabo perfectamente, cabe la posibilidad de que aparezca un alelo resistente, el cual sería fuertemente seleccionado a favor y, por tanto, impediría la propagación del genoimpulsor a la descendencia (Champer et al., 2016).

Existen distintas estrategias para retrasar o prevenir la evolución de una posible resistencia en el sitio diana de corte. La primera de estas es diseñar un impulsor con secuencias diana en regiones altamente conservadas en las que la probabilidad de que aparezcan variantes es muy baja. En estas regiones los cambios normalmente están asociados con altos costos de aptitud e incluso puede matar al individuo (Kyrou et al., 2018; Scudellari, 2019). Esto, sin embargo, aumenta la probabilidad de que el genoimpulsor se propague a especies no objetivo. Otra de las posibles medidas para evitar la aparición de resistencias es añadir al sistema varios gRNAs diferentes (Figura 9), para así hacer que la endonucleasa corte en múltiples sitios. Además, de esta forma aumenta la eficiencia del sistema, (McFarlane et al., 2018). Una tercera estrategia se basa en la combinación de múltiples mecanismos de impulso génico, lo que podría retrasar la aparición de resistencias (Simoni et al., 2020).

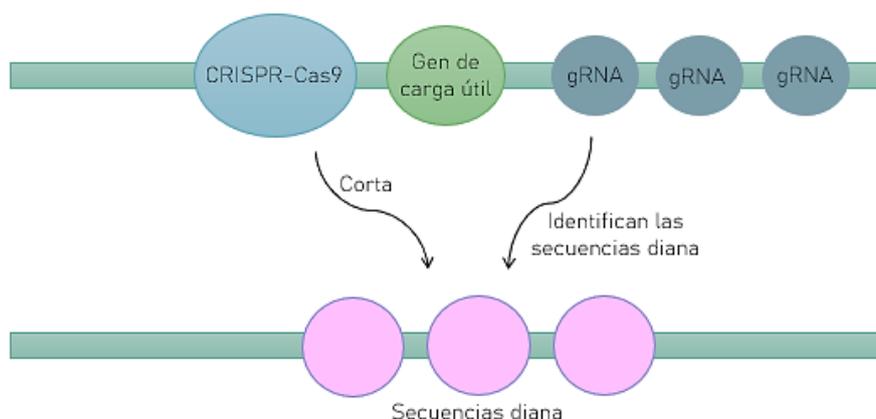


Figura 9. Impulsor hospedador con más de un gRNA. El sistema se ha diseñado con varios gRNAs que reconocen diferentes secuencias diana en el cromosoma homólogo.

En cualquier sistema de impulso génico la selección para la resistencia actuará sobre el propio locus objetivo, los genes ligados al objetivo y, en algunos casos, sobre todo el genoma. La fuerza de la selección contra un impulsor puede variar: un impulsor dirigido a matar a los portadores, a impedir la reproducción o a distorsionar la proporción de sexos, creará una selección extremadamente fuerte para la resistencia que aparece contra el impulsor; por el contrario, un impulsor génico que no conlleva ningún coste para el organismo seleccionará la resistencia en el locus objetivo y en los sitios ligados, pero no tendrá ningún efecto en el resto del genoma (Price et al., 2020).

6. RIESGOS

El uso del impulso génico podría resultar en peligros potenciales a diferentes escalas desde el nivel molecular hasta el nivel de ecosistema. En la actualidad es imposible anticipar todas las consecuencias de los impulsores en la naturaleza, pero lo que está claro es que puede ser un arma muy poderosa. Por ejemplo, un proyecto en el que se utilizó la cepa de *Wolbachia* wMelPop para invadir poblaciones de mosquitos en jaulas, fracasó en varios ensayos de campo porque los huevos producidos por las hembras presentaban una viabilidad inesperadamente reducida (Nguyen et al., 2015).

