



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA DE EDICIÓN  
GENÓMICA BASADA EN LA ENTREGA *IN OVO* DE 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

**Jesús Guadalupe Castro Obeso**

La Paz, Baja California Sur, marzo de 2024.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 21 del Mes de Febrero del 2024, 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:

**"Desarrollo de una metodología de edición genómica basada en la entrega *in ovo* de Cas9 en *Penaeus vannamei*"**

Presentada por el alumno:

**Jesús Guadalupe Castro Obeso**

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.

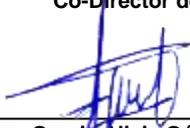
### LA COMISIÓN REVISORA



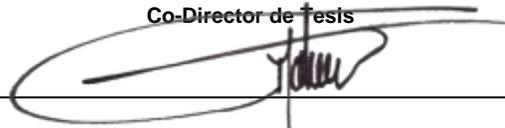
Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Co-Director de Tesis



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera  
Co-Director de Tesis



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro  
Co-Tutora de Tesis



Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres  
Co-Tutor de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos.



**CONAHCYT**  
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



La Paz, Baja California Sur, a 23 de febrero de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Jesús Guadalupe Castro Obeso del Programa de Maestría en Uso, Manejo y Preservación de los recursos naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. 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:  
8%  
Se muestra captura de pantalla

**8%**  
ÍNDICE DE SIMILITUD

---

FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://cibnor.repositorioinstitucional.mx">cibnor.repositorioinstitucional.mx</a> Internet	280 palabras – 3%
2	<a href="http://www.saveourseeds.org">www.saveourseeds.org</a> Internet	98 palabras – 1%
3	<a href="http://patents.google.com">patents.google.com</a> Internet	42 palabras – < 1%
4	<a href="http://www.colibri.udelar.edu.uy">www.colibri.udelar.edu.uy</a> Internet	36 palabras – < 1%
5	<a href="http://aquadoocs.org">aquadoocs.org</a> Internet	35 palabras – < 1%
6	<a href="http://dspace.cibnor.mx:8080">dspace.cibnor.mx:8080</a> Internet	35 palabras – < 1%
7	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Internet	32 palabras – < 1%
8	<a href="http://www.frontiersin.org">www.frontiersin.org</a> Internet	30 palabras – < 1%
9	<a href="http://www.coursehero.com">www.coursehero.com</a> Internet	27 palabras – < 1%

Firmas del Comité

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Raúl Llera Herrera

Dra. Gracia Gómez Anduro

Dr. Pavel Galindo Torres

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Director de Tesis

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

Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.  
Co-Tutor de Tesis

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

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Dr. Raúl Antonio Llera Herrera  
Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres  
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

### **Jurado de Examen**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Dr. Raúl Antonio Llera Herrera  
Dr. Pavel Eduardo Galindo Torres

### **Suplente**

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

## Resumen

*Penaeus vannamei*, conocido como camarón blanco, es la especie de camarón más producida a nivel mundial para el consumo humano. Debido a su importancia económica y por lo tanto social, continuamente se desarrollan líneas de investigación que puedan tener un impacto positivo en la producción de esta especie. Recientemente, el sistema CRISPR/Cas9, una herramienta de edición genómica de vanguardia, en conjunto con la tecnología de transducción ovárica mediada por receptor (ReMOT), han demostrado ser una estrategia exitosa para generar variantes alélicas en insectos. En este estudio se evaluó la actividad endonucleasa *in vitro* de la proteína Cas9-PvVg. Así mismo, con la finalidad de evaluar su internalización hacia los ovocitos, se realizaron ensayos en hembras vitelogénicas de *P. vannamei*, inyectando intramuscularmente una mezcla de la proteína con cloroquina, la cual es un agente disruptor endosomal. Evaluaciones inmunohistológicas en muestras de tejido gonadal 12 h post-inyección, evidenciaron que la proteína Cas9-PvVg es capaz de internalizarse en los ovocitos, incluso translocarse al núcleo. Aunque estudios moleculares posteriores son necesarios para confirmar estos resultados, la técnica CRISPR/Cas9-ReMOT desarrollada en este estudio muestra ser una herramienta prometedora para ser empleada en aproximaciones de edición genómica en *P. vannamei* y potencialmente en crustáceos.

**Palabras clave:** CRISPR/Cas9, ReMOT, *Penaeus vannamei*, crustáceos, inmunohistología, vitelogenina

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8392-3802>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Ricardo Pérez Enríquez



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

## Summary

*Penaeus vannamei*, commonly known as white shrimp, is the most globally produced shrimp species for human consumption. Due to its economic and, consequently, social significance, ongoing research efforts aim to positively impact the production of this species. Recently, the CRISPR/Cas9 system, a cutting-edge genomic editing tool, in conjunction with Ovary Transduction Receptor-Mediated Technology (ReMOT), has proven to be a successful strategy for generating allelic variants in insects. In this study, the *in vitro* endonuclease activity of the Cas9-PvVg protein was evaluated. Additionally, to assess its internalization into oocytes, experiments were conducted on vitellogenic females of *P. vannamei* by intramuscularly injecting a mixture of the protein with chloroquine, an endosomal disruptor agent. Immunohistological evaluations of gonadal tissue samples 12 hours post-injection revealed that the Cas9-PvVg protein can internalize into oocytes, even translocating into the nucleus. Although further molecular studies are necessary to confirm these results, the CRISPR/Cas9-ReMOT technique developed in this study proves to be a promising tool for use in genomic editing approaches in *P. vannamei* and potentially in crustaceans.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, ReMOT, *Penaeus vannamei*, crustaceans, immunohistology, vitellogenin

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8392-3802>

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Ricardo Pérez Enríquez



Dr. Raúl Antonio Llera Herrera

## Dedicatoria

A mis Padres y Hermanas,  
Siempre han sido el pilar de mi existencia.

## Agradecimientos

Quiero agradecer en primera instancia al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. por la oportunidad de finalizar este proyecto que inició desde mi licenciatura, así como por el apoyo parcial para culminación del proyecto. De la misma manera, a la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos, por el apoyo en todos los procesos y tramites que fueron necesarios.

Gracias al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por el otorgamiento de la beca de manutención con número 994645, además del 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*” por la financiación.

Un gran agradecimiento a los miembros de mi Comité, mis Co-Directores el Dr. Ricardo Pérez Enríquez y el Dr. Raúl Antonio Llera Herrera y, en su momento, a la Dra. Ana María Ibarra Humphries, así como a mis Co-Tutores el Dr. Pavel Galindo y la Dra. Gracia Gómez. Todos estuvieron desde el día uno apoyándome y ayudándome en todos los aspectos.

Gracias también al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL), Unidad Mazatlán por recibirme en una estancia para realizar parte de este proyecto. Al Dr. Mauricio Escalante por el apoyo y la compañía durante los bioensayos requeridos.

A la granja productoras de larvas “Larvas Oceánicas del Pacífico” y al biólogo Eduardo Pereira por el otorgamiento de los organismos necesarios para los bioensayos y las facilidades en sus instalaciones para realizarlos.

A la M. C. Susana Ávila, la Dra. Rosa María Morelos y todos los integrantes del Laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR por recibirme y apoyarme en lo que necesitara. Sin duda el mejor laboratorio en el que he trabajado.

Gracias especiales a las responsables del Laboratorio de Histología del CIBNOR Carmen Rodríguez Jaramillo y Eulalia Meza Chávez, así como al responsable del Laboratorio de Microscopia Electrónica del CIBNOR Ariel Cruz Villacorta, que a pesar de no estar involucrados en el proyecto siempre me orientaron y me apoyaron en lo que fuera para el análisis de muestras.

Por último, pero no menos importante, a mis compañeros de Maestría Alonso Padilla, Marina Jiménez, Fernanda Manriquez, Alexis López y Carlos Aquino. Así como aquellos de otras generaciones, Joshua Pacheco, Natalia Joachín, Jair Castillo, Dante Gijón, María Aguilar, Laura Cota y Eduardo Contreras. Muchas gracias por todas las aventuras y el apoyo emocional. Fueron parte esencial en este proceso. Siempre estarán presentes en mi vida.

## Contenido

Resumen .....	i
Summary .....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Contenido.....	vi
Lista de figuras .....	viii
Lista de tablas .....	ix
Abreviaturas .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>3</b>
2.1 Edición genómica.....	3
2.1.1 Sistema CRISPR/Cas9 .....	3
2.1.2 Estado actual de la edición genómica en organismos acuícolas y otros crustáceos.....	6
2.2 Entrega del sistema CRISPR/Cas9 .....	7
2.3 Transducción ovárica mediada por receptor (ReMOT).....	10
2.4 Vitelogénesis.....	11
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
3.1 Impacto científico .....	14
3.2 Impacto tecnológico .....	14
3.3 Impacto económico .....	14
3.4 Impacto social.....	15
3.5 Impacto ambiental.....	15
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>16</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
5.1 Objetivo general .....	17
5.2 Objetivos particulares.....	17
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
6.1 Evaluar la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg <i>in vitro</i> . .....	18
6.1.1 Síntesis de secuencia blanco para ensayo de corte <i>in vitro</i> . .....	18
6.1.2 Actividad endonucleasa <i>in vitro</i> del complejo Cas9-PvVg/ARNg.....	20
6.2 Analizar la internalización en ovocitos <i>in vivo</i> en hembras vitelogénicas del camarón blanco <i>P. vannamei</i> . .....	21
6.2.1 Material biológico. ....	21
6.2.2 Ensayo de toxicidad del agente disruptor endosomal cloroquina .....	21
6.2.3 Preparación de soluciones a inyectar para los ensayos <i>in vivo</i> en hembras de <i>P. vannamei</i> .....	22
6.2.4 Ensayos <i>in vivo</i> en hembras vitelogénicas de <i>P. vannamei</i> .....	22
6.2.5 Inmunohistología de tejido gonadal de <i>P. vannamei</i> .....	22
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
7.1 Evaluar la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg <i>in vitro</i> .....	25
7.1.1 Actividad endonucleasa <i>in vitro</i> del complejo Cas9-PvVg/ARNg.....	25
7.2 Analizar la internalización en ovocitos <i>in vivo</i> en hembras vitelogénicas del camarón blanco <i>P. vannamei</i> .....	25

7.2.1 Ensayo de toxicidad del agente disruptor endosomal cloroquina. ....	25
7.2.2 Histología de tejido gonadal de hembras de <i>P. vannamei</i> inyectadas. ....	26
7.2.3 Inmunohistología de tejido gonadal de <i>P. vannamei</i> . ....	28
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	36
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	41
<b>10. LITERATURA CITADA</b> .....	42
<b>11. ANEXOS</b> .....	48
Anexo A.-Extracción de ADN genómico: Método salting out .....	48
Anexo B.-Construcción de Cas9-PvVg.....	49
Anexo C.-Preparación de PBS 10× – 1 L.....	51
Anexo D.-Comprobación de inyección por el uso de azul de metileno .....	52
Anexo E.-Corte del cordón nervioso de <i>P. vannamei</i> .....	52
Anexo F.-Disección de fragmentos de gónada de <i>P. vannamei</i> .....	52
Anexo G.-Preparación de paraformaldehído 4% en PBS 2× – 1 L .....	53
Anexo H.-Tinción Hematoxilina y Eosina .....	53
Anexo I.-Inmunohistología en gónada de camarón .....	54

**Lista de figuras**

<b>Figura 1.</b> Esquema de acoplamiento y corte del sistema CRISPR/Cas9 .....	5
<b>Figura 2.</b> Producción de vitelogenina en <i>P. vannamei</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema ilustrativo del gen <i>fem-1</i> respecto al ARNg y la región amplificada.....	19
<b>Figura 4.-</b> Ubicación de primers y ARNg en el gen <i>fem-1</i> . .....	20
<b>Figura 5.</b> Corte in vitro de Cas9-PvVg.....	25
<b>Figura 6.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico.....	30
<b>Figura 7.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (2) .....	31
<b>Figura 8.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (3) .....	32
<b>Figura 9.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (4) .....	33
<b>Figura 10.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio de vitelogénesis secundaria .....	34
<b>Figura 11.</b> Inmunotinciones de ovario en estadio de vitelogénesis secundaria (2).....	35

