

Implementación de la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura de peces: revisión sistemática

Implementation of CRISPR-Cas technology for the treatment of diseases in fish aquaculture: A systematic review

Mighelangelo Santiago Arcila Quintero^{*} , Sara Michel Morales Polo^{*}

Resumen

Introducción: Aproximadamente el 50% de la pérdida en la producción acuícola destinada al consumo humano se debe a enfermedades causadas por patógenos. Muchos tratamientos tradicionales para estas enfermedades están prohibidos debido a sus efectos negativos en el medio ambiente, la salud del consumidor o el crecimiento de los peces. La modificación genética, en particular mediante la tecnología CRISPR-Cas, ofrece una solución prometedora. Esta tecnología permite realizar modificaciones genéticas y detectar secuencias específicas con una precisión superior a otros métodos. **Objetivo:** Describir las aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades de peces en la industria de la acuicultura. **Metodología:** Se realizó una búsqueda bibliográfica implementando los términos *aquaculture*, *CRISPR*, *CRISPR-Cas*, *CRISPR-Cas Systems*, *diseases*, *fish disease*, *treatment*, *treatments*, *control* en únicamente artículos originales publicados entre 2014 y 2024 en inglés, la búsqueda se realizó en ScienceDirect, Scopus y Google Scholar. **Resultados:** Los resultados muestran que China y Estados Unidos son líderes en este campo. Los patógenos más frecuentes en los estudios son virales, y los peces más estudiados son *Ictalurus punctatus* y *Salmo salar*. La aplicación más relevante es el diagnóstico de enfermedades virales y bacterianas mediante fluorescencia. CRISPR-Cas se está consolidando como una herramienta crucial para el diagnóstico temprano de enfermedades en peces. Su uso está en expansión para abordar tanto enfermedades bacterianas como virales, debido a la dificultad en su tratamiento y control. **Conclusiones:** Se requieren más investigaciones para confirmar su efectividad y sostenibilidad como alternativa viable para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura. **Palabras clave:** Acuicultura. Control. Crispr-Cas. Diagnóstico Temprano. Enfermedades de los Peces. Tratamiento.

^{*} Estudiantes de microbiología industrial y ambiental de la Universidad de Antioquia (Escuela de Microbiología).

Recepción: 24/09/2024. Aceptación: 15/12/2024

Cómo citar este artículo: Arcila Quintero S., Morales Polo SM. Implementación de la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura de peces: revisión sistemática. Hechos Microbiol. 2024;15(1): DOI: 10.17533/udea.hm.v15n1a04

Abstract

Introduction: Approximately 50% of production losses in aquaculture destined for human consumption are attributed to diseases caused by pathogens. Many traditional treatments for these diseases are prohibited due to their negative impacts on the environment, consumer health, or fish growth. Genetic modification, particularly through CRISPR-Cas technology, presents a promising solution. This technology enables precise genetic modifications and the detection of specific sequences with higher accuracy compared to other methods. **Objective:** To describe the applications of CRISPR-Cas technology in the treatment of fish diseases within the aquaculture industry. **Methodology:** A literature search was conducted using the terms aquaculture, CRISPR, CRISPR-Cas, CRISPR-Cas Systems, diseases, fish disease, treatment, treatments, and control. The search was limited to original articles published between 2014 and 2024 in English, and was conducted in ScienceDirect, Scopus, and Google Scholar. **Results:** Results indicate that China and the United States are leading in this field. Viral pathogens were most frequently studied, and *Ictalurus punctatus* and *Salmo salar* were the most common fish species. The most significant application of CRISPR-Cas is the diagnosis of viral and bacterial diseases through fluorescence. CRISPR-Cas is becoming an essential tool for the early diagnosis of fish diseases. Its use is expanding to address both bacterial and viral diseases due to the challenges associated with their treatment and control. **Conclusions:** Further research is necessary to confirm its efficacy and sustainability as a viable alternative for treating diseases in aquaculture.

Keywords: Aquiculture. Control. Crispr-Cas. Early Diagnosis. Fish Diseases. Treatment.

Introducción

Aproximadamente el 50% de la pérdida de la producción acuícola para consumo humano es debido a enfermedades causadas por patógenos de peces cuyos efectos negativos en la aptitud biológica de los mismos aumentan debido a las condiciones de estrés a las que están sometidos los peces en cautiverio^[1]. Sumado

a ello, la alta demanda obliga a que la producción de peces sea más rápida, por lo tanto, la disminución de la calidad del agua implementada crea condiciones óptimas para la rápida proliferación de los patógenos y que sumado al transporte masivo de los animales, equipos implementados y malas prácticas por parte de los operarios hacen que estas enfermedades tengan una mayor tasa de propagación [2,3,4]. Debido al aumento del estrés en los peces, la competencia por el alimento entre individuos, los sistemas inmunes de los peces deprimen su actividad considerablemente siendo más vulnerables a una infección [5]. Además, las enfermedades en los peces se logran diagnosticar asertivamente cuando su esparcimiento entre la población y los efectos en la salud están muy avanzados, lo que disminuye las probabilidades de éxito en los tratamientos, muchos de los cuales afectan negativamente las etapas de desarrollo de los peces, entre ellos, se encuentran los tintes basados en trifenilmetano, el cobre, acriflavinas y formalinas, cuyos residuos pueden resultar tóxicos tanto para el medio ambiente como para el consumidor, por lo que algunos de estos tratamientos se encuentran prohibidos en algunos países [6]. Conforme la población mundial va en aumento, la producción alimenticia debe hacerlo a la par para suplir la demanda, aumentando de manera rápida de 69 millones de toneladas a 93 millones a lo largo de las tres últimas décadas hasta el 2014 [7], teniendo en el 2020 una producción de 178 millones de toneladas, donde los países asiáticos son los responsables del 91,6% del total producido, siendo china el mayor contribuyente, seguida por Vietnam, Bangladesh, Egipto, Noruega y Chile, entre 2005 y 2020 [8]. Por parte de los ecosistemas marinos se ha determinado que poseen la capacidad de sostener la demanda per cápita hasta el año 2050 siempre y cuando se implementen adecuadas medidas para la administración, aumento y estabilidad del proceso de producción acuícola, así como su capacidad de nivelar los impactos del cambio climático^[9].