6.1. PÉRDIDA DE HETEROCIGOSIDAD

Una de las consecuencias del impulso génico es la pérdida de heterocigosidad (inherente al fenómeno de conversión génica) cuando se usa un impulsor hospedador para introducir en la población un gen de carga útil. Esto representa un riesgo importante en los impulsores de rescate, ya que se podrían malograr los efectos beneficiosos del impulsor al aparecer un aumento de la homocigosis. Por el contrario, la pérdida de heterocigosidad sería de interés desde la perspectiva de los impulsores destinados a la erradicación o supresión, ya que podría acelerar el declive de la población objetivo (Rode et al., 2019). En algunos casos la pérdida de heterocigosidad es muy drástica, pudiendo llegar a afectar a brazos cromosómicos enteros, como se ha encontrado en ciertos experimentos con levaduras (Gorter de Vries et al., 2019).

6.2. PROPAGACIÓN A POBLACIONES NO OBJETIVO

La aplicación de impulsores génicos conlleva el riesgo de que estos se puedan transmitir y afectar a poblaciones no objetivo. Varias estrategias podrían limitar este efecto no deseado. Primero, los llamados impulsores de precisión que apuntarían a un gen o una secuencia específica de una población objetivo. Una segunda estrategia consiste en recodificar primero un alelo para propagar un gen sin costo de aptitud, y luego liberar un segundo impulsor dirigido solamente a aquellos alelos que han sido recodificados (Esvelt et al., 2014). No obstante, los individuos portadores de impulsores destinados al rescate de una población se ven favorecidos selectivamente y, por lo tanto, podrían hibridar con poblaciones no objetivo.

6.3. PROPAGACIÓN A ESPECIES NO OBJETIVO

Otro de los riesgos de esta técnica es la transmisión del impulsor a especies no objetivo, un suceso que podría tener un gran efecto a nivel ecosistémico. Se han documentado transferencias de genes de endonucleasas hospedadoras naturales entre especies estrechamente relacionadas, probablemente por hibridación, y entre especies lejanas, posiblemente por transferencia horizontal (Rode et al., 2019; Wedell et al., 2019).

La transferencia horizontal de genes en la naturaleza puede ocurrir a través de parásitos, patógenos o endosimbiontes, por ejemplo, virus, bacterias u hongos o parasitoides en animales. Además, se puede transmitir entre especies que están extremadamente alejadas evolutivamente, por ejemplo, el elemento genético transponible denominado *BovB*, se ha movido al menos 11 veces entre serpientes, lagartos, rumiantes y marsupiales (Ivancevic et al., 2017). Otro ejemplo son los elementos P que han invadido poblaciones de *D. melanogaster* en todo el mundo, probablemente después de un solo evento de transferencia horizontal desde *D. willistoni* (Clark and Kidwell, 1997).

6.4. RIESGOS PARA EL ECOSISTEMA

Además de los riesgos directos que conllevan los impulsores génicos, también es importante evaluar las consecuencias más amplias que tendría en el ecosistema la eliminación o alteración de la población o especies objetivo (Wedell et al., 2019).

Eliminar o reducir la densidad de una especie afectará a la dinámica de sus presas, depredadores y competidores, y posiblemente a las otras especies con las que estas interactúan (Godfray et al., 2017). Cabe destacar que los riesgos que conlleva eliminar una especie de un ecosistema no son exclusivos de la gestión de poblaciones mediante genoimpulsores, pero siempre hay que tenerlo en cuenta si se quiere liberar un impulsor en una población natural.

La eliminación de especies podría tener impactos negativos en los ecosistemas a través de efectos indirectos en las redes tróficas, los cuales dependen de la posición de las especies en las mismas. Por ejemplo, la ausencia repentina de una especie que es consumida en gran medida por los depredadores de la zona podría resultar en un aumento de la depredación sobre otras especies (Courchamp et al., 2003). Los impulsores de rescate, además, podrían desestabilizar las redes tróficas, por ejemplo, convirtiendo una especie que está en peligro de extinción en una especie perturbadora, debido al aumento en el tamaño de su población. Por otro lado, cuando dos especies compiten por el mismo nicho si se propaga el impulsor solo a una de las dos especies, puede resultar en un aumento de la población de la otra especie, un evento que no siempre es positivo para el ecosistema.