**Lista de tablas**

<b>Tabla 1.</b> Uso del sistema CRISPR/Cas9 en crustáceos.....	7
<b>Tabla 2.</b> Ventajas y desventajas de los métodos de entrega del sistema CRISPR/Cas9. ....	9
<b>Tabla 3.</b> Secuencias de oligonucleótidos para la síntesis de ARNg.....	19
<b>Tabla 4.</b> Imágenes de tinciones HyE de tejido gonadal de <i>P. vannamei</i> .....	26

## Abreviaturas

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNg:** Ácido ribonucleico gruía

**BSA:** Bovine serum albumin (Albúmina de suero bovino)

**Cas9-PvVg:** Cas9 fusionada al péptido ligando de su receptor de la vitelogenina de *P. vannamei*

**cNHEJ:** Classical non-homologous end-joining (Unión clásico de extremos no homólogos)

**CRISPR:** Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (Repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas)

**HDR:** Homology-directed repair (Reparación dirigida por homología)

**MMEJ:** Microhomology-mediated end-joining (Unión de extremos mediada por microhomología)

**PAM:** Protospacer adjacent motif (Motivo adyacente al protoespaciador)

**pb:** Pares de bases

**ReMOT:** Receptor mediated ovaric transduction (Transducción ovárica mediada por receptor)

**RNP:** Ribonucleoproteína

**SSA:** Single strand annealing (Alineamiento de una sola hebra)

**TALEN:** Transcription activator-like effector nuclease (Nucleasa efectora parecida a activador de transcripción)

## 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la edición genómica ha emergido como una de las biotecnologías más prometedoras en diferentes áreas científicas como la medicina, la biología y la biotecnología (Hsu *et al.*, 2014). El sistema CRISPR/Cas9 se destaca, en particular, por su capacidad relativa para adaptar su diseño a diversos objetivos de edición, así como por su sencilla aplicación, en comparación con otros sistemas de edición genómica (Yin *et al.*, 2017). Esta biotecnología ha sido utilizada exitosamente en algunos crustáceos. Por ejemplo, en la determinación de la función de genes de desarrollo morfológico en el anfípodo *Parhyale hawaiensis* (Martin *et al.*, 2016), la función del gen *EcChi4* en el proceso de muda (Gui *et al.*, 2016) y metamorfosis del decápodo *Exopalaemon carinicauda* (Zhang *et al.*, 2018), así como la importancia del gen *Pax6* en el desarrollo de los ojos de *E. carinicauda* (Gao *et al.*, 2020) y del langostino *Macrobrachium rosenbergii* (Molcho *et al.*, 2022;). También se ha demostrado su aplicabilidad en dáfidos, donde ha sido posible evaluar la función de genes involucrados en la morfogénesis de *Daphnia pulex* (Hiruta *et al.*, 2018), mientras que en *Daphnia magna*, se ha reportado la introducción de mutaciones específicas y que además estas pueden ser transmitidas a la progenie (Kumagai *et al.*, 2017; Nakanishi *et al.*, 2014). Sin embargo, en el caso de los camarones peneidos los intentos han sido muy pocos (Gratacap *et al.*, 2019); y a pesar de que *Penaeus vannamei* representa más del 50% de la producción de crustáceos en cultivos acuícolas a nivel mundial (FAO, 2022) y que la tendencia de su consumo va en aumento (CONAPESCA, 2021), la aplicación de CRISPR en estos organismos ha sido poco explorada y los pocos intentos realizados no han sido exitosos (Gratacap *et al.*, 2019). Este lento avance ha sido principalmente asociado a la ausencia de un método de entrega eficiente (Song, 2017). En este sentido, la microinyección y la electroporación asistida con el uso de reactivos de transfección han sido las aproximaciones más empleadas aun cuando estos han demostrado bajas tasas de supervivencia, de eficiencia de transfección y edición (Marín-Carrasco, 2021; Sun *et al.*, 2005). Particularmente, en *P. vannamei*, Marín-Carrasco (2021) evaluó la aplicación de esta técnica a través de la microinyección de embriones de *P. vannamei*, donde se llevó a cabo la dirección del corte de cas9 hacia el gen *ubx*, involucrado en el desarrollo morfológico. Como resultado, se obtuvieron nauplios con fenotipos acordes a las expectativas, pero con genotipos que no presentaban evidencia aparente de edición genómica. Hallazgo que sugiere que el origen de las morfologías

anormales podría estar relacionado con el daño celular ocasionado por la microinyección. Por otro lado, Men *et al.* (2024) lograron obtener organismos de esta especie con ediciones en el gen *Pax6* introduciendo CRISPR con un reactivo transfectante. Debido a estas limitantes técnicas, diversos grupos de investigación se encuentran realizando esfuerzos para el desarrollo de nuevas estrategias de entrega del sistema CRISPR/Cas9 (Liu *et al.*, 2017). Dentro de los casos de éxito en organismos modelo, específicamente en *Aedes aegypti*, se encuentra la tecnología de transducción ovárica mediada por receptor (ReMOT, por sus siglas en inglés), cuyo principio recae en el proceso de vitelogénesis (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2018). Esta metodología consiste en fusionar la proteína Cas9 con la porción ligando de la proteína vitelogenina y posteriormente ser inyectada en el sistema circulatorio del organismo en cuestión, con o sin un agente disruptor endosomal. De esta manera, facilitar a la proteína ser introducida a los ovocitos en maduración y que sea liberada en el citosol, para poder llegar al núcleo (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2018).

Con el objetivo de replicar la metodología empleada con éxito en *A. aegypti*, en una primera fase, se desarrolló una versión de Cas9 fusionada con la porción ligando de la vitelogenina de *P. vannamei* (Cas9-PvVg) y se determinó su correcta construcción mediante secuenciación del plásmido, además de su expresión e identificación en cultivos bacterianos (Castro-Obeso, 2021). En el presente proyecto se explora la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg *in vitro*, así como su capacidad *in vivo* de alcanzar los núcleos de los ovocitos al ser inyectada en hembras vitelogénicas de *P. vannamei*.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Edición genómica

La edición genómica o genética emerge desde la conceptualización de la manipulación genómica. Consiste en realizar cambios puntuales (inserciones o deleciones de bases nitrogenadas) en regiones específicas de ácidos nucleicos, aprovechando mecanismos de reparación de ADN endógenos; a diferencia de la transgénesis donde genes completos y funcionales, provenientes de otros organismos, son introducidos al genoma (Permyakova y Deineko, 2024).

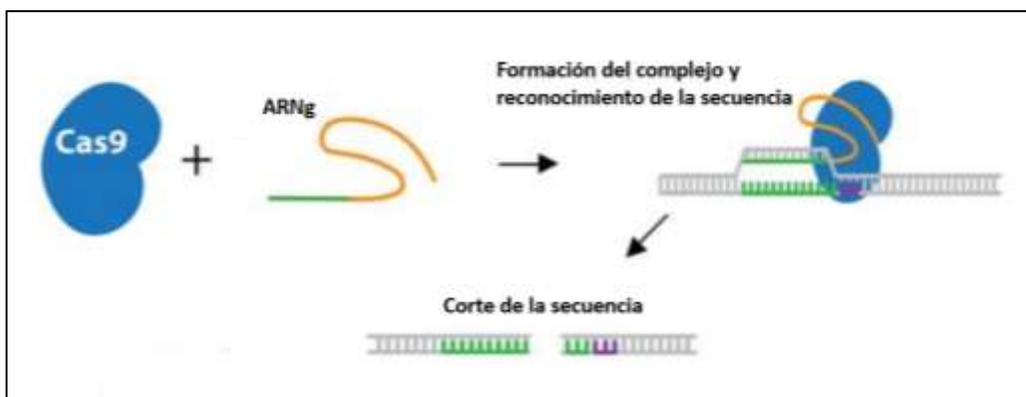
Existen ya diversas herramientas biológicas capaces de llevar a cabo modificaciones en el genoma, cada una con sus ventajas y desventajas (Yin *et al.*, 2017). Los ejemplos más importantes son las meganucleasas, nucleasas dedos de zinc (ZFN, por sus siglas en inglés), nucleasas efectoras parecidas a activadores de transcripción (TALEN) y, recientemente las repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR) (Yin *et al.*, 2017). Las meganucleasas son endonucleasas derivadas de microorganismos involucradas en los procesos de modificaciones postranscripcionales de ácidos nucleicos (Stoddard, 2011), mientras que las ZFN y las TALEN son nucleasas inespecíficas fusionadas a dominios proteicos de reconocimiento al ADN (Joung y Sander, 2013; Urnov *et al.*, 2010). Sin embargo, una desventaja de estas técnicas es que sus dominios de reconocimiento al ADN son específicos a bases nitrogenadas individuales, en pares o tripletes, implicando un tiempo adicional para ajustar estos dominios a cada secuencia de ADN en particular. En contraste, el sistema CRISPR también hace uso de una endonucleasa, pero su especificidad no reside en ella, sino en una molécula de ARN que, al unirse a la endonucleasa, sirve como guía para localizar una secuencia de ADN complementaria y accionar el corte de esta (Jinek *et al.*, 2012).

#### 2.1.1 Sistema CRISPR/Cas9

La familia de endonucleasas implicadas en el sistema CRISPR son llamadas Cas (asociadas a CRISPR, por sus siglas en inglés) (Jansen *et al.*, 2002). Hoy en día se conocen variantes de Cas con diversas características, como Cas de tamaños relativamente pequeños (Burstain *et al.*,

2017) o aquella que genera extremos cohesivos en el ADN después del corte (Zetsche *et al.*, 2015), entre otras (Cebrian-Serrano y Davies, 2017). Pero la más usada y estudiada es la variante que se describió primero para estos fines, la Cas9 (Jinek *et al.*, 2012). Esta proteína es monomérica y consiste en dos regiones: una de reconocimiento (REC) y otra con actividad nucleasa (NUC). La región NUC contiene los dominios RuvC y HNH que se encargan de realizar el corte al ADN, además de un dominio PI para reconocer un motivo llamado PAM (Fig. 1, en morado) dentro del ácido nucleico que se cortará (Nishimasu *et al.*, 2014). El motivo PAM es específico para cada variante de proteína Cas, que para el caso de Cas9 es 5'-NGG (N=cualquier nucleótido) (Mojica *et al.*, 2009). Por otro lado, el lóbulo REC cuenta con dominios para reconocer un ARN guía (ARNg) que ayuda a ubicar la secuencia que se desea cortar (Nishimasu *et al.*, 2014). Originalmente, en procariontes, el ARNg es una molécula compuesta por dos ARN parcialmente complementarios que en conjunto suman alrededor de 131 nucleótidos (Deltcheva *et al.*, 2011), pero optimizaciones a su estructura han establecido que una sola molécula de ARN de un tamaño de alrededor de 62 nucleótidos es suficiente para activar a Cas9: 20 nucleótidos para reconocer específicamente la secuencia a cortar (Fig. 1, en verde) y el resto para anclarse a Cas9 (Fig. 1, en amarillo) (Jinek *et al.*, 2012).

Una vez acoplado el ARNg a Cas9 estas forman un complejo ribonucleoprotéico capaz de escanear secuencias de ácidos nucleicos, buscando la secuencia complementaria (Jinek *et al.*, 2012). Una vez ubicada, y que al mismo tiempo se encuentre un motivo PAM, se acciona un cambio conformacional de la proteína Cas9 que provoca un corte en ambas hebras del ADN (Jinek *et al.*, 2014). Mientras que el dominio HNH corta la hebra complementaria al ARNg 3 nucleótidos río arriba del motivo PAM, el dominio RuvC ha mostrado flexibilidad cortando la hebra no complementaria de 3-5 nucleótidos río arriba del motivo PAM (Garneau *et al.*, 2010; Shou *et al.*, 2018) (Fig. 1).