La modificación genética se ha convertido en una herramienta indispensable en el desarrollo biotecnológico tanto en las industrias como la medicina, actualmente, se implementa en el desarrollo de alimentos transgénicos, medicinas, y biomateriales, entre otros campos, por lo que hay un fuerte interés en encontrar nuevas metodologías que ofrezcan mayor

precisión y accesibilidad. Dentro de estas nuevas metodologías, las más recientes implementan elementos procedentes del sistema CRISPR-Cas bacteriano para la modificación genética. CRISPR-Cas (Repeticiones Palindrómicas Cortas, Agrupadas y Regularmente Interespaciadas y Cas porque se implementan las enzimas de dicha familia) es un sistema de inmunidad capaz de reconocer secuencias de fagos que son inyectadas en la célula y logra conferir una alta resistencia a estas infecciones virales, actualmente, está descrito sólo en procariotas (Archaea y Bacteria), y consiste principalmente en la degradación de la doble cadena del material genético viral que ingresa a la célula y un posterior almacenamiento de una “huella genética” de este, para que en caso de una reinfección la célula esté en capacidad de combatir rápidamente esta infección por parte del fago [10, 11].

La importancia del estudio del sistema CRISPR-Cas radica en que sus enzimas Cas sirven como una herramienta de edición genética, que se puede implementar para cortar el DNA de doble cadena de un gen de interés con una alta especificidad logrando resultados precisos y efectivos para el silenciamiento o incorporación de una secuencia de interés en el cromosoma del organismo [12,13]. El silenciamiento se logra evitando el inicio de la transcripción o la interrupción temprana de la misma mediante la inducción de mutaciones en la secuencia de tipo INDEL, término que es una abreviatura para mutaciones de tipo inserción y deleción, ya que el proceso de reparación celular de daño en el DNA mediante recombinación no homóloga en cadenas con un corte no adhesivo de doble cadena genera inserciones o deleciones que desplazan el marco de lectura, mientras que la incorporación de un gen de interés se logra mediante el mecanismo de reparación del DNA de la recombinación homóloga en la cual a partir de una secuencia con regiones homólogas la célula repara los daños en su DNA e incorpora toda la información que se encuentre entre los sitios homólogos a ambos extremos donde se realizó el corte [14]. Las técnicas derivadas de este sistema han reportado porcentajes de éxito en la incorporación o silenciamiento de genes mayores que los obtenidos por aproximaciones tradicionales como TALENS (Transcription Activator-Like

Effector Nuclease o Nucleasa de Actividad Similar a Activador de Transcripción en español) y Zinc Fingers (Dedos de Zinc), siendo hasta seis veces mayor y con un porcentaje de eficacia que oscila entre el 97% y el 99%, tanto en la implementación en animales como en microorganismos [15, 16]. Además, estas técnicas tradicionales son más complejas de implementar y tienen un mayor costo para la síntesis de sus componentes en comparación con CRISPR-Cas que posee mucha menor complejidad y menores costos económicos y que tras su descubrimiento fue rápidamente implementada en laboratorios alrededor del mundo, para la modificación genética en plantas y peces [17].

Este sistema ha sido foco de muchas investigaciones en la última década, entre las que se han descrito la existencia de 3 tipos de sistemas CRISPR-Cas encontrados en bacterias y arqueas, clasificados mediante un enfoque politético y apuntando a que pueden existir más de 11 subtipos con diferentes isoformas [18]. Además, la información de ellos y sus usos se encuentran muy dispersos en la literatura, en efecto, debido a que justamente se ha descrito como la herramienta de la nueva era y ha aumentado cada vez más el interés sobre este sistema y por lo tanto, también las publicaciones. Solo en el 2023 en el motor de búsqueda Google académico hay 39.700 artículos con la palabra CRISPR-Cas o su tema principal es este sistema, que resulta en una cantidad de información dispersa, segmentada, abrumadora y difícil de priorizar para un investigador que quiera conocer sus posibles usos y los avances realizados en el campo. En consecuencia, nace una necesidad de recopilar la información presente en la literatura científica sobre los usos de CRISPR-Cas en la acuicultura, tanto en su forma más común como de sus variantes en un mismo artículo. Por lo tanto, esta revisión sistemática busca describir las aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades de peces en la industria de la acuicultura, a partir de artículos de investigación publicados durante el periodo de tiempo 2014-2024, recopilando información sobre el tipo de agentes causales y peces de interés a los que se les han implementado las técnicas basadas en CRISPR-Cas para su tratamiento o diagnóstico.

Materiales y métodos

La presente revisión sistemática se realizó siguiendo la estrategia PRISMA 2020 [19]. Esta revisión sistemática se fundamentó en la pregunta: ¿Qué aplicaciones de la tecnología CRISPR-Cas se han implementado para tratar enfermedades de peces en la acuicultura?

Para realizar la búsqueda, se utilizaron los descriptores en Ciencias de la Salud (DeCs), MeSH y AGROVOC definiendo los siguientes tesauros: CRISPR-Cas system, CRISPR-Cas systems, CRISPR, fish aquaculture, fish diseases, fish disease, treatment, treatments. A partir de estos se diseñó una estrategia de búsqueda con base en estos descriptores; además, se emplearon los booleanos AND y OR y se determinó finalmente la siguiente ecuación de búsqueda: (aquaculture) AND (CRISPR OR “CRISPR-CAS system” OR “CRISPR CAS systems”) AND (diseases OR “fish disease”) AND (treatment OR treatments OR control).

La búsqueda se realizó en las bases de datos ScienceDirect, Scopus y el motor de búsqueda Google Scholar, y solo se tuvieron en cuenta los artículos originales que fueron publicados entre los años 2014-2024 en inglés, como criterio de inclusión que hicieran mención del género taxonómico del pez implementado en el estudio y como criterios de exclusión no se

tomaron los artículos que no dijeran la enfermedad a tratar o diagnosticar y aquellos que no estuvieran alineados a la pregunta de investigación anteriormente planteada, es decir, aquellos artículos en los que no utilizaran la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades de peces en la acuicultura. Para el sesgo de estudios solo se tuvieron en cuenta artículos que dentro de su diseño experimental realizarán réplicas y tuviesen un control, los artículos que no cumplieran con estas dos mínimas características fueron descartados junto a los que no se alineaban a la pregunta de investigación. Por último, para reducir el riesgo de sesgo de publicación, se realizó una búsqueda exhaustiva y se incluyó la literatura gris, y se tuvieron en cuenta artículos en los que se obtuvieron resultados positivos con CRISPR-Cas y también en los que se obtuvieron resultados negativos.

Resultados y Discusión

Se obtuvieron 18 resultados luego de aplicar los criterios de inclusión y exclusión que se detallaron anteriormente, el número de artículos que se eligieron en el proceso de tamizaje y por último elegibilidad se resumen en la **Figura 1**.