Además, la liberación de individuos con genoimpulsores puede aumentar excesivamente el tamaño de la población, lo que puede acarrear consecuencias ecológicas negativas potencialmente duraderas (David et al., 2013).

6.5. PROCEDIMIENTOS PARA MITIGAR LOS RIESGOS

Debido a todos los posibles riesgos que puede conllevar la propagación de un impulsor génico, se han consensado una serie de medidas y recomendaciones a seguir en caso de querer aplicarlo en una población salvaje. Estas actuaciones no eliminan los posibles riesgos, pero sí podrían disminuir la probabilidad de que ocurran o revertir el efecto producido. Varios grupos de expertos han propuesto una serie de directrices para evitar que organismos portadores de un genoimpulsor se propaguen por una población de forma descontrolada, de forma intencionada o involuntaria (Akbari et al., 2015):

- **Confinamiento ecológico**, mediante la realización de investigaciones de impulso génico en países donde la especie objetivo no está presente o no puede establecerse en la naturaleza.

- **Contención física**, mediante restricciones naturales o artificiales. Los experimentos se deberían desarrollar en jaulas o habitáculos que eviten la fuga de individuos y su establecimiento en el ecosistema de la zona. En teoría, una buena contención para los experimentos de impulso génico son las islas no pobladas por humanos, en las que hay menos posibilidades de que los individuos migren.

- **Confinamiento reproductivo**, mediante el uso de líneas de laboratorio que no pueden reproducirse con individuos silvestres, por ejemplo, mutantes de *Drosophila* con reordenamientos cromosómicos.

- **Confinamiento molecular**, mediante el uso de impulsores con el gen Cas9 y el gRNA en diferentes cromosomas, o mediante impulsores dirigidos a una secuencia artificial (DiCarlo et al., 2015; Champer et al., 2019).

- **Identificación molecular**, mediante el etiquetado de cepas portadoras del genoimpulsor con marcadores fenotípicos específicos de expresión dominante (Benedict et al., 2017).

Al mismo tiempo, por prevención, siempre se debería liberar el impulsor génico teniendo disponible una estrategia que lo inactive en caso de que se produzcan efectos no deseados. A pesar de ello, es probable que las contramedidas contra los impulsores de rescate fallen, ya que los alelos introducidos artificialmente confieren, en teoría una mayor aptitud que los alelos de tipo salvaje.

Un método sencillo para detener un impulsor génico en curso es liberar individuos resistentes a los impulsores, los cuales llevan una copia del gen objetivo, pero sin la secuencia diana (Vella et al., 2017). Otra posibilidad es diseñar simultáneamente un impulsor que invierta el efecto del primero e impida que este siga propagándose en las generaciones futuras, haciendo resistentes a los organismos en cuestión (McFarlane et al., 2018). Dependiendo de si el segundo impulsor incluye el gen Cas9 o no, se pueden distinguir dos tipos (Figura 10): "los impulsores reversibles inmunizantes" y "los impulsores reversibles". Los primeros son utilizados para reemplazar tanto al impulsor inicial como al alelo diana de tipo salvaje. En este tipo se incluye el gen Cas9 y dos gRNA diferentes que se dirigen a la secuencia de tipo salvaje y a la secuencia del genoimpulsor inicial. Los impulsores reversibles, por otro lado, no poseen el gen *Cas9* pero sí el gRNA que lo dirige a la secuencia del impulsor génico inicial aprovechando la endonucleasa preexistente (Rode et al., 2019).