**Figura 1.** Esquema de acoplamiento y corte del sistema CRISPR/Cas9 (Adhikari y Poudel, 2020). ARNg: secuencia que se desea buscar en el ADN a cortar (verde), secuencia necesaria para anclarse a Cas9 (amarillo). ADN: región complementaria al ARNg diseñado (verde), motivo PAM que complementa el reconocimiento por Cas9 (morado).

Este fenómeno desencadena la activación de diversos mecanismos intrínsecos de reparación del ADN en la célula. Entre los más comunes en las células eucariotas se encuentran la unión de extremos no homólogos clásica (cNHEJ), la unión de extremos mediada por micro homología (MMEJ), el alineamiento de una sola hebra (SSA) y la reparación mediada por homología (HDR). Algunos de estos mecanismos aprovechan secuencias molde para llevar a cabo la reparación del corte. La reparación mediante recombinación homóloga (HDR) utiliza ADN de doble cadena, que puede encontrarse en el entorno o en la otra copia del cromosoma en células haploides. Por otro lado, la reparación mediante SSA podría emplear ADN de una sola cadena del entorno únicamente cuando se aplica externamente. Esto se debe a que, en condiciones naturales dentro de una célula, no es posible encontrar ADN de una sola hebra para utilizar como molde. En consecuencia, se desencadenan procesos de eliminación de decenas de nucleótidos hasta lograr un alineamiento adecuado entre las hebras cortadas. (Xue y Greene, 2021).

MMEJ opera de manera análoga a SSA, aunque la eliminación de nucleótidos no excede las 10 bases nitrogenadas. En contraste, cNHEJ tiene la capacidad de tomar los extremos del ADN cortado y unirlos sin realizar modificaciones en la secuencia. A pesar de ello, este mecanismo no es infalible, pudiendo ocasionar cambios en la secuencia original de 1 a 2 nucleótidos (Xue y Greene, 2021).

Debido a la naturaleza inherentemente imprecisa de los mecanismos de reparación, diversos factores adicionales contribuyen a la generación de mutaciones, como la flexibilidad en el sitio de corte del dominio RuvC de Cas9 (Shou *et al.*, 2018), la actividad predominante de SSA, MMEJ y HDR en las fases S/G1 del ciclo celular, la ubicación específica del sitio de corte dentro de la estructura de la cromatina (Xue y Greene, 2021), y la persistencia de Cas9 en la secuencia durante varios minutos después de la realización del corte (Clarke *et al.*, 2018). Estos elementos, en su conjunto, obstaculizan una reparación eficiente del ADN, resultando en la mayoría de los casos en mutaciones que implican inserciones o deleciones de nucleótidos, desencadenando cambios tanto estructurales como funcionales en la secuencia original. (Kosicki *et al.*, 2022; Xue y Greene, 2021).

### **2.1.2 Estado actual de la edición genómica en organismos acuícolas y otros crustáceos.**

Dentro del sector acuícola, la edición genómica ha sido aplicada de forma exitosa para lograr esterilidad (*Salmonidae*, *Siluridae*), para mejorar aspectos reproductivos (tilapia *Oreochromis niloticus*), para mejorar el crecimiento (*Salmonidae*, *Siluridae*, ostra *Crassostrea gigas*, pez dorada *Sparus aurata*), entre otros (Gratacap *et al.*, 2019; Jin *et al.*, 2021). Por su parte, en crustáceos, los trabajos más recientes permitieron comprobar la hipótesis de que ciertos apéndices presentes en crustáceos actuales son los predecesores de aquellos que originaron las alas en insectos. Esto se comprobó al realizar *knock-out* en genes de desarrollo de apéndices del anfípodo *Parhyale hawaiiensis*, utilizando el sistema CRISPR/Cas9 (Bruce y Patel, 2020; Clark-Hachtel y Tomoyasu, 2020). En decápodos, los trabajos de edición genómica son pocos, siendo los más recientes la aplicación del sistema CRISPR/Cas9 para evidenciar la intervención del gen *pax6* en el desarrollo de los ojos en los langostinos *Macrobrachium rosenbergii* (Molcho *et al.*, 2022), *Exopalaemon carinicauda* (Gao *et al.*, 2020) y el camarón *Penaeus vannamei* (Men *et al.*, 2024). Resultados de la aplicación de CRISPR/Cas9 en estos organismos y otros crustáceos se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Uso del sistema CRISPR/Cas9 en crustáceos. S: Porcentaje de supervivientes; M: Porcentaje de mutantes de los sobrevivientes. Modificado de Liu *et al.* (2017).

Organismo	Formato CRISPR/Cas9	S	M	Ref.
<i>Daphnia sp.</i>	Microinyección embrionaria (ARNm Cas9/ARNg)	67	18	Nakanishi <i>et al.</i> (2014)
		54	39	
		70	30	
		59	21	
	Microinyección embrionaria (Complejos Cas9/ARNg)	57	65	Kumagai <i>et al.</i> (2017)
		30	96	
	Microinyección embrionaria (Complejos Cas9/ARNg)	29	~11.5	Hiruta <i>et al.</i> (2018)
		43	~7	
	20	42		
<i>Parhyale hawaiiensis</i>	Microinyección embrionaria (ARNm Cas9/ARNg)	41-71	35-46	Martin <i>et al.</i> (2016)
		53-71	12-70	
<i>Exopalaemon carinicauda</i>	Microinyección embrionaria (ARNm Cas9/ARNg)	14	7	Gui <i>et al.</i> (2016)
		9.2	4.8	Zhang <i>et al.</i> (2018)
		20.4	8.7	Gao <i>et al.</i> (2020)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Microinyección embrionaria (Complejos Cas9/ARNg)	-	73.4 (n=6)	Molcho <i>et al.</i> (2022)
	Electroporación de cultivo celular (Complejos Cas9/ARNg)	-	42 (n=8)	
<i>Penaeus vannamei</i>	Transfección embrionaria (Plásmido para Cas9 y ARNg)	36	20	Men <i>et al.</i> (2024)

## 2.2 Entrega del sistema CRISPR/Cas9

Una de las limitantes actuales en el uso de la edición genómica es la disponibilidad de un sistema de entrega eficiente y masivo (Song, 2017). Dentro de los métodos de entrega que se emplean actualmente son: el uso de virus, aprovechando su capacidad de introducir ácidos nucleicos a las células, ya que estos se pueden cargar con secuencias nucleotídicas que

codifiquen para los componentes del sistema (Grimm *et al.*, 2008); la microinyección que consiste en inyectar compuestos directo al citosol de las células usando micro agujas de cristal u otro polímero (Crispo *et al.*, 2015); la electroporación, en la cual se crean poros transitorios en las membranas celulares de células en suspensión al aplicar pulsos eléctricos (Venslauskas y Šatkauskas, 2015); y aquellos basados en nanotecnología como cubiertas de polímeros (Men *et al.*, 2024), liposomas (Mali *et al.*, 2013), nanoestructuras de ADN (Sun *et al.*, 2015) o partículas de oro (Lee *et al.*, 2017), en las cuales la carga se adhiere a las nanopartículas a través de interacciones electrostáticas.

Actualmente existen tres variantes en la que el sistema puede ser introducido: (i)vectores de expresión (plásmido), que cuenten con regiones codificantes para Cas9 y el(los) ARNg, (ii)el ARNm que codifica para Cas9 y los ARNg's y (iii)los complejos RNPs formados por el ARNg acoplado a Cas9 recombinante. Dadas las diferentes naturalezas de estas tres estrategias, la mayoría de los métodos de entrega existentes no aplican para todas, y cada uno presenta una serie de ventajas y desventajas que reducen su practicidad al momento de aplicarse (Tabla 2) (Liu *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Ventajas y desventajas de los métodos de entrega del sistema CRISPR/Cas9.

Método de entrega	Estrategia			Ventajas	Desventajas
	Plásmido	ARNm Cas9 ARNg	RNPs		
Virus	●	●		-Especificidad -Eficiencia de transfección	-Difícil producción -Altos costos
Microinyección	●	●	●	-Eficiencia de transfección -Aplicable a diversas células	-Equipo especializado -Personal capacitado -Baja sobrevivencia -Células individuales
Electroporación	●	●	●	-Eficiencia de transfección -Aplicable a diversas células	-No específica -Equipo especializado -Células en suspensión
Nanopartículas de polímeros / Liposomas	●	●	●	-Fácil preparación -Aplicable en células individuales, tejidos e <i>in vivo</i>	-Reactivos costosos -No específica -Baja eficiencia de transfección
Nanoestructuras de ADN		●	●	-Rango amplio de capacidad de carga -Modificable para especificidad	-Difícil ensamblaje -Poca estabilidad
Nanopartículas de oro		●	●	-Eficiencia de transfección	-Reactivos costoso -Tóxico a altas concentraciones

En crustáceos y decápodos, la microinyección y la electroporación han sido dos de las técnicas que han mostrado resultados exitosos, aun cuando su alcance es poco masivo (Molcho *et al.*, 2021; Gao *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021). Por su parte, en el camarón blanco *P. vannamei* se ha empleado la electroporación y microinyección asistida con reactivos de transfección para inducir mutantes, sin embargo, ninguna aproximación hasta el momento ha permitido generar variantes alélicas (Marín-Carrasco, 2021; Sun *et al.*, 2005). Esta dificultad se debe principalmente a la naturaleza del cigoto, el cual genera una capa gelatinosa después de ser

fecundado (Clark Jr *et al.*, 1990). Con la finalidad de disminuir esta barrera física, se han realizado de forma exitosa tratamientos para eliminarla (Marín-Carrasco, 2021).

Una de las estrategias implementadas para la entrega de CRISPR/Cas9 en células individuales ha sido el uso de péptidos diseñados para tener cargas positivas, lo que les confiere la capacidad de atravesar las membranas plasmáticas a través de interacciones electrostáticas. Estos péptidos, al ser fusionados a la enzima Cas9, la ayudan a ingresar a la célula (Ramakrishna *et al.*, 2014). Una metodología de esta naturaleza brindaría la posibilidad de prescindir de equipos especiales y manipulaciones dañinas a la célula blanco, pero si el objetivo es aplicarse *in vivo* solo a ciertas células, tiene la desventaja de ser inespecífica. Por ello, una manera de cubrir esa variable es la entrega de biomoléculas mediada por receptores, en donde el péptido fusionado a Cas9 es el ligando de un receptor de membrana específico de un tejido, que además promueve la endocitosis (Chen *et al.*, 2010; Spencer y Verma, 2007; Tortorella y Karagiannis, 2014).

### **2.3 Transducción ovárica mediada por receptor (ReMOT)**

La tecnología ReMOT es un ejemplo de entrega de biomoléculas mediada por receptores, específicamente a los ovocitos presentes en los ovarios de los organismos en cuestión. El primer registro que se cuenta de esta metodología data de su utilización en hembras de *Aedes aegypti*, en donde la proteína Cas9 fue fusionada a la porción ligando de la proteína vitelogenina de la mosca *Drosophila melanogaster* (P2C-Cas9), facilitando la entrada a los ovocitos a través del receptor de vitelogenina; como resultado, una proporción de la progenie contenía las ediciones genómicas esperadas (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2018). Posteriormente, utilizando la misma enzima P2C-Cas9, se realizaron ensayos similares en el mosquito *Anopheles stephensi* (Macias *et al.*, 2020), en la avispa *Nasonia vitripennis* (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2020), el mosquito *Culex pipiens pallens* (Li *et al.*, 2021), la garrapata *Ixodes scapularis* (Sharma *et al.*, 2022), el psílido *Diaphorina citri* (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2023) y el mosquito *Anopheles sinensis* (Yang *et al.*, 2023), obteniendo en todos los casos eventos de edición genómica en la progenie, además de demostrar que especies taxonómicamente cercanas pueden ser tratadas con el mismo constructo de Cas9. Sin embargo, nuevas versiones de Cas9 específicas para cada organismo deben ser desarrolladas debido a ejemplos como el de Shirai *et al.* (2020), donde se utilizó la

P2C-Cas9 en hembras del escarabajo *Tribolium castaneum* y se observó menor porcentaje de edición genómica comparado a trabajos anteriores con esta versión de Cas9. Similarmente, Heu *et al.* (2020), realizaron experimentos en la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) utilizando la P2C-Cas9 y una nueva versión con la fusión del péptido ligando homólogo de la mosca blanca (BtKV), y solamente se obtuvo progenie editada genómicamente con el uso de BtKV. En otra ocasión, se evaluó la P2C-Cas9 y la BtKV en hembras de la chinche *Rhodnius prolixus*, obteniendo eventos de edición genómica con ambas variantes de Cas9, pero en mayor medida con BtKV (Lima *et al.*, 2023).