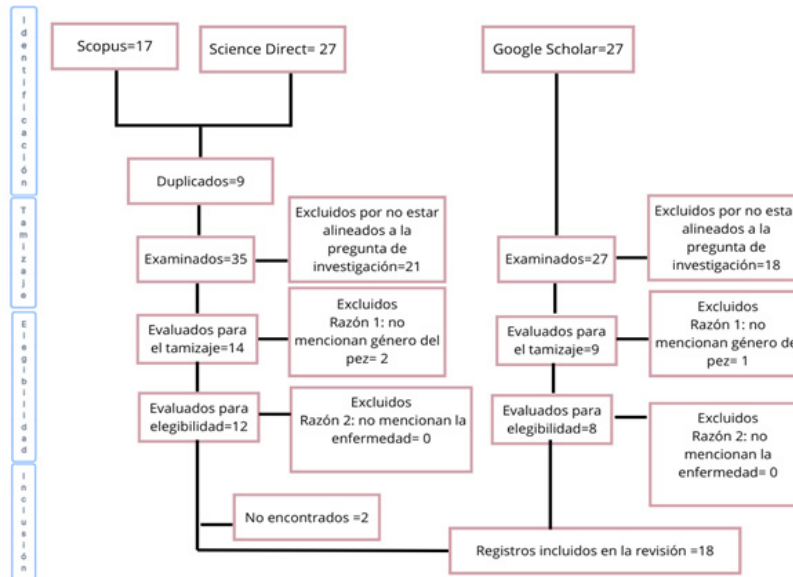


Figura 1. Diagrama PRISMA de la revisión sistemática: Implementación de la tecnología CRISPR-Cas para el tratamiento de enfermedades en la acuicultura de peces: Revisión sistemática.

GÉNEROS DE PECES TRATADOS Y DIAGNOSTICADOS CON CRISPR-CAS

Los géneros de peces más comunes fueron *Ictalurus punctatus* con 4 artículos, *Oncorhynchus* con 2 artículos y *Salmo salar* con 2; sin embargo; todos los géneros de peces mostrados son muy comerciales en distintas regiones (**Fig. 2**). *Ictalurus punctatus*, conocido como pez gato o bagre de canal, es muy popular y consumido en Estados Unidos [20], por lo que su demanda es cada vez mayor y ha aumentado su crianza en criaderos; no obstante, es susceptible a diferentes enfermedades como las causadas por *Edwardsiella ictaluri* y *Flavobacterium Covae*, entre otros agentes causales [21].

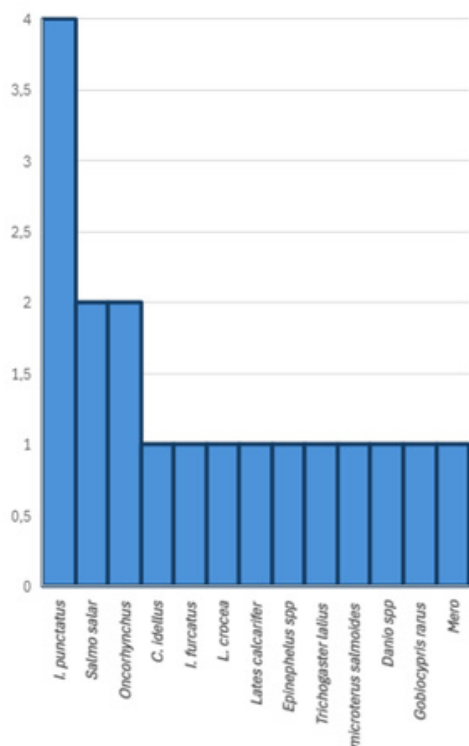


Figura 2. Géneros de peces que se han tratado o diagnosticado con CRISPR-Cas reportados en los artículos de la actual revisión sistemática.

Salmo salar o salmón del atlántico pertenece a la familia de los salmónidos y está altamente distribuido a lo largo de la costa norteamericana y de Europa, también, es una especie muy comercial en países asiáticos y en Norteamérica, es susceptible a enfermedades virales como la anemia infecciosa del salmón. *Oncorhynchus* son peces marinos y de aguas dulces, también

pertenecen a la familia de los salmónidos, crecen en el mar y la mayoría de las especies de este género se desplazan a desovar en los ríos; su carne tiene un valor comercial muy alto, por lo cual se encuentra distribuido en diferentes regiones, concentrándose en mayor medida en Asia y Norteamérica, su demanda es alta en la acuicultura [22,23] y son altamente susceptibles a diferentes enfermedades como la septicemia hemorrágica viral (VHSV), una enfermedad que genera pérdidas económicas altas [24].

Los géneros de peces más frecuentes que se utilizaron para tratarlos o diagnosticarlos con CRISPR-cas coinciden en que son muy comerciales en países asiáticos y en Norteamérica [7,8], esto tiene relación porque los países donde más se realizaron las investigaciones son China con 7 artículos, y Estados Unidos con 7 artículos (**Fig. 3**) y coincide en que sean los países que más consumen y comercian peces.

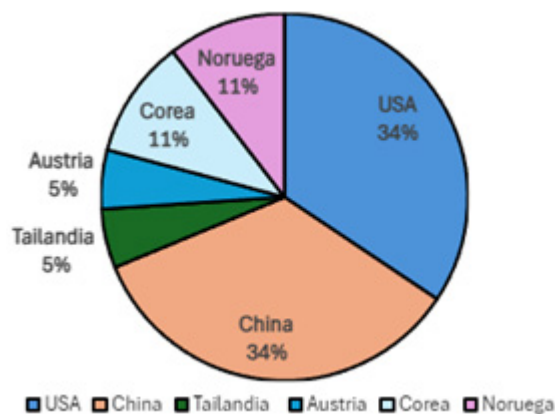


Figura 3. Países en los que se realizaron investigaciones donde se trataban o diagnosticaron peces con CRISPR-cas.

AGENTES CAUSALES ENFERMEDADES QUE SE HAN TRATADO O DIAGNOSTICADO CON CRISPR-CAS

En los artículos revisados, tres tipos de agentes patógenos se describieron; los virus, las bacterias y los pseudohongos (Oomicetos); de los tres agentes, el más frecuente fueron los virus, de los 18 artículos, 11 eran sobre el tratamiento o diagnóstico de enfermedades virales, y correspondieron al 52.4% del total, seguido de las enfermedades bacterianas con 6 artículos y por último por Oomicetos con 1 artículo (**Fig. 4**).