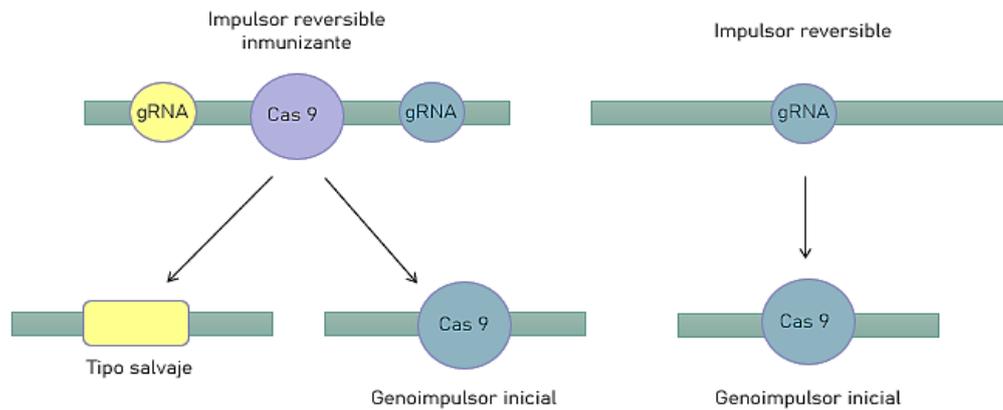


Figura 10. Efecto de un impulsor reversible inmunizante y un impulsor reversible. Para eliminar el efecto de un primer impulsor liberado en una población, se puede liberar un impulsor reversible inmunizante que reemplaza la secuencia de tipo salvaje y la secuencia del primer impulsor o se puede liberar un impulsor reversible que simplemente reemplaza la secuencia del primer impulsor.

En el caso concreto de los impulsores basados en el fenómeno de subdominancia es relativamente sencillo revertir el efecto del genoimpulsor, teóricamente liberando un número suficientemente alto de individuos con el genotipo salvaje. Por otro lado, este tipo de impulsores tienen una alta probabilidad de permanecer en una población local, porque disminuye la posibilidad de hibridación (Champer et al., 2016).

Hay que tener en cuenta que una vez se libera un impulsor en una población, no se puede recuperar al 100% el genotipo de tipo salvaje, porque quedarán residuos de Cas9 y gRNAs en la población (McFarlane et al., 2018). Por tanto, una vez introducido el impulsor génico en una población, esta, ya se considera genéticamente modificada y es poco probable que se pueda restablecer el genotipo original, simplemente se pueden mitigar los efectos producidos con la edición del genoma. Las poblaciones fijadas para un impulso reversible también se consideran genéticamente modificados, ya que, aunque no portan el gen que codifica para Cas9, siguen expresando el gRNA.

6.6. REGULACIONES LEGISLATIVAS PARA LA APLICACIÓN DEL IMPULSO GÉNICO

Debido al conjunto de riesgos asociados a la aplicación del impulso génico en una población en la naturaleza, es necesario hacer un estudio previo de peligros potenciales. Por ello, se han descrito una serie de factores que se deberían evaluar antes de llevar a cabo la liberación de un genoimpulsor en una población:

- Se debería disponer de un genoma de referencia tanto de la especie objetivo como de las especies no objetivo de la zona, para identificar dianas potenciales y diseñar gRNA que sean específicos de los loci de la población o especie objetivo (Moro et al., 2018).

- La cuantificación del flujo de genes entre poblaciones de la especie objetivo o entre esta y especies no objetivo (hibridación o transferencia horizontal) es otro de los parámetros que se deberían evaluar.

- Disponer de datos demográficos y ecológicos es otro requisito importante, por ejemplo, conocer la variación espacio-temporal en el tamaño de una población, al igual que la obtención de modelos de la estructura de la red trófica para predecir los impactos en el ecosistema a corto y largo plazo (Moro et al., 2018).

- Obtener una buena comprensión del sistema de apareamiento que informe de la existencia de poblaciones estructuradas, de la posibilidad de autogamia o de multiplicación asexual (Webber et al., 2015).