Debido a que los receptores de la vitelogenina pertenecen a la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDLR) (Warrier y Subramoniam, 2002) y estos utilizan la endocitosis mediada por clatrin (Goldstein *et al.*, 1985), es necesario el uso de reactivos capaces de disgregar el endosoma y liberar el sistema ReMOT al citosol. Los trabajos reportados de la aplicación de ReMOT informan el uso de dos reactivos principalmente, la saponina y la cloroquina. Estos han mostrado en ocasiones no ser necesarios (Heu *et al.*, 2020) o provocar efectos adversos en altas concentraciones (Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022); sin embargo, en la mayoría de los casos incrementan la tasa de edición genómica (Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2018; Macias *et al.*, 2020).

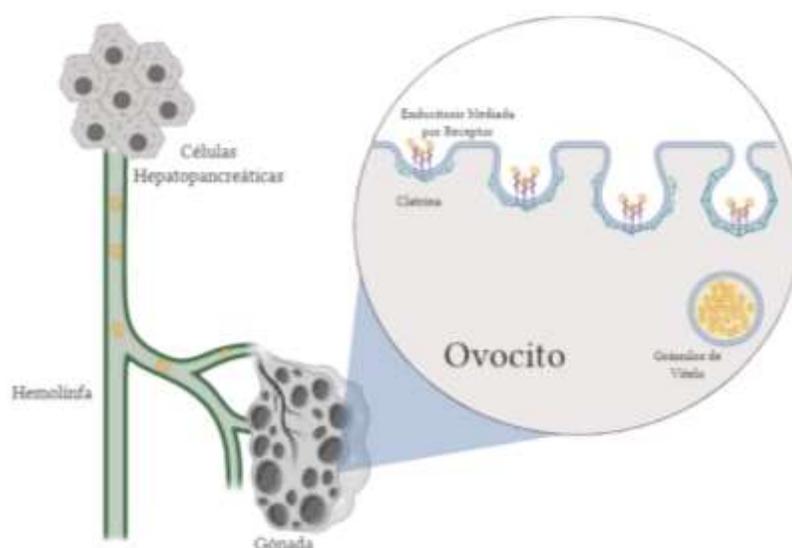
## 2.4 Vitelogénesis

La vitelogénesis es un proceso fisiológico necesario para el desarrollo gonadal y la maduración de los ovocitos en organismos ovíparos. Este consiste en la producción y almacenamiento de las reservas nutricionales del ovocito, comúnmente llamadas yema o vitelo (Babin *et al.*, 2007; Subramoniam, 2011). Los componentes principales del vitelo en crustáceos son lipoproteínas de alta densidad (llamadas en conjunto vitelogenina), carotenoides y carbohidratos (Wallace *et al.*, 1967).

La vitelogénesis en crustáceos se divide en dos fases: primaria y secundaria. En la primaria ocurre una producción de las reservas de manera local (ovarios y/u ovocitos), mientras que en la secundaria ocurre una captación de reservas endógenas por endocitosis (Nelson, 1990; Ruan

*et al.*, 2020). Todo el proceso está controlado por una compleja regulación comenzando por los estímulos del ambiente como la temperatura y el fotoperiodo, que activan la liberación de hormonas encargadas de regular la acción de factores endócrinos (Subramoniam, 2011).

En *P. vannamei* la producción de vitelogenina tiene lugar en el hepatopáncreas y en los ovarios y de igual forma se divide en primaria y secundaria (Raviv *et al.*, 2006). La vitelogenina producida en hepatopáncreas es movilizada hacia los ovarios a través de la hemolinfa (Arcos *et al.*, 2011), y una vez en contacto con los ovocitos en maduración, es internalizada en ellos por medio de endocitosis mediada por receptores (Fig. 2) (Ruan *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Producción de vitelogenina en *P. vannamei*. La vitelogenina producida en el hepatopáncreas es movilizada a través de la hemolinfa, hacia las gónadas. Cuando alcanza los ovocitos, interactúa con sus receptores de membrana. Se activa la internalización mediada por clatrininas y se forman los gránulos de vitelo en el citoplasma (elaboración propia).

Estas características del proceso de vitelogénesis en *P. vannamei* lo vuelven buen candidato para la aplicación de la tecnología ReMOT – Cas9, con la ventaja de obtener potencialmente múltiples eventos de edición genómica en un solo desove y evitar manipular excesivamente los embriones.

Con el objetivo de replicar la metodología ReMOT, anteriormente nuestro equipo de investigación desarrolló en una primera etapa, una variante de Cas9 fusionada a la porción

ligando de la vitelogenina de *P. vannamei* (Cas9-PvVg) (Castro-Obeso, 2021), tomando los resultados obtenidos por Roth *et al.* (2013) en donde se caracterizaron las porciones de la proteína vitelogenina reactivas a su receptor del langostino *M. rosenbergii*. Estableciendo los fundamentos para evaluar la actividad endonucleasa *in vitro* de Cas9-PvVg, así como su capacidad de internalizarse a los ovocitos *in vivo* en hembras del camarón blanco *P. vannamei* en una segunda etapa.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Debido al incremento constante de la demanda de camarón blanco por la población y al lento avance de mejoramiento genético en este organismo con técnicas tradicionales, el desarrollo de nuevas metodologías para su mejoramiento, estudio y optimización en su producción son necesarios. La edición genómica a través de la combinación de CRISPR/Cas9-ReMOT se posiciona como una alternativa con el potencial suficiente para lograr estos objetivos de manera rápida y específica en este organismo y otros crustáceos importantes en la acuicultura, debido a que la principal limitante de esta biotecnología es la disponibilidad de un mecanismo eficiente para ingresar el sistema CRISPR/Cas9 en los cigotos, además de la propia naturaleza estructural que presentan estos últimos. Particularmente en *P. vannamei*, la presencia de una capa externa viscosa en los cigotos ha dificultado el uso exitoso de metodologías como la electroporación y microinyección embrionaria. Una metodología que supere estos impedimentos en la entrega del sistema CRISPR/Cas9, como lo es ReMOT, contribuiría en el avance de los programas de mejoramiento genético y la generación de conocimiento sobre la función de genes.

#### **3.1 Impacto científico**

La exitosa aplicación de esta metodología en el camarón blanco abre la posibilidad de estudiar de manera más rápida y profunda, a gran escala, diversos aspectos biológicos de este organismo. Además, se vislumbra su potencial aplicación en otros crustáceos.

#### **3.2 Impacto tecnológico**

La implementación de ReMOT en el camarón blanco representaría un método de entrega del sistema CRISPR en ovocitos más preciso, específico y a gran escala en comparación con los métodos de entrega actualmente disponibles, en una especie de interés acuícola.

#### **3.3 Impacto económico**

La prescindencia de reactivos costosos, equipos especializados o personal altamente capacitado para la aplicación de esta tecnología en *P. vannamei* hace que el uso de CRISPR/Cas9 sea más

accesible en este sector. Además, se anticipan mejoras potenciales en la producción de camarón y otros crustáceos en un futuro. Por ejemplo, la introducción exitosa de alelos favorables para caracteres de interés productivo, de resistencia a patógenos, para la generación de cultivos monosexo o la obtención de hembras con mayor número de desoves.

### **3.4 Impacto social**

Un mejoramiento a futuro en la producción total de camarón blanco traería consigo incrementos en la oferta laboral a nivel producción y comercialización del sector. En consecuencia, el consumo de estos productos podría ser más accesible para un mayor número de usuarios.

### **3.5 Impacto ambiental**

Si con la aplicación de esta metodología en genes relacionados con el crecimiento y el sistema inmune de *P. vannamei* es posible acortar el tiempo de crecimiento y mejorar la resistencia a enfermedades, se podría obtener una reducción del tiempo de los ciclos de engorda y una mejor respuesta a patógenos, por lo tanto, menos uso de combustibles y medicamentos como antibióticos.

#### 4. HIPÓTESIS

La proteína de fusión Cas9-PvVg, con potencial uso para realizar edición genómica basada en la tecnología CRISPR/Cas9-ReMOT, es capaz de llevar a cabo su actividad endonucleasa *in vitro* e internalizarse en los ovocitos de hembras vitelogénicas del camarón blanco *Penaeus vannamei*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar la actividad endonucleasa *in vitro* de la proteína Cas9-PvVg, así como su internalización en ovocitos del camarón blanco *P. vannamei*.

### 5.2 Objetivos particulares

- 1) Evaluar la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg *in vitro*.
- 2) Analizar la internalización en ovocitos *in vivo* en hembras vitelogénicas del camarón blanco *P. vannamei*.

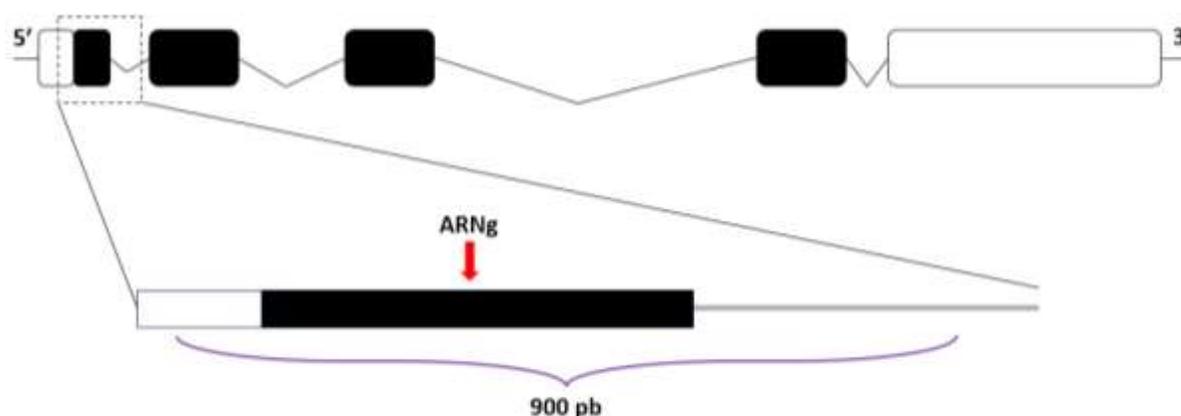
## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Evaluar la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg *in vitro*.

#### 6.1.1 Síntesis de secuencia blanco para ensayo de corte *in vitro*.

Para subclonar la secuencia blanco, se extrajo ADN genómico de tejido muscular de *P. vannamei* usando el método de salting-out (Anexo A).

Como secuencia blanco se eligió una región del exón 1 del gen *fem-1* (GenBank No. de acceso: XM\_027368504.1) (Fig. 3) de *P. vannamei* debido a que ya se contaba con un ARNg específico para esa porción (Marín-Carrasco, 2021). El ARNg fue diseñado y seleccionado bajo los criterios del software CRISPOR (Concordet y Haeussler, 2018). Su síntesis se divide en dos etapas: primero en la síntesis de un molde por medio de PCR y en la transcripción *in vitro* del molde previamente polimerizado. En la primera etapa, dos oligonucleótidos son empleados, uno de ellos (Oligonucleotido FRW) contiene el promotor T7 en su extremo 5' (TAATACGACTCACTATA GGG), seguido de 20 nucleótidos diseñados para el reconocimiento de la secuencia blanco (ARNcr: 5'-CGTTGTGGCGTTGACGTTGGCGG) y 20 más al final que alinean con el segundo oligonucleótido (ARNtracr: 5'-GTTTTAGAGCTAGAAATAGC). El segundo oligonucleótido (Oligonucleotido 2-REV) consiste en los 20 nucleótidos en su extremo 3' complementarios al primer oligonucleótido y 60 nucleótidos más que funcionan como el anclaje del ARNg a la Cas9 (Tabla 3). Los componentes de la PCR para esta etapa fueron: 0.5 U de ADN polimerasa Platinum SuperFi (Invitrogen, Carlsbad, California), 1x de buffer SuperFi 5x, 0.2 mM de dNTPs, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 μM de cada oligonucleótido en un volumen final de 15 μL. Las condiciones de reacción fueron: 98 °C por 2 min, seguido de 33 ciclos de 94 °C por 30 s, 48 °C por 10 s y 72 °C por 5 s.



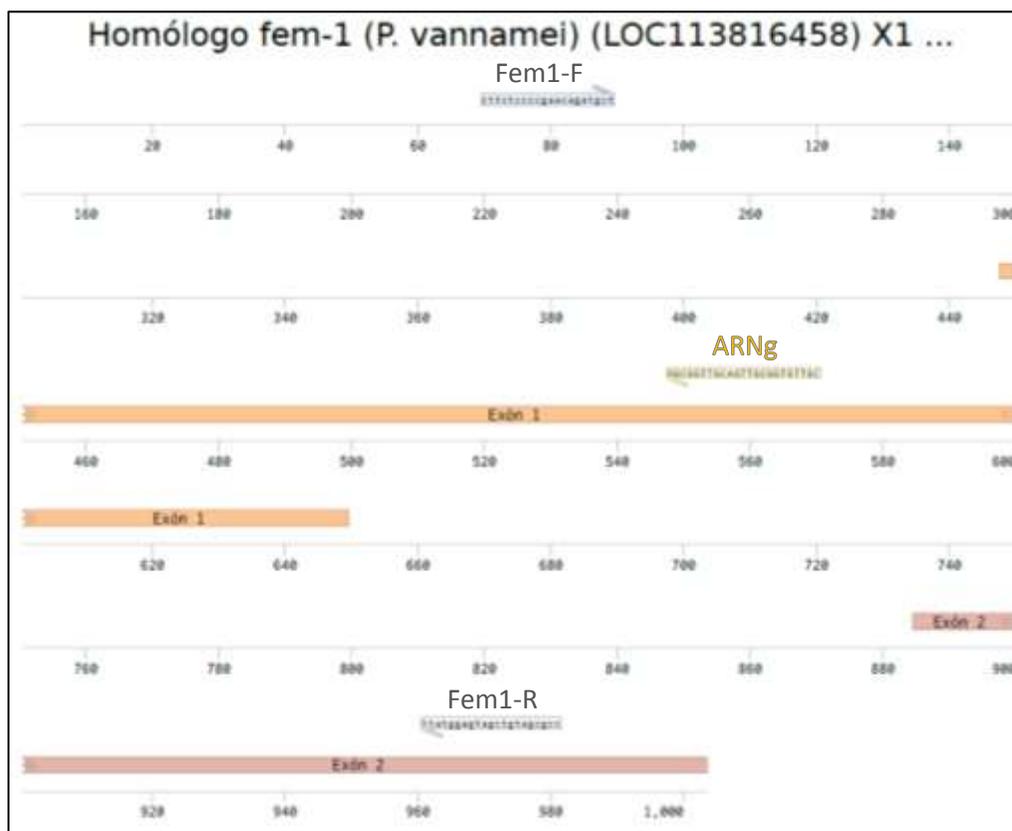
**Figura 3.** Esquema ilustrativo del gen *fem-1* respecto al ARNg y la región amplificada. Cuadros negros=exones, cuadros blancos intrones, flecha roja=sitio de corte del ARNg, llave morada=región amplificada con *primers* *fem1-F* y *fem1-R* (elaboración propia).

**Tabla 3.** Secuencias de oligonucleótidos para la síntesis de ARNg.

(5' – 3')	Promotor T7	ARNcr	ARNtracr
<b>Oligonucleótido</b>	TAATACGACTCACTATA GGG	CGTTGTGGCGTTGACGTTGGCGG	GTTTTAGAGCTAGAAATAGC
<b>FRW</b>			
<b>Oligonucleotido REV</b>			
AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC			

Los *primers* utilizados para obtener región del exón 1 de *fem* fueron *fem1-F*: 5'-CTTCTCCCCGAACAGATGCT y *fem1-R*: 5'- CCGCGATGTCGATGAGGTATT, mismos que fueron diseñados con el software Benchling (2021) (Fig. 4). Estos *primers* se diseñaron para amplificar un fragmento de 900 pb, con el sitio de corte por Cas9 alrededor de los 400 pb, con el fin obtener dos secuencias de alrededor de 400 y 500 pb para su posterior visualización. Para llevar a cabo la reacción de amplificación se usaron 1  $\mu$ L de Buffer 10 $\times$  (Thermofisher, No. de Cat.: 18067017), 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.8  $\mu$ L de mix de dNTPs 10 mM (Promega, No. de Cat.: C1145), 0.06  $\mu$ L polimerasa Taq 5 U/ $\mu$ L (Thermofisher, No. de Cat.: EP0401), 1  $\mu$ L de cada *primer* 10 mM, 1  $\mu$ L de ADN genómico y 5.2  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. Las condiciones para realizar esta amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95° C por 5 min, 35 ciclos de

desnaturalización a 95° C por 30 s, alineamiento a 54° C por 15 s, extensión a 72° C por 2 min y extensión final a 72° C por 5 min.



**Figura 4.-** Ubicación de *primers* y ARNg en el gen *fem-1*.

### 6.1.2 Actividad endonucleasa *in vitro* del complejo Cas9-PvVg/ARNg

Se utilizaron dos variantes de Cas9: Cas9-PvVg desarrollada por Castro-Obeso (2021) y producida a gran escala por un servicio de producción de proteínas recombinantes (GenScript), y una Cas9 comercial para usarla como control positivo (Sigma-Aldrich: CAS9PROT-50UG). La construcción de Cas9-PvVg consistió en ubicar el péptido reportado por Roth *et al.* (2013) dentro de la secuencia de vitelogenina de *P. vannamei* y diseñar *primers*, que contenían los sitios de restricción para *Bam*HI y *Sac*I, para subclonar esa secuencia nucleotídica. Posteriormente, se realizaron digestiones enzimáticas con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I tanto a la secuencia subclonada como del plásmido pET28a-Cas9 (Addgene, No. de acceso: 53261). Por último, ambas fueron ligadas con ADN ligasa T4 (New England Biosciences, No. de Cat.: M0202) (Anexo B). El ensayo *in vitro* de la actividad endonucleasa se realizó utilizando el kit Guide-it

sgRNA In Vitro Transcription Screening™ (Takara). En breve 1 µL de Cas9 (PvVg o comercial) con 0.5 µL de ARNg se incubó a 37° C por 5 min, para formar el complejo Cas9-ARNg. Este complejo fue a su vez mezclado con 1.5 µL de Buffer de reacción 10×, 10 µL de agua libre de nucleasas y 2 µL del producto de PCR de la secuencia blanco e incubados a 37° C por 1 h, seguido de 80° C por 5 min. Se probaron dos concentraciones de Cas9-PvVg, 50 y 100 ng/µL. Al mismo tiempo, se utilizaron como control negativo el amplicón de 900 pb y como control positivo el resultado del corte de la Cas9 comercial (33 ng/µL). Los resultados se visualizaron a través de un gel de electroforesis de agarosa al 2%.

## **6.2 Analizar la internalización en ovocitos *in vivo* en hembras vitelogénicas del camarón blanco *P. vannamei*.**

### **6.2.1 Material biológico.**

Las hembras vitelogénicas de *P. vannamei*, así como la infraestructura para mantenerlas, fueron otorgados por la empresa productora Larvas Oceánicas. Se seleccionaron 13 organismos con base en el desarrollo gonadal observado a simple vista, siguiendo los criterios usados en otros trabajos (Tan-Fermin y Pudadera, 1989; Palacios *et al.*, 2003): nueve para ser inyectadas con Cas9-PvVg (tres en estadio de maduración gonadal temprano, tres en estadio intermedio y tres en estadio tardío), dos en estadio indistinto para el control cloroquina/PBS y dos en estadio indistinto para el control PBS. Se mantuvieron en contenedores de 1000 L con agua salina filtrada, a una temperatura de 27° C, con aireación constante.

### **6.2.2 Ensayo de toxicidad del agente disruptor endosomal cloroquina**

Se realizó un ensayo de toxicidad a la cloroquina para definir una concentración inocua. Se obtuvieron 330 ejemplares de *P. vannamei* de alrededor de 10 g, los cuales pasaron por un periodo de aclimatación de 8 días, con aireación constante, alimentación tres veces al día y recambios de agua usando agua filtrada y tratada con rayos UV. Se realizaron pruebas de PCR para diversos virus (WSSV, AHPND, TSV e IHNV) y cultivos microbiológicos para la detección de bacterias patógenas.

Para el ensayo se probaron tres dosis de cloroquina (5  $\mu\text{g/g}$ , 0.5  $\mu\text{g/g}$  y 0.05  $\mu\text{g/g}$ ), las cuales abarcaban las dosis usadas en los reportes previos de ReMOT (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2018; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2020; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2023; Heu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2023; Macias *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022; Shirai *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). En paralelo, se mantuvo un grupo control inyectado solo con solución salina 2.5% y otro grupo control sin inyectar. Los organismos fueron inyectados en el seno ventrolateral utilizando agujas de insulina calibre 31G  $\times$  6 mm.

### **6.2.3 Preparación de soluciones a inyectar para los ensayos *in vivo* en hembras de *P. vannamei*.**

Se preparó una solución de trabajo con las siguientes concentraciones: 0.8  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de Cas9-PvVg (43.1  $\mu\text{L}$ ), 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de cloroquina previamente filtrada (12  $\mu\text{L}$ ) y PBS 10 $\times$  estéril (60  $\mu\text{L}$ ) (Anexo C). A la mezcla se le añadieron una gota de azul de metileno y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 600  $\mu\text{L}$ . De la misma manera se prepararon las soluciones de trabajo para los grupos control. Una de ellas con cloroquina 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , PBS 1 $\times$  y azul de metileno, y la otra con PBS 1 $\times$  y azul de metileno.

### **6.2.4 Ensayos *in vivo* en hembras vitelogénicas de *P. vannamei***

Con la finalidad de que todos los organismos recibieran las mismas dosis de Cas9-PvVg (1  $\mu\text{g/g}$ ) y cloroquina (5  $\mu\text{g/g}$ ), estos fueron inicialmente pesados y volúmenes específicos fueron inyectados. Las hembras fueron aletargadas colocándolas sobre una cama de hielo por lo menos 3 min e inyectadas intramuscularmente (entre el cuarto y quinto segmento abdominal), usando jeringas para insulina calibre 31G  $\times$  6 mm. La presencia del azul de metileno permitió observar la penetración de la solución al tejido (Anexo D).

### **6.2.5 Inmunohistología de tejido gonadal de *P. vannamei***

Se tomaron muestras de tejido gonadal 12 horas post inyección. Para ello, las hembras fueron aletargadas primero en agua con hielo durante por lo menos 3 min. Luego se colocaron en una cama de hielo otros 3 min. Posteriormente se realizó un pequeño corte en la parte inferior, en

la unión del cefalotórax y el abdomen (Anexo E), con el objetivo de cortar el cordón nervioso y disminuir la sensibilidad del animal. Se cortaron secciones del exoesqueleto del cefalotórax, así como del tejido muscular y conectivo que se encontraba debajo, para dejar al descubierto la gónada (Anexo F). Pequeños fragmentos de esta se colocaron en casetes histológicos y se fijaron en paraformaldehído 4% en PBS 2× y 0.5% de tritón X-100 (pH: 7.4) (Anexo G), durante 36 h a 4°C. Los tejidos se deshidrataron en inmersiones de etanol con concentraciones ascendentes: 70%-12 h, 70%-1 h, 80%-1 h, 90%-1 h, 96%-1 h, 100%-30 min (×3). Posteriormente pasaron por un proceso de diafanización: xileno-etanol absoluto (1:1)-1 h, xileno 100%-1 h (×2). Tuvieron tres inmersiones en parafina fresca de una hora y luego fueron incluidas en bloques de parafina usando un centro de inclusión LEICA EG1150 H.

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de 4 μm con un microtomo LEICA RM2155 y se colocaron sobre portaobjetos. Una serie de laminillas se destinó a tinción con hematoxilina y eosina para la corroboración del estadio gonadal (Anexo H); aquellos destinados a las inmunotinciones se desparafinizaron con tres inmersiones en xileno de 10 min y dos en solución xileno:etanol (1:1) de 2 min, se rehidrataron en inmersiones de etanol con concentraciones descendientes: 100%-2 min (×2), 96%-2 min (×2), 90%-2 min (×2), 80%-2 min (×2), 70%-2 min (×2). Por último, dos inmersiones de 2 min en agua destilada.

Una vez rehidratados, los cortes se permeabilizaron en PBS 1× con 0.5% de tritón X-100 durante 10 min. Se sumergieron en 3% de BSA en PBS 1× durante 1 h, a 37° C, con una agitación de 5 rpm para bloquear posibles sitios de unión inespecífica. Luego se incubaron con el anticuerpo anti-Cas9 (Santa Cruz Biotechnologies. CAT: 517386) disuelto en la solución 3% BSA/PBS 1×, en cámara húmeda, a 37° C, durante 3 h. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (CTR Scientific, CAT: AB150113) disuelto en 3% BSA/PBS 1×, durante toda la noche a 4° C, en cámara húmeda y en oscuridad. Para cada incubación con anticuerpos se realizaron cinco lavados con PBS 1× de 1 min. Por último, se montaron usando el medio Vectashield (CTR Scientific, CAT: H-1700-2) durante 2 h, para ser visualizados con un microscopio de fluorescencia confocal LEICA TCS DMI8. Por último, se tomaron laminillas representativas de cada estadio de desarrollo gonadal se desparafinizaron con tres inmersiones

en xileno de 10 min, dos en solución xileno:etanol (1:1) de 2 min y se montaron con medio Vectashield por 2 h. Esto para observar la autofluorescencia natural del tejido y evitar falsos positivos (Palasin *et al.*, 2014). Aspectos detallados del protocolo de inmunohistología en gónada de camarón se pueden encontrar en el Anexo I.

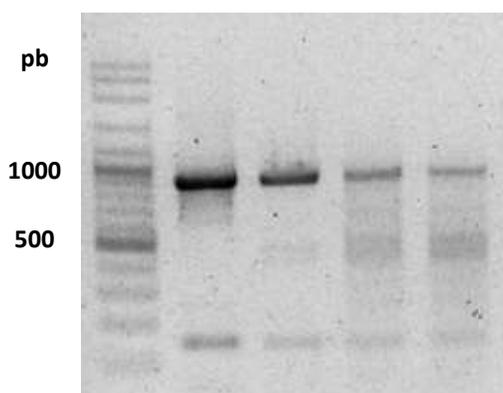
Las imágenes obtenidas, excepto las destinadas a observar autofluorescencia y los controles negativos, fueron procesadas con el software Leica Application Suite X Versión 3.5.7.23225 (2020). Se ajustó la luminosidad de la fluorescencia, para eliminar aquella correspondiente a la autofluorescencia del tejido para solo capturar las señales más intensas correspondientes a los anticuerpos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Evaluar la actividad endonucleasa de Cas9-PvVg *in vitro*

#### 7.1.1 Actividad endonucleasa *in vitro* del complejo Cas9-PvVg/ARNg

La proteína recombinante Cas9-PvVg se muestra activa enzimáticamente, ya que al usar el mismo ARNg que la Cas9 comercial, ambas liberan dos fragmentos con los tamaños esperados de 500 y 400 pb (Fig. 5).



**Figura 5.** Corte *in vitro* de Cas9-PvVg. Carril 1: marcador molecular, carril 2: amplicón control negativo, carril 3: producto de corte de Cas9 comercial (33 ng/μL), carril 4: producto de corte de Cas9-PvVg (50 ng/μL) y carril 5: productos de corte de Cas9-PvVg (100 ng/μL).

### 7.2 Analizar la internalización en ovocitos *in vivo* en hembras vitelogénicas del camarón blanco *P. vannamei*

#### 7.2.1 Ensayo de toxicidad del agente disruptor endosomal cloroquina.

Durante esta aclimatación se registraron mortalidades diarias, acumulándose un 39% al final. Las pruebas de detección de virus demostraron presencia de IHNV y las pruebas microbiológicas mostraron una infección bacteriana presuntamente por *Vibrio harveyi*.

Al finalizar el periodo de aclimatación se seleccionaron 60 individuos que no mostraran signos clínicos de infección y se dividieron en 10 tanques bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas.

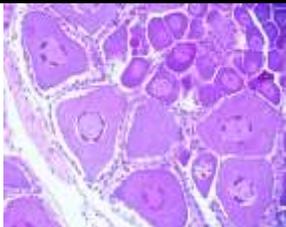
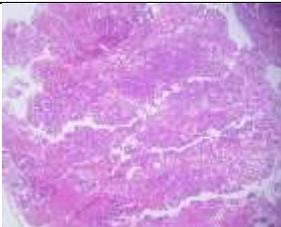
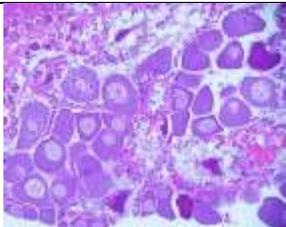
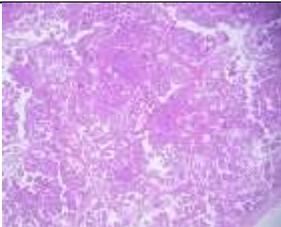
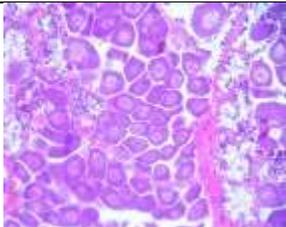
Posterior a las inyecciones con cloroquina, se mantuvieron en observación durante 24 h, en las cuales no se observaron cambios en el comportamiento ni se registraron muertes en los grupos

inyectados con la cloroquina. Solo se presentaron dos muertes en el grupo de no inyectados, presuntamente por infección bacteriana. Esto nos permitió establecer como dosis segura la de 5  $\mu\text{g/g}$ .

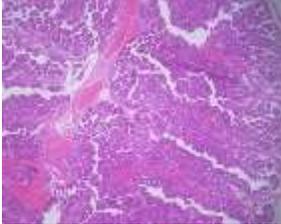
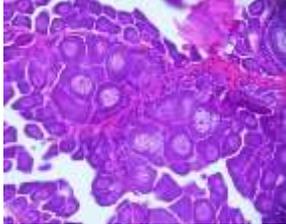
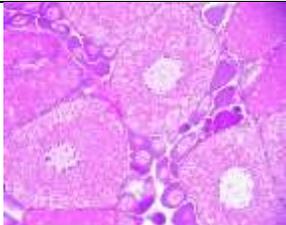
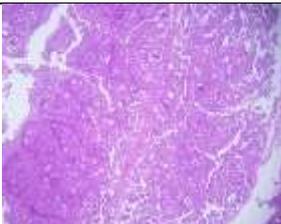
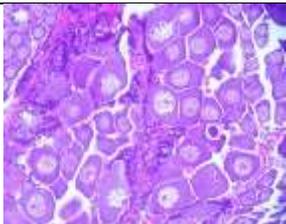
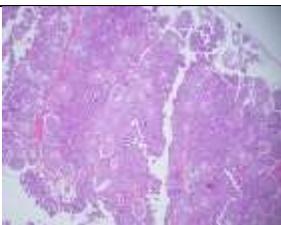
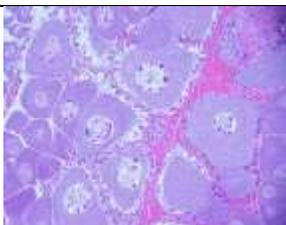
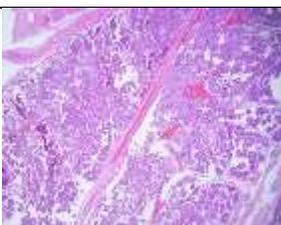
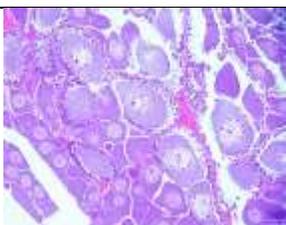
### 7.2.2 Histología de tejido gonadal de hembras de *P. vannamei* inyectadas.

Las imágenes obtenidas de los cortes con tinción de hematoxilina y eosina mostraron estadios de maduración gonadal que corresponden a los estimados por observación externa, a excepción del organismo 9, el cual se estimó como estadio intermedio, pero muestra características de ser estadio inicial (Tabla 4) (Arcos *et al.*, 2011; Yano, 1988). A su vez, se pudieron catalogar bajo la nomenclatura propuesta por Arcos *et al.* (2011) de previtelogénesis, vitelogénesis primaria, secundaria y maduración.

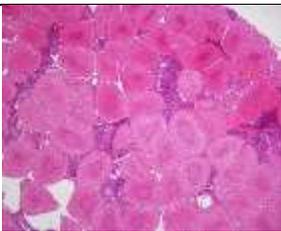
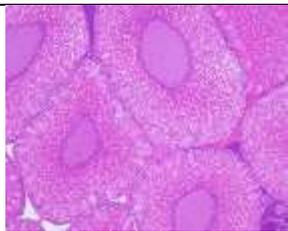
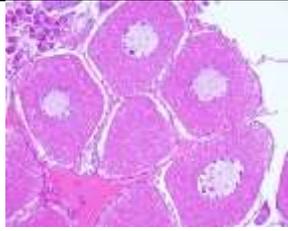
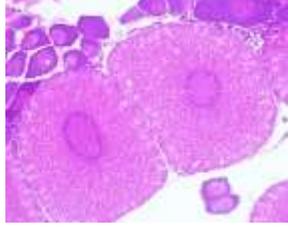
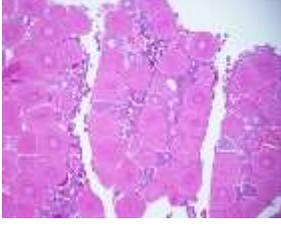
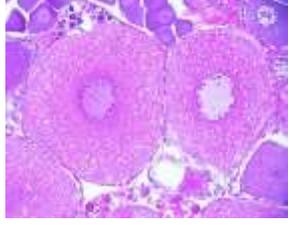
**Tabla 4.** Imágenes de tinciones HyE de tejido gonadal de *P. vannamei*.

Organismo	Estadio esperado	Estadio de acuerdo con Arcos <i>et al.</i> (2011) y Yano (1988)	10X	40X
1 (PBS)	Intermedia	Intermedia (vitelogénesis primaria)		
2 (PBS)	Intermedia	Intermedia (vitelogénesis primaria)		
3 (Cas9)	Inicial	Inicial (previtelogénesis)		

**Tabla 4.** Continuación

4 (Cas9)	Inicial	Inicial (previtelogénesis)		
5 (Cas9)	Inicial	Inicial (previtelogénesis)		
6 (Cas9)	Tardía	Tardía (vitelogénesis secundaria)		
7 (Cas9)	Intermedia	Intermedia (vitelogénesis primaria)		
8 (Cas9)	Intermedia	Intermedia (vitelogénesis primaria)		
9 (Cas9)	Intermedia	Inicial (previtelogénesis)		

**Tabla 4.** Continuación

10 (Cas9)	Tardía	Tardía (vitelogénesis secundaria)		
11 (Cas9)	Tardía	Tardía (vitelogénesis secundaria)		
12 (Cloroquina)	Tardía	Tardía (vitelogénesis secundaria)		
13 (Cloroquina)	Tardía	Tardía (vitelogénesis secundaria)		

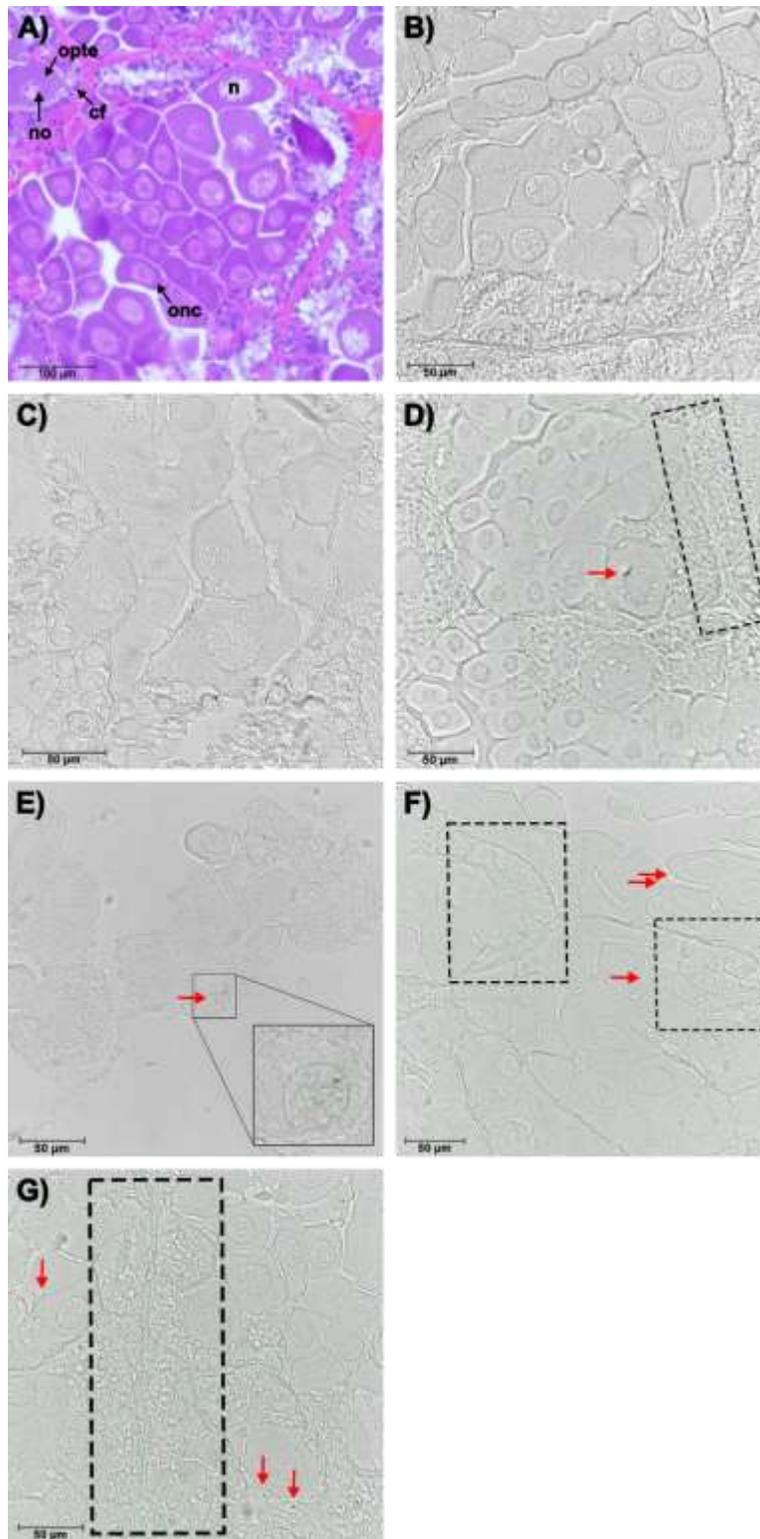
### 7.2.3 Inmunohistología de tejido gonadal de *P. vannamei*.

De los 9 organismos inyectados con Cas9-PvVg, 6 de ellos (réplicas biológicas) mostraron reacción antígeno-anticuerpo. En algunos casos, en más de una laminilla (réplicas técnicas). Los estadios que mostraron esta reacción positiva fueron iniciales o previtelogénicos (Fig. 6, 7, 8 y 9) y tardíos o en vitelogénesis secundaria (Fig. 10 y 11). Todas las imágenes de fluorescencia mostradas fueron tomadas usando los mismos parámetros de intensidad de láser (5.07% de intensidad, 488 nm) y amplificación (40×) del microscopio.

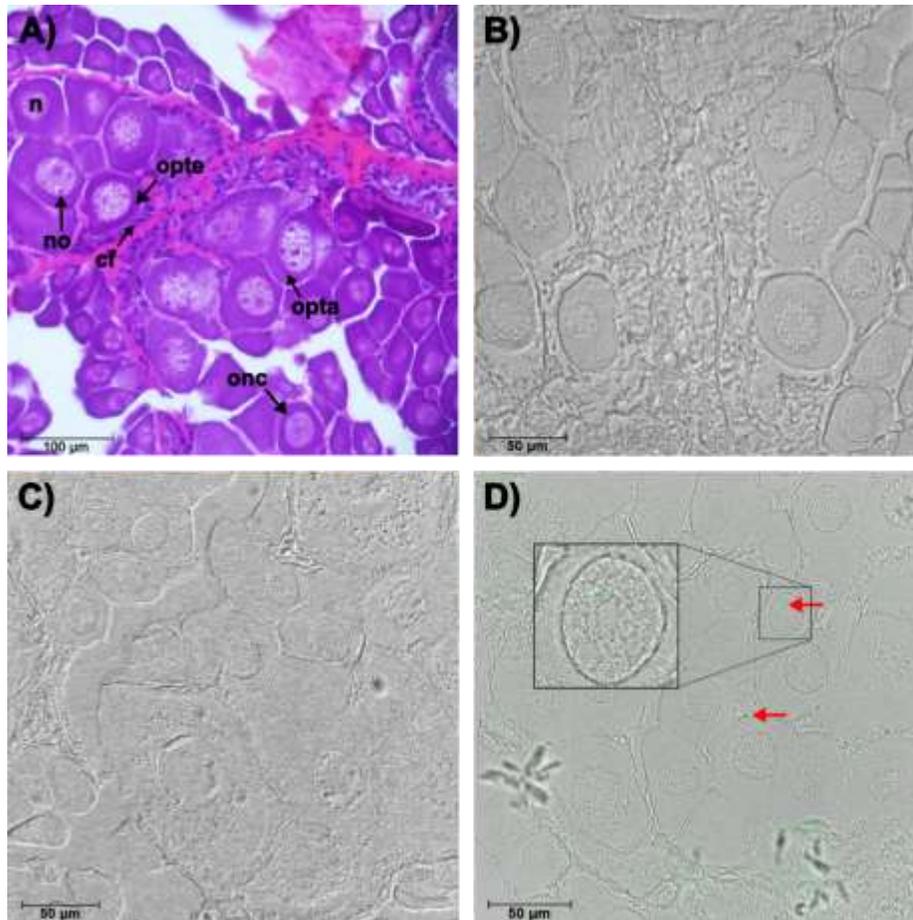
En la mayoría de las detecciones, las emisiones fluorescentes se encontraron en la matriz extracelular, ya sea por donde se transporta la hemolinfa o en la periferia de la membrana celular de los ovocitos. En algunos casos la detección se observó dentro de los ovocitos (Fig. 6D, 8D, 10D, 11D-E), incluso dentro del núcleo (Fig. 6E, 7D).

Para evitar falsos positivos, dada la naturaleza autofluorescente del tejido (Palasin *et al.*, 2014), se procesaron muestras solo hasta la desparafinación y se montaron para su visualización (incisos B de cada figura). Los incisos C representan las imágenes correspondientes a los controles negativos siendo las inyecciones de PBS 1× para el caso del estadio previtelogénico y PBS 1× más cloroquina 5 µg/g para el estadio de vitelogénesis secundaria. En todas las visualizaciones de estos controles solo se observaron emisiones fluorescentes similares a sus respectivas imágenes de autofluorescencia.

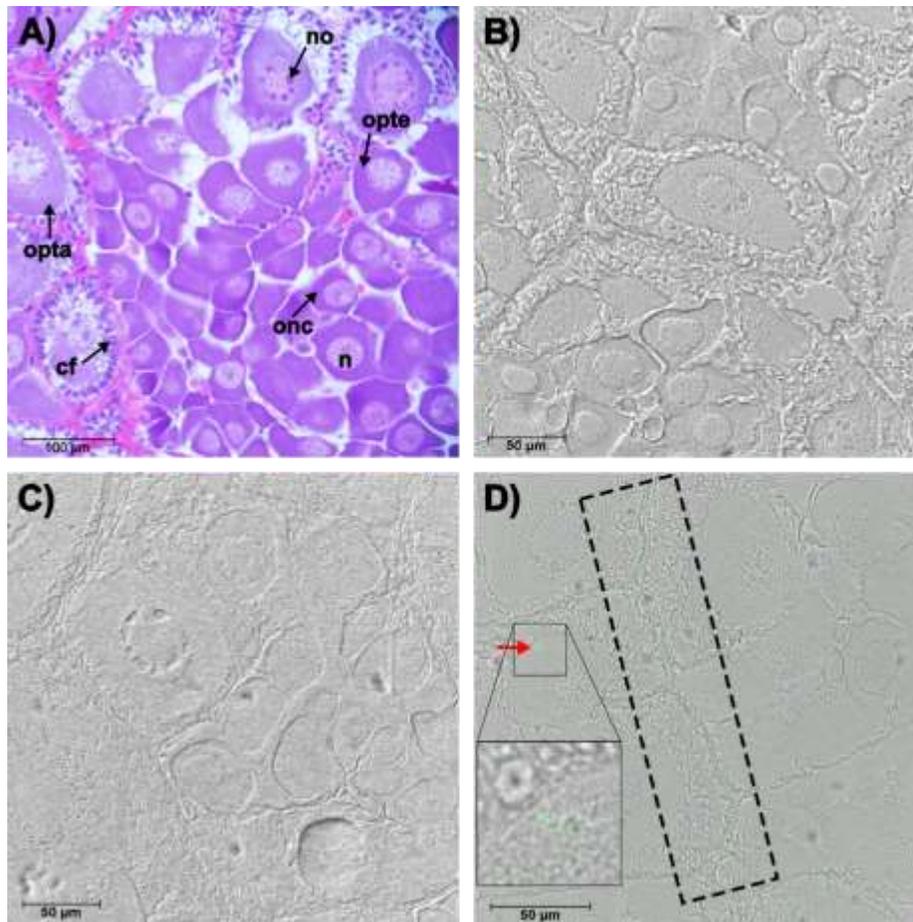
Tanto las imágenes de autofluorescencia como las de los controles negativos son mostradas sin modificación alguna. Al resto se les ajustó la intensidad de fluorescencia con el software Leica Application Suite X Versión 3.5.7.23225 (2020), para eliminar el ruido de fondo correspondiente a la autofluorescencia del tejido.



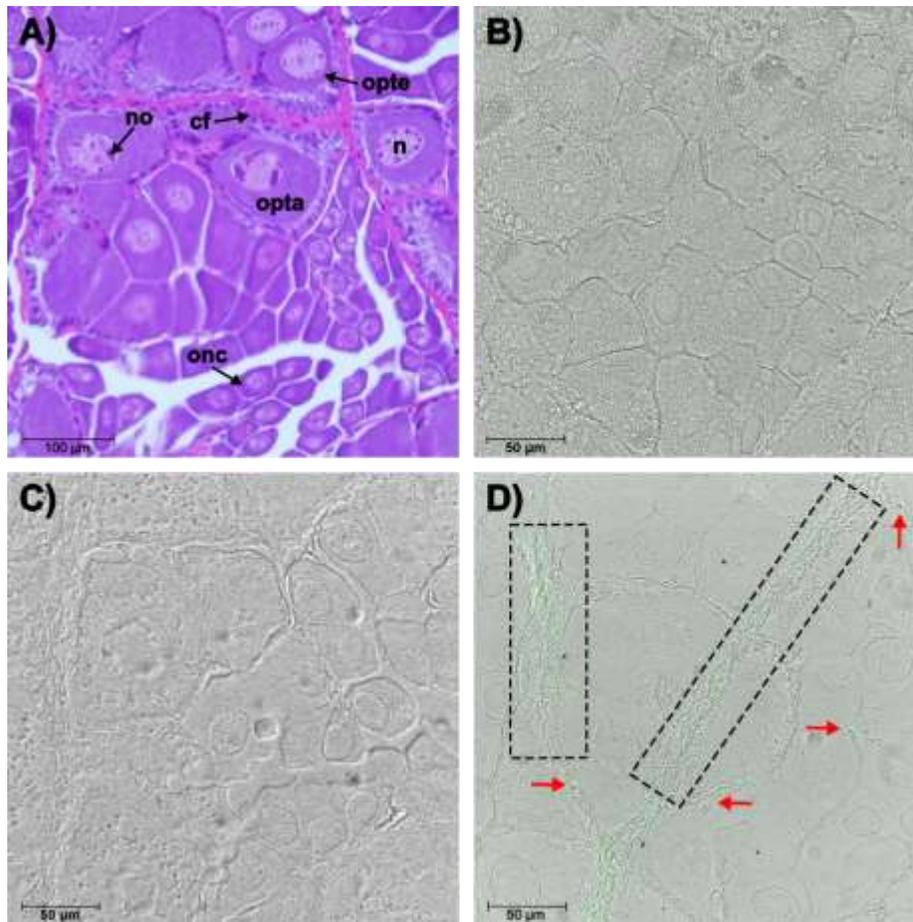
**Figura 6.** Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico. **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1×. **D, E, F, G)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales, recuadros negros indican detecciones extensas. Ovocito con nucleolo de cromatina (onc), ovocito perinuclear temprano (opte), núcleo (n), nucleolo (no), células foliculares (cf).



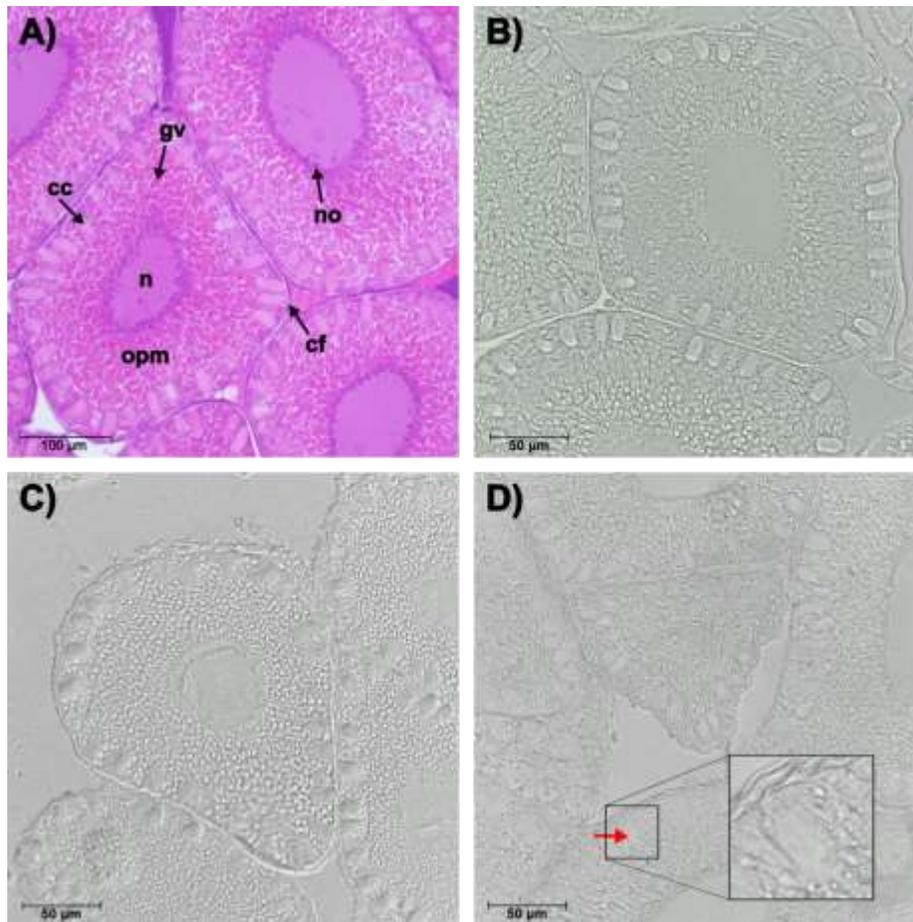
**Figura 7.** Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (2). **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1x. **D)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales. Ovocito con nucleolo de cromatina (onc), ovocito perinuclear temprano (opte), ovocito perinuclear tardío (opta), núcleo (n), nucleolo (no), células foliculares (cf).



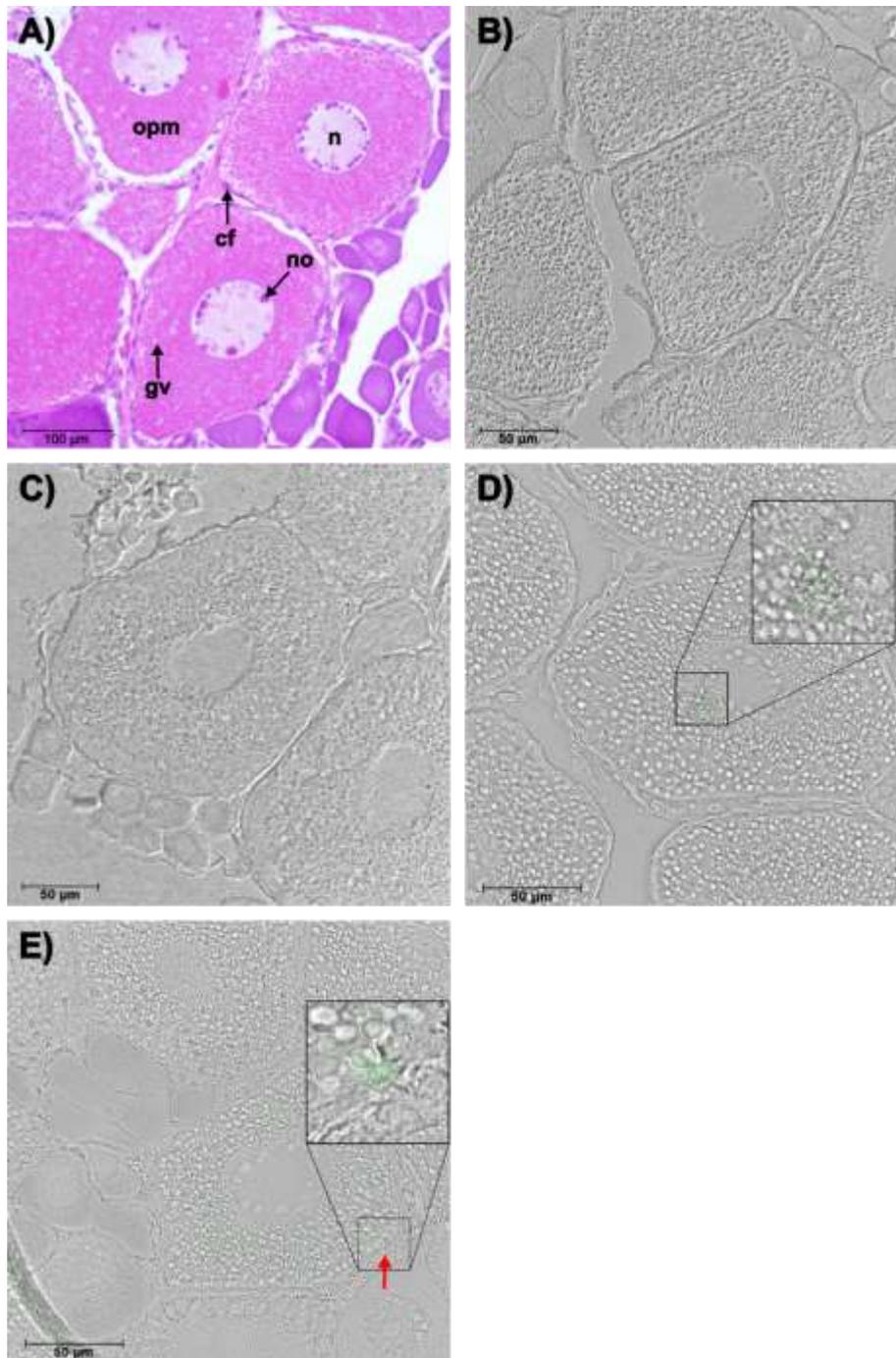
**Figura 8.** Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (3). **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1x. **D)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales, recuadros negros indican detecciones extensas. Ovocito con nucleolo de cromatina (onc), ovocito perinuclear temprano (opte), ovocito perinuclear tardío (opta), núcleo (n), nucleolo (no), células foliculares (cf).



**Figura 9.** Inmunotinciones de ovario en estadio previtelogénico (4). **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1x. **D)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales, recuadros negros indican detecciones extensas. Ovocito con nucleolo de cromatina (onc), ovocito perinuclear temprano (opte), ovocito perinuclear tardío (opta), núcleo (n), nucleolo (no), células foliculares (cf).



**Figura 10.** Inmunotinciones de ovario en estadio de vitelogénesis secundaria. **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1x y cloroquina 5µg/g. **D)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales. Ovocito premaduro (opm), célula folicular (cf), núcleo (n), nucleolo (no), cripta cortical (cc), granulo de vitelo (gv).



**Figura 11.** Inmunotinciones de ovario en estadio de vitelogénesis secundaria (2). **A)** Tinción hematoxilina y eosina. **B)** Autofluorescencia de tejido desparafinado. **C)** Control inyectado con PBS 1× y cloroquina 5 µg/g. **D, E, F)** Inmunodetección de Cas9-PvVg 12 h post-inyección. Las flechas rojas señalan detecciones puntuales. Ovocito premaduro (opm), célula folicular (cf), núcleo (n), nucleolo (no), granulo de vitelo (gv).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se adecuó y aplicó la técnica ReMOT en el camarón blanco *Penaeus vannamei*, donde una variante de Cas9 fusionada a la porción de la vitelogenina ligando de su receptor (Cas9-PvVg) fue capaz de internalizarse en ovocitos de hembras adultas de esta especie e incluso translocarse al núcleo. La técnica ReMOT ha sido utilizada y ajustada para artrópodos de las clases *Insecta* y *Arachnida* (Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2018; Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2020; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2023; Heu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2023; Lozano-Fernandez *et al.*, 2019; Macias *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022; Shirai *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). Algunos de ellos organismos modelo, como *Aedes aegypti* y otros que representan transmisores de enfermedades o plagas, como *Ixodes scapularis*, *Bemisia tabaci* y *Diaphorina citri*; en general todos de tamaños relativamente pequeños. Estos resultados obtenidos en *P. vannamei* demuestra la adaptabilidad y potencial de la técnica en organismos de mayor tamaño y de importancia económica. Además de que Cas9-PvVg conservó su actividad endonucleasa *in vitro*.

El ensayo de corte *in vitro* fue llevado a cabo mediante el kit Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Screening™ de Takara, siendo notable la única excepción de no utilizar BSA. Este protocolo presenta similitudes con el utilizado por Chaverra-Rodríguez *et al.* (2018), quienes utilizaron el kit de PNA BIO para evaluar su versión de Cas9 y obtuvieron resultados exitosos. A pesar de la omisión del uso de BSA en nuestro protocolo, es posible apreