



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

MICROINYECCIÓN COMO METODOLOGÍA DE ENTREGA DE
MATERIAL DE EDICIÓN A TRAVÉS DE CRISPR/CAS9 EN
Penaeus vannamei.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Acuicultura)

P r e s e n t a

Daniela Marianne Marín Carrasco

La Paz, Baja California Sur, agosto de 2021.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14:00 horas del día 14 del Mes de julio del 2021, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Microinyección como metodología de entrega de material de edición a través de CRISPR/Cas9 en *Penaeus vannamei*"

Presentada por el alumno:

Daniela Marianne Marín Carrasco

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Acuicultura**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



Dra. Ana María Ibarra Humphries
Co-Directora de Tesis



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Co-Director de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Co-Tutora



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos.

La Paz, Baja California Sur, a 10 de julio de 2021.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante DANIELA MARIANNE MARÍN CARRASCO del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el VoBo dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
iThenticate
- Filtros utilizados:
Excluir citas
Excluir bibliografía
- Porcentajes de similitud:
6%
Se muestra captura de pantalla:

Tesis_D_Marin

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%
ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	docplayer.es Internet	104 palabras — 1%
2	cibnor.repositorioinstitucional.mx Internet	88 palabras — 1%
3	dspace.cibnor.mx:8080 Internet	76 palabras — < 1%
4	eprints.uanl.mx Internet	76 palabras — < 1%
5	hdl.handle.net Internet	76 palabras — < 1%
6	archive.org Internet	25 palabras — < 1%
7	patents.google.com Internet	22 palabras — < 1%
8	aprenderly.com Internet	21 palabras — < 1%
9	firmaonline.org Internet	21 palabras — < 1%
10	rua.ua.es Internet	

Firmas del comité



Dra. Ana María Ibarra Humphries



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro



Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Directora de tesis

Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Universidad Nacional Autónoma de México (ICMyL)
Co-Director de tesis

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Co-Tutora de tesis

Comité Revisor de Tesis

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Jurado de Examen

Dra. Ana María Ibarra Humphries
Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Suplente

Dra. Cristina Escobedo Fregoso

Resumen

Las nuevas herramientas de uso biotecnológico e ingeniería genética como CRISPR/Cas9, son consideradas técnicas revolucionarias que podrían permitir potencializar la mejora genética sostenible de la acuicultura. CRISPR /Cas9 se describe como la acción de una nucleasa (Cas9) guiada por fragmentos cortos de ARN con complementariedad de bases al genoma y como consecuencia, un rompimiento de doble cadena que tendrá que ser reparado. Si bien, CRISPR/Cas9 es una poderosa herramienta de edición genética, esta depende de algunos factores como una entrega exitosa dentro de la célula o embrión, o el tipo de reparación del ADN activado, Non-Homologous End Joining (NHEJ) o Homology-Directed Repair (HDR).

El propósito de este trabajo es la implementación de las nuevas tecnologías CRISPR/Cas9 en el crustáceo decápodo *Penaeus vannamei*, a partir del uso de la microinyección embrionaria como la técnica de acarreo de material de edición. Para la estandarización de esta metodología se evaluaron métodos de reblandecimiento de la pared del huevo, sujeción óptima de los huevos a un sustrato y, por último, el diseño óptimo de la aguja para la microinyección, observando con este método supervivencias aproximadas de 3 - 5%. A partir de una co-inyección de sondas donadoras para genes involucrados en el desarrollo de apéndices (*Ubx*) se observaron algunos fenotipos con malformaciones esperadas por disrupción de dicho gen. Para la verificación genética de las mutaciones resultantes se evaluaron metodologías de enriquecimiento genómico y extracciones de ADN enzimáticas ante el obstáculo que supone las extracciones de los diminutos nauplios individuales.

Finalmente, se esperaba que el diseño realizado para las sondas donadoras utilizadas en el sistema CRISPR/Cas9 (ssODN y dsODN), permitiría validar una metodología sencilla para la caracterización del genotipo obtenido mediante la amplificación por PCR a partir de la combinación estratégica de oligonucleótidos y a su vez la determinación del mecanismo de reparación de ADN activado por la célula (NHEJ o HDR). Sin embargo, los resultados arrojan un conjunto de amplicones inespecíficos generados posiblemente a partir del uso de secuencias altamente repetitivas, lo que aunado a la secuenciación lleva a que no es posible concluir sobre la generación de mutaciones. Se propone el uso de secuenciación masiva (NGS) a futuro para verificar las mutaciones generadas

Palabras clave: *Hox*, CRISPR/Cas9, DSB repair, microinyección, mutación.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4775-1034>



Dra. Ana María Ibarra Humphries
Vo. Bo



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Vo. Bo

Summary

The new biotechnological tools and genetic engineering such as CRISPR/Cas9 are now considered revolutionary techniques that can potentiate the sustainable genetic improvement of aquaculture species. CRISPR/Cas9 is described as a nuclease (Cas9) guided by a short RNA capable of base pairing to the genome, leading to a double strand break that will have to be repaired. While CRISPR/Cas9 is a powerful gene editing tool, it depends on some factors such as a successful delivery within the cell or embryo, or the type of DNA repair mechanism activated. Non-Homologous End Joining (NHEJ) or Homology- Directed Repair (HDR).

The objective of this work was to apply the new CRISPR / Cas9 technologies in the decapod crustacean *Penaeus vannamei*, evaluating the use of microinjection as the technique of carrying editing material into an embryo. For the standardization of this methodology, methods of softening the egg wall, optimal attachment of the eggs to a substrate and last, the optimal design of the needle for microinjection were thoroughly evaluated. With this protocol, we observed improvement of survival rates up to 3-5%. From a co-injection of donor probes for genes involved in appendage development (Ubx), phenotypes with expected abnormal development were observed, implying successful disruption of the gene. For the genetic verification of the resulting mutations, genomic enrichment methodologies and enzymatic DNA extractions were evaluated to deal with the difficulty of extractions from the tiny individual nauplii.

Finally, it was hypothesized that the unique design of the donor probes for the CRISPR/Cas9 system (ssODN and dsODN), would allow for the validation of a simple methodology for the characterization of the obtained genotype by PCR amplification using a strategic combination of oligonucleotides, and simultaneously for establishing which cell DNA repair mechanism (NHEJ or HDR) was activated. Nonetheless the results showed a set of nonspecific amplicons most probably generated from the use of highly repetitive sequences, which coupled with Sanger limited sequencing, did not allow to conclude about the generation of mutations by CRISPR/Cas9. Using massive sequencing as that from NGS is proposed for verifying mutations in future work.

Keywords: *Hox, CRISPR /Cas 9, DSB repair, microinjection, mutation.*

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4775-1034>



Dra. Ana María Ibarra Humphries
Vo. Bo



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera
Vo. Bo

Dedicatoria

A mis padres, que nunca han dejado de apoyarme.

A mis hermanas, que son mi dicha.

A mi yo de este momento: creciste mucho.

Agradecimientos

Agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. y a todo el personal que ahí labora para su óptimo funcionamiento, en especial a la Dirección de Estudios de Posgrado por atender las solicitudes de forma eficiente y profesional, facilitando mi estancia como estudiante.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención otorgada con número 924489, así como la Beca Mixta de Movilidad Nacional 2019 para la realización de la estancia de investigación.

Agradezco al proyecto SEP-CONACyT Ciencia Básica CB-2016-01, clave 281157 “Análisis de la función de genes sobre la determinación / diferenciación sexual y la maduración gonadal del camarón *Litopenaeus vannamei*”.

Agradezco ampliamente a mis Co-Directores: La Dra. Ana María Ibarra Humphries por su dedicación y gran apoyo académico, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por siempre estar al pendiente de las necesidades para el desarrollo de este proyecto. Al Dr. Raúl Antonio Llera Herrera por su orientación, tiempo e ideas y siempre brindarme las facilidades para mi formación y el desarrollo de este trabajo. A mi Co-Tutora, la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro por sus sugerencias y comentarios para este trabajo, por su disposición y apoyo académico.

Al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), UNAM, Unidad Mazatlán y a todo su personal, en especial al laboratorio de Genómica Funcional por recibirme durante mi estancia de investigación.

Extiendo mis agradecimientos a la empresa FITMAR por la aportación del material biológico, en especial al Biol. Jesús Alberto Sotelo y los técnicos del departamento de maduración Noé Ibarra y Jaime Mejía por siempre estar a la disposición de las necesidades presentadas.

Al Dr. Pavel Galindo por todos sus comentarios y aportes en el laboratorio, el envío de reactivos y materiales, el diseño de sondas y adiestramiento en microinyección. A Alba Ureña Guzmán por el aporte en el desarrollo del proyecto. A la Dra. Alejandra García Gasca por facilitarme el uso del equipo de preparación de microcapilares para microinyección. A Jesús Castro por su apoyo y

disposición durante todas las visitas a FITMAR. A Gabriela Green por su apoyo durante los ensayos de reblandecimiento embrionario.

A la MC. Susana Ávila, responsable del laboratorio de Genética Acuícola, por proporcionarme todos los recursos necesarios para el desarrollo de mi tesis; así como a la MC. María de los Ángeles Herrera, responsable del laboratorio de genética en el ICMYL por su apoyo en cuanto a las necesidades presentadas durante mi estancia académica.

Contenido

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 CRISPR/Cas9	3
2.2 Mecanismos de reparación de DSB del ADN	5
2.2.1 NHEJ	6
2.2.2 HDR	8
2.3 Sistemas de entrega CRISPR	11
2.4 Microinyección	13
2.4.1 Establecimiento de metodología	14
2.5 Uso de sondas de genes de desarrollo (Hox)	15
2.5.1 Ultrabithorax (Ubx)	16
2.6 <i>Penaeus vannamei</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS	22
5.1 Objetivo general	22
5.2 Objetivos particulares	22
6. MATERIAL Y MÉTODOS	23
6.1 Material biológico	23
6.2 Diseño de primers	23
6.3 Preparación del complejo RNP	24
6.3.1 Síntesis y purificación del ARNsg	25
6.3.2 Diseño de ODN	26
6.4 Microinyección	28
6.4.1 Mix de microinyección	28
6.4.2 Construcción de micropipetas	29
6.4.3 Reblandecimiento de cubierta embrionaria	30
6.4.4 Biselado de agujas	31
6.5 Análisis de fenotipos observados	32
6.5.1 Extracción de ADN genómico	32
6.6 Genotipificación	32
6.6.1 PCR	32
6.6.2 Secuenciación	34
7. RESULTADOS	36
7.1 Reblandecimiento de la cubierta embrionaria	36
7.2 Biselado de agujas	38
7.3 Microinyección y análisis de fenotipos observados	40

7.3.1 Extracción de ADN genómico.....	43
7.3.2 Genotipificación por PCR	46
7.3.3 Confirmación de potenciales mutantes mediante secuenciación capilar	50
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES.....	60
10. LITERATURA CITADA.....	62
11. ANEXOS.....	73
Anexo A.....	73
Anexo B.....	73
Anexo C.....	74

Lista de figuras

Figura 1. Sistema CRISPR/Cas9..	4
Figura 2. Diagrama de reparación ante un quiebre de doble cadena..	9
Figura 3. Diagrama de diseño de sondas para reparación por HR o NHEJ.	11
Figura 4. <i>Penaeus vannamei</i> . Morfología externa del camarón blanco.	18
Figura 5. Mapa de diseño de primers..	24
Figura 6. Diseño de oligodeoxinucleótidos..	27
Figura 7. Micropipeta utilizada. Micropipeta de 4 mm, protocolo estandarizado.....	30
Figura 8. Diagrama de biselado de microcapilares para la producción de agujas.....	31
Figura 9. Diagrama de diseño de sondas para establecer la forma de reparación de la ruptura de la dsDNA, HR o NHEJ..	34
Figura 10. Porcentaje de eclosión total a las 24 horas en dos desoves con 5 tratamientos, cuando los embriones son tratados con ATA (1mM) durante distintos tiempos a partir de la fertilización.....	37
Figura 11. Ensayo para establecer el mejor periodo para iniciar el reblandecimiento medido como porcentaje de eclosión total (24 horas)	38
Figura 12. Montaje del sistema de biselado.....	39
Figura 13. Nauplios de fenotipo esperado.....	42
Figura 14. Embriones inyectados y en arresto de su desarrollo.....	43
Figura 15. Electroforesis en agarosa 2% para comparar metodologías de extracciones de ADN.	44
Figura 16. Estandarización de metodología de extracción de ADN de tipo enzimática.....	45
Figura 17. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers.....	46
Figura 18. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers.....	47
Figura 19. Gel de agarosa al 2% con productos de amplificación por PCR.....	48
Figura 20. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers (Lv_UBX_3).	49
Figura 21. Genotipificación por amplificación por PCR mediante combinación estratégica de primers (Lv_UBX_4).....	50
Figura 22. Reacción cortical en ovocitos. (Tomado de (88)).....	52

Lista de tablas

Tabla 1. Secuencia de primers diseñados	24
Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para la síntesis de ARNsg.....	25
Tabla 3. Mix de microinyección	29
Tabla 4. Protocolo de microcapilares	29
Tabla 5. Concentraciones evaluadas para la estandarización de la metodología de extracción enzimática.	45
Tabla 6. Tamaño de fragmentos esperados por combinación de primers.....	49

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente la acuicultura ha ido en aumento y con perspectivas favorables ascendiendo a una producción mundial de 110,2 millones de toneladas hasta 2016 (243 500 millones de USD), incluyendo la producción de crustáceos de 7,9 millones de toneladas (57 100 millones de USD) (1). En México la producción acuícola de camarón ha sido de 158,115 toneladas en peso vivo, teniendo una diferencia de producción del 5 % en un año (2) y siendo *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* la especie de mayor incremento.

El descubrimiento de CRISPR ha revolucionado enormemente el campo de la biotecnología y la edición genética debido a su simplicidad y precisión la cual ya ha demostrado ser prometedora principalmente en su aplicación a diferentes áreas de la investigación. Actualmente, en PubMed podemos encontrar más de 24,000 publicaciones relacionadas con CRISPR que abarca diversos avances tecnológicos, generación de conocimiento, entre otros. CRISPR/Cas9 (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente interespaciadas asociada a Cas9 o *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 associated*) podemos describirla brevemente por la acción de una nucleasa (Cas9) guiada por fragmentos cortos de ARN por complementariedad de bases al genoma foráneo y como consecuencia una reparación de este ADN por *non-homologous end joining* (NHEJ) o *homology-directed repair* (HDR).

A pesar de ser una herramienta poderosa, CRISPR depende de un sistema de entrega del material de edición, es decir, un mecanismo de acarreo al objetivo con la capacidad de generar mutaciones eficientes, precisas y seguras. La microinyección ha sido ampliamente usada en la entrega de sistemas CRISPR-Cas9 por su alta eficiencia de mutación inyectando el material en células individuales.

El objetivo de este trabajo fue la evaluación de la microinyección como técnica de acarreo de material de edición (complejo ribonucleoprotéico) mediante la caracterización del fenotipo y genotipo resultante a partir de mutaciones disruptivas en genes de desarrollo

morfológico por CRISPR-Cas9 y determinar los mecanismos de reparación del ADN a partir del quiebre de doble cadena que implica CRISPR y que a la fecha son desconocido en *P. vannamei*. La evaluación de los genotipos resultantes fue realizada mediante amplificación por PCR y secuenciación, así como posibles alteraciones fenotípicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 CRISPR/Cas9

Las nuevas herramientas de uso biotecnológico para la edición génica han ampliado la capacidad de investigación y de potenciar el mejoramiento genético. Una de ellas es CRISPR/Cas9 que surge a partir del descubrimiento de CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas o *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) que entre los años 1987 y 2000 no eran más que “secuencias curiosas” que se identificaban en un gran número de especies microbiológicas y que para el año 2002 se les acuñó el acrónimo CRISPR (3–5). Ese mismo año, fueron descubiertos un conjunto de genes adyacentes a CRISPR a las que se les llamó *CRISPR-associated system* (Cas) y posteriormente las secuencias no repetitivas fueron identificadas a partir de DNA foráneos, especialmente de bacteriófagos, por lo que se hipotetizó que CRISPR forma parte del sistema inmune adaptativo de organismos procariontas (6–8). No fue hasta 2007 cuando se presentó la primera evidencia de la integración de nuevos espaciadores después de un reto viral en procariontas (9) y posteriormente se determinó que CRISPR funciona como una “memoria” ante la invasión de patógenos, que esta memoria es usada por ciertas proteínas asociadas (proteínas Cas) que son guiadas por fragmentos de ARN y que se encargan de buscar el DNA foráneo para deshacerse de él mediante un corte de doble cadena o *Double Strand Breaks* (DSB). Siete años más tarde, esta serie de descubrimientos se convirtieron en una poderosa y prometedora herramienta de edición genómica (10–12). En 2020 las investigadoras Jennifer Anne Doudna y Emmanuelle Charpentier recibieron el premio nobel de química por el desarrollo de un método de edición del genoma.

Actualmente se conocen seis tipos de sistemas CRISPR, de los cuales, I, II y III son los más estudiados (Revisado por (13)). Particularmente el tipo II, encontrado en *Streptococcus pyogenes*; cuenta con una proteína nucleasa asociada Cas9 con un dominio HNH (un dominio endonucleasa llamado así por los residuos característicos de histidina y

asparagina), el cual es responsable del corte de la cadena blanco, y un dominio RuvC (miembro de la familia RNasa-H) que escinde la cadena no diana o no complementaria (11).

De manera general CRISPR/Cas9 se compone de tres elementos, el ARN CRISPR transactivador (tracrRNA), la proteína endonucleasa Cas 9 y un pre-crRNA transcrito a partir de repeticiones interespaciadas por pequeñas secuencias derivadas de DNA foráneo (protoespaciador). Estos pre-crRNA (pre-crispr RNA) codifican RNA guías, y son procesados a una forma individual o unidades más sencillas por la acción de tracrRNA, a crRNA (crisprRNA) (figura 1). El tracrRNA cuenta con una estructura de bucle-tallo que contribuye a asociarse a la proteína Cas9. Cada crRNA consiste en una secuencia de aproximadamente 20 nucleótidos y una secuencia de repetición, que contiene sitios de secuencias específicas llamadas PAM (*protospacer adjacent motif*). Este sistema tipo II (*S. pyogenes*) obedece a un PAM 5'-NGG. Los crRNA se encargan de guiar por homología o emparejamiento a la endonucleasa Cas9 a un ADN diana de 20 nucleotidos, y una vez que se localiza la región PAM homóloga, Cas9 hace un corte de doble cadena. Finalmente, el complejo se libera (11,13,14).

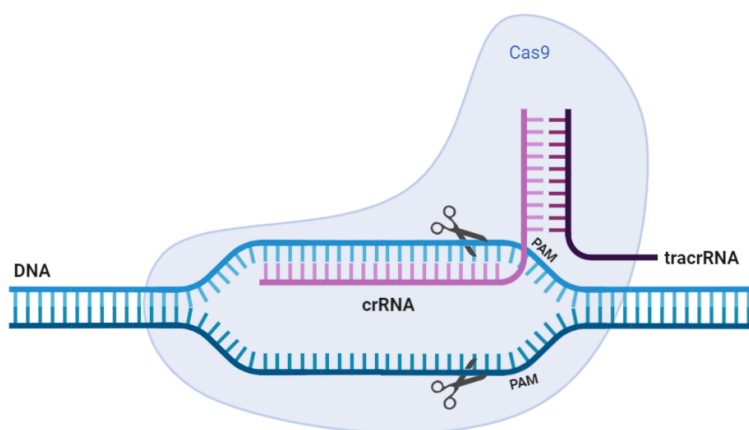


Figura 1. Sistema CRISPR/Cas9. En morado la proteína Cas9, en rosa el ARNcr o ARN CRISPR, en lila el tracrRNA o transactivador y en azul el ADN diana. Las tijeras representan los sitios de corte.