Una vez obtenida toda la información necesaria sería posible realizar ensayos en la naturaleza, liberando a los individuos con el genoimpulsor, pero siempre siguiendo las regulaciones que dicte cada país. En Estados Unidos, el comité NASEM (*National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine*) recomendó que la investigación de laboratorio y los ensayos de campo deben continuar porque son muy importantes los potenciales beneficios de la investigación teórica y aplicada de esta tecnología. Por otro lado, se ha propuesto que la investigación debería seguir un proceso de 4 fases, y la seguridad debe ser una consideración fundamental en cada una de ellas. Las fases son las siguientes: fase 0, preparación de la investigación; fase 1, investigación de laboratorio; fase 2, investigación de campo; fase 3, liberación ambiental por etapas; y fase 4, vigilancia posterior a la liberación. (Collins, 2018).

A nivel internacional, la Convención de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica destaca la necesidad de una evaluación de riesgos en cada uno de los casos, para minimizar los posibles efectos adversos, y la importancia de obtener el consentimiento informado de las comunidades locales que podrían verse afectadas (Rode et al., 2019).

Lógicamente, los impulsores génicos están sujetos a la regulación nacional e internacional de organismos genéticamente modificados (OGM) y sus disposiciones, ya

que son OGM al contener fragmentos foráneos de ADN recombinantes. Estas modificaciones genéticas pueden acabar modificando el destino de una población lo que conlleva a su vez cambios en el ecosistema en el que esta habita, incluyendo a los humanos (Werren, 2011; McLaughlin and Malik, 2017). Sin embargo, como la tecnología está evolucionando rápidamente, algunos de los marcos regulatorios internacionales y nacionales de OGM deben adaptarse a las especificidades de los organismos tratados mediante impulso génico (Rode et al., 2019), dados los altos riesgos de propagación de un genoinpulsores a través de las fronteras. Existe, por tanto, una necesidad imperiosa de construir un marco regulatorio internacional sólido.

7. CUESTIONES ÉTICAS

Los aspectos éticos deberían de estar siempre presentes cuando lo que se propone es modificar el genoma de una especie, ya que las consecuencias pueden ser de gran impacto y algunas de ellas imposibles de revertir. Además, no afectan solo a la población o especie que es modificada, sino que también puede influir sobre el ecosistema, por lo que requieren distintas evaluaciones éticas y políticas (Lunshof, 2015). Para ello, se necesitan comités éticos independientes que justifiquen y determinen objetivamente si los proyectos de investigación basados en impulso génico pueden ser llevados a cabo. Asimismo, es importante proporcionar la información necesaria para que las partes interesadas y las comunidades locales puedan tomar decisiones informadas, considerando tanto los beneficios como los riesgos asociados al uso del impulso génico en poblaciones salvajes (Rode et al., 2019).

Los organismos modificados con impulso génico pueden verse como una tecnología eficiente para el control de poblaciones, pero también como potenciales armas biológicas, por esto la pregunta ya no es si podemos controlar a las especies o subpoblaciones utilizando el impulso génico, sino si deberíamos hacerlo (Rode et al., 2019).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Se ha resumido en esta memoria la gran variedad de usos potenciales del impulso génico, tanto en agricultura, como en la salud humana o en la conservación de la

biodiversidad. Algunas de las aplicaciones aportan un gran beneficio al ecosistema y especialmente a los humanos, pero en ocasiones a costa de la erradicación de poblaciones enteras o incluso de especies, lo cual, como mínimo, es preocupante. No obstante, los genoimpulsores son muy prometedores para el manejo de poblaciones, ya que suelen tener una menor repercusión en la salud, la económica y el ambiente que los métodos tradicionales usados en diferentes escenarios. Debido a sus potenciales bajos costes y gran escala de acción, los impulsores han sido considerados por algunos autores como una solución polivalente en biología de la conservación, agricultura y salud pública. Sin embargo, su implementación podría tener consecuencias no deseadas de gran alcance y provocar una modificación irremediable del entorno natural, por lo que otros autores señalan que los impulsores génicos plantean fuertes amenazas para la conservación.

Para poder determinar si el impulso génico es una técnica factible en sus distintos campos de aplicación, se requiere seguir investigando para así conocer con gran detalle sus mecanismos de acción y establecer los riesgos que puede conllevar, así como las posibles soluciones que se requerirían. Hasta entonces, la aplicación en el campo debería estar limitada a aquellas regiones que cumplan las condiciones recomendadas de confinamiento y contención. Además, no debemos considerar solo los aspectos técnicos del impulso génico, sino también abarcar los éticos y sociales, antes de llevar a cabo cualquier experimento.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

The great variety of potential uses of the gene drive has been summarized in this report, both in agriculture, as well as in human health or in the conservation of biodiversity. Some of the applications bring great benefit to the ecosystem and especially to humans, but sometimes, at the cost of eradicating entire populations or even species, which is worrying to say the least. However, gene drives hold great promise for population management, as they tend to have less impact on health, economics, and the environment than traditional methods used in different areas. Due to their potential low costs and large scale of action, gene drive has been considered, by some authors, as a multipurpose solution in conservation biology, agriculture, and public health. However, their implementation could have far-reaching unintended

consequences and lead to irreparable modification of the natural environment, which is why other authors point out that gene drives present strong threats to conservation.

In order to determine whether gene drive is a reliable technique in its different fields of application, further research is required in order to know in great detail its mechanisms of action and establish the risks that it may entail, as well as the possible solutions that would be required. Until then, field application should be limited to those regions that meet the recommended confinement and containment conditions. Furthermore, we should not only consider the technical aspects of gene drive, but also include the ethical and social ones, before conducting any experiments.

BIBLIOGRAFÍA

- Akbari OS, Bellen HJ, Bier E, Bullock SL, Burt A, Church GM et al. (2015). BIOSAFETY. Safeguarding gene drive experiments in the laboratory. *Science*. 349: 927-929.
- Backus GA and Gross K (2016). Genetic engineering to eradicate Invasive mice on islands: Modeling the efficiency and ecological impacts. *Ecosphere*. 7: e01589.
- Beeman RW, Friesen KS and Denell RE (1992). Maternal-effect selfish genes in flour beetles. *Science*. 256: 89-92.
- Benedict MQ, Burt A, Capurro ML, De Barro P, Handler AM, Hayes KR et al. (2017). Recommendations for Laboratory Containment and Management of Gene Drive Systems in Arthropods. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 18: 2-13.
- Burt A and Crisanti A (2018). Gene Drive: Evolved and Synthetic. *ACS Chem Biol*. 13: 343-346.
- Burt A and Trivers R (2006). Genes in Conflict: The Biology of Selfish Genetic Elements. *Harvard University Press. Cambridge*.
- Champer J, Buchman A and Akbari OS (2016). Cheating evolution: Engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nat Rev Genet*. 17: 146-159.
- Champer J, Chung J, Lee YL, Liu C, Yang E, Wen Z, Clark AG and Messer PW (2019). Molecular safeguarding of CRISPR gene drive experiments. *Elife*. 8: e41439.
- Clark JB and Kidwell MG (1997). A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 11428-11433.
- Courchamp F, Chapuis JL and Pascal M (2003). Mammal invaders on islands: impact, control and control impact. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 78: 347-83.

- David AS, Kaser JM, Morey AC, Roth AM and Andow DA (2013). Release of genetically engineered insects: a framework to identify potential ecological effects. *Ecol Evol* 3: 4000-4015
- Deredec A, Burt A and Godfray HCJ (2008). The population genetics of using homing endonuclease genes in vector and pest management. *Genetics*. 179: 2013-2026.
- Deredec A, Godfray HC and Burt A (2011). Requirements for effective malaria control with homing endonuclease genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108: 874-880.
- Devos Y, Bonsall MB, Firbank LG, Mumford J, Nogué F and Wimmer EA (2020). Gene Drive-Modified Organisms: Developing Practical Risk Assessment Guidance. *Trends Biotechnol*, Epub ahead of print. DOI: 10.1016/j.tibtech.2020.11.015
- DiCarlo JE, Chavez A, Dietz SL, Esvelt KM and Church GM (2015). Safeguarding CRISPR-Cas9 gene drives in yeast. *Nat Biotechnol*. 33: 1250-1255.
- Egli D, Hafen E and Schaffner W (2004). An efficient method to generate chromosomal rearrangements by targeted DNA double-strand breaks in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 14: 1382-1393.
- Esvelt KM, Smidler AL, Catteruccia F and Church GM (2014). Emerging technology: concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*. 3: e03401.
- Fisher MC, Garner TW and Walker SF (2009). Global emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and amphibian chytridiomycosis in space, time, and host. *Annu Rev Microbiol*. 63: 291-310.
- Galizi R., Doyle L, Menichelli M, Bernardini F, Deredec A, Burt A et al. (2014). A synthetic sex ratio distortion system for the control of the human malaria mosquito. *Nat Commun* 5: e3977.
- Galizi R, Hammond A, Kyrou K, Taxiarchi C, Bernardini F, O'Loughlin SM et al. (2016). A CRISPR-Cas9 sex-ratio distortion system for genetic control. *Sci Rep*. 6: e31139.
- Godfray HCJ, North A and Burt A (2017). How driving endonuclease genes can be used to combat pests and disease vectors. *BMC Biol*. 15: e81.
- Gorter de Vries AR, Couwenberg LGF, van den Broek M, de la Torre Cortés P, Ter Horst J, Pronk JT, Daran JG (2019). Allele-specific genome editing using CRISPR-Cas9 is associated with loss of heterozygosity in diploid yeast. *Nucleic Acids Res*. 47: 1362-1372.
- Hammond A, Karlsson X, Morianou I, Kyrou K, Beaghton A, Gribble M, et al. (2020). Regulation of gene drive expression increases invasive potential and mitigates resistance. *BioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/360339>
- Huang Y, Lloyd AL, Legros M and Gould F (2011). Gene-drive into insect populations with age and spatial structure: a theoretical assessment. *Evol. Appl*. 4: 415-428.
- Ivancevic AM, Daniel Kortschak R, Bertozzi T and Adelson DL (2017). Re-evaluating inheritance in genome evolution: widespread transfer of LINEs between species. *BioRxiv*. DOI: <https://doi.org/10.1101/106914>

- Kyrou K, Hammond AM, Galizi R, Kranjc N, Burt A, Beaghton AK, Nolan T and Crisanti A (2018). A CRISPR–Cas9 gene drive targeting doublesex causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat Biotechnol* 36: 1062-1066.
- Leitschuh CM, Kanavy D, Backus GA, Valdez RX, Serr M, Pitts EA, Threadgill D and Godwin J (2018). Developing gene drive technologies to eradicate invasive rodents from islands. *Journal of Responsible Innovation*. 5: 121-138.
- Lorenzen MD, Gnirke A, Margolis J, Garnes J, Campbell M, Stuart JJ et al. (2008). The maternal-effect, selfish genetic element Medea is associated with a composite Tc1 transposon. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 10085-10089.
- Marshall JM (2011). The toxin and antidote puzzle: new ways to control insect pest populations through manipulating inheritance. *Bioeng Bugs*. 2: 235-240.
- Marshall JM and Hay BA (2014). Medusa: a novel gene drive system for confined suppression of insect populations. *PLoS One*. 9: e102694.
- Marshall JM, Pittman GW, Buchman AB and Hay BA (2011). Semele: a killer-male, rescue-female system for suppression and replacement of insect disease vector populations. *Genetics*. 187: 535–551.
- McFarlane GR, Whitelaw CBA and Lillico SG (2018). CRISPR-Based Gene Drives for Pest Control. *Trends Biotechnol* 36: 130-133.
- McLaughlin RN and Malik HS (2017). Genetic conflicts: the usual suspects and beyond. *J Exp Biol*. 220: 6-17.
- Moro D, Byrne M, Kennedy M, Campbell S and Tizard M (2018). Identifying knowledge gaps for gene drive research to control invasive animal species: The next CRISPR step. *Glob Ecol Conserv*. 13: e00363.
- Nijensohn SE, Schaberg PG, Hawley GJ and DeHayes DH (2005). Genetic subpopulation structuring and its implications in a mature eastern white pine stand. *Can J For Res*. 35: 1041-1052.
- Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN et al. (2015). Field evaluation of the establishment potential of wMelPop *Wolbachia* in Australia and Vietnam for dengue control. *Parasit Vectors*. 8: e563.
- Pannell JR, Auld JR, Brandvain Y, Burd M, Busch JW, Cheptou PO et al. (2015). The scope of Baker's law. *New Phytol*. 208: 656-667.
- Price TAR, Windbichler N, Unckless RL, Sutter A, Runge JN, Ross PA, et al. (2020). Resistance to natural and synthetic gene drive systems. *J Evol Biol*. 33: 1345-1360.
- Rasgon JL and Gould F (2005). Transposable element insertion location bias and the dynamics of gene drive in mosquito populations. *Insect Mol Biol*. 14: 493-500.
- Rode NO, Estoup A, Bourguet D, Courtier-Orgogozo V and Débarre F (2019). Population management using gene drive: molecular design, models of spread dynamics and assessment of ecological risks. *Conserv Genet* 20: 671-690.

- Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Hurst TP, Retzki K, Brown-Kenyon J, et al. (2020). Establishment of *w* Mel *Wolbachia* in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. *Gates Open Res.* 3: e1547.
- Savage AE and Zamudio KR (2011). MHC genotypes associate with resistance to a frog-killing fungus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 16705-16710.
- Schmidt TL, Barton NH, Rašić G, Turley AP, Montgomery BL, Iturbe-Ormaetxe I, et al. (2017). Local introduction and heterogeneous spatial spread of dengue-suppressing *Wolbachia* through an urban population of *Aedes aegypti*. *PLoS Biol.* 15: e2001894.
- Scudellari M (2019). Self-destructing mosquitoes and sterilized rodents: the promise of gene drives. *Nature.* 571: 160-162.
- Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F and Sullivan W (2008). The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet.* 42: 683-707.
- Simoni A, Hammond AM, Beaghton AK, Galizi R, Taxiarchi C, Kyrou K et al. (2020). A male-biased sex-distorter gene drive for the human malaria vector *Anopheles gambiae*. *Nat Biotechnol.* 38: 1054-1060.
- Simoni A, Siniscalchi C, Chan YS, Huen DS, Russell S, Windbichler N and Crisanti A (2014). Development of synthetic selfish elements based on modular nucleases in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 42: 7461-7472.
- Sinkins SP and Gould F (2006). Gene drive systems for insect disease vectors. *Nat Rev Genet.* 7: 427-435.
- Smith RC and Atkinson PW (2011). Mobility properties of the Hermes transposable element in transgenic lines of *Aedes aegypti*. *Genetica.* 139: 7-22.
- Stoddard BL (2011). Homing endonucleases: From microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure.* 19: 7-15.
- Vella MR, Gunning CE, Lloyd AL and Gould F (2017). Evaluating strategies for reversing CRISPR-Cas9 gene drives. *Sci Rep.* 7: e11038.
- Webber BL, Raghu S and Edwards OR (2015). Opinion: Is CRISPR-based gene drive a biocontrol silver bullet or global conservation threat? *Proc Natl Acad Sci USA.* 112: 10565-10567.
- Wedell N, Price TAR and Lindholm AK (2019). Gene drive: progress and prospects. *Proc Biol Sci.* 286: e20192709.
- Werren JH (2011). Selfish genetic elements, genetic conflict, and evolutionary innovation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108: 10863-10870.
- Windbichler N, Papathanos PA, Catteruccia F, Ranson H, Burt A and Crisanti A (2007). Homing endonuclease mediated gene targeting in *Anopheles gambiae* cells and embryos. *Nucleic Acids Res.* 35: 5922-5933.