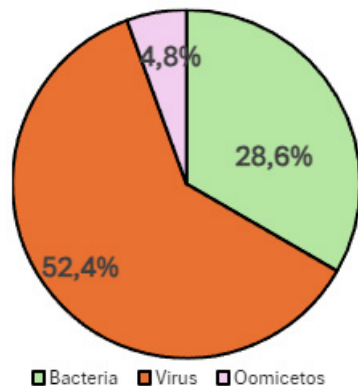


Figura 4. Principales agentes causales de la enfermedad de peces que se han tratado o diagnosticado con CRISPR-Cas

Dentro de los agentes causantes de enfermedades virales (**Tabla 1**), hay dos que resaltan; el virus de la necrosis nerviosa (RGNNV) y el virus de la septicemia hemorrágica viral (VHSV). El RGNNV es un virus con genoma ARN que afecta y es causante de la muerte de peces marinos, lo que resulta en pérdidas económicas significativas; entre estos los peces del género mero. Por otro lado, en las enfermedades bacterianas la más frecuente es *Edwardsiella ictaluri* la cual es una bacteria Gram negativa que afecta y ataca principalmente al bagre del canal *Ictalurus punctatus*, el otro agente causal bacteriano investigado ha sido *Flavobacterium covae* y para los Oomicetos *Aphanomyces invadans* (**Tabla 1**).

Tabla 1: Resultados de las enfermedades encontradas que se han tratado o diagnosticado con CRISPR-Cas asociadas al género de pez que afecta y el agente causal de la enfermedad.

Pez afectado	Enfermedad	Agente causal	Autor (Año), [Ref]
<i>Ictalurus punctatus</i>	Septicemia Entrérica del bagre	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	Coogan, M. et al. (2022), Wang, J. et al. (2023), Wang, J. et al. (2024), Simora, R. M. C. (2020), [25,26,27,28]
<i>Ctenopharyngodon idellus</i>	Enfermedad hemorrágica de la carpa herbívora	GCRV	Ma, J. et al. (2018), [29]
<i>Ictalurus furcatus</i>		<i>Flavobacterium covae</i>	Wang, J. et al. (2023), [30]
<i>Larimichthys crocea</i>	Iridovirus de la corvina amarilla	LYCIV	Zhang, C. et al. (2024), [31]
<i>Lates calcarifer</i>	Enfermedad de la caída de escamas	SDDV	Sukonta, T. et al. (2021), [32]
<i>Epinephelus spp</i>	Virus de la necrosis nerviosa	RGNNV	Wang, Q. et al. (2021), [33]
<i>Trichogaster lalius</i>	Síndrome ulcerativo epizootico (EUS)	<i>Aphanomyces invadans</i>	Majeed, M. et al. (2018), [34]
<i>Microterus salmoides</i>	Ranavirus de la lobina negra	LMBV	Guang, M. et al. (2024), [35]
<i>Danio spp</i>	Septicemia hemorrágica viral	VHSV	Shanaka, K. A. S. N. et al. (2022), [36]
<i>Salmo salar</i>	Anemia infecciosa del salmón	AIS	Dalmo, R. A. & Okoli, A. S. (2022), Kurup, A. R. (2022), [37,38]
<i>Oncorhynchus</i>	Septicemia hemorrágica viral	VHSV	Kim, M. S. & Kim, K. H. (2019), [39]
<i>Oncorhynchus</i>	Vibriosis	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Cao X. et al. (2022), [40]
<i>Gobiocypris rarus</i>	Enfermedad hemorrágica de la carpa herbívora	GCRV	Huang, R. et al. (2021), [41]
Mero	Virus de la necrosis nerviosa	RGNNV	Huang, F. et al. (2022), [42]

GCRV: Reovirus de la carpa herbívora. **LYCIV:** Iridovirus de la corvina amarilla. **SDDV:** Virus de la enfermedad de la caída de escamas. **RGNNV:** Virus de la necrosis nerviosa. **LMBV:** Ranavirus de la lobina negra. **VHS:** Septicemia hemorrágica viral. **AIS:** Virus anemia infecciosa del salmón.

APLICACIONES PARA EL TRATAMIENTO O DIAGNÓSTICO CON CRISPR-CAS.

En esta revisión sistemática se dividieron las aplicaciones o aproximaciones para el diagnóstico o tratamiento de enfermedades de peces con CRISPR-cas en cinco categorías: “Determinación de la presencia del patógeno mediante CRISPR + Fluorescencia”, “Knock-out de genes en el cromosoma del pez con CRISPR”, “Knock-in de genes nuevos en el cromosoma del pez con CRISPR”, “Desarrollo de cepas menos patógenas de los agentes causales para reducir paulatinamente su capacidad de generar la enfermedad o la gravedad de los síntomas” y “Desarrollo de terapias basadas en inyección del sistema crispr/cas en peces para reducir los efectos de las enfermedades virales”.

De estas cinco categorías, las que se repitieron con más frecuencia en los artículos fueron “Determinación de la presencia del patógeno mediante CRISPR + Fluorescencia” con 5 artículos y “Knock-out de genes en el cromosoma del pez con CRISPR” con 8 artículos (Fig. 5).

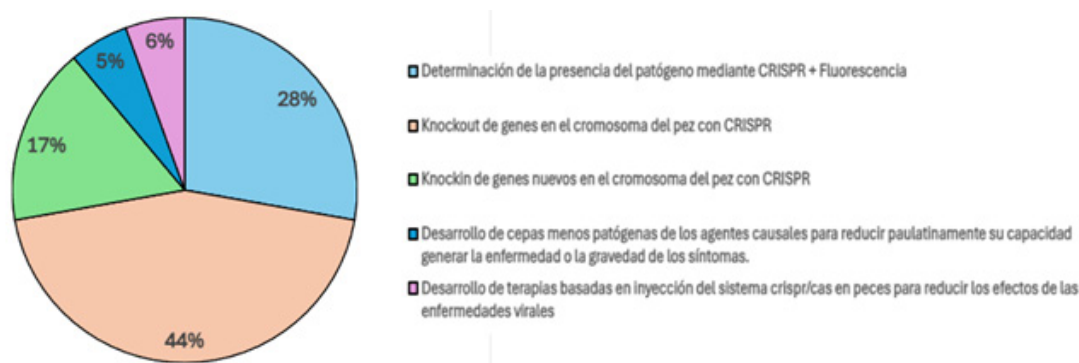


Figura 5. Aplicaciones para el tratamiento y diagnóstico de enfermedades en los peces con la implementación de la tecnología CRISPR-Cas.

Discusión

Además de la pérdida de producción por enfermedades, la industria de la crianza y pesca de peces debe adaptarse constantemente a los retos que supone el calentamiento global, la creciente demanda de alimentos por el aumento en la densidad demográfica y las eventualidades climáticas imprevistas [43]. Una posible respuesta hacia estos retos ha surgido con el desarrollo y avance de los métodos para la modificación genética basados en CRISPR-Cas como los reportados en la literatura, sin embargo, con los métodos de modificación genética ha surgido la preocupación por los posibles problemas que la crianza y comercialización de peces transgénicos con mayor resistencia a enfermedades puedan acarrear para la integridad genética de la biodiversidad presente en el medio ambiente, por lo cual, se requiere el desarrollo de regulaciones para una correcta contención y manejo de los mismos

[44, 45]. En el caso de la acuicultura, se requeriría un costo adicional a nivel de inversión para el diseño y construcción de lugares idóneos para la crianza, especialmente en respuesta al aumento de riesgos que un escalado a nivel industrial de una especie modificada podría conllevar. Las alternativas químicas tradicionales para el tratamiento pueden conllevar riesgos para la propia salud de los peces, como sucedía con la formalina y el verde de malaquita, donde la formalina a elevadas temperaturas aumenta su toxicidad y cuya concentración se calcula según una temperatura específica esperada, mientras que además en algunos países se prohibió el verde de malaquita debido a la larga presencia residual en los peces tratados y que eventualmente sería ingerida por el consumidor final [46, 47]. Siendo estos ejemplos de cómo el manejo químico tradicional puede conllevar un riesgo considerable teniendo en cuenta el calentamiento global y los cambios bruscos de temperatura asociados para

aquellos que requieran una formulación específica para una condición física esperada.

Cerca de la mitad del total de producción en la industria de la acuicultura corresponde a los peces (45 millones de toneladas y en ascenso cada año a una tasa de 6.13%), que equivale a un mercado valuado en más de 140 mil millones de dólares y cuyos países líderes en producción constituyen aquellos en vía de desarrollo de la región asiática acaparando el 91.9% del mercado, y que son liderados principalmente por China, Indonesia, India y Vietnam, siendo China el líder en la producción con un 57% del total en el planeta [48], valores que ayudan a comprender por qué la mayoría de las investigaciones recuperadas mediante la estrategia de búsqueda corresponden a producciones académicas asiáticas (Fig. 3). Por otra parte, la segunda región que lidera la investigación en el tema se encuentra Estados Unidos con un 34% del total de artículos reportados, además de ser no solo uno de los países con mayor producción científica en las ciencias naturales sino el que generalmente encabeza la lista de acuerdo con los datos presentados por Nature Index en el 2020 [49]. USA posee una economía acuícola de más de 59 mil millones de dólares y cuya zona de mayor producción se encuentra en las costas de Alaska; sin embargo, la práctica tradicional de pesca en mar abierto a gran escala acarrea el riesgo de pescar de más y desestabilizar el ecosistema marino al remover una especie relevante en la cadena alimenticia y, que por su lenta o incluso nula recuperación en sus niveles poblacionales podría conllevar a un colapso del abastecimiento en los mercados de algunas especies y generando pérdidas económicas para los productores de más de 150 millones de dólares [50]. Como respuesta, el interés por la crianza de peces en vez de su captura ha aumentado en las últimas décadas, lo cual a su vez impulsa nuevos esfuerzos de los países para buscar eliminar o por lo menos controlar eficazmente aquellos factores que puedan ocasionar pérdidas parciales o totales en los lotes como lo son enfermedades tanto genéticas como causadas por agentes infecciosos presentes en los estanques de crianza.

Los géneros de peces más destacados en las investigaciones fueron *Ictalurus punctatus* y *Salmo salar* (Fig. 2); según lo reportado por la FAO [51], el cultivo del bagre del canal (*Ictalurus punctatus*) empezó a incrementar entre 1960 y 1970 y los principales países

productores fueron Estados Unidos, China y algunas partes de Latinoamérica; y, además de ser peces de consumo, también se utilizan en la pesca recreativa. *Salmo salar* o salmón del atlántico en su estado silvestre se encuentra a ambos lados del atlántico norte, sus principales productores son Canadá y USA y varias zonas europeas, mientras que la producción mundial actual de salmón del Atlántico cultivado excede a 1 000 000 de toneladas, el salmón del Atlántico cultivado constituye el 90 por ciento del mercado de salmón cultivado y el 50 por ciento del mercado global total de salmón. Los principales mercados para el salmón del Atlántico cultivado son Japón, la Unión Europea y Norte América [52]. La enfermedad más investigada en este pez, es la Anemia infecciosa del salmón (AIS), la cual es causada por un virus (que lleva el mismo nombre que la enfermedad) y, como consecuencia, las agallas del salmón toman un color pálido y el pez tiene hemorragias internas en diferentes órganos. Hasta el momento no hay tratamiento con algún tipo de medicamento, y los productores intentan realizar un control a sus cultivos para evitar la aparición o proliferación de la enfermedad; sin embargo, estos controles no son suficientes para evitar las grandes pérdidas. Para su control, se ha utilizado el sistema CRISPR-Cas [37], el cual reduce la tasa de infección y le otorga resistencia al virus. CRISPR ofrece una nueva visión como un tratamiento y control más eficaz y rápido.

El bagre de canal es criado principalmente en estanques de tierra, jaulas y tanques circulares, lo que aumenta las posibilidades de que una enfermedad se esparza rápidamente. Este pez es susceptible a diferentes enfermedades, pero la más común es la septicemia entérica causada por *Edwardsiella ictaluri* que produce hemorragias externas sobre la superficie de la boca del pez, lesiones en dorso y la cabeza. Esta enfermedad se puede tratar con diferentes antibióticos como oxitetraciclina, pero se propaga muy rápido en los peces y tiende a hacer difícil de controlar, es por esto que se buscan alternativas rápidas para el diagnóstico temprano y control de la enfermedad y, CRISPR ofrece esta nueva perspectiva con la edición genética. En uno de los estudios publicados [26], se emplearon dos sistemas de administración de CRISPR/Cas9 (HA y KI mediado por ssODN) para el Knock-in del gen de la catelicidina del cocodrilo en el locus lh para crear peces estériles pero resistentes

a *E. ictaluri*, donde los peces modificados mostraron mayor resistencia a las infecciones y los signos clínicos de infección fueron más leves; además, la segunda generación de peces modificados mostró ser más resistente que la primera. Los productores del bagre del canal están preocupados por el impacto de especies foráneas no emparentadas, que ponen en peligro su economía, dado que el precio pagado a los productores del bagre del canal doméstico es cada vez más bajo y no compensan los costos de producción y las pérdidas económicas por las enfermedades, aunque la industria del bagre del canal es bastante madura y su tendencia en los últimos años ha sido incrementar, la verdad es que su futuro es incierto hasta resolver el control de las nuevas enfermedades, por esto se invita a realizar más investigaciones que respalden el uso de estas nuevas tecnologías de edición genética para el control de las enfermedades [55].

Por otra parte, en cuanto a los agentes causales de estas enfermedades, el mayor número de artículos se enfocaron en los virus y es que como lo describen en uno de los estudios [56], en el cual describen que los virus de ARN son mortales para los peces, debido a sus cortos tiempos de generación y sus altas tasas de mutación. Por ejemplo, el VHSV es un virus que afecta tanto a peces marinos como de agua dulce, y en algunas especies los síntomas no se manifiestan y puede que no represente grandes pérdidas, pero, en otros géneros como *Danio* spp. tiene altos índices de mortalidad [57]. El virus causante de la anemia infecciosa en salmones (AIS) no tiene un índice de mortalidad muy alto en las primeras fases de la infección, pero se extiende rápido y su tasa de mortalidad se dispara infectar una gran parte de la población y cuya supervivencia a altos niveles de infección en largos periodos de tiempo esta influenciada por los posibles niveles de inflamación [58]. Como respuesta, se han desarrollado varias investigaciones que respaldan el uso de CRISPR-cas como una alternativa eficaz, en especial CRISPR/CasRx, dado que este nuevo subtipo de la proteína Cas13, es más eficiente y se activa de forma más robusta en las células cuando se produce una escisión del ARN, comparado con otros sistemas de CRISPR, esto explica por qué en esta revisión sistemática se encontraron tantas investigaciones de virus de ARN, y entre estos el más destacado fue el RGNV, que hace parte de la clasificación del virus de la

necrosis nerviosa (NNV) que afecta a peces como el Mero, que son peces comunes para el consumo humano. En diferentes investigaciones utilizan CRISPR/cas13a para una detección fácil y temprana del virus para reducir la tasa de mortalidad [42]; y desde otro enfoque se ha utilizado el sistema CRISPR/casRx para intervenir el virus RGNV y reducir significativamente la infectividad tanto in vivo como in vitro en *Epinephelus* spp. [33].

CRISPR-Cas también se ha implementado como prueba diagnóstica para la detección, por fluorescencia, de la presencia de bacterias y virus en muestras de procedencia ambiental, y ofrece resultados confiables gracias a su elevada precisión y sensibilidad. Este método se fundamenta en la capacidad de las enzimas Cas12a y Cas13a de reconocer y acoplarse a una secuencia específica de nucleótidos de tipo DNA y RNA, respectivamente, mediante una secuencia crRNA para ambos casos; sin embargo, la principal diferencia entre ambas enzimas es que la Cas13a es una RNasa no específica que una vez se une a su secuencia RNA blanco, corta de manera aleatoria aquellas secuencias de RNA de cadena simple que se encuentren adyacentes a su sitio activo, mientras que la Cas12a es una enzima cuyo blanco son secuencias de DNA de doble cadena y, que tras su clivaje inicial, corta de manera colateral aquellas secuencias de DNA de cadena simple adyacentes al sitio activo. Así pues, el método se complementa con sondas fluorescentes adaptadas al tipo de enzima Cas que al sufrir un corte, indicarán a través de la emisión de fluorescencia, que la enzima Cas encontró la secuencia blanco [61]. Alternativamente, el uso de esta herramienta para la determinación sistemática de posibles factores de patogenicidad a través del silenciamiento de genes predeterminados o aleatorios en los agentes causales es ampliamente utilizado en las ciencias de la salud humana y animal [34], y cuyos hallazgos podrían implementarse para generar cepas de peces con una menor capacidad infecciosa o gravedad en la presentación de los síntomas, para posteriormente ser liberadas en zonas de crianza con altas tasas de incidencia de infecciones con la finalidad de que se genere un desplazamiento paulatino de las características genotípicas no deseadas de las cepas silvestres al intercambiar material genético con las desarrolladas in vitro sin que comprometa otras posibles interacciones ecosistémicas; sin embargo, esta aplica-

ción hipotética requiere una evaluación en su efectividad y acarrea algunos dilemas bioéticos similares a los que poseen la comercialización y distribución de plantas, frutos y animales transgénicos [17]. Según la EFSA [63], uno de los principales riesgos a considerar al desarrollar organismos modificados genéticamente (MG) es la posible amenaza de invasión de dichas especies en el ecosistema, y que puedan incrementar particularmente debido a los procesos de flujo genético, lo que a su vez podría conferir características no deseadas a otra especie desequilibrando las interacciones ecosistémicas al otorgarle una aptitud biológica “artificial” a uno o varios miembros de la comunidad, un riesgo que debe ser firmemente evaluado a la luz de las posibles ventajas. Así pues, la aprobación y efectividad de una estrategia para controlar enfermedades causadas por virus, bacterias y hongos en los peces, basada en el desarrollo y liberación de agentes causales con capacidad patogénica disminuida es poco probable, mientras que el desarrollo de peces MG con mayor resistencia a dichos agentes causales sí podría garantizar su correcto manejo y aprehensión, lo cual sería una alternativa viable que no comprometería la integridad de la biodiversidad de los ecosistemas alejados a las zonas de crianza.

Conclusiones

La tecnología CRISPR-cas es una herramienta de edición genética que está tomando fuerza en la acuicultura, especialmente al ser implementada para el diagnóstico temprano de enfermedades a través de la detección temprana, por fluorescencia, de la presencia de los agentes causales en matrices ambientales. Así mismo, otros potenciales usos se investigan cada vez más en relación al otorgamiento de resistencia a los peces de interés mediante modificación genética, especialmente a aquellas patologías causadas por virus y bacterias pues su tratamiento y control supone un esfuerzo de mayor dificultad que puede poner en riesgo la viabilidad económica de un lote de peces; además, es importante resaltar que su uso no supone un riesgo para la biodiversidad si se implementa de manera sistemática, documentada y con responsabilidad. Aun así, son necesarios mayores avances en el proceso, pues casi en todos los casos se presenta

como efecto secundario la esterilidad de los individuos modificados genéticamente, lo cual impide la transferencia vertical de la resistencia al agente causal de las enfermedades, lo que a su vez puede conllevar a mayores costos de operación en comparación con la implementación de métodos químicos tradicionales. Finalmente, esta revisión sistemática presenta como limitación la barrera del idioma, puesto que al encontrarse el epicentro comercial en la región asiática es posible que haya una mayor producción científica sobre el tema en los idiomas propios de aquellos países. Finalmente, son necesarias mayores investigaciones que resalten y respalden el uso de CRISPR-Cas más allá de ensayos a nivel de laboratorio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Referencias

1. **Assefa A, Abunna F.** Maintenance of Fish Health in Aquaculture: Review of Epidemiological Approaches for Prevention and Control of Infectious Disease of Fish. *Veterinary Medicine International* 2018;2018:1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>.
2. **Subasinghe R, Reantaso M, McGladdery S.** Aquaculture Development, Health and Wealth n.d. <https://www.fao.org/4/ab412e/ab412e09.htm>.
3. **Ikeogu FC, Nsofor CI, Ikpeze OO.** A review of risk factors for fish diseases in aquatic environments. *Proceedings of the 6th National Conference of the Society for Occupational Safety and Environmental Health (SOSEH) 2010:199–204.*
4. **Alfred O, Shaahu A, Orban DA,** Egwenomhe M. Understanding The Basic Concept Of Diseases In Aquaculture. *IRE Journals* 2020;4:83–91.
5. **Tort L.** Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 2011;35:1366–75. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>.
6. **Lieke T, Meinelt T, Hoseinifar SH, Pan B, Straus DL, Steinberg CEW.** Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture* 2020;12:943–65. <https://doi.org/10.1111/raq.12365>.
7. **Estadísticas de pesca y acuicultura 2014.** Fisheries and Aquaculture 2016. <https://www.fao.org/fishery/en/publication/27459>.

8. **Gutási A, Hammer SE, El-Matbouli M, Saleh M.** Review: Recent Applications of Gene Editing in Fish Species and Aquatic Medicine. *Animals* 2023;13:1250. <https://doi.org/10.3390/ani13071250>.
9. **Merino G, Barange M, Blanchard JL, Harle J, Holmes R, Allen I, et al.** Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? *Global Environmental Change* 2012;22:795–806. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.03.003>.
10. **Belmar R, Alfonso V.** The CRISPR-Cas systems of microbial defense. *Publicaciones Didácticas* 2018;96:629–50.
11. **Ford K, McDonald D, Mali P.** Functional Genomics via CRISPR–Cas. *Journal of Molecular Biology* 2019;431:48–65. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.034>.
12. **Terns MP, Terns RM.** CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology* 2011;14:321–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>.
13. **Tasan I, Zhao H.** Targeting Specificity of the CRISPR/Cas9 System. *ACS Synth Biol* 2017;6:1609–13. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00270>.
14. **Nambiar TS, Baudrier L, Billon P, Ciccía A.** CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Molecular Cell* 2022;82:348–88. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.026>.
15. **Li Y, Wang H, Zhang L, Ding Z, Xu S, Gu Z, et al.** Efficient Genome Editing in *Bacillus licheniformis* Mediated by a Conditional CRISPR/Cas9 System. *Microorganisms* 2020;8:754. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050754>.
16. **Varshney GK, Pei W, LaFave MC, Idol J, Xu L, Galardo V, et al.** High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Res* 2015;25:1030–42. <https://doi.org/10.1101/gr.186379.114>.
17. **Mejías Rodríguez I.** Aspectos bioéticos de la edición genética. master thesis. Universidad Católica de Valencia, 2016.
18. **Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJJ, Charpentier E, Horvath P, et al.** Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>.
19. **Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al.** Declaración PRISMA 2020: una guía actualizada para la publicación de revisiones sistemáticas. *Revista Española de Cardiología* 2021;74:790–9. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2021.06.016>.
20. **Robinson EH, Li MH.** Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, nutrition in the United States: A historical perspective. *J World Aquaculture Soc* 2020;51:93–118. <https://doi.org/10.1111/jwas.12657>.
21. **Wise AL, LaFrentz BR, Kelly AM, Liles MR, Griffin MJ, Beck BH, et al.** The Infection Dynamics of Experimental *Edwardsiella ictaluri* and *Flavobacterium covae* Coinfection in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Pathogens* 2023;12:462. <https://doi.org/10.3390/pathogens12030462>.
22. **Gross MR.** One species with two biologies: Atlantic salmon (*Salmo salar*) in the wild and in aquaculture. *Can J Fish Aquat Sci* 1998;55:131–44. <https://doi.org/10.1139/d98-024>.
23. **Setyawan A, Zuo S, Kania P, Buchmann K.** Endoparasitic helminths in Baltic salmon *Salmo salar*: ecological implications. *Dis Aquat Org* 2019;135:193–9. <https://doi.org/10.3354/dao03391>.
24. **Moran D, Fofana A.** An economic evaluation of the control of three notifiable fish diseases in the United Kingdom. *Preventive Veterinary Medicine* 2007;80:193–208. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.02.009>.
25. **Coogan M, Alston V, Su B, Khalil K, Elasad A, Khan M, et al.** CRISPR/Cas-9 induced knockout of myostatin gene improves growth and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 2022;557:738290. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738290>.
26. **Wang J, Su B, Xing D, Bruce TJ, Li S, Bern L, et al.** Generation of Eco-Friendly and Disease-Resistant Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) Harboring the Alligator Cathelicidin Gene via CRISPR/Cas9 Engineering. *Engineering* 2024;39:273–86. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2023.12.005>.
27. **Wang J, Su B, Bruce TJ, Wise AL, Zeng P, Cao G, et al.** CRISPR/Cas9 microinjection of transgenic embryos enhances the dual-gene integration efficiency of antimicrobial peptide genes for bacterial resistance in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 2023;575:739725. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739725>.
28. **Simora RM.** Transgene Insertion of Cathelicidin Gene in Channel Catfish *Ictalurus punctatus* using CRISPR/Cas9 Knock-in Technology and Cathelicidin Activity Against Catfish Pathogens 2020.
29. **Ma J, Fan Y, Zhou Y, Liu W, Jiang N, Zhang J, et al.** Efficient resistance to grass carp reovirus infection in JAM-A knockout cells using CRISPR/Cas9. *Fish & Shellfish Immunology* 2018;76:206–15. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.039>.
30. **Wang J, Su B, Al-Armanazi J, Wise AL, Shang M, Bern L, et al.** Integration of alligator cathelicidin gene via two CRISPR/Cas9-assisted systems enhances bacterial resistance in blue catfish, *Ictalurus furcatus*. *Aquaculture* 2023;576:739860. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739860>.
31. **Zhang C, Tao Z, Ye H, Wang P, Jiang M, Benard K, et al.** Development and validation of a CRISPR/Cas12a-based platform for rapid and sensitive detection of the large yellow croaker iridovirus. *Aquaculture*

- 2024;584:740658. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740658>.
- 32. Sukonta T, Senapin S, Meemetta W, Chaijarasphong T.** CRISPR-based platform for rapid, sensitive and field-deployable detection of scale drop disease virus in Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Journal of Fish Diseases* 2022;45:107–20. <https://doi.org/10.1111/jfd.13541>.
- 33. Wang Q, Liu Y, Han C, Yang M, Huang F, Duan X, et al.** Efficient RNA Virus Targeting via CRISPR/CasRx in Fish. *J Virol* 2021;95:e00461-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00461-21>.
- 34. Majeed M, Soliman H, Kumar G, El-Matbouli M, Saleh M.** Editing the genome of *Aphanomyces invadans* using CRISPR/Cas9. *Parasites Vectors* 2018;11:554. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3134-8>.
- 35. Guang M, Zhang Q, Chen R, Li H, Xu M, Wu X, et al.** Rapid and facile detection of largemouth bass rana virus with CRISPR/Cas13a. *Fish & Shellfish Immunology* 2024;148:109517. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2024.109517>.
- 36. Shanaka KASN, Jung S, Madushani KP, Wijerathna HMSM, Neranjan Tharuka MD, Kim M-J, et al.** Generation of viperin-knockout zebrafish by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering and the effect of this mutation under VHSV infection. *Fish & Shellfish Immunology* 2022;131:672–81. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.10.040>.
- 37. Strømsnes TAH.** Targeted gene editing of an infectious salmon anemia (ISA)-relevant gene in salmonids cells using the CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein complex. Master thesis. UiT The Arctic University of Norway, 2022.
- 38. Kurup AR.** CRISPR/Cas9 based knockout of genes in SHK-1 cell line, to investigate their role in development of Infectious salmon anemia virus infection. Master thesis. Norwegian University of Life Sciences, Ås, 2022.
- 39. Kim MS, Kim KH.** Effect of CRISPR/Cas9-mediated knockout of either Mx1 or ISG15 gene in EPC cells on resistance against VHSV infection. *Fish & Shellfish Immunology* 2019;93:1041–6. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.058>.
- 40. Lv X, Cao W, Zhang H, Zhang Y, Shi L, Ye L.** CE-RAA-CRISPR Assay: A Rapid and Sensitive Method for Detecting *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. *Foods* 2022;11:1681. <https://doi.org/10.3390/foods11121681>.
- 41. Huang R, Shi M, Luo L, Yang C, Ou M, Zhang W, et al.** *De novo* screening of disease-resistant genes from the chromosome-level genome of rare minnow using CRISPR-cas9 random mutation. *GigaScience* 2021;10:giab075. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab075>.
- 42. Huang F, Shan J, Liang K, Yang M, Zhou X, Duan X, et al.** A new method to detect red spotted grouper neuro necrosis virus (RGNNV) based on CRISPR/Cas13a. *Aquaculture* 2022;555:738217. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738217>.
- 43. Qiu Y, Lin Z, Wang Y.** Responses of fish production to fishing and climate variability in the northern South China Sea. *Progress in Oceanography* 2010;85:197–212. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2010.02.011>.
- 44. Pandian TJ, Marian LA.** Problems and prospects of transgenic fish production. *Current Science* 1994;66:635–49.
- 45. Sundström LF, Devlin RH.** Ecological implications of genetically modified fishes in freshwater fisheries, with a focus on salmonids. In: Craig JF, editor. *Freshwater Fisheries Ecology*. 1st ed., Wiley; 2015, p. 594–615. <https://doi.org/10.1002/9781118394380.ch46>.
- 46. PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE LOS PECES n.d.** https://www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709s/x6709s15.htm.
- 47. White CR, Davies SJ, Henry TB.** Malachite Green Toxicity and Effects on Reproductive Success in Zebrafish *Danio rerio*. *Zebrafish* 2012;9:135–9. <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0762>.
- 48. Tacon AGJ.** Trends in Global Aquaculture and Aquafeed Production: 2000–2017. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* 2020;28:43–56. <https://doi.org/10.1080/23308249.2019.1649634>.
- 49. The ten leading countries in natural-sciences research.** *Nature* 2020. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01231-w>.
- 50. Kearney M, Harris B, Hershbein B.** What's the Catch? Challenges and Opportunities of the U.S. Fishing Industry. *Brookings* 2014. <https://www.brookings.edu/articles/whats-the-catch-challenges-and-opportunities-of-the-u-s-fishing-industry/>.
- 51. Crespi V, New M.** *Ictalurus punctatus* (Rafinesque, 1818) [Ictaluridae]. *Cultured Aquatic Species Fact Sheets* 2009. https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/l1129m/file/es/es_channelcatfish.htm.
- 52. Crespi V, New M.** *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) [Salmonidae]. *Cultured Aquatic Species Fact Sheets* 2009. https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/aquaculture/l1129m/file/en/en_atlanticsalmon.htm.
- 53. Scheld AM, Calhoun WR, Gilsinan CB, White SB.** Market development for an invasive fish species: Blue catfish in the Chesapeake Bay, US. *Fisheries Research* 2024;278:107099. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2024.107099>.
- 54. Ferdous MdA, Islam SI, Habib N, Almeahmedi M, Allahyani M, Alsaiani AA, et al.** CRISPR-Cas Genome Editing Technique for Fish Disease Management: Current Study and Future Perspective. *Microorganisms* 2022;10:2012. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102012>.
- 55. Novoa B, Romero A, Mulero V, Rodríguez I, Fernández I, Figueras A.** Zebrafish (*Danio rerio*) as a model

for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vaccine* 2006;24:5806–16. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.015>.

56. Jørgensen S, Afanasyev S, Krasnov A. Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality. *BMC Genomics* 2008;9:179. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-179>.

57. Qiu M, Li P. CRISPR/Cas-based Diagnostics and Gene Therapy. *BIOI* 2021;2. <https://doi.org/10.15212/bioi-2020-0048>.

58. Waigmann E, Paoletti C, Davies H, Perry J, Kärenlampi S, Kuiper H. Risk assessment of Genetically Modified Organisms (GMOs). *EFS2* 2012;10. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.s1008>.