Dentro de las muchas adaptaciones que se han realizado a CRISPR/Cas para edición genómica, crRNA y tracrRNA puede ser fusionado debido a que cuentan con una región corta de homología para crear un solo RNA guía o sgRNA (*single-guide RNA*). El sgRNA y la proteína Cas9 son comúnmente expresados en un sólo plásmido cuando el sistema de entrega es directo o mediante vectores virales. Por otro lado, cuando el sistema de entrega es mediante microinyección embrionaria o transfección, generalmente la proteína Cas9 recombinante es conjugada con el sgRNA para formar un complejo llamado ribonucleoproteína Cas9 (RNP) (12).

2.2 Mecanismos de reparación de DSB del ADN

Se estima que el ADN de cada célula se enfrenta a alrededor 10^5 lesiones al día. Los daños que sufre el ADN pueden causar cambios en la expresión, control de ciclo celular, y mutaciones puntuales; estas últimas juegan un papel fundamental en el mantenimiento y evolución de la vida, sin embargo, también contribuye a ciertos daños irreparables que pueden conducir a la muerte celular. De forma general, el daño al ADN se puede clasificar en dos tipos principales, el daño endógeno y el daño exógeno; por un lado, el daño endógeno ocurre cuando el ADN participa químicamente en reacciones oxidativas hidrolíticas y especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro de la misma célula. El daño exógeno, por otro lado, surge cuando factores ambientales, químicos o físicos como agentes quelantes, radiación UV o radiación ionizante se hacen presentes, lesionando el ADN (15,16).

Afortunadamente las células cuentan con mecanismos (mecanismos de reparación, tolerancia al daño, puntos de control del ciclo celular y apoptosis) para reducir las consecuencias del daño al ADN (16). Dependiendo del tipo de daño causado, las células inducen una respuesta por daño al ADN (*DNA damage response*; DDR), lo que brinda tiempo para que los mecanismos de reparación del ADN corrijan el daño. Existen al menos cinco vías de reparación del ADN: reparación por escisión de bases (BER), reparación por

esición de nucleótidos (NER), reparación por desajustes (MMR), recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ).

Una ruptura de doble cadena o *Double-strand breaks* (DSB) es uno de los daños más graves que puede sufrir el ADN, con alteraciones por pérdida de material genético; sin embargo también es necesario para algunos procesos vitales como la recombinación meiótica y en vertebrados, el desarrollo del sistema inmune (17,18). Un DSB no reparado podría provocar la pérdida de algún gen esencial y por consecuencia llevar a la apoptosis celular. En eucariotas, la reparación ante una ruptura de doble cadena puede ocurrir a través de dos mecanismos generales: (a) por unión no homóloga (*non-homologous end joining*; NHEJ) o (b) por reparación dirigida por homología (*homology-directed repair*; HDR). Para el primer caso, (NHEJ) una proteína ligasa es encargada de ligar las cadenas rotas directamente o insertando/eliminando algunos nucleótidos. Generalmente este tipo de reparación suele venir acompañada de mutaciones que van desde mutaciones silenciosas hasta truncamiento prematuro de las proteínas. Para HDR, como su nombre lo indica, la reparación es liderada por una plantilla de homología, lo que significa una mayor precisión de la reparación. Este último mecanismo ocurre menos frecuentemente en la mayor parte de organismos eucariotas (19), aunque no en algunos invertebrados.

Los mecanismos de reparación del ADN por ruptura de doble cadena, pueden ser convenientes cuando se trata de procesos de mutagénesis dirigida mediante la delección/inserción de secuencias endógenas o la inserción de secuencias específicas. Muchas de las aplicaciones de ingeniería genética en eucariotas pueden ser de utilidad en diferentes organismos modelo, sin embargo los mecanismos de reparación involucrados en éstos pueden ser diferentes, incluso dentro del mismo organismo (20).

2.2.1 NHEJ

Como se mencionaba anteriormente, la reparación por *non-homologous end joining* no requiere una hebra molde de reparación, y las cadenas sencillas del ADN son ligadas nuevamente. Este tipo de mecanismo es visto en algunas bacterias como *Bacillus subtilis*,

Pseudomonas aeruginosa y *Mycobacteria*, sin embargo no es muy común encontrarlo en procariotas (21,22). Generalmente puede ocurrir a través de todo el ciclo celular, siendo más activo durante la fase G1 (23).

La mutagénesis a través de NHEJ frecuentemente induce pequeñas mutaciones en sitios particulares del genoma obteniendo diversos resultados. Por ejemplo, si esta mutación ocurre dentro de alguna región codificante, su reparación puede generar mutaciones puntuales en la proteína de interés, lo cual resulta útil para un análisis funcional. Sin embargo, cuando esta mutación cambia el marco de lectura, es posible crear proteínas truncadas.

Como parte del mecanismo de reparación, el sitio de corte es reconocido por el complejo KU, un complejo heterodímero formado por KU70 y KU80 que se encargan de localizar la ruptura y funciona como un nodo al que se unirán los siguientes elementos. La subunidad catalítica dependiente de la proteína quinasa DNA-Pkcs (*DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit*) es activada por este complejo proteico KU, que la dirige a los extremos del ADN para protegerlo de la degradación y conservar las cadenas unidas. La endonucleasa Artemis, se encarga de procesar los extremos del ADN y la enzima DNA-PK fosforila para completar la acción del complejo formado por la ligasa IV y la proteína XRCC4 (también conocida como *X-ray repair cross-complementing protein 4*) (Figura 2), que unen los extremos de las cadenas (24,25). Adicionalmente, en mamíferos, las polimerasas μ y λ pueden unirse al complejo KU – DNA gracias a su dominio BRCT localizado en la sección N-terminal de cada polimerasa; del mismo modo en levadura con la polimerasa POL4. Esto posibilita a que la pérdida o ganancia de nucleótidos dependerá fundamentalmente de la llegada de los elementos de reparación, es decir, si la polimerasa llega primero, entonces la adición de nucleótidos podría ocurrir primero, por otro lado, de ser la primera la nucleasa, da lugar a resección de nucleótidos primero (26).

2.2.2 HDR

El mecanismo de reparación a través de *homology-directed repair* (HDR), se lleva a cabo durante la replicación celular debido al uso de la cromátida hermana para la recombinación homóloga como molde, por lo que comparado con NHEJ, la reparación por homología directa, esta propensa a menos errores.

Cuando el objetivo es de edición génica, este tipo de reparación es aprovechada para la inserción de una secuencia específica en el sitio de quiebre mediante la introducción de un ADN “donador” que suplirá la cromátida hermana. Actualmente para obtener un ADN donador es usado ADN plasmídico u oligonucleótidos sintéticos (27); estas moléculas donadoras consisten en una secuencia específica flanqueada por secuencias homólogas al objetivo de interés llamadas, “brazos homólogos”, las secuencias específicas son integradas al genoma como parte del proceso de reparación por homología directa. Los oligodeoxinucleótidos (ODN) han sido usados ampliamente para la inhibición de expresión génica sirviendo como un oligonucleótido antisentido que se hibrida con el ARNm diana e impide su traducción (28). Por otro lado, las cadenas sencillas de oligodeoxinucleótidos o *single-strand oligodeoxynucleotide* (ssODN) han sido probadas en distintos ensayos experimentales de recombinación homóloga (29,30) y como hebra donadora usado exitosamente en ensayos con cultivo celular e inyecciones embrionarias (31,32).

Las cadenas sencillas de oligodeoxinucleótidos (ssODN) suelen ser inyectadas en altas concentraciones, sin embargo, comparado con los ADN donadores plasmídicos que requieren brazos de homología de 1 kpb, son relativamente pequeños (≤ 200 pb). Brazos de homología largos son requeridos generalmente cuando se trata de ediciones del tamaño de los genes diana, mientras que cuando se trata de fragmentos específicos cortos de genes, son usados brazos de homología cortos (≤ 100 pb) debido a su facilidad de preparación (33,34).

Los mecanismos moleculares de la recombinación homóloga son bastante complejos, sin embargo, han sido reconocidas un conjunto de proteínas con un papel fundamental en la

reparación por HDR: XRCC2, XRCC3, RAD51, RAD51B y RAD51C. En muchas especies, los quiebres de doble cadena (DSB) son reconocidos por el complejo proteico MRN (Rad50/Mre11/Nbs1); la nucleasa Mre degrada el ADN y produce cadenas sencillas, mientras que RAD52 se une a los extremos de las cadenas protegiendo ante las exonucleasas inespecíficas. RAD51 (en presencia de ATP) se encarga de sintetizar un filamento nucleoproteico que busca una secuencia homóloga y en conjunto a RAD52, catalizan el apareamiento y se forma la estructura del intermediario Holliday (*Holliday Junction*), que consiste en cuatro uniones del ADN, formadas entre dos ADN homólogos de doble cadena mediante el intercambio de un par de cadenas simples (Figura 2) (25,35–37).

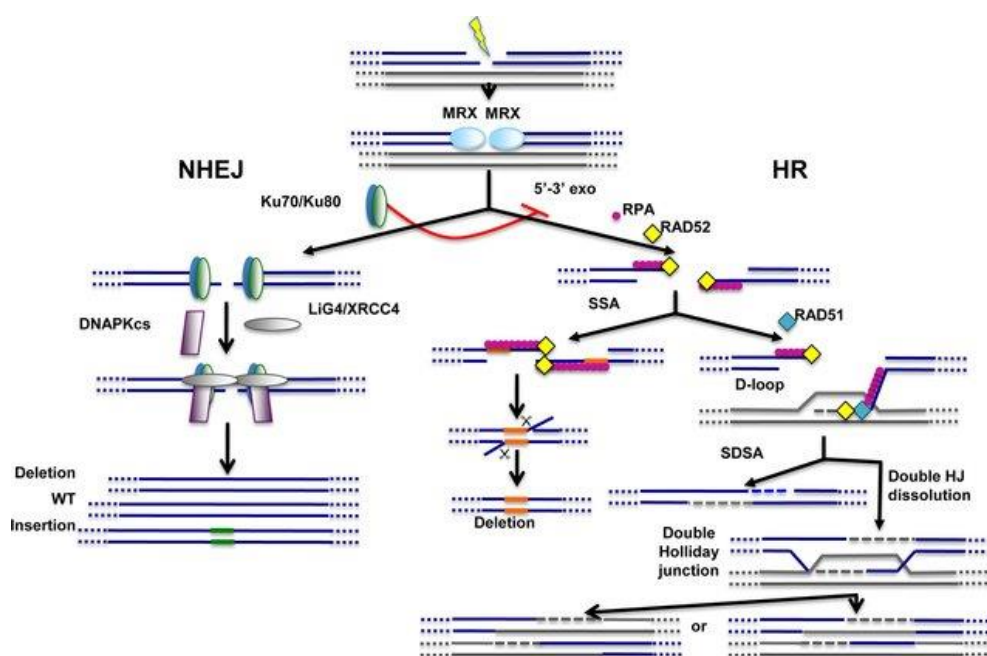


Figura 2. Diagrama de reparación ante un quiebre de doble cadena. A partir de un quiebre de doble cadena, el complejo MRX une las hebras para evitar degradación antes de una reparación. A partir de aquí pueden activarse dos mecanismos de reparación, NHEJ o HR, donde proteínas específicas a cada mecanismo se unen al complejo para completar la reparación. Tomado de (38).

En *Penaeus monodon*, ante un quiebre de doble cadena (DSB) del ADN, el principal mecanismo de reparación del ADN es HDR (Reparación Dirigida por Homología) ya sea por medio de una recombinación recíproca o una conversión génica (39).

Du y colaboradores, en 2018 (40) desarrollaron una metodología para la identificación y cuantificación de la actividad de NHEJ y HDR por reparación a partir de oligodeoxinucleótidos (ODN) ante un DSB inducido mediante CRISPR/Cas9. Células eucariotas (HEK293 T, HeLa y A549) fueron co-transfectadas con plásmido CRISPR/Cas9 y *single-stranded* ODN (ssODN) o *double-stranded* ODN (dsODN), ambas contaban con una secuencia única que parte de ella funge como la secuencia para un *primer* específico (Figura 3). En el primer caso, ssODN, funcionó como una “plantilla” de ADN donadora durante una reparación HDR, integrando de este modo la secuencia única, mientras que dsODN fue integrada en el sitio del DSB por ligación como parte de la ruta de reparación NHEJ. Posteriormente, mediante análisis de PCR y con el primer específico en la secuencia insertada, se amplificó la zona al DSB para determinar el tipo de reparación y cuantificar el marcador (o secuencia única) insertado. Para calcular la correlación entre la abundancia del marcador y la actividad de HDR y NHEJ, fue usado NU7441, un inhibidor de DNA-Pk (proteína quinasa dependiente de ADN), involucrado en la reparación NHEJ y *mirin*, inhibidor del complejo MRN, participante durante la reparación HDR (41).

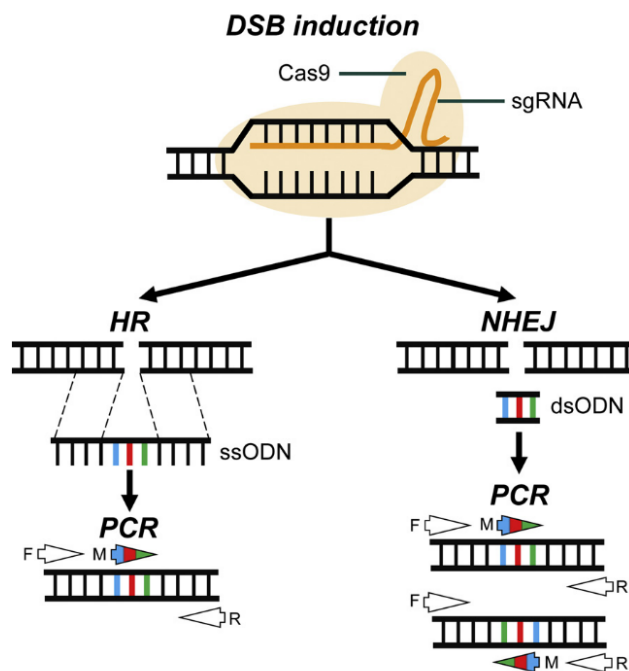


Figura 3. Diagrama de diseño de sondas para reparación por HR o NHEJ. Ante una reparación HR el diseño es un ssODN con un marcador integrado, representado con líneas de colores. Para NHEJ, un dsODN que consiste únicamente en la secuencia del marcador. Los análisis de PCR se encuentran indicados por las direcciones de las flechas. Tomado de (40)

2.3 Sistemas de entrega CRISPR

CRISPR/Cas9 es una herramienta molecular que ha demostrado ser bastante conveniente, sin embargo, cuenta con algunas limitaciones como el diseño de los sgRNA, el sitio diana en el ADN, la eficiencia de los mecanismos de reparación (HDR y NHEJ), la actividad de Cas9 y los sistemas de entrega del material de edición, es decir su acarreo al objetivo con la capacidad de generar mutaciones eficientes, precisas y seguras. En un principio, la forma de entrega puede dividirse en dos clases: el cargo, que se refiere al material de entrega (ADN plasmídico codificante para Cas9 y ARNg, ARNm para traducción de Cas9 y el ARNg por separado o la proteína Cas9 y ARNg) y el vehículo de entrega, que dicta la forma en la que el cargo será empacado y entregado. Actualmente estos vehículos de entrega se han dividido en tres principalmente: aquellos de entrega viral como los virus

adeno-asociados (AAV) y lentivirus, vectores no virales como las nanopartículas lipídicas o de oro, y métodos físicos como la electroporación y microinyección, entre otros (13).

Los sistemas de entrega de CRISPR son un aspecto fundamental para considerar debido a que el principal reto como vehículo es la introducción eficiente del cargo al interior de las células sin dañarlas y adicionalmente, el cargo puede no siempre ser el adecuado para el vehículo debido a su alta variabilidad en tamaño, forma y propiedades químicas. Los tres grupos de entrega cuentan tanto con ventajas como limitaciones. Por ejemplo, los vectores virales presentan alta eficiencia y transferencia persistente, sin embargo pueden presentar una respuesta inmune aumentada, baja capacidad de mutación, silenciamiento transgénico y dificultad de uso (42–45). Los vectores no virales son una alternativa de manipulación simple además de estar libre de virus y algunos de bajo costo, por otro lado, la entrega puede verse limitada por una eficacia de penetración variable, respuestas inflamatorias o degradaciones endosomales (46,47). Finalmente, los sistemas de entrega físicos varían mucho en dificultad y costos, pero su entrega es más garantizada (48,49).

- Vectores virales: Los vectores virales han sido usados para la entrega de material genético dentro de la célula debido a su capacidad natural de introducir su genoma dentro del huésped. El cargo más común para este vehículo es el ADN plasmídico codificante para Cas9 y ARNg. Dentro de los vectores virales más utilizados se encuentran, los virus adeno-asociados (AAV) debido a su simplicidad y baja respuesta inmunogénica; otros vectores también utilizados son los lentivirus (LV) y los adenovirus (AV).
- Vectores no virales: En cuanto a los vectores no virales, suelen ser más seguros ante respuestas inmunogénicas, de bajo costo y sin límite de tamaño; los principales cargos de entrega son ADN plasmídico, ARNm y el complejo Cas9: ARNsg RNP. Algunos tipos de vectores no virales son las nanopartículas de lípidos o liposomas, lipoplexes/poliplexes, péptidos penetrantes de células (CPP), *nanoclew* ADN, nanopartículas de oro (AuNPs), iTOP, SLO, MENDs y partículas de sílice

mesoporosas recubiertas de lípidos, siendo las primeras ampliamente usadas principalmente para la entrega de ácidos nucleicos gracias a su naturaleza catiónica que envuelven a los ácidos nucleicos de carácter aniónico y pueden ser entregados fácilmente.

- Métodos físicos: como su nombre lo indica, los métodos físicos utilizan fuerzas físicas para la introducción del material genético al interior de la célula; han sido ampliamente utilizados debido a su gran variedad de cargos que pueden acarrear, la no toxicidad que presentan y su entrega que suele ser más garantizada. Algunos ejemplos de estos son la microinyección, electroporación y la entrega hidrodinámica.

2.4 Microinyección

Esta metodología consiste en la introducción directa de material dentro de la célula con ayuda de micropipetas construidas a partir de capilares de vidrio y usando un *pipette puller*. Estas micropipetas son colocadas en un micromanipulador y con ayuda de un estereoscopio son ubicadas en la posición deseada, para el paso del material es utilizado un microinyector con un flujo constante o intermitente de aire (50). De forma sencilla, uno de los principales enfoques de la microinyección, es la disrupción membranal, es decir, la creación de algún orificio que permita la entrada del cargo a través de la membrana; lo que conlleva a dos principales retos, evitar la perturbación o muerte celular por el daño ocasionado en la membrana y el correcto pasaje para la entrada del material (51).

Actualmente la microinyección ha sido ampliamente usada en la entrega del sistema CRISPR-Cas9 por su alta eficiencia de mutación inyectando el material en células individuales (48). La técnica de microinyección ha tenido un impacto significativo ya que no está limitada por el tamaño del cargo, se tiene un mayor control de las concentraciones entregadas y suele ser inyectada en ubicaciones precisas dentro de una célula individual. La importancia de esta técnica también radica en el cargo a inyectar, por ejemplo, la introducción de ARNm en el citoplasma le permite a la célula la traducción de

Cas9 *in situ* y su posterior unión al ARNg para ser llevadas al núcleo celular, esta técnica concede el target de varios genes simultáneos con una sola inyección en algunos mamíferos (52,53). Por otro lado, está la entrega de ADN plasmídico en el núcleo para su transcripción y traducción en la misma célula evitando las reacciones *in vitro* (54) o el complejo RNP (13).

La microinyección es una técnica bastante usada en embriones ya que permite una modificación eficiente en la línea germinal acompañada de la maquinaria CRISPR/Cas9. Para esto, generalmente la inyección se realiza durante la fase pronuclear, es decir, durante o inmediatamente después de la fertilización. La sincronización de estos eventos es difícil, por lo que es de esperarse que ocurran mutaciones dialélicas, pero en un escenario de mosaicismo (48,53).

En la acuicultura esta metodología ha sido utilizada para la entrega de material genético en algunas especies de peces (55), erizos de mar (56,57), anfípodos (58) y camarones (59,60). En *P. japonicus*, la microinyección ha sido una técnica muy efectiva y eficiente para la introducción de ADN a pesar de su alta demanda de tiempo, comparada con la electroporación y biobalística o bombardeo de partículas ya que esta, asegura la entrada del ADN a las células (59); para el caso de *P. vannamei*, Sun *et al.* en 2005 (60), realizan la entrega de un vector de expresión mediante microinyección, sin embargo, encuentran una baja tasa de eclosión (3-5%) debido al daño físico que esta técnica ocasiona.

2.4.1 Establecimiento de metodología

Como se mencionaba anteriormente, la inyección se realiza durante la fase pronuclear, es decir, durante la etapa unicelular para limitar mosaicismo y observar el fenotipo resultante; cuando la microinyección es producida específicamente en el pronúcleo, las concentraciones recomendadas de las soluciones a introducir son 10 ng/ μ L de proteína Cas9, 5 ng/ μ L de sgRNA y 10 ng/ μ L de ADN donador (61). Sin embargo, la microinyección en esta zona específica del camarón *P. vannamei* resulta extremadamente complicada debido a la dificultad para distinguir el pronúcleo, el tamaño del embrión y la composición

de la membrana externa que dificulta a la penetración, por lo que se realizan las inyecciones en el citoplasma y son utilizadas concentraciones mucho más elevadas: 100 ng/ μ L de Cas9, 50 ng/ μ L de sgRNA y 200 ng/ μ L de plantilla de reparación o ADN donador plasmídico (32). Una inyección en el citoplasma es conveniente, además, cuando se trata del ARNm y el complejo RNP como cargo, ya que no es necesaria una transcripción *in situ*.

2.5 Uso de sondas de genes de desarrollo (Hox)

La selección apropiada de los genes diana para una disrupción mediada por CRISPR es importante, un target ideal es aquel que induzca fenotipos importantes. Los genes homeóticos o *homeobox* (*Hox*) se encargan de controlar el desarrollo de los segmentos o las estructuras completas del cuerpo de organismos multicelulares, son genes del control maestro del desarrollo anteroposterior, por lo que pueden ser apropiados. El término “homeótico”, se le atribuyó por primera vez, en 1894 por William Bateson, a las variaciones fenotípicas en las que “algo cambia a semejanza de otra cosa” (62,63).

A partir de 1915, fueron aisladas en *Drosophila melanogaster*, una serie de mutaciones homeóticas (*bx*, *bx_d*, *Ubx*) (64,65) que en 1950 se convirtieron en el primer clúster de genes homeóticos (HOX), el complejo *bithorax* (BX-C) y más adelante el segundo clúster, el complejo *Antennapedia* (ANT-C) (66). Posteriormente, en 1978, Ed Lewis (67) trabajando con el complejo BX-C, describe una serie de mutaciones que afectan la identidad de segmentos en *D. melanogaster*, es decir, el proceso por el cual es establecido el desarrollo de los segmentos del eje anteroposterior. En algunas mutaciones, se observó el desarrollo de segmentos como una copia del anterior. Mediante mapeo genético de algunas mutaciones se llevó al descubrimiento de que su disposición a lo largo del cromosoma es paralela a los segmentos del cuerpo de la mosca que afectan a lo largo de este eje (anteroposterior) (Revisado de (63)). Los genes *Hox*, codifican factores de transcripción que juegan un papel fundamental en el establecimiento de identidad segmental de artrópodos y otros animales mediante la interacción con muchos genes diana *downstream* (68).

Se ha demostrado que insectos y crustáceos cuentan con un solo set de genes *Hox* homólogos (69). Entre las diferentes especies de crustáceos, es claro que los tipos de apéndices, tanto torácicos como abdominales varían en número y posición; algunos estudios comparativos sugieren que los cambios espaciales de la expresión de genes *Hox*, facilitan esta variación mediante la modulación de un “código combinatorio” para la identidad de las extremidades (70–74). En la mayoría de los artrópodos, los apéndices torácicos son principalmente especializados para la locomoción, sin embargo, en algunos crustáceos los apéndices del tórax anterior se han desarrollado para la manipulación de comida (maxilípedos) y son tanto morfológica como funcionalmente similares a los apéndices de alimentación (maxilares). Esto se cree estar asociado a la expresión de los genes *Ubx* y *abdA* y su especificación en la región post-gnathal del tronco (70).

2.5.1 Ultrabithorax (*Ubx*)

Ultrabithorax es un gen homeobox que se encuentra en insectos y crustáceos con papel fundamental en la morfogénesis. En un estudio publicado en 2016, un grupo de investigadores utilizaron mutagénesis dirigida mediante CRISPR/Cas9 para la intervención de la función de seis genes *Hox* (*Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *abd-A*, *Abd-B*), durante el desarrollo embrionario de *Parhyale hawaiensis*. Los seis genes (expresados en la boca y tronco) presentaron algunos cambios homeóticos en las características de los apéndices que hablan de la sistemática de los genes *Hox* y el plan corporal entre diferentes crustáceos; por ejemplo: para el *knockout* de *Antp*, los quelípedos o pinzas dieron lugar a pereiópodos (T2/3 a T4/5), en estas extremidades transformadas también se observaron branquias, concluyendo que *Antp* es necesario para la identidad de quelípedos o apéndices en forma de pinza (75). En insectos como *Spodoptera litura*, la eficiencia de los sistemas CRISPR/Cas en genes *Hox* ha sido probada exitosamente mediante pérdida de función de *abd-A* a través de microinyección embrionaria (76). Para *Ubx*, mediante ensayos con RNAi en *P. hawaiensis*, al disminuir la expresión del gen, se desarrollaron maxilípedos adicionales a partir de una transformación de más apéndices posteriores. Estos resultados sugieren que *Ubx* desempeña un papel importante en la discriminación de segmentos con apéndices de

alimentación y los segmentos torácicos, es decir, la represión de la identidad gnathal (podómeros) (77). Experimentos posteriores con CRISPR/Cas9, corroboraron dichos resultados y a su vez se concluyó que *Ubx* es además necesario para el desarrollo de branquias (75).

En decápodos, con el uso del anticuerpo monoclonal FP6.87 (dirigido al epítipo específico conservado de las proteínas *Ubx* y *abdA*), en embriones, la expresión de los genes *Ubx-abdA* parece haberse desplazado hacia atrás, a comparación de otros crustáceos (*Leptostraca*, *Notostraca*, *Anostraca*), donde su distribución durante el desarrollo embrionario es observada en toda la región post-gnathal del tronco, desde T1 (70). En nuestro trabajo, este límite de expresión embrionario de *Ubx* podría pronosticar en qué zona del cuerpo del camarón blanco distinguir durante el desarrollo del nauplio el *knockout* del gen mediante CRISPR/Cas9.

2.6 *Penaeus vannamei*

El camarón blanco, *Penaeus vannamei*, (Decápoda: Penaeidae) es nativo de la costa del Pacífico oriental de México y el norte de Perú donde la temperatura del agua se encuentra usualmente arriba de los 25° C.

Los camarones penéidos cuentan con 19 pares de segmentos corporales divididos en tres secciones principalmente (Figura 4); el cefalón o la cabeza, compuesto por los primeros cinco pares, la zona del tórax, que cuenta con los siguientes ocho pares y en el abdomen se encuentran los últimos seis pares. La cabeza cuenta con una “cuchilla” con dientes dorsales y ventrales, los cinco segmentos que componen esta sección en orden aparecen como un par de anténulas, antenas, mandíbulas, maxilares 1 y maxilares 2. La cabeza y el tórax están fusionados en el cefalotórax o pereon compuesto por un exoesqueleto que se encarga de cubrir y proteger la cámara branquial (branquiostegite). El tórax consta de tres pares de maxilípedos y cinco pares de pereiópodos o patas de los cuales los primeros tres son utilizados para alimentación y los dos últimos pares para caminar. El abdomen (pleon) se divide en seis segmentos de los cuales, en los primeros cinco se distribuyen cinco pares

de pleópodos o patas para nadar; finalmente, en el último segmento se encuentra la cola con una forma de abanico que consta de dos pares de urópodos y el telson, que ayuda al animal a saltar o huir repentinamente en caso de peligro (78–80).

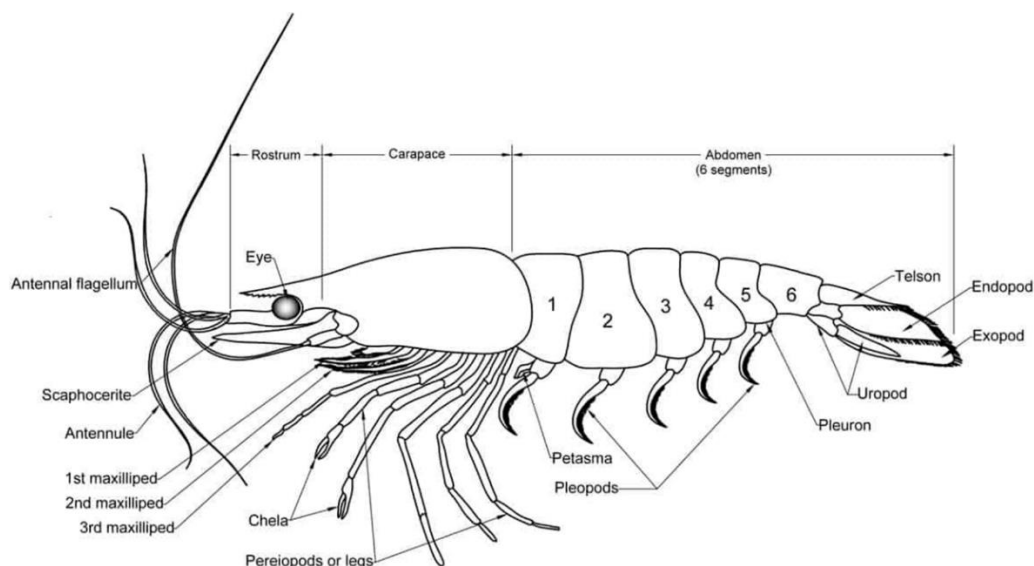


Figura 4. *Penaeus vannamei*. Morfología externa del camarón blanco.

Esta es una especie de sexos separado fácilmente distinguible, un petasma en machos y telicum en hembras, además, cuenta con un dimorfismo sexual bien marcado en tallas, donde las hembras tienen una mayor tasa de crecimiento que los machos. La fertilización de esta especie es externa, pudiendo alcanzar una hembra madura, un total de entre 100,000 a 250,000 huevos durante un desove (80). Una vez fertilizados los huevos, estos alcanzan un diámetro de 230 μm e inicia el proceso de desarrollo del embrión, donde la primera división ocurre 40 minutos post-desove a una temperatura de 27° C (81). A partir de la primera división y hasta la eclosión del huevo, transcurre un total de 12 horas de desarrollo, siguiendo con las etapas de: *nauplio* (I, II, III, IV), *zoea* (I, II, III), *misis* (I, II, III) y *poslarva* (I) (82).

Actualmente se cuenta con el ensamble del genoma de referencia *de novo* de *P. vannamei*, que fue reportada en 2019. Este tiene un tamaño reportado de 2.45 Gb; para el

ensamblado de las secuencias a un total de 44 cromosomas fueron utilizados mapas de ligamiento, en los cuales alrededor de 25,590 genes codificantes fueron anotados. Este genoma cuenta con un alto porcentaje de elementos transponibles (TEs) (16.17%) y con una extremadamente alta proporción de repeticiones de secuencias simples (SSRs) (23.93%), siendo estas de una longitud dos veces mayor que en otros artrópodos, habiendo sido esto último el mayor inconveniente para la secuenciación y ensamble del genoma de esta especie (83).

3. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años el desarrollo de la acuicultura ha ido creciendo cada vez más, siendo la industria de la camaronicultura una de las principales generadoras de mercado. *Penaeus vannamei* es la especie más importante de cultivo acuícola en México y con gran potencial ante la demanda actual de alimentos. Muchas características en *P. vannamei*, como el dimorfismo sexual en talla que las hembras presentan han llamado la atención por ejemplo para llevar a cabo cultivos monosexuales. Así mismo el mejoramiento genético a partir de la aplicación de nuevas tecnologías de edición genómica como CRISPR/Cas9. Sin embargo hace falta desarrollar metodologías de entrega de los componentes ribonucleoproteicos para implementar estas tecnologías de edición genómica. En paralelo, es importante comprender los mecanismos de reparación de ADN por ruptura de doble cadena que implica estas herramientas ya que a la fecha son desconocidos en la mayoría de las especies de camarones. A partir de este trabajo se pretende contribuir al conocimiento morfológico del camarón a través de la mutagénesis del gen homeótico *Ubx* como un control visual y la comprensión de los mecanismos de reparación de ADN aplicando las nuevas tecnologías de CRISPR-Cas9. Finalmente se destaca uno de los principales retos de la microinyección embrionaria en *P. vannamei* como parte del sistema de entrega de material de edición: el tamaño y dureza del huevo, por lo que la estandarización de esta metodología podrá permitir superar obstáculos de internalización, transporte y entrega de estos sistemas.

4. HIPÓTESIS

Si la microinyección funciona como metodología de acarreo de material de edición de CRISPR/Cas9, es posible estandarizarla en embriones del camarón *Penaeus vannamei*, y a partir del tipo de sonda utilizada, las frecuencia y tipos de mutaciones generadas, esclarecer los mecanismos utilizados para la reparación del ADN.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Validar la técnica de microinyección embrionaria como metodología de entrega de material de edición génica por CRISPR/Cas9 evaluando mecanismos de reparación del ADN por ruptura de doble cadena.

5.2 Objetivos particulares

- Diseñar y sintetizar sondas para el complejo RNP.
- Implementar la microinyección embrionaria como metodología de entrega de material de edición.
- Evaluar los genotipos resultantes de la disrupción del gen *Ubx* en individuos supervivientes y muertos.
- Validar la metodología de identificación de mecanismos de reparación a partir de análisis de PCR y secuenciación.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Los embriones de camarón *P. vannamei* en etapa de desarrollo temprano, fueron proporcionados por la proveedora de larvas FITMAR S.A. de C.V ubicada a aproximadamente 70 Km de la ciudad de Mazatlán Sinaloa (22°54'28.4"N 106°05'43.9"W). Las hembras maduras fueron colocadas individualmente en tinacos de 500 litros dentro de un cuarto oscuro con fotoperiodo invertido a 10 horas oscuridad y 14 horas luz (apagado de luces partir de las 11:00 a.m. y hasta las 9: p.m.) para su desove alrededor de las 13:00 y 14:00 p.m. Los embriones fueron recolectados mediante un sifón, pasados por tamices NITEX™ de nylon de 150 µm y colocados en agua marina con aireación.

6.2 Diseño de primers

A partir de una secuencia genómica de *P. vannamei* (GenBank no. de acceso NW_020869267.1) fue aislada la secuencia nucleotídica del gen *Ultrabithorax (Ubx)* (posiciones 757255-599209 del scaffold "LVANscaffold_1882"). Este gen cuenta con tres exones. Se realizó el diseño de tres pares de primers utilizando el programa Primer3Plus (84) (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>); de estos primers, indicados en la figura 5, el primer par, en amarillo, amplifican una región de 490 pb, ubicado en el primer exón, y los siguientes dos pares de primers flanquean el primer amplicón con una región de mayor tamaño, aproximadamente 850 pb en azul para Lv_UBX_3 y en rojo para Lv_UBX_4 (Tabla 1).

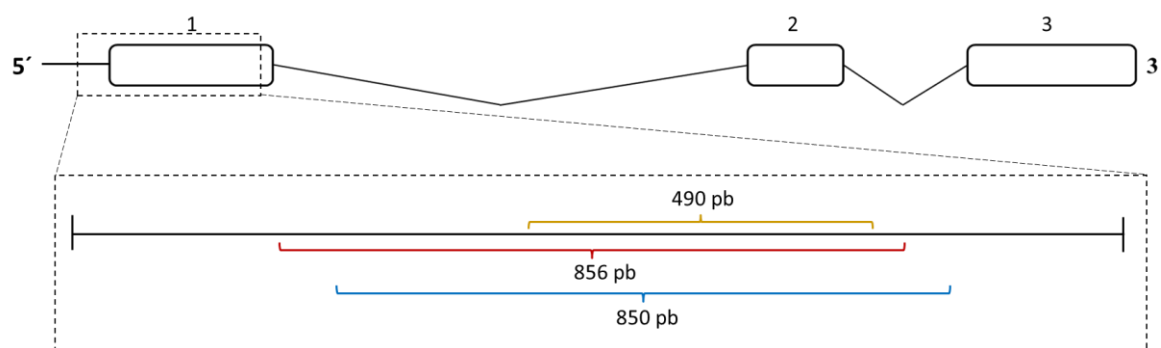


Figura 5. Mapa de diseño de primers. En la parte superior se encuentra un mapa del gen *Ubx* y se resalta en recuadro punteado, una región del exón 1. En la parte inferior, el color de las llaves indica la zona a amplificar por el conjunto de primers diseñados.

Tabla 1. Secuencia de primers diseñados

Oligonucleótido	Secuencia (5' – 3')	T °C de alineamiento	Tamaño esperado (pb)
ubx_e1_2F	TCAGTGGGTGCGTGTAGTGT	60	490
ubx_e1_2R	GCCTGGTTCATCTGGTTGTT		
Lv_UBX_3_F	TTTGGGCGAGAAGAATTTTG	60	850
Lv_UBX_3_R	AAATCGGTTGGTGTGTTGGT		
Lv_UBX_4_F	ACCTACGAGGGGGTGTAGG	60	856
Lv_UBX_4_R	TCTTGGTGTGGTGGAGTGA		

6.3 Preparación del complejo RNP

A partir del diseño de los primers se realizó el diseño de dos oligonucleótidos adicionales en *forward* en el *software* CRISPOR (85) (<http://crispor.tefor.net/>), que funcionan como molde para la síntesis del ARN guía, y que estructuralmente se componen de la secuencia del promotor T7, la secuencia de interés con su secuencia PAM (en rojo) y un fragmento de la secuencia del *tracrna* universal; además de un oligonucleótido *reverse* que lo compone la secuencia completa del *tracrna* (Tabla 2). En el primer caso (*ubx_e1_a1*), la

secuencia se encuentra en la región anti-sentido (3' – 5') y en el segundo caso (ubx_e1_s1) en la región sentido (5' – 3').

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos para la síntesis de ARNsg

Oligo frw	Promotor T7	crRNA (5' – 3')	tracrRNA
ubx_e1_a1	TAATACGACTCACTATA	GGGCGGTACAGCTTGCAGGAGG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
ubx_e1_s1	TAATACGACTCACTATAGGG	CGGGACCGGGCAGCACACGTGGG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Oligo rev			
AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC			

6.3.1 Síntesis y purificación del ARNsg

Para la generación del ARNsg, se llevó a cabo la preparación de un ADN molde por empalme de oligonucleótidos crRNA y tracrRNA (ubx_e1_a1 y tracrRNA, 120 pb) mediante una temperatura de hibridación a 50° C durante 10 minutos y una temperatura de extensión a 72°C durante 10 min, en una reacción de 26 µL con las siguientes condiciones: 1X *Colorless GoTaq^R Flexi Buffer*, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada oligonucleótido, 1.25 U de *GoTaq^R Flexi DNA Polymerasa* (Promega). Para la síntesis del sgRNA, se realizó la transcripción con la RNA polimerasa T7 (*Thermo ScientificTM TranscriptAidTM T7 High Yield Transcription Kit*) a un volumen final de 10 µL incubando a 37° C durante dos horas. El producto fue cuantificado en el espectrofotómetro *NanoDropTM Lite* (*Thermo Scientific*).

De acuerdo a las especificaciones del fabricante, se realizó un tratamiento con *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega) para la degradación selectiva de ADN molde no transcrito y posteriormente se realizó la purificación del ARNsg mediante precipitación con LiCl, añadiendo 1 volumen de LiCl 7.5 M, incubando en 2.5 volúmenes de etanol 80% a -20°C durante 30 minutos y centrifugando a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4° C, posteriormente se removió el sobrenadante y se realizaron dos lavados con etanol 80%, finalmente se removió el sobrenadante y se resuspendió en 30 µL de agua libre de

RNAsas, el producto se cuantificó en el espectrofotómetro *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific) obteniendo una concentración de 740.8 ng/μL y se realizó una dilución hasta 225.5 ng/μL para facilitar la preparación de la mezcla de microinyección.

Debido al gran porcentaje de secuencias repetitivas que se encuentran en la región final del exón 1 no se procedió a realizar la síntesis del ARNsg a partir del ARNcr con la sonda *ubx_e1_a1*.

6.3.2 Diseño de ODN

Para la evaluación del mecanismo de reparación activado ante un corte de doble cadena, y establecer una reparación mediante *Homology Directed Repair* se realizó el diseño de un oligodeoxinucleótidos (ODN's) dirigido a la zona de corte guiada por *ubx_e1_a1*, una sonda de una sola cadena de 234 pb compuesta por dos brazos homólogos de 100 pb cada uno que flanquean una secuencia única (5' – GTTTAATTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT – 3') y a partir de la cual se cuenta con una secuencia marcador que funciona como un oligonucleótido primer (5' – GAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT – 3'); ante dicha reparación, los brazos homólogos permiten la incorporación del marcador por su empalme. Durante el diseño se realizó un cambio adicional de las bases "CC" (inmediatamente *downstream* del PAM) por "AA" con la intención de brindarle protección al ADN reparado ante un segundo corte, así mismo, el oligodeoxinucleótido cuenta con dos enlaces fosforotioato en el extremo 5' para facilitar su incorporación en la cadena. Por otro lado, para evaluar una posible reparación alternativa mediante *Non Homologous End Joining*, se diseñó un oligodeoxinucleótido de doble cadena que consiste solamente en la secuencia única de 34 pb (5' – GTTTAATTGAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT – 3'). Dado este diseño, la sonda puede ser incorporada en la cadena en ambos sentidos (5' – 3' o 3' – 5'). Esta sonda cuenta con dos enlaces fosforotioato en ambos extremos para facilitar su incorporación en la cadena al ser cortada y brindarle resistencia ante exonucleasas intracelulares (Figura 6).

1

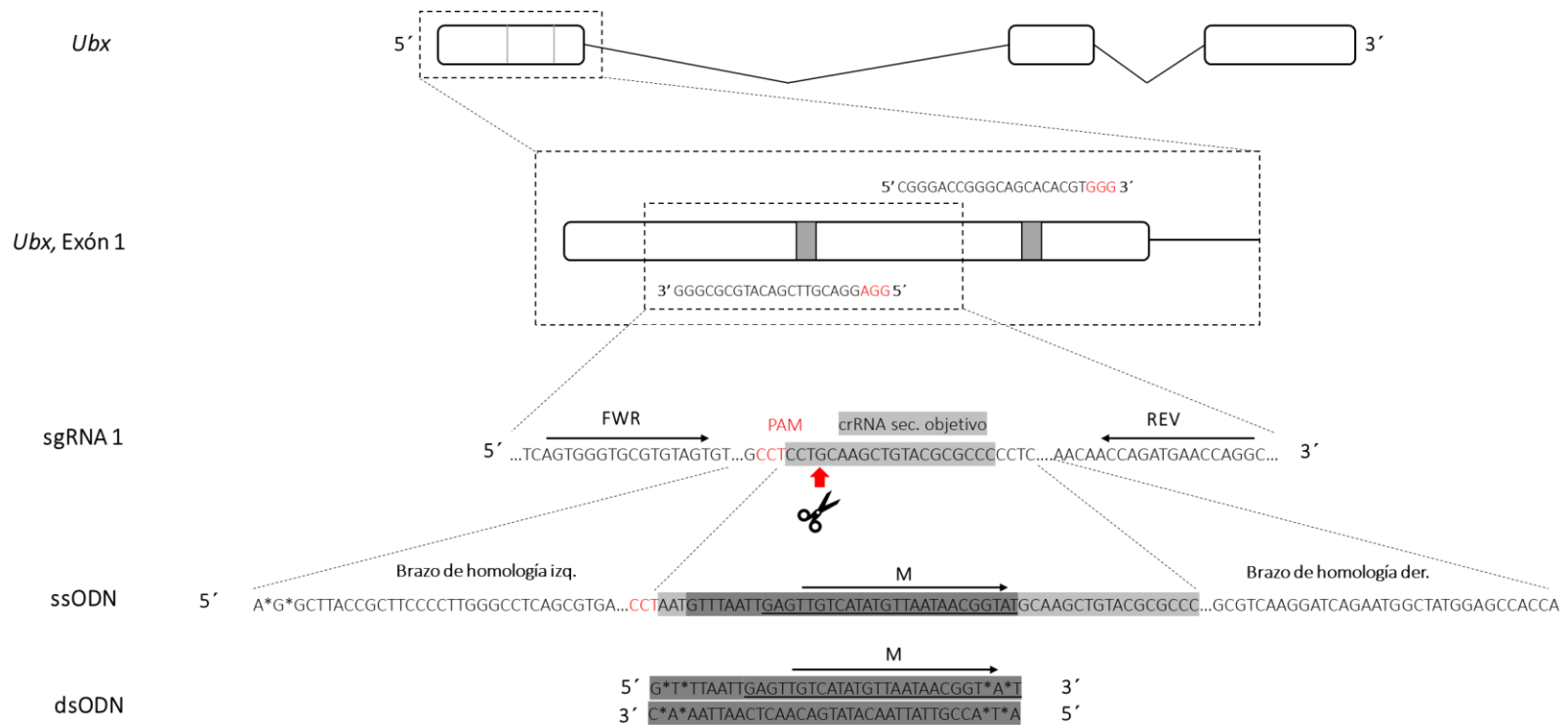


Figura 6. Diseño de oligodeoxinucleótidos. En la parte superior (marcado a la izquierda como *Ubx*) se presenta un mapa del gen *Ubx* al que se le realiza un acercamiento en el exón 1, en donde se encuentran dos secuencias marcadas con un rectángulo gris que representan las guías y para las cuales se realiza un acercamiento a la primera de ellas, diseñada en la hebra antisentido. En “sgRNA1” se encuentra la secuencia de la crRNA resaltada en gris claro y en rojo la secuencia PAM. Más abajo, “ssODN”, representa la secuencia de la ODN diseñada que incluye dos brazos de homología y la incorporación de una secuencia resaltada en gris oscuro en la región de corte (marcada con una flecha roja, las tijeras representan el sitio de corte de Cas9). Finalmente, en “dsODN”, se señala la secuencia de esta sonda que incluye dos enlaces fosforotionato en ambos extremos.

6.4 Microinyección

La microinyección fue realizada en el área de maduración de proveedora de larvas FITMAR S.A. Las inyecciones se realizaron durante la etapa embrionaria unicelular a partir de la formación de la membrana de eclosión, es decir, aproximadamente durante los primeros 20 minutos posteriores a la fertilización (81). Los embriones de camarón con diámetro aproximado de 230 μm fueron colectados con filtros NITEXTM de nylon de 150 μm una vez formada la membrana de eclosión (15 minutos post desove, mpd) e inmediatamente fueron colocados en agua marina filtrada y estéril para su enjuague.

El sistema de microinyección se compone de un estereoscopio (Carl Zeiss), un microinyector Pneumatic PicoPump PV830 que mantiene una contrapresión a 2 psi para evitar el tapar de la aguja, un micromanipulador MN-151 con Joystick integrado (Narishige) y un tanque de gas de 5 Lb con N₂ industrial. Los embriones a microinyectar fueron colocados en una cama de agarosa al 1.5% sobre una malla de nylon de 150 μm en una caja de Petri para evitar la rotación del embrión durante la microinyección y facilitar su manipulación (59,60). La microinyección se realizó formando un ángulo aproximado de 30° con respecto al plano horizontal. Una vez inyectados, los embriones fueron tomados con pipetas y pasados a frascos de cultivo celular completamente llenos de una solución de agua marina estéril y oxitetraciclina 1 ppm, para así facilitar su transporte al laboratorio de Genética Funcional en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología y colocados en una incubadora a 28 ° C.

6.4.1 Mix de microinyección

La preparación del complejo ribonucleoprotéico para microinyección se realizó en una mezcla con volumen final de 2 μL . La mezcla se compone por la proteína Cas9 (Sigma-Aldrich) (100 ng/ μL), gRNA (50 ng/ μL), un oligodeoxinucleótido donador de doble cadena (dsODN) (20 ng/ μL) o de cadena sencilla (ssODN) (20 ng/ μL), rojo de fenol (0.05%) y buffer de dilución para proteínas Cas9 1x compuesto por 20 mM Na-Hepes pH 7.5 y 200 mM NaCl (hasta volumen final). Los volúmenes se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3. Mix de microinyección

Nombre del mix	Volumen gRNA stock μL	ODN μL	Volumen Cas9 μL	Volumen rojo de fenol μL	Buffer Cas μL
Pvan_dsODN	0.44	0.2	0.2	0.4	0.75
Pvan_ssODN	0.44	0.4	0.2	0.4	0.56
Pvan_Control	0	0.2	0.2	0.4	1.2
Pvan_Control2	0	0.4	0.2	0.4	1
Coinyección	0.44	0.6	0.2	0.4	0.36

6.4.2 Construcción de micropipetas

Las agujas utilizadas fueron fabricadas usando capilares de borosilicato de 1 mm OD/0.5 mm ID, en un *micropipette puller* Sutter P-97 mediante tres ciclos con el siguiente protocolo estandarizado (Figura 7).

Tabla 4. Protocolo de microcapilares

Ciclo	Calor	Tracción	Velocidad	Tiempo
1	503	100	10	250
2	503	100	10	250
3	503	100	60	250

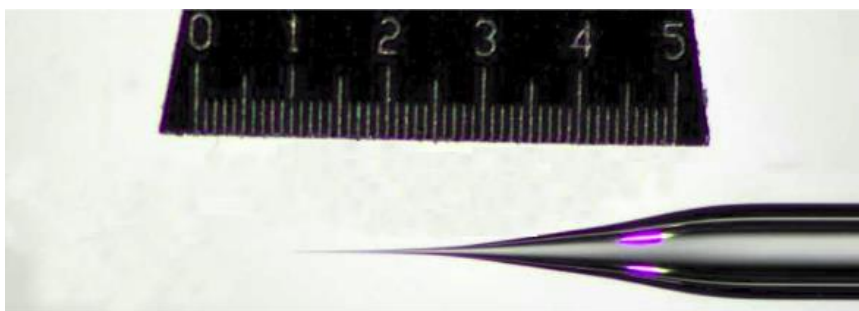


Figura 7. Micropipeta utilizada. Micropipeta de 4 mm, protocolo estandarizado. La escala superior representa valores enteros de milímetros.

6.4.3 Reblandecimiento de cubierta embrionaria

Para incrementar la facilidad de penetración de la aguja durante la microinyección, se llevó a cabo un debilitamiento de la envoltura embrionaria o membrana de eclosión mediante un tratamiento previo a la microinyección de embriones (57,59,60,86–88), 1 mM de 3-amino-1,2,4-triazol (ATA).

Este tratamiento consistió en la evaluación de un primer ensayo evaluando el tiempo necesario de reblandecimiento, es decir el tiempo de exposición al reactivo y un segundo ensayo de periodo de exposición a ATA. Los ensayos fueron realizados por duplicado (dos hembras), con tres replicas y 100 ± 20 individuos. Para establecer el tiempo de exposición al reactivo, los embriones fueron tomados aproximadamente 13 – 15 minutos post-desove, e inmediatamente colocados en una solución 1 mM ATA y agua marina estéril. Los tratamientos fueron los siguientes: control (sin exposición, directamente a agua marina), 5 minutos, 10 minutos, 30 minutos, 1 hora y 24 horas. Transcurrido el tiempo de exposición, los embriones fueron colocados en agua marina filtrada a $0.22 \mu\text{m}$. Se realizaron dos observaciones para el porcentaje de eclosión, a las 16 horas (máximo tiempo para eclosión) y a las 24 horas post-desove y una más para la facilidad de penetración de la aguja en los embriones tratados a las 24 horas post-desove (excepto el tratamiento de 24 horas de exposición). Para el ensayo de periodo de exposición se utilizó una concentración 1 mM con una exposición mínima de 5 minutos, evaluando los siguientes tratamientos:

control (sin exposición, directamente a agua marina), inicio de exposición 13 – 15 minutos post-desove (formación de la membrana de eclosión), inicio de exposición a los 15 minutos después de la formación de la membrana de eclosión (13 – 15 minutos post-fertilización), exposición en la primera división y blastómero. De igual manera, se realizaron dos observaciones a las 16 y 24 horas post-desove

6.4.4 Biselado de agujas

Como una alternativa más para incrementar la eficiencia de la microinyección se realizó un biselado de las agujas o microcapilares utilizadas, siguiendo el protocolo propuesto por Canfield (89). Se partió del disco magnético proveniente de un disco duro de cómputo (*Hard drive*) de 3.5 pul. y velocidad nominal de 5400 rpm, energizado mediante una fuente de poder de 12 V de corriente directa (DC). La superficie del disco fue abrasionada en sentido radial con una lija para metal número 320 (Fanal; México), en dirección del centro a la periferia por toda la circunferencia y posteriormente limpiado con etanol absoluto. Las agujas fueron montadas en un micromanipulador con un ángulo de 45° con respecto al disco y en una posición transversal a las rayaduras, formando un ángulo de 50° a 60° (Figura 8). Con ayuda de un estereoscopio se llevó hasta el eje del disco para ser cortado mientras este se encuentra girando.

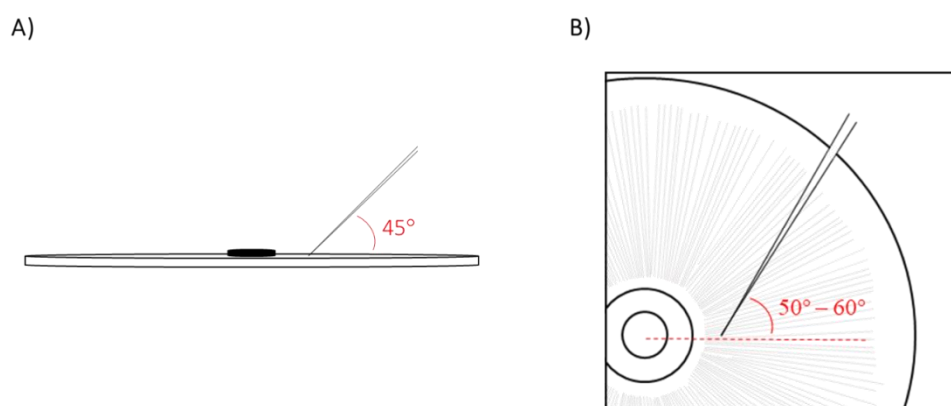


Figura 8. Diagrama de biselado de microcapilares para la producción de agujas. A) vista lateral del disco, el microcapilar forma un ángulo de 45° . B) vista superior del disco, el microcapilar forma un ángulo de $50 - 60^\circ$ con respecto a las líneas de la lija (línea punteada roja). El giro del disco ocurre en sentido de las manecillas del reloj.

6.5 Análisis de fenotipos observados

La microinyección, análisis de fenotipos y evaluación de genotipos fue realizada lógicamente en dos etapas, la primera consistió en la inyección de las mezclas de microinyección “Pvan_dsODN”, “Pvan_ssODN” y controles; y la segunda en la inyección de la mezcla de coinyección y controles.

Los fenotipos obtenidos fueron registrados a partir de una cámara NIKON D3200 con una lente de 50 mm con adaptador al ocular del estereoscopio.

6.5.1 Extracción de ADN genómico

Los nauplios y huevos inyectados (pero no eclosionados), fueron fijados en etanol al 80% para su almacenamiento, y posteriormente fueron separados individualmente en tubos de 200 μ L. Se estandarizó una metodología de extracción de ADN genómico de tipo enzimática para embriones hasta nauplios, la cual consiste en una incubación con 1 μ L de Proteinasa K (20 mg/ mL) en 30 μ L de buffer TE 1X durante 60 min a 50° C, seguido de un ciclo de inactivación de la Proteinasa K a 95°C durante 10 minutos. Las muestras ya extraídas pueden ser almacenadas a -4°C. Se realizaron ensayos de amplificación a partir de dicho ADN con los oligonucleótidos dirigidos al gen del factor de elongación (EF), empleando un protocolo estándar por 35 ciclos.

6.6 Genotipificación

La detección de mutaciones se realizó mediante dos metodologías: la primera, PCR y una segunda más profunda, secuenciación capilar de Sanger.

6.6.1 PCR

La incorporación del ADN donador para establecer el tipo de reparación activada fue comprobada mediante PCR a través de juegos de oligonucleótidos. Como se mencionó anteriormente, el ADN donador (dsODN y ssODN) cuenta con una secuencia “marcador” de cadena única integrada a partir de la cual se tiene un oligonucleótido (5’ – GAGTTGTCATATGTTAATAACGGTAT – 3’).

Tanto para el caso de los nauplios inyectados con las mezclas “Pvan_dsODN”, “Pvan_ssODN” como “co-inyección”, se realizaron tres amplificaciones por muestra, como lo indica el diagrama de la figura 9 (respetando los colores de las flechas, así como el sentido de estas): la primera, usando la combinación de primers flanqueantes a la región de corte y/o región de inserción de la secuencia marcador (flechas rojas), por ejemplo, usando el primer ubx_e1_2F y ubx_e1_2R se espera un amplicón de 490 pb. La segunda y tercera amplificación parte del primer amplicón, en este caso, con el producto de 490 pb, por un lado combinando el oligonucleótido marcador M1 y el primer flanqueante forward, ej. ubx_e1_2F, esperando un amplicón aproximado de 220 pb, y por otro lado, la combinación del oligonucleótido marcador M1 y el reverse, ej. ubx_e1_2R, para un amplicón de 330 pb (flechas rojas con verdes); para los tres casos, dicha amplificación se realizó mediante el mix 2X LongAmp® Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) a un volumen final de 20 µL y las siguientes condiciones en el termociclador MyCycler™ Bio-Rad: 5 minutos a 95° C, seguido de 35 ciclos a 98°C por 20 s, 49° C por 15 s, 72° C por 30 s y finalmente una extensión a 72° C por 2 minutos. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% en TAE.

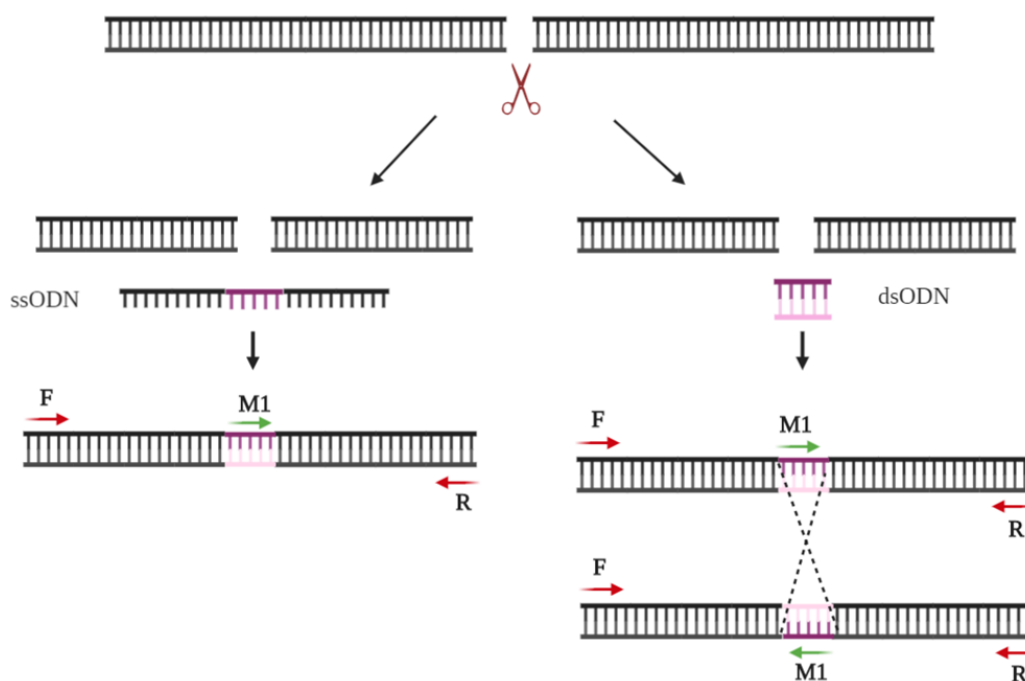


Figura 9. Diagrama de diseño de sondas para establecer la forma de reparación de la ruptura de la dsDNA, HR o NHEJ. Ante una reparación HR el diseño es un ssODN con un marcador integrado, representado con las flechas verdes. Para una reparación por NHEJ, un dsODN que consiste únicamente en la secuencia del marcador. Los análisis de PCR se encuentran indicados por las direcciones y colores de las flechas, verde y rojo.

6.6.2 Secuenciación

Todos los amplicones con primers flanqueantes (*forward* y *reverse*) fueron seleccionados, así como todos aquellos productos de tamaño esperado. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) en TAE, recortando y purificando las bandas mediante el Zymoclean gel DNA recovery kit de Zymo Research (Irvine, Estados Unidos) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, eluyendo en 12 μl y posteriormente cuantificados en el espectrofotómetro *NanoDrop™ Lite* (Thermo Scientific). Para aquellos productos cuya concentración no fue suficiente, se realizó un enriquecimiento mediante una segunda amplificación por PCR y una purificación con perlas magnéticas (Ampure XP beads; Beckman Coulter), la cual consistió en una dilución del producto de PCR a razón 1:1, y posteriormente la incorporación de 0.8x de suspensión de perlas magnéticas, se mezclaron por pipeteo y se dejó incubar

durante 10 minutos a temperatura ambiente. A la par de la incubación se preparó etanol al 80%. Posteriormente las muestras se colocaron en un rack magnético y se desechó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con etanol al 80% sin dañar el pellet o pastilla y se descartó totalmente el líquido dejando secar la muestra. Se retiró el tubo del rack magnético y se añadieron 15 µl de agua libre de nucleasas, dejando incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y colocándolo nuevamente en el rack magnético para recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo. Finalmente, las muestras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro *NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific)* y preparadas para su envío y secuenciación capilar en MacroGen Inc. (Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante similitud de alineamiento local por homología con la secuencia nucleotídica de *Ultrabithorax (Ubx)* (757255-599209) a partir de la base de datos de GenBank empleando el software CodonCode Aligner (<https://www.codoncode.com/>).

7. RESULTADOS

7.1 Reblandecimiento de la cubierta embrionaria

En trabajos con diversos penéidos (57,59,60,86–88), se ha utilizado una concentración de ATA al 1 mM, sin embargo el tiempo de exposición al reactivo es desconocido, por lo que se realizaron observaciones enfocadas a definir el tiempo de exposición al compuesto, observando el avance embrionario hasta aproximadamente nauplio III (considerando el desove como referencia), el porcentaje de eclosión y la facilidad de penetración de la aguja.

Este experimento consistió en la evaluación del tiempo necesario de reblandecimiento, realizando un ensayo para establecer el tiempo óptimo de exposición a ATA. Se evaluaron 6 tratamientos (tiempos) por triplicado usando dos desoves (dos hembras): 0 min (control), 5 min, 10 min, 30 min, 1 hora y 24 horas. Transcurrido el tiempo de exposición, los embriones se colocaron en agua marina estéril nuevamente. Las observaciones se realizaron mediante la estimación del porcentaje de eclosión y la facilidad de penetración de la aguja en los embriones tratados (excepto el tratamiento de 24 horas). En la siguiente gráfica (Figura 10) no se muestra una tendencia lineal con respecto al porcentaje de eclosión total (24 horas) entre los tiempos de exposición, sin embargo ambos desoves muestran resultados similares. Durante una exposición prolongada a ATA (24 horas), no se observó eclosión de los embriones. A partir de los resultados obtenidos, proponemos que la exposición a ATA 1 mM durante 5 minutos permite la eliminación de la membrana de eclosión sin afectar el porcentaje de eclosión, destinando tiempo suficiente a la técnica de microinyección antes de la primera división.

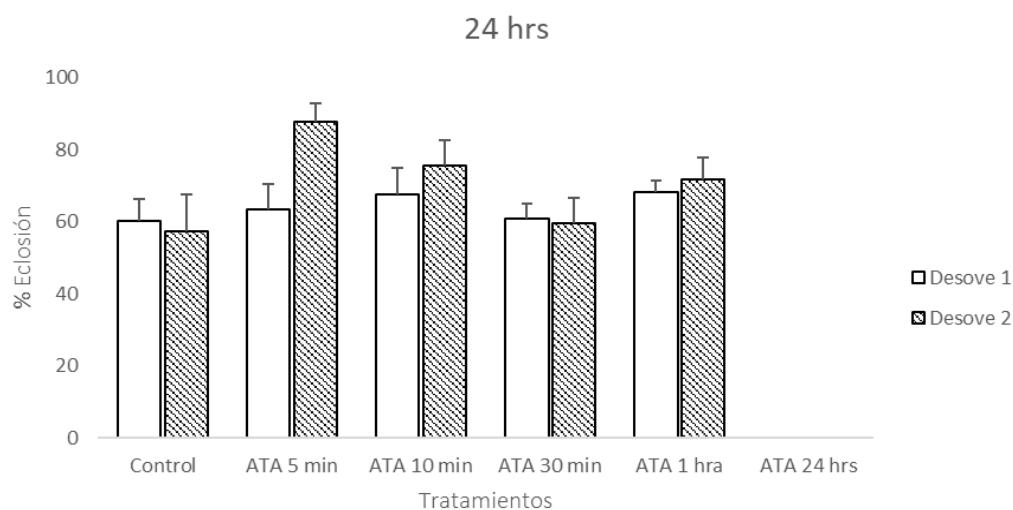


Figura 10. Porcentaje de eclosión total a las 24 horas en dos desoves con 5 tratamientos, cuando los embriones son tratados con ATA (1mM) durante distintos tiempos a partir de la fertilización.

Se realizó adicionalmente un ensayo para definir el periodo de exposición, utilizando la concentración 1 mM con la exposición mínima del ensayo anterior (5 minutos), evaluando los siguientes tiempos de inicio post-desove: control (sin exposición, directamente a agua marina), inicio de exposición 13 – 15 minutos post desove (formación de la membrana de eclosión) (60), 15 minutos después de la formación de la membrana de eclosión (13 – 15 minutos post-fertilización), exposición en la primera división y blastómero. Se realizaron dos observaciones a las 16 y 24 horas post desove. De acuerdo con los resultados observados en la siguiente gráfica (Figura 11), no se encontraron diferencias entre los tiempos evaluados, por lo que puede concluir que la eliminación de la membrana de eclosión inmediatamente luego de ser formada (13 – 15 minutos) deja mayor tiempo para proseguir con la microinyección antes de la primera división. Por otro lado, es notoria la variación entre desoves sometidos a los mismos tratamientos por lo que considerar esta variación entre hembras es de importancia.

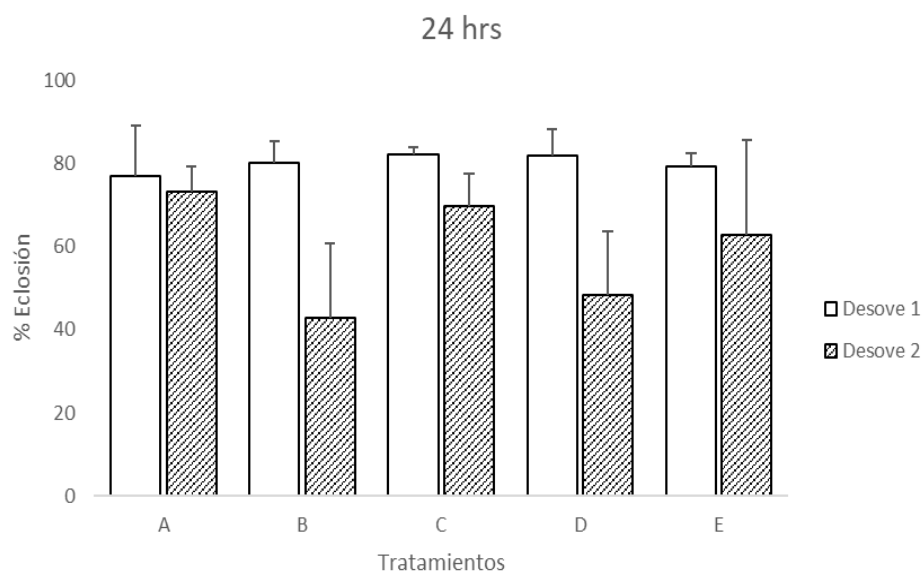


Figura 11. Ensayo para establecer el mejor periodo para iniciar el reblandecimiento medido como porcentaje de eclosión total (24 horas): (A) control (sin exposición, directamente a agua marina), (B) a los 13 – 15 minutos post-desove (formación de la membrana de eclosión), (C) 15 minutos después de la formación de la membrana de eclosión, (D) primera división y (E) blastómero.

7.2 Biselado de agujas

En la figura 12 se muestra el montaje del sistema de biselado usando un disco duro (de cómputo) sobre el estereoscopio. A partir de los cortes generados con el biselado, se obtuvo una clara ventaja en la técnica de microinyección embrionaria con un éxito de supervivencia de aproximadamente 5%, inyectando ~ 150 embriones por desove en una ventana de tiempo de inyección aproximada de 20 minutos (antes de la primera división). En cuanto a la facilidad de penetración, el corte logrado así, es bastante fino para una entrada sutil y sin perturbación a la célula.



Figura 12. Montaje del sistema de biselado. Compuesto por un disco magnético de un disco duro energizado a partir de una fuente de poder externa, un estereoscopio y un micromanipulador.

Con las anotaciones realizadas en los ensayos de reblandecimiento de la cubierta embrionaria, se realizaron observaciones para conjuntar el biselado de agujas al reblandecimiento. Esto con el fin de identificar un procedimiento óptimo durante la inyección debido a una mayor área en la aguja, generada por el biselado. Contrario a lo esperado, la combinación de tratamientos (reblandecimiento de membrana y biselado de aguja) sin embargo no facilitó la penetración de la aguja durante la microinyección debido al bloqueo causado por la cubierta gelatinosa expuesta.

7.3 Microinyección y análisis de fenotipos observados

Una de las principales desventajas de la microinyección es el bajo rendimiento y el proceso de naturaleza tediosa en algunas especies ya que la inyección se realiza en células individuales; sin embargo, con la implementación del biselado de las agujas se logró obtener supervivencias de entre 1 y 5%. Entre estas supervivencias, en un muy bajo porcentaje (~ 5%) se obtuvieron fenotipos morfológicamente esperados por el uso de la sonda *Ubx* para inducir mutaciones, es decir, morfológicamente diferentes por el truncamiento de un gen responsable del desarrollo de segmentos del cuerpo del camarón.

Se evaluaron diversas metodologías de fijación de nauplios para un análisis visual más delicado, como por ejemplo formaldehído 4%. Sin embargo, los nauplios pierden su morfología externa y difícilmente se puede trabajar con el ADN. Los nauplios fueron también observados en un montaje con glicerina, pero la cutícula se adelgazaba demasiado, por otro lado, las fijaciones con etanol ocasionaban la precipitación de sales, lo que hacía ensuciar la muestra para la fotografía. Finalmente se optó por la toma de imágenes sin fijación o a bajas concentraciones de etanol (~15%).

En la figura 13 se muestra un conjunto de fotografías en el plano dorsal de nauplios con fenotipo esperado en etapa de desarrollo 3 y 4; claramente los fenotipos varían entre individuos, todos comparados con un control (a) (sin inyección). En la imagen 13b, se observa el nauplio "I7" con inyección de un mix "Pvan_dsODN" el cual presenta la fusión del apéndice superior derecho o primera antena con la segunda antena bi-ramificada. La imagen 13c muestra el organismo "29N1" en un plano dorsal, sin embargo no se observó en ningún momento en el plano ventral los cuatro pares de espinas (resultados no mostrados); se observa un tórax alargado y seis pares de apéndices, es decir, un par adicional, aparentemente el individuo no cuenta con el par anterior de apéndices (primer antena) dado que el resto de apéndices son bi-ramificados (segunda antena y mandibular); la zona del abdomen se observa reducida y ovalada y no cuenta con espinas caudales; en dicho individuo se realizó una coinyección de sondas. El nauplio "18N1" de la

imagen 13d, inyectado con el mix de coinyección, mostró una ausencia total del tercer par de apéndices o par mandibular del costado derecho, a su vez, la región abdominal se observa irregularmente ensanchada, sin espinas caudales y el vitelo pobremente distribuido; en la primera antena izquierda se observa un adelgazamiento distal, sin embargo podríamos atribuirlo a un daño ocasionado por deficiencia de nado. Finalmente, en la imagen 13e, podemos observar el nauplio "19" inyectado con el mix "Pvan_dsODN", con la ausencia parcial del segundo par de apéndice derecho o segunda antena bi-ramificada.

Como se mencionó anteriormente, a partir de las microinyecciones generadas con el mix de coinyección se obtuvieron algunos fenotipos significativos. Estos individuos fueron evaluados para posibles mutaciones a través de PCR y secuenciación; cabe mencionar que adicionalmente a los anteriores individuos se genotipificó un embrión cuyas características morfológicas resaltaron su selección, aunque fue imposible la obtención de una imagen. La descripción morfológica fue semejante al individuo "29N1" (Figura 13c), es decir, con un gran número de apéndices amorfos, en cambio este embrión (etiquetado "29E2") no eclosionó por completo, encontrado únicamente la región abdominal fuera del corión de forma redondeada y sin espinas caudales.



Figura 13. Nauplios de fenotipo esperado. a) control sin inyección. b) nauplio “17” inyectado con el mix “Pvan_dsODN”. c) nauplio “29N1” con inyección del mix de coinyección. d) “18N1” inyectado con el mix de coinyección. e) nauplio “19” inyectado con el mix “Pvan_dsODN”.

El análisis tanto de fenotipos como de genotipos fue realizado en individuos supervivientes y muertos, estos últimos por la posibilidad de un truncamiento deletéreo deteniendo el desarrollo. En la figura 14 se observa un par de imágenes de embriones inyectados con la guía *Ubx*; aparentemente estos embriones no sufrieron daño físico o pérdida de material celular, sin embargo no siguieron su desarrollo. Estos son ejemplo de los embriones seleccionados como posibles mutantes muertos y llevados para su genotipificación.

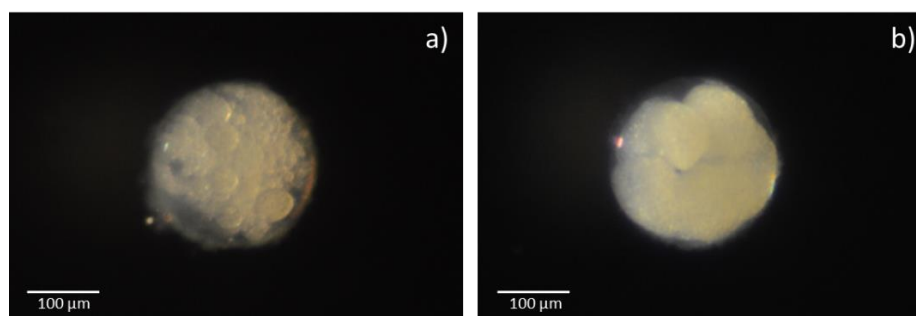


Figura 14. Embriones inyectados y en arresto de su desarrollo.

7.3.1 Extracción de ADN genómico

Para la evaluación de los genotipos resultantes, se evaluaron algunas metodologías de extracción de ADN genómico. Entre ellas, lisis alcalina y enzimática. Los embriones o nauplios fueron fijados en etanol al 80% y posteriormente separados individualmente en tubos de 200 µL. En un primer lugar se realizó una extracción de tipo lisis alcalina que consistió en una incubación con NaOH por 10 minutos a 100°C y posteriormente una reacción de amortiguamiento con Tris HCl (90); con esta primera extracción, al realizar una electroforesis de ADN, se observaron bandas muy tenues por lo que realizaron algunas adecuaciones en los volúmenes de soluciones amortiguadoras en la extracción del ADN (20 µl Tris HCL 100mM pH 8). Se adoptó el uso de esta metodología como “Protocolo de extracción #2”; posteriormente debido a restricciones del uso del laboratorio (por la pandemia COVID-19), las muestras de ADN extraídas tuvieron que ser almacenadas a -20°C durante un par de meses. Finalmente, al hacer uso de estas muestras nuevamente, las amplificaciones mediante PCR fueron ineficientes, no se observaron amplificaciones o bandas visibles en geles de agarosa.

Como metodología alternativa de extracción de ADN se optó por un enriquecimiento de ADN a través de una amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) mediante el kit REPLI-g® Single Cell de QIAGEN (Hilden, Alemania). Este enriquecimiento consiste en una lisis y desnaturalización alcalina en presencia de buffers con formulación propia del fabricante, y una posterior amplificación isotérmica a 65°C mediante dos componentes,

hexámeros aleatorios y la ADN-polimerasa $\Phi 29$. El Kit REPLI-g® Single Cell provee dos protocolos: el primero, es la amplificación a partir del ADN genómico de células individuales, y el segundo es a partir de ADN purificado. Se realizó la amplificación por PCR de *Ubx* con parámetros conocidos (materiales y métodos) a partir de diferentes metodologías de extracción de ADN. En el primer carril de la figura 15 se observa la metodología propuesta por Samarut *et al.* en 2016 (90); en el carril número dos, se realizó una extracción con el protocolo modificado de Samarut *et al.* en 2016 (“Protocolo de extracción 2”), y en el tercer carril, se siguió una extracción mediante REPLI-g®. Tanto la metodología de extracción por lisis alcalina como la de replicación de ADN fueron exitosos, sin embargo, podemos observar bandas de mayor intensidad en el carril 2 y 3 (Figura 15).

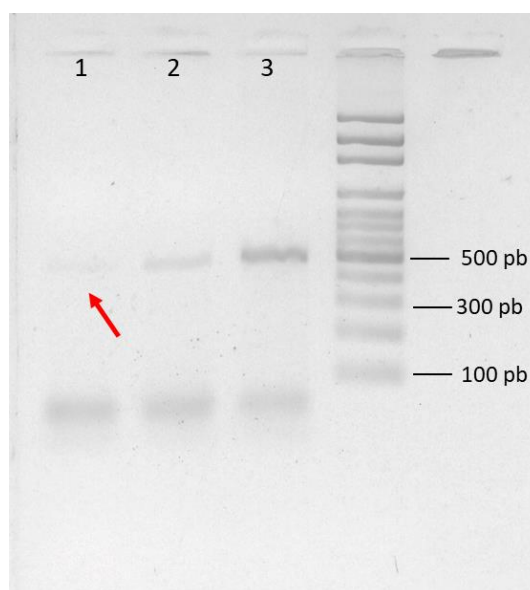


Figura 15. Electroforesis en agarosa 2% para comparar metodologías de extracciones de ADN. En el carril 1 el protocolo originalmente propuesto por Samarut *et al.* en 2016. Carril 2, el modificado de Samarut *et al.*, “protocolo de extracción 2”, y carril 3, extracción mediante kit REPLI-g. La flecha roja señala una banda muy tenue de 490 pb en el carril 1.

Como se mencionó anteriormente, el kit REPLI-g® Single Cell, cuenta con dos protocolos de amplificación. Al realizar dicho enriquecimiento de ADN a partir del ADN purificado en

las muestras “dañadas”, fue imposible recuperarlo dado que el ADN ya se encontraba muy fragmentado (Resultados no mostrados).

Finalmente se optó por una metodología de extracción de tipo enzimática (91). En la figura 16 se muestran amplificaciones de *Ubx* en un gel de agarosa a partir de cuatro extracciones analizadas por triplicado, tres de ellas de tipo enzimática (proteinasasa K) y la última, se utilizó el “Protocolo de extracción 2” mencionado arriba. Las concentraciones se muestran en la tabla 5.

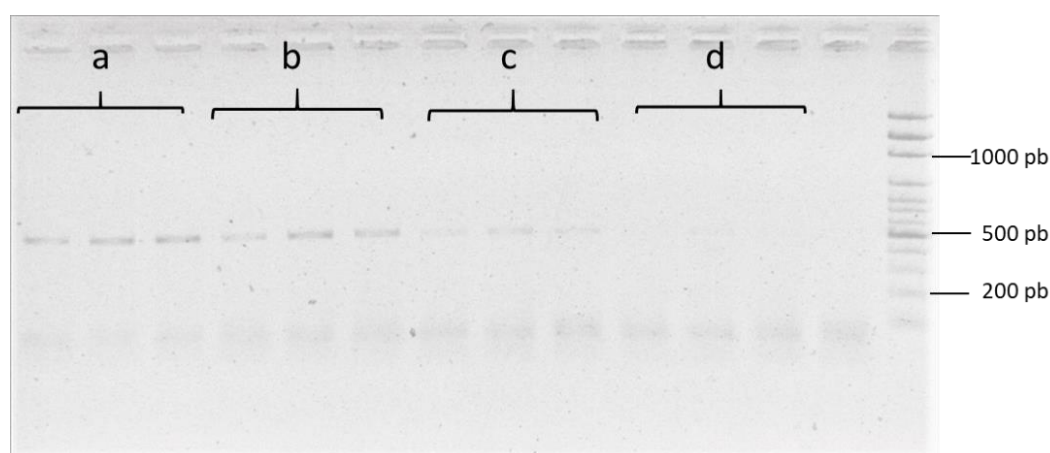


Figura 16. Estandarización de metodología de extracción de ADN de tipo enzimática. Las concentraciones evaluadas se presentan en la tabla siguiente (a, b, c, d).

Tabla 5. Concentraciones evaluadas para la estandarización de la metodología de extracción enzimática.

Extracción	Concentración de proteinasa K
a	1 uL (20 mg/mL) en 20 uL TE
b	1 uL (20 mg/mL) en 50 uL TE
c	1 uL (200 mg/mL) en 50 uL TE
d	NaOH 50 mM, Tris HCL 100mM

7.3.2 Genotipificación por PCR

La genotipificación mediante amplificación por PCR se realizó en aquellos organismos inyectados con la mezcla “Pvan_dsODN”, “Pvan_ssODN”, coinyección y controles. En la figura 17 se muestran el producto de la amplificación de tres organismos, I4, y I5 inyectados con la mezcla “Pvan_dsODN” y el control C7. En los carriles FR (*Forward* y *Reverse*) se realizó una amplificación con los primers flanqueantes, “ubx_e1_2F” y “ubx_e1_2R”, y podemos observar productos de 490 pb, en el organismo control (C7) se observa una banda muy tenue. En los carriles FM (*Forward* y Marcador), la amplificación se realizó a partir de los primers “ubx_e1_2F” y “M1” esperando una banda de 220 pb debido a la incorporación del marcador, es decir, la generación de mutaciones. Dicha banda parece presentarse muy tenue en los individuos I4 e I5. Finalmente, en los carriles RM (*Reverse* y Marcador), se llevó a cabo una amplificación con los primers “ubx_e1_2R” y “M1”, observando una banda aproximada a la esperada de 338 pb por la incorporación del marcador, en los individuos I4 e I5.

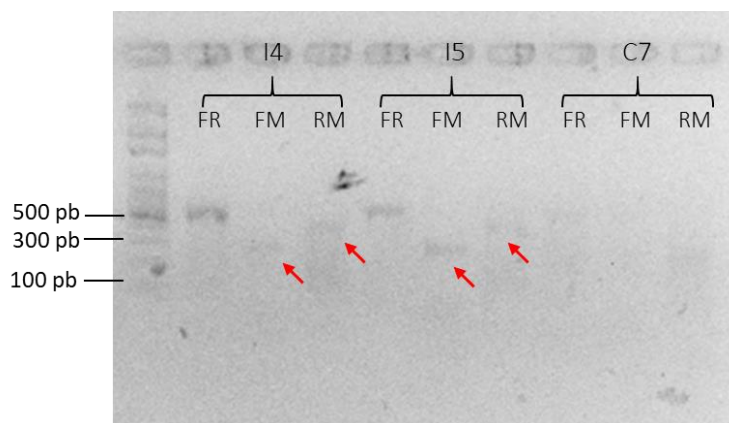


Figura 17. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers. Análisis de mutaciones en organismos inyectados con el mix “Pvan_dsODN”. Las flechas rojas señalan bandas muy tenues de tamaños esperados; ~220 para la combinación FM y ~330 para la combinación RM.

En el siguiente gel (Figura 18) se observa el resultado de las amplificaciones en el mismo orden para individuos inyectados con el mix “Pvan_dsODN” (I7, I8, I9 e I10) y CS1 como control; en este caso no se obtuvieron bandas de valor esperado como resultado de una

mutación por la incorporación del marcador, en los carriles “FM” y “RM”, sin embargo, se observó la presencia de amplificaciones inespecíficas, tal es el caso del individuo I9 para el carril “FR” y el control CS1 en los tres carriles (óvalos rojos).

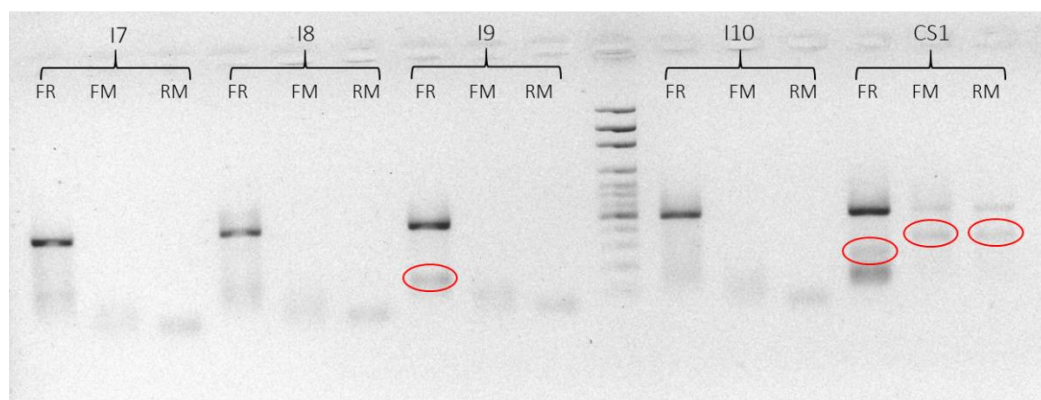


Figura 18. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers. Análisis de mutaciones en organismos inyectados con el mix “Pvan_dsODN”. Los óvalos rojos indican amplicones inespecíficos.

En los embriones no desarrollados que fueron inyectados con el mix “Pvan_dsODN” se observaron bandas no específicas de tamaños variables (> 500 pb) principalmente en los carriles “FM”, sin embargo estas bandas también estuvieron presentes en el individuo control (organismo no inyectado) (Anexo A). Por otro lado, los individuos inyectados a partir del mix “Pvan_ssODN” fueron genotipificados siguiendo la misma metodología, pero no se observaron bandas del valor esperado (Anexo B).

Finalmente para los organismos inyectados con la mezcla de co-inyección, se evaluaron principalmente aquellos seleccionados morfológicamente (29N1, 29E2 Y 18N1). En este caso fueron utilizados los primers Lv_UBX_3_F y Lv_UBX_3_R y Lv_UBX_4_F y Lv_UBX_3_R que amplifican una región de aproximadamente 850 pb para obtener amplicones flanqueantes a la región de corte de mayor tamaño. Para el organismo “18N1” no se observaron amplificaciones de tamaños esperados a partir de la combinación estratégica de primers. En la figura 19 se presenta un gel de agarosa en el que se observan las amplificaciones obtenidas con los primers flanqueantes (*Forward* y *Reverse*) de los tres

pares de primers (ubx_e1_2, Lv_UBX_3 y Lv_UBX_4) en los organismos “29N1”, “29E2” y un nauplio control (sin inyección). Podemos observar bandas muy tenues señaladas con flechas rojas en el organismo “29N1” que indica la amplificación correcta del producto, aunque se presentan una serie de bandas de tamaño inespecífico. Por otro lado, para el organismo “29E2” no se observan las bandas de 490 y 850 pb esperadas, empero se presenta el conjunto de bandas de tamaño inespecífico para los primers Lv_UBX_3 y Lv_UBX_4.

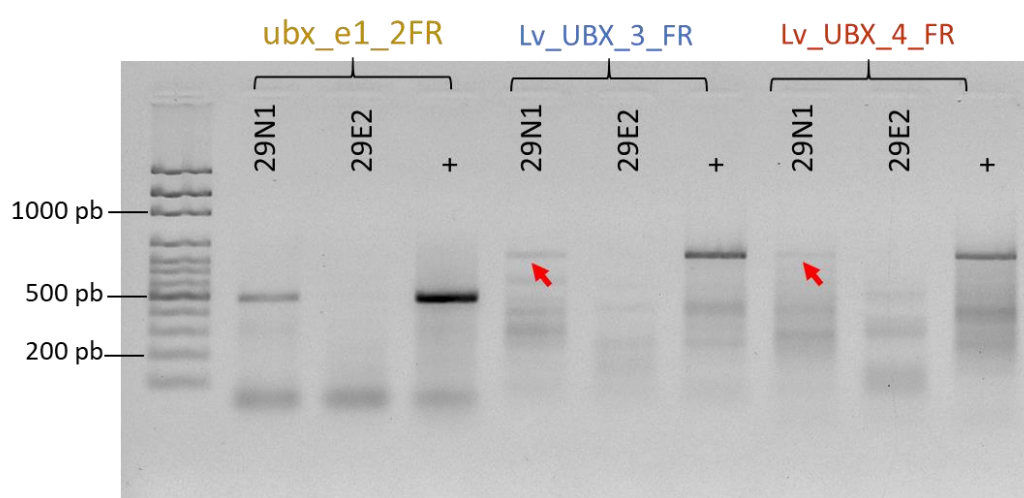


Figura 19. Gel de agarosa al 2% con productos de amplificación por PCR. Amplificaciones con primers flanqueantes de los organismos “29N1” y “29E2”. Las flechas rojas señalan bandas tenues de 850 pb.

Posteriormente se pasó a la genotipificación de las muestras mediante la combinación estratégica de los primers; en este caso al trabajar con los primers Lv_UBX_3 y Lv_UBX_4 los tamaños esperados por la incorporación del marcador eran diferentes a la etapa 1 dado el tamaño de los amplicones, es decir, para las combinaciones forward y marcador los fragmentos esperados son entre 620 y 680 pb, y para las combinaciones reverse y marcador, entre 250 y 300 pb (Tabla 6). Iniciando con reacciones de amplificación por combinación de primers utilizando el par de oligos Lv_UBX_3, en el gel de la figura 20, para el organismo “29N1” se observa que para la combinación “FM” (*Forward* y Marcador) hay una banda muy intensa en las amplificaciones de aproximadamente 400 pb, así como

para el organismo “29E2” se observan una serie de bandas de diversos tamaños en la combinación “RM”.

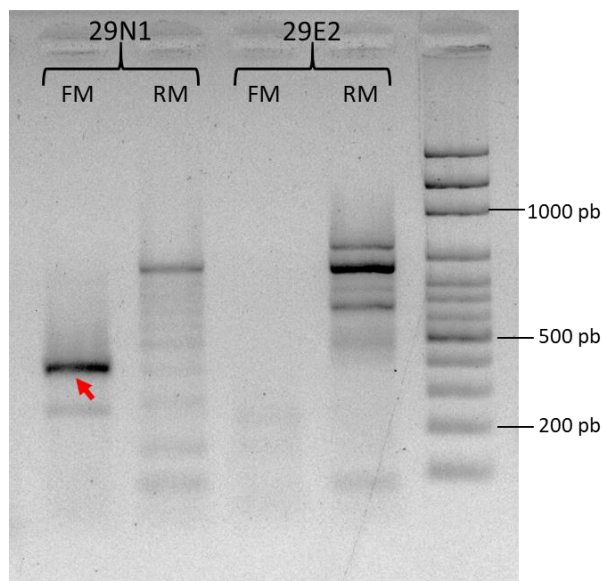


Figura 20. Genotipificación por PCR mediante combinación estratégica de primers (Lv_UBX_3). Análisis de mutaciones en organismos inyectados con el mix “coinyección”. La flecha roja señala una banda intensa de 400 pb.

Tabla 6. Tamaño de fragmentos esperados por combinación de primers

HDR	
Lv_UBX_3_F + M	618 pb
Lv_UBX_4_F + M	679 pb
NHEJ	
Lv_UBX_3_F + M	618 pb
Lv_UBX_4_F + M	679 pb
Lv_UBX_3_R + M	300 pb
Lv_UBX_4_R + M	245 pb

Por otro lado, en reacciones de combinaciones de primers utilizando los oligos Lv_UBX_4 se obtuvieron bandas de interés dada su intensidad y por tener el tamaño esperado; esto es, para el organismo "29N1" en la combinación "RM", se observó una banda de tamaño aproximado de 280 pb, y para el organismo "29E2" también en la combinación "RM", una banda de aproximadamente 250 pb (Figura 21).

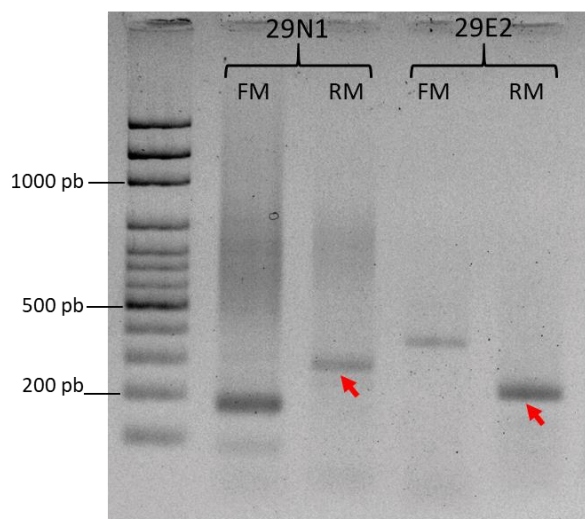


Figura 21. Genotipificación por amplificación por PCR mediante combinación estratégica de primers (Lv_UBX_4). Análisis de mutaciones en organismos inyectados con el mix "coinyección". Las flechas rojas señalan bandas intensas de ~250 y 280 pb de tamaño esperado ante una combinación de primers RM.

7.3.3 Confirmación de potenciales mutantes mediante secuenciación capilar

Una vez obtenidas las secuencias se analizaron mediante alineamiento local por homología con la secuencia nucleotídica aislada de *Ubx* (757255-599209) encontrada en la base de datos de GenBank, se utilizó el software CodonCode Aligner (<https://www.codoncode.com/>). Una vez alineadas las secuencias, no se encontraron cambios nucleotídicos.

8. DISCUSIÓN

Actualmente para *P. vannamei*, el o los mecanismos de reparación del ADN ante una ruptura de doble cadena son desconocidos, por ello se planteó la evaluación de dichos mecanismos generados a través de CRISPR/Cas9. Adicionalmente, el contar con la estandarización de una metodología para la entrega de estos sistemas de edición fue un tema primordial. Durante el desarrollo de este trabajo, uno de los principales retos fue la implementación de la microinyección en esta especie de camarón blanco debido a la suma de muchos factores afectando el resultado, desde el tamaño y dureza del huevo, su transparencia, el desarrollo embrionario, así como daño físico a la célula que supone la propia metodología.

Uno de los principales factores a evaluar dada la dureza de la cubierta embrionaria o membrana de eclosión de los embriones de *Penaeus vannamei* fue de cómo lograr el reblandecimiento de esta.

La membrana de eclosión es formada durante la embriogénesis, cuando ocurren cambios tanto morfológicos como moleculares en el cigoto después de la fertilización, e inicia a partir del proceso de activación del huevo con la entrada del espermatozoides y el contacto con el agua marina. La activación del huevo a su vez consiste en un cambio de potencial de membrana, un incremento intracelular en la concentración de Ca^{2+} y la fusión de pronúcleos (92,93). En *P. monodon*, esta activación también es desencadenada por los iones de magnesio presentes en el agua marina, lo que sugiere un mecanismo en común entre los *Dendobranchiata* (94,95)

A nivel de eventos específicos, se ha observado que cuando el ovocito es liberado este está rodeado de una envoltura de vitelina y cuenta con criptas corticales extracelulares (96) que en penéidos contienen una sustancia gelatinosa o precursor *Jelly*. Al tener contacto con el agua, la delgada capa de vitelina se pierde y las criptas reducen su tamaño, lo que ocasiona la liberación del precursor *Jelly* y la formación de una capa gelatinosa o *Jelly layer* (86). Posteriormente dos grupos de vesículas corticales migran a la

periferia y su contenido es expulsado vía exocitosis para la formación de una membrana en la superficie celular: la membrana de eclosión, que funciona como una barrera física para evitar la polispermia y brindar protección al embrión durante su desarrollo temprano (Figura 22) (92,97).

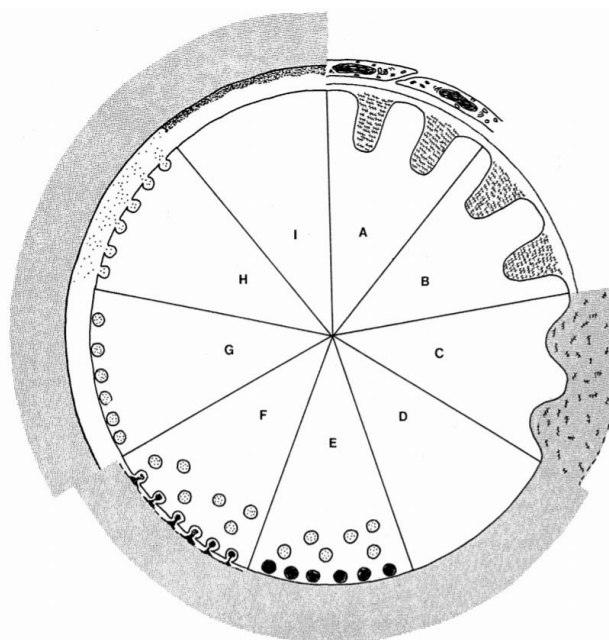


Figura 22. Reacción cortical en ovocitos. (Tomado de (92)). A) ovocito previo a la activación, sin vesículas corticales en el citoplasma. B) el ovocito está rodeado por una delgada capa de vitelina y criptas corticales previo a la activación. C) las criptas corticales reducen su tamaño al contacto con el agua marina y la capa de vitelina se pierde, dejando salir el contenido de las criptas (precursor *Jelly*). D) las criptas desaparecen y su contenido rodea el huevo formando una membrana gelatinosa. E) aparecen dos grupos de vesículas corticales migrando hacia la periferia. F) el primer grupo de vesículas densas sale mediante exocitosis. G) un segundo grupo de vesículas migra H) y es excretada vía exocitosis nuevamente. I) La fusión entre el contenido de ambas vesículas forma la membrana de fertilización o membrana de eclosión.

Durante las observaciones iniciales del presente trabajo para el reblandecimiento de la cubierta embrionaria, se estimó en primera instancia el tiempo para la colecta de los embriones después del desove. Esto debido a que al no contar con dicha membrana de protección justo después del desove estos pasaban por el tamiz. Se encontró que transcurridos alrededor de 13 – 17 minutos después del desove, la membrana es formada

y los embriones podían ser recolectados. El tiempo transcurrido encontrado en el presente es el mismo reportado por algunos autores; para *P. vannamei*, esta membrana de eclosión es completamente formada alrededor de 13 – 15 minutos después del desove, consiguiendo un diámetro del huevo aproximado de 230 μm (60,81).

Otro de los factores a evaluar fue la mejora en la microinyección cuando se elimina la membrana de eclosión debido a su dureza y un taponamiento de la aguja de microinyección. Para este fin se utilizó el 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT o ATA), el cual es un compuesto orgánico heterocíclico comúnmente utilizado como herbicida que funciona como inhibidor de la peroxidasa. Esta enzima es la encargada de la formación de enlaces di- y tri-tirosina, responsables a su vez del endurecimiento del huevo (ovoperoxidasa). A pesar de que en otros trabajos (57,59,60,86–88) se ha reportado el uso exitoso de un reactivo químico como tratamiento previo a la microinyección embrionaria en invertebrados para la eliminación de la membrana de eclosión sin causar daño a la capa hialina ni a la vitelina y así lograr una penetración de la aguja fácilmente, eso no se observó en el presente trabajo, ya que el bloqueo de la aguja ocurrió con material celular a pesar de probar el incremento de presión de mantenimiento (*holding pressure*) configurada en el sistema de microinyección. A pesar del bloqueo o taponamiento de las agujas, la remoción de la membrana de eclosión fue exitosa a la concentración de 1 mM de ATA, misma reportada por (57,60,86,98) a un tiempo propuesto de 5 minutos, tiempo mínimo evaluado en el presente estudio. Aunque la eliminación química o esta remoción de la membrana de eclosión no fue la adecuada para los objetivos de la microinyección en el presente trabajo, podría ser relevante su implementación para otros fines, tales como la electroporación o el estudio de blastómeros individuales.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de reblandecimiento de la membrana de eclosión, los esfuerzos para facilitar la microinyección pasaron posteriormente a los capilares de vidrio, ya que estas son un componente clave de la técnica. De forma general, el biselado de capilares le brinda una forma ideal a la punta

para atravesar la barrera de protección del embrión. Para este fin, en 2006 Canfield propone una metodología de biselado para capilares de borosilicato de 1.5 mm OD con resultados exitosos en inyecciones a las células Mauthner en tejidos de peces (89), En el presente trabajo el biselado de los capilares llevó a aumentar la finura de la lija esperando cortes más delicados. Definitivamente esta metodología empleada es de fácil uso y bajo costo comparada con sistemas o servicios comerciales. Un aspecto importante para usar óptimamente esta metodología es la experiencia adquirida por el técnico operante tanto en el biselado de los capilares como en el uso del micromanipulador, ya que es necesario un corte bastante fino para una microinyección exitosa y un movimiento brusco de las manos al llevar la aguja al eje del disco puede fracturar la punta. Así mismo, una punta muy corta puede resultar difícil de abrir con una pinza o biselado generando un diámetro muy grande y dañando el embrión durante la inyección, y una punta demasiado larga se dobla haciendo imposible penetrar el corion. Finalmente, las micropipetas deben ser construidas el mismo día de la inyección idealmente ya que de otra forma recurrentemente observamos obstrucciones cristalinas que impiden una microinyección exitosa.

Todos los ensayos anteriores se realizaron con el fin de optimizar la microinyección de los embriones para la inducción de mutaciones. La microinyección puede clasificarse con un enfoque de disrupción membranal por penetración directa, por lo que en estas estrategias de entrega, la célula debe responder rápidamente a la reparación de dicha disrupción membranal (o inclusive de otras estructuras subcelulares). En una primera respuesta, la célula hace un “llamado” para realizar una reparación membranal, que puede ser desencadenado por una diferencia de concentración de calcio afuera y adentro; una vez atendido este llamado, una segunda respuesta celular ocurre al compensar la homeostasis de la conformación membranal y contenido intracelular (51,99). Durante nuestro trabajo, la microinyección arrojó una supervivencia aproximada del 5%, mismo porcentaje reportado en 2005 en *P. vannamei* para la transfección de un vector de expresión que codifica la proteína de la cubierta del virus del síndrome de Taura (TSV-CP) ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$); la

microinyección fue realizada con un tratamiento previo de ATA 1mM durante el estadio de una célula, posteriormente los embriones se colocaron en aireación a 28°C y 0.15 ppm de penicilina y estreptomina (60). Este bajo porcentaje de eclosión puede ser atribuido a muchos factores, entre los que en gran parte destaca el daño físico a la membrana de eclosión de los embriones inyectados, así como una disrupción a la membrana plasmática. El orificio generado por la microinyección es grande, y aunque este puede ser reparado rápidamente por la inmediata señal de un flujo de concentraciones diferencial, es posible que también ocurra una pérdida significativa de material celular, que, si bien no mata a la célula inmediatamente, puede verse afectado el desarrollo embrionario, deteniéndose. Se ha observado que las células dañadas se encontraban con niveles elevados de algunos iones como Na^+ , Cl^- y Ca_2^+ y la disminución de K^+ , ATP, aminoácidos, proteínas y algunos otros componentes intracelulares; sin embargo, suponiendo que ocurra una corrección membranal, la célula puede aún sufrir muerte celular por la alteración y no retorno de la homeostasis celular(51). Del mismo modo que Sun y colaboradores reportan en su trabajo (60), los porcentajes de eclosión fueron muy bajos comparados con la tasa de eclosión del cultivo de camarón comercial. En este caso con FITMAR en condiciones favorables (temperatura, salinidad, contaminación, fertilización, edad y madurez de la hembra, copula, etc.), la tasa de eclosión oscila entre 70 y 90%. A diferencia del trabajo de Su y colaboradores, la eclosión y desarrollo de *P. vannamei* fue evaluado únicamente a nauplio, tiempo suficiente para considerar las muertes por el estrés técnico. En trabajos con *P. japonicus* clasifican a la microinyección como una técnica eficaz pero demandante de tiempo para la introducción de ADN en embriones comparada con metodologías como la electroporación y biobalística (59). Esta metodología fue considerada para este trabajo ya que existen distintos puntos para reflexionar antes de su aplicación, tales como, el tamaño, dureza y transparencia del embrión, fertilización, tiempo de inicio de desarrollo embrionario, daño físico por penetración directa, tamaño de gota, calidad de reproductores, etc. Diversos trabajos, principalmente con disrupción membranal por electroporación (51,100,101), han enfocado su atención en el medio extracelular para

promover una exitosa reparación membranal. En futuros ensayos será importante evaluar la suplementación futura del agua marina con Mg^{2+} , ATP, antioxidantes y glucosa compensando así la pérdida de dichos elementos por consecuencia del orificio de la microinyección, fomentando con esto el regreso al estado de pre-perturbación u homeostasis.

Finalmente, el objetivo principal de este trabajo fue inducir mutaciones utilizando la metodología de CRISPR/Cas9, y validarlas a través de la genotipificación de embriones. La metodología de genotipificación mediante PCR a partir de la combinación estratégica de primers es una técnica bastante sencilla con el diseño de sondas adecuado. Sin embargo, durante el uso de la metodología propuesta por Du (40) nos topamos con muchas amplificaciones no específicas y un efecto “escalera” del que Hommelsheim plantea un modelo, proponiendo que esto resulta debido a la amplificación por PCR de secuencias repetitivas del ADN(102,103). Este modelo consiste en un desacople de la polimerasa al encontrar estructuras en forma de horquillas, que resulta en fragmentos de menor tamaño y que a su vez, ciclo con ciclo funcionan como “mega-primers”. Los geles presentados anteriormente en los resultados mostraron bandas de intensidad considerable y de tamaños esperados para inferir que ocurrió una reparación del ADN por NHEJ, por lo que resultaría difícil considerar mecanismos de *off-target* dado que las combinaciones de primers se realizaron en previas amplificaciones con primers flanqueantes. Sin embargo la secuenciación mediante electroforesis capilar no indicó la incorporación del marcador esperado. Por lo que el modelo propuesto por Du se ajusta a nuestros resultados en cuanto a las amplificaciones en forma “escalera”.

Por otro lado se ha reportado que el tiempo de disociación del complejo Cas9/dsDNA puede llegar a ser muy lento (~6 horas) (104,105), mucho más largo que en condiciones in vitro (106), esto sugiere una unión muy estable que podría bloquear el paso a los componentes de reparación al rompimiento de doble cadena (DSB), reduciendo entonces la eficiencia de edición. En mamíferos se sabe que esta fuerte asociación puede ser

eliminada eficientemente a través de una unión transitoria con ARN polimerasa, siempre y cuando esta vaya en dirección hacia el complejo, es decir, en dirección 5' – 3' (105). Lo anterior indica la importancia en el diseño de las sondas sgRNA, ya que en nuestro trabajo la sonda guía que se diseñó se encuentra dirigida a la hebra retrasada o antisentido por lo que la dirección de polimerización es la contraria. En bacterias se han localizado regiones de sesgo GC en la hebra molde o sentido provenientes de bacteriófagos atacantes, lo que inclina la balanza a una preferencia de hibridación en esta cadena (105,107), y si bien en *P. vannamei* no se tiene reportado este tipo de sesgos, resulta interesante reconsiderar el diseño en la hebra sentido. Cabe recordar que el elevado porcentaje de secuencias repetitivas nos imposibilitó seguir trabajando con la sonda *ubx_e1_s1*, una sonda dirigida a la cadena sentido.

A lo largo de la realización de la microinyección se obtuvieron organismos fenotípicamente esperados debido a la disrupción del gen *Ubx* mediante CRISPR/Cas9 sin embargo a partir de los análisis de secuenciación realizados no se observaron mutaciones en los amplicones. Es posible que los fenotipos fueran obtenidos a partir de una ablación celular, resultado de la penetración directa de la microinyección. En *P. vannamei*, al igual que *S. ingentis* presenta un patrón de escisión temprano (81,87), sugiriendo un desarrollo mosaico, por lo que al ablacionar un blastómero o blastómeros tempranamente comprometidos este no puede ser sustituido y es probable que su campo morfogénico se vea afectado generando gradientes de morfógenos anormales, lo que podría conducir a un desarrollo amorfo.

La diferenciación de los distintos tipos de células especializadas en los organismos no ocurre rápidamente, existe todo un proceso que resulta en un compromiso celular y este desarrollo se divide en dos, la especificación, en donde el compromiso celular aún puede ser reversible y la determinación, cuando las células son capaces de diferenciarse incluso en otra región del embrión. En algunos animales la especificación de cierto tejido actúa sobre una “base” preestablecida por eventos de escisión temprana, este tipo de desarrollo

se conoce como desarrollo mosaico, donde una célula solo se desarrolla de forma independiente, y si una célula con este tipo de desarrollo es ablacionada, esta no puede remplazarse dentro del embrión en desarrollo. Por otro lado, un desarrollo regulativo ocurre cuando en la interacción entre células vecinas la especificación restringe dicho linaje celular, es decir, el destino celular dependerá de las condiciones en las que se encuentre (108). Algunos estudios de linaje celular en crustáceos malacostracanos con escisión holoblástica o completa (87,109,110), demuestran que desde las primeras etapas de división los linajes celulares ya se encuentran comprometidos a la capa germinal, sin embargo entre los crustáceos no está claro si esta restricción del linaje temprano es debido al desarrollo mosaico o existe cierta regulación entre destinos celulares (111) dado que hay evidencia de mezcla ocasional entre linajes celulares (109).

Podemos concluir que la microinyección funciona como una metodología de transporte de material de edición (CRISPR/Cas9) en *P. vannamei* con supervivencias del 3 – 5 %, y de forma general, ser utilizada como metodología de transfección. Nuestro aporte y su implementación posibilitan su aplicación en el área de la ingeniería genética superando retos de internalización por factores como tamaño y dureza del huevo. Ciertamente la exploración de metodologías de genotipificación concedería un panorama amplio a la integración del material genético y en este caso para la comprensión de la reparación del ADN ante un quiebre de doble cadena. Se propone inicialmente el diseño de sondas dirigidas a la cadena sentido, eficientizando así la actividad de edición. El uso de metodologías como el ensayo de endonucleasa T7 o HRM, así como la estandarización de la amplificación por PCR cuando se trata de secuencias ricas en regiones repetitivas. Incluso la inspección de sistemas alternativos de transporte como la electroporación o la entrega mediada por receptores de membranales son proyecciones que se tienen.

Penaeus vannamei es una de las especies de mayor importancia comercial en México y ya que son muchas las razones que han despertado el interés de la aplicación de tecnologías de mejoramiento y edición génica; el conocimiento morfológico, así como el estudio a

fondo de blastómeros individuales, la comprensión de la determinación y diferenciación sexual son ejemplos de la importancia aplicada a un alcance acuícola.

9. CONCLUSIONES

Existen diversos factores a considerar durante todo el proceso, entre ellos está, la experiencia del operador de microinyección, el porcentaje de eclosión de los embriones en condiciones normales, las cuales pueden verse afectadas por la temperatura del agua durante el desove y desarrollo embrionario, la contaminación, así como la edad y alimentación de las hembras desovadoras aunado al daño físico que sufre el embrión debido a la penetración de la aguja.

Algunos procedimientos para el estudio o manipulación del embrión requieren la eliminación de la membrana de fertilización sin causar daño al desarrollo embrionario. Un ejemplo de este y siguiendo la misma línea de investigación es la electroporación. La electroporación es una técnica bastante usada y destinada a la entrega de cargos grandes como RNP que, debido a sus propiedades de carga negativa, facilita su administración en la célula. La eliminación de la membrana de fertilización podría resultar en la entrada facilitada del cargo sin causar daño al desarrollo embrionario.

El principal objetivo del uso de la sonda *Hox* fue la inducción de fenotipos importantes en las primeras etapas de desarrollo del camarón por lo que continuar con el establecimiento de una metodología para un análisis visual sin dañar los tejidos y el material genético es de interés.

Se logró establecer la metodología de microinyección en embriones del camarón blanco *Penaeus vannamei*, alcanzando una supervivencia similar a la anteriormente reportada del 3 - 5%. Adicionalmente se implementó el uso de un sistema de biselado construido en el laboratorio a partir del cual se logró un mayor éxito de inyección. Así mismo se logró la estandarización de una metodología de extracción de ADN genómico para organismos que van de 230 μm a 360 μm aproximadamente.

Los resultados arrojados durante la genotipificación por PCR a partir de la combinación estratégica de primers revelaron bandas de tamaños variables, algunas de ellas de

tamaños esperados, sin embargo, al realizar una segunda genotipificación mediante secuenciación, no se observaron mutaciones o cambios nucleotídicos. Las bandas en los geles presentados podrían ser amplicones inespecíficos, consecuencia de la amplificación por PCR de secuencias con un alto porcentaje de secuencias repetitivas.

10. LITERATURA CITADA

1. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome; 2020.
2. CONAPESCA. Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca 2018. Com Nac Acuicultura y Pesca. 2018;293.
3. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakamura A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429–33.
4. Mojica, F. J.M., Díez-Villaseñor., C., Soria, E., Juez. *MicroCorrespondence.* 2000;36:244–6.
5. Mojica FJM, Juez G, Rodríguez-Valera F. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol Microbiol.* 1993;9(3):613–21.
6. Jansen R, Van Embden JDA, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 2002;43(6):1565–75.
7. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* 2005;151(8):2551–61.
8. Mojica FJM, Díez-Villaseñor C, García-Martínez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174–82.
9. Barrangou R, Boyaval P, Moineau S, Romero D a, Horvath P. Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-).* 2007;315(March):1709–12.
10. BrounsRutering J, Ilmer M, Recio A, Coleman M, Vykoukal J, Alt E, et al. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science (80-).* 2008;5(6):1–8.
11. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (80-).*

- 2012;337(6096):816–21.
12. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Hsu PD, et al. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... Zhang, F. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science (New York, N.Y.)*. *Science*. 2013;339(6121):819–23.
 13. Lino CA, Harper JC, Carney JP, Timlin JA. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv [Internet]*. 2018;25(1):1234–57. Available from: <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1474964>
 14. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011;471(7340):602–7.
 15. Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(1):1–19.
 16. Chatterjee, N., Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. *Physiol Behav*. 2017;58(5):235–63.
 17. Neale MJ, Keeney S. Clarifying the mechanics of DNA strand exchange in meiotic recombination. 2006;442(7099):153–8.
 18. Mcvey M, Lee SE. MMEJ repair of double-strand breaks: deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*. 2008;24(11):529–38.
 19. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J*. 1998;17(18):5497–508.
 20. Peng G, Lin CCJ, Mo W, Dai H, Park YY, Kim SM, et al. Genome-wide transcriptome profiling of homologous recombination DNA repair. *Nat Commun*. 2014;5:1–11.
 21. Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. 2002;40:309–48.

22. Bowater R, Doherty AJ. Making ends meet: Repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining. *PLoS Genet.* 2006;2(2):93–9.
23. Zhang Y, Moqtaderi Z, Rattner BP, Euskirchen G, Snyder M, Kadonaga JT, et al. Intrinsic histone-DNA interactions are not the major determinant of nucleosome positions in vivo. *Physiol Behav.* 2009;16(8):847–52.
24. Maser RS, Monsen KJ, Nelms BE, Petrini JH. hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol.* 1997;17(10):6087–96.
25. Tarfut C Y, Marin M MA. Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN - Main Repair Mechanisms for Damages in the DNA Molecule. *Biosalud.* 2014;13(2):95–110.
26. Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, Koiwai O, et al. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell.* 2004;16(5):701–13.
27. Renaud JB, Boix C, Charpentier M, De Cian A, Cochennec J, Duvernois-Berthet E, et al. Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Rep.* 2016;14(9):2263–72.
28. Stein CA, Subasinghe C, Shinozuka K, Cohen JS. Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(8):3209–21.
29. Simon JR, Moore PD. Homologous recombination between single-stranded DNA and chromosomal genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987;7(7):2329–34.
30. Campbell EI, Unkles SE, Macro JA, van den Hondel C, Contreras R, Kinghorn JR. Improved transformation efficiency of *Aspergillus niger* using the homologous *niaD* gene for nitrate reductase. *Curr Genet.* 1989;16(1):53–6.
31. Auer TO, Del Bene F. CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods* [Internet]. 2014;69(2):142–50. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.03.027>

32. Shao Y, Guan Y, Wang L, Qiu Z, Liu M, Chen Y, et al. CRISPR/Cas-mediated genome editing in the rat via direct injection of one-cell embryos. *Nat Protoc.* 2014;9(10):2493–512.
33. Böttcher R, Hollmann M, Merk K, Nitschko V, Obermaier C, Philippou-Massier J, et al. Efficient chromosomal gene modification with CRISPR/cas9 and PCR-based homologous recombination donors in cultured *Drosophila* cells. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(11).
34. Dicarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(7):4336–43.
35. Holliday R. A mechanism for gene conversion in fungi. *Genet Res.* 1964;5(2):282–304.
36. D’Amours D, Jackson SP. The Mre11 complex: At the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):317–27.
37. Li X, Stith CM, Burgers PM, Heyer WD. PCNA Is Required for Initiation of Recombination-Associated DNA Synthesis by DNA Polymerase δ . *Mol Cell* [Internet]. 2009;36(4):704–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2009.09.036>
38. Decottignies A. Alternative end-joining mechanisms: A historical perspective. *Front Genet.* 2013;4(APR).
39. Srivastava S, Dahal S, Naidu SJ, Anand D, Gopalakrishnan V, Kooloth Valappil R, et al. DNA double-strand break repair in *Penaeus monodon* is predominantly dependent on homologous recombination. *DNA Res.* 2017;24(2):117–28.
40. Du J, Yin N, Xie T, Zheng Y, Xia N, Shang J, et al. Quantitative assessment of HR and NHEJ activities via CRISPR/Cas9-induced oligodeoxynucleotide-mediated DSB repair. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2018;70(June):67–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.09.002>
41. Dupré A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee J-H, Nicolette ML, et al. A

- forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Bone*. 2008;4(2):119–25.
42. Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AYL, et al. A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep*. 2015;5:1–10.
 43. Wang X, Wang Y, Wu X, Wang J, Wang Y, Qiu Z, et al. Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat Biotechnol*. 2015;33(2):175–9.
 44. Roehm PC, Shekarabi M, Wollebo HS, Bellizzi A, He L, Salkind J, et al. Inhibition of HSV-1 Replication by Gene Editing Strategy. *Sci Rep*. 2016;6(October 2015):1–11.
 45. Voets O, Tielen F, Elstak E, Benschop J, Grimbergen M, Stallen J, et al. Highly efficient gene inactivation by adenoviral CRISPR/Cas9 in human primary cells. *PLoS One*. 2017;12(8):1–20.
 46. Sakuma T, Nishikawa A, Kume S, Chayama K, Yamamoto T. Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. *Sci Rep*. 2014;4:4–9.
 47. Sun W, Ji W, Hall JM, Hu Q, Wang C, Beisel CL, et al. Efficient Delivery of CRISPR-Cas9 for Genome Editing via Self-Assembled DNA Nanoclews ** HHS Public Access. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2015;54(41):12029–33.
 48. Horii T, Arai Y, Yamazaki M, Morita S, Kimura M, Itoh M, et al. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Sci Rep*. 2014;4(2):1–6.
 49. Hashimoto M, Takemoto T. Electroporation enables the efficient mRNA delivery into the mouse zygotes and facilitates CRISPR/Cas9-based genome editing. *Sci Rep*. 2015;5(June):1–3.
 50. Dean DA. Microinjection. *Brenner's Encycl Genet Second Ed*. 2013;409–10.
 51. Stewart MP, Langer R, Jensen KF. Intracellular delivery by membrane disruption: Mechanisms, strategies, and concepts. *Chem Rev*. 2018;118(16):7409–531.

52. Ma Y, Shen B, Zhang X, Lu Y, Chen W, Ma J, et al. Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9. *PLoS One*. 2014;9(3).
53. Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, et al. Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell*. 2014;156(4):836–43.
54. Chuang CK, Chen CH, Huang CL, Su YH, Peng SH, Lin TY, et al. Generation of GGTA1 Mutant Pigs by Direct Pronuclear Microinjection of CRISPR/Cas9 Plasmid Vectors. *Anim Biotechnol* [Internet]. 2017;28(3):174–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/10495398.2016.1246453>
55. Elawad A, Khalil K, Cline D, Page-McCaw P, Chen W, Michel M, et al. Microinjection of CRISPR/cas9 protein into channel catfish, *Ictalurus punctatus*, embryos for gene editing. *J Vis Exp*. 2018;2018(131):1–12.
56. Lin C-Y, Su Y-H. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Dev Biol* [Internet]. 2016 Jan;409(2):420–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160615300907>
57. Yaguchi J. Microinjection methods for sea urchin eggs and blastomeres [Internet]. 1st ed. Vol. 150, Echinoderms. Elsevier Inc.; 2019. 173–188 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.09.013>
58. Rehm EJ, Hannibal RL, Chaw CC, Vargas-Vila MA, Patel NH. Injection of *Parhyale hawaiiensis* blastomeres with fluorescently labeled tracers. *Cold Spring Harb Protoc*. 2009;4(1):1–6.
59. Preston NP, Baule VJ, Leopold R, Henderling J, Atkinson PW, Whyard S. Delivery of DNA to early embryos of the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*. 2000;181(3–4):225–34.
60. Sun PS, Venzon NC, Calderon FRO, Esaki DM. Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Dec 22];243(1–4):19–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848604005575>

61. Yang H, Wang H, Shivalila CS, Cheng AW, Shi L, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* [Internet]. 2013;154(6):1370. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.022>
62. Bateson W. *Materials for the study of variation treated with especial regard to discontinuity in the origin of species*. London: Cambridge University Press; 1894.
63. Pourquie O. *HOX genes*. Vol. 88. Kansas City, MO, USA: Academic Press; 2009. 328 p.
64. Bridges CB, Morgan TH. *The third-chromosome group of mutant characters of Drosophila melanogaster*. Washington: Carnegie Institution of Washington; 1923. 253 p.
65. Hollander WF. Bithorax alleles. *Drosoph Inf Serv*. 1937;7(77).
66. Kaufman TC, Seeger MA, Olsen G. Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of drosophila melanogaster. *Adv Genet*. 1990;27(C):309–62.
67. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature*. 1978;276(5688):565–70.
68. Pavlopoulos A, Akam M. Hox gene Ultrabithorax regulates distinct sets of target genes at successive stages of Drosophila haltere morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2855–60.
69. Akam M. Hox genes and the evolution of diverse body plans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1995;349(1329):313–9.
70. Averof M, Patel NH. Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature*. 1997;388(6643):682–6.
71. Abzhanov A, Kaufman TC. Novel regulation of the homeotic gene Scr associated with a crustacean leg-to-maxilliped appendage transformation. *Development*. 1999;126(6):1121–8.
72. Abzhanov A, Kaufman TC. Crustacean (malacostracan) Hox genes and the evolution

- of the arthropod trunk. *Development*. 2000;127(11):2239–49.
73. Abzhanov A, Kaufman TC. Embryonic expression patterns of the Hox genes of the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea, Decapoda). *Evol Dev*. 2000;2(5):271–83.
 74. Deutsch JS, Mouchel-Vielh E. Hox genes and the crustacean body plan. *BioEssays*. 2003;25(9):878–87.
 75. Martin A, Serano JM, Jarvis E, Bruce HS, Wang J, Ray S, et al. CRISPR/Cas9 Mutagenesis Reveals Versatile Roles of Hox Genes in Crustacean Limb Specification and Evolution. *Curr Biol* [Internet]. 2016;26(1):14–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.021>
 76. Bi HL, Xu J, Tan AJ, Huang YP. CRISPR/Cas9-mediated targeted gene mutagenesis in *Spodoptera litura*. *Insect Sci*. 2016;23(3):469–77.
 77. Liubicich DM, Serano JM, Pavlopoulos A, Kontarakis Z, Protas ME, Kwan E, et al. Knockdown of *Parhyale* *Ultrabithorax* recapitulates evolutionary changes in crustacean appendage morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13892–6.
 78. Dall W, Hill BJ, Rothlisberg PC, Sharples DJ. *the Biology of the Penaeidae*. Vol. 27, *Advances of Marine Biology*. London: Academic Press; 1990. 489 p.
 79. Ruppert EE, Barnes RD. *Invertebrate Zoology* 6th ed. 6th ed. Orlando Florida, USA: Saunders College Division; 1994. 1056 p.
 80. Dugassa H, Gaetan DG. Biology of White Leg Shrimp , *Penaeus vannamei* : Review. *World J Fish Mar Sci*. 2018;10(2):5–17.
 81. Hertzler PL. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* (Malacostraca, Decapoda, Dendrobranchiata). *Arthropod Struct Dev*. 2005;34:455–69.
 82. Kitani H. Larval development of the white shrimp *Penaeus vannamei* BOONE reared in the Laboratory and the statistical observation of its naupliar stages. *Bull Japanese Soc Sci Fish*. 1986;52(7):1131–9.
 83. Zhang X, Yuan J, Sun Y, Li S, Gao Y, Yu Y, et al. Penaeid shrimp genome provides

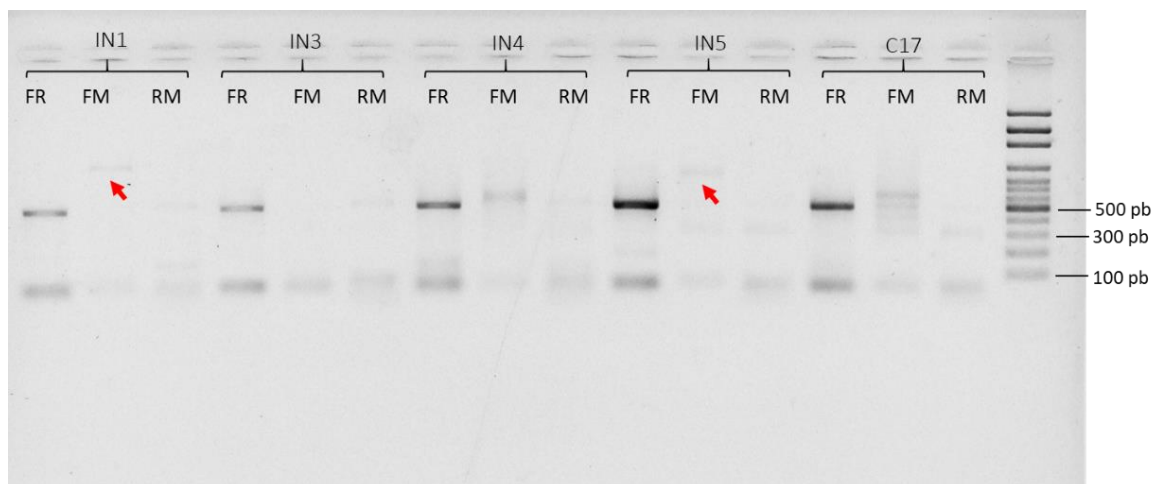
- insights into benthic adaptation and frequent molting. *Nat Commun* [Internet]. 2019;10(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-08197-4>
84. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3 [Internet]. Vol. 35, *Nucleic Acids Research*. 2007. p. 2110. Available from: <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
 85. Concordet JP, Haeussler M. CRISPOR: Intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens [Internet]. Vol. 46, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press; 2018. p. W242–5. Available from: <http://crispor.tefor.net/>
 86. Showman RM, Foerder CA. Removal of the fertilization membrane of sea urchin embryos employing aminotriazole. *Exp Cell Res*. 1979;120(2):253–5.
 87. Hertzler PL, Clark WH. Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: Invagination is accompanied by oriented cell division. *Development*. 1992;116(1):127–40.
 88. Toullec JY, Crozat Y, Patrois J, Porcheron P. Development of primary cell cultures from the penaeid shrimps *Penaeus vannamei* and *P. indicus*. *J Crustac Biol*. 1996;16(4):643–9.
 89. Canfield JG. Dry beveling micropipettes using a computer hard drive. *J Neurosci Methods*. 2006;158(1):19–21.
 90. Samarut É, Lissouba A, Drapeau P. A simplified method for identifying early CRISPR-induced indels in zebrafish embryos using High Resolution Melting analysis. *BMC Genomics* [Internet]. 2016;17(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2881-1>
 91. Ki J, Jang GY, Han M. Integrated Method for Single-Cell DNA Extraction , PCR Amplification , and Sequencing of Ribosomal DNA from Harmful Dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Alexandrium catenella*. 2005;587–93.
 92. Clark WH, Yudin AI, Lynn JW, Griffin FJ, Pillai MC. Jelly Layer Formation in

- Penaeoidean Shrimp Eggs. *Biol Bull.* 1990;178(3):295–9.
93. Pongtippatee P, Putthawat W, Dungsuan P, Weerachartyanukul W, Withyachumnarnkul B. Hatching envelope formation in the egg of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Decapoda, Penaeidae). *Aquac Res.* 2013;44(9):1358–69.
 94. Clark WH, Lynn JW. Mg⁺⁺ dependent cortical reaction in the eggs of Penaeid shrimp. *J Exp Zool.* 1977;1(200):177–83.
 95. Pongtippatee-Taweepreda P, Chavadej J, Plodpai P, Pratoomchart B, Sobhon P, Weerachartyanukul W, et al. Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture.* 2004;234(1–4):183–98.
 96. Yano I. Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Mar Biol.* 1988;99(4):547–53.
 97. Pillai MC, Clark WH. Development of cortical vesicles in *Sicyonia ingentis* ova: Their heterogeneity and role in elaboration of the hatching envelope. *Mol Reprod Dev.* 1990;26(1):78–89.
 98. Glas PS, Green JD, Lynn JW. Oxidase activity associated with the elevation of the penaeoid shrimp hatching envelope. *Biol Bull.* 1995;189(1):13–21.
 99. Mcneil PL, Kirchhausen T. for Membrane Repair. *Mol Cell.* 2005;6(June):499–505.
 100. Rols MP, Delteil C, Golzio M, Teissié J. Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression. *Eur J Biochem.* 1998;254(2):382–8.
 101. Schulz I. Permeabilizing cells: Some methods and applications for the study of intracellular processes. *Methods Enzymol.* 1990;192(C):280–300.
 102. Hommelsheim CM, Frantzeskakis L, Huang M, Ülker B. PCR amplification of repetitive DNA: A limitation to genome editing technologies and many other applications. *Sci Rep.* 2014;4:1–13.
 103. Riet J, Ramos LRV, Lewis R V., Marins LF. Improving the PCR protocol to amplify a repetitive DNA sequence. *Genet Mol Res.* 2017;16(3):1–11.

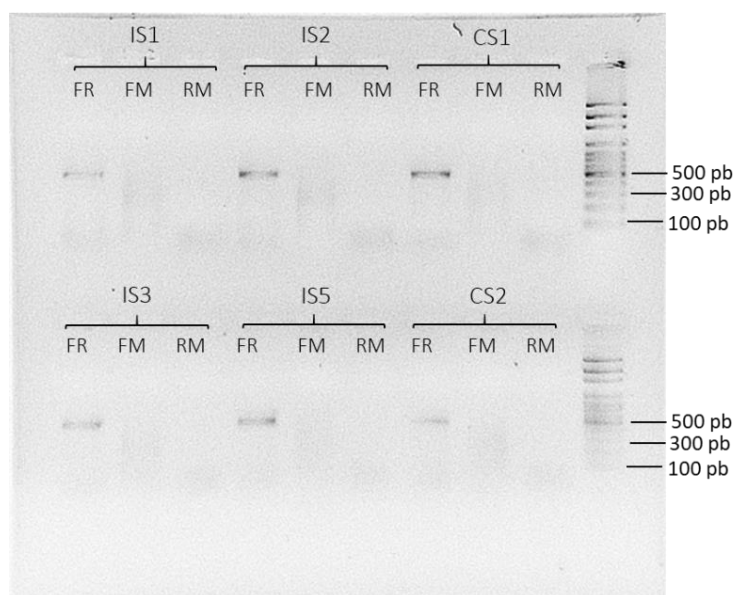
104. Richardson CD, Ray GJ, DeWitt MA, Curie GL, Corn JE. Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nat Biotechnol.* 2016;34(3):339–44.
105. Clarke R, Heler R, MacDougall MS, Yeo NC, Chavez A, Regan M, et al. Enhanced Bacterial Immunity and Mammalian Genome Editing via RNA-Polymerase-Mediated Dislodging of Cas9 from Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell* [Internet]. 2018;71(1):42-55.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.005>
106. Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Jennifer A, Biophysics M, et al. HHS Public Access Author manuscript *Nature*. Author manuscript; available in PMC 2014 September 06. Published in final edited form as: *Nature*. 2014 March 6; 507(7490): 62–67. doi:10.1038/nature13011. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonucleas. *Nature*. 2014;507(7490):62–7.
107. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Chen SJ, Huang DH, et al. Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1–14.
108. Gilbert SF. *Developmental Biology* 10th Edition. 2013;1–791.
109. Gerberding M. Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals an early restriction of cell fates. *Development* [Internet]. 2002 Dec 15;129(24):5789–801. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00155>
110. Wolff C, Scholtz G. Cell lineage, axis formation, and the origin of germ layers in the amphipod crustacean *Orchestia cavimana*. *Dev Biol*. 2002;250(1):44–58.
111. Price AL, Modrell MS, Hannibal RL, Patel NH. Mesoderm and ectoderm lineages in the crustacean *Parhyale hawaiiensis* display intra-germ layer compensation. *Dev Biol* [Internet]. 2010;341(1):256–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.006>

11. ANEXOS

Anexo A. productos de genotipificación por PCR por combinación de primers analizados por electroforesis. Organismos no eclosionados, inyectados con mix Pvan_dsODN. Las flechas rojas señalan bandas tenues de aproximadamente 900 pb, producto de tamaño no esperado.



Anexo B. Productos de genotipificación por PCR por combinación de primers analizados por electroforesis. Organismos eclosionados inyectados con el mix Pvan_ssODN.



Anexo C. Secuencia nucleotídica *Ubx*. región de diseño de primers y guía. En mayúscula se presenta la región no codificante y en minúscula la región codificante correspondiente al exón 1

```

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1  AATTCTATCTATCATCATTGTTATTGCCAACACTACTCCCACAGCTATAAATTACTATTAC 60

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
61  TACTACTGCCACTACTATTACTATGACTATTGTTACTATCATCATTATCAGCATGAATAC 120

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
121 CATAATTACTTCATTGTACCTAAGTCATCGCCCTCCGATTCCCGTCTATCATTATAAT 180

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
181 AAGCATTACAAATGGGATAATATATTACGTAGCAACACATGATAACTTTTGTGGCCACTT 240

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
241 AATCATCACACAGATAAACGTCACCTTCATGGGAATTACACTCTCTCATAGTCTGTGTTTA 300

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
301 CTGTATATTTTCATGACACTTTTTTTTCTGTGTTTCTGGTGTATTTCGAATTACTACT 360

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
361 TTTTAAAATAAATCAGGCGATTGTTGTCACCTTTATTTTTTTTTTCATTTTCGTTTCAATTT 420

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
421 GTATATTTTTCACTGTTTCACATTTTGAGGGGAGCGCACTTTTTCATTGTACTTTTAGTG 480

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
481 GGATATTAATTTGCTTATCGTTTTTTGGGGGTAACCTTTCGTATTTGTTTTGTAAAAGCT 540

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
541 TGTACATTATATAACTTGAAAGACCGAATGCCATTTTCATTCCATTTTTTTACATAAATTT 600

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
601 CCATTATTTTGGTTTGAAAATATGTTACGAATTTAGGGAATGATAACTGCTTTATTTCTT 660

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
661 GTGTGAAAAGGATAGTAAATTGAGCCTGGCTTTGCTCTGCCCGAAACCTAATTTGTCTT 720

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
721 ACTCATCTGTGGGAGATTAAACCCAGTGGGGGAGGGCGGACCCCGCCGGTTAAATGTT 780

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
781 GGTAAACTAACTTTTTTTCGGGGGAGCCTCAGCTTGATTATCTCATTGTATTACTGAAG 840

-----|-----|-----|>>>>Lv_UBX_4_F>>>>-----|
841 ATAGATACGGTAGATAAATTATGCAAATTAGACCTACGAGGGGGTGTAGGTGCTTATGGG 900

-----|-----|-----|>>>>Lv_UBX_3_F>>>>-----|
901 AGCCGAGGCTGTCTGCCGAGATTTATTCATTTTGGGCGAGAAGAATTTTGATGGATTTT 960

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
961 AATCTTTGGGAAAAGGCTTCGCGTGGAGGCTGGCACGACCCGGGCGGCGGCCAGCAG 1020

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1021 GGAGGCCACGAGTGCCGCACTGGCCCGCGGGGCGCGGGCGGTGGCACGGCGGCTGCAC 1080

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1081 CGTCAGACACCTTGCTTGCGGTGGGCGGCACAGGTGCCACGGCCCTCCACCAGCCACA 1140

-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1141 CCACAGTACTGTCGGAAGCTTGGTACGTacctgcaatggccatccaggggtagaagggtg 1200

-----|>>>>ubx_e1_2R>>>>-----|-----|-----|
1201 tgttgaggggcgctggttcatctggttgttggctgctgaggcggctgctgggattgct 1260

```

```
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1261 gatggggctgggacacgggctcatcccgcacgtgttccaccgcccacgtgtgtgcc 1320
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1321 ggtcccgggggacgtgctgggtccggagggtagccgcgagctgccaccgggtccggg 1380
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1381 tgcaggcggggcgaccgcgggccccagccccggacatgtccttggtggtccatagc 1440
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1441 cattctgatccttgacgcagtcaccttgaatgggtggcgtcatgtgctcctgaggg 1500
ubx_e1_a1<<<<<<<<<<-----|-----|-----|-----|
1501 gcgcgtacagcttgacaggcggccgtggtgtcgtagccatcctgacgaggtcctggc 1560
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1561 gcccgtagggctcacgctgaggccaaggggaagcggtgagcctgggtcccgcgggagc 1620
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1621 cgcgctacaaaacccgccctgttcgaagtaggagttcatggttgggttatgaagtaa 1680
<<<<<ubx_e1_2F<<<<<<-----<<<<<Lv_UBX_4_R<<<<<---|-----|
1681 cacactacacgcacccactgacacactcactccaccaacaccaagaaccaactgaagttc 1740
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1741 cagtaacacaccgtgatcaccaccaacacaccaaccgattttcaaattgtaaatttacc 1800
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1801 cgcgctaccacaccatgtgctggatttaaatttgcctatagcagctcgtatgtgtaaacat 1860
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1861 atgaaggacggcccggagaggcagaagcagccaatgaggatgggttgcgtcacgcgccg 1920
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1921 caggacgactgtgagtgggacgggagtcgcgggaagaactagctccgtaatagtgcgt 1980
-----|-----|-----|-----|-----|-----|
1981 cacgaccggcgactcgcacacgcgctgattatcgggtgggtggctggctggcgccac 2040
-----
2041 actggcC 2047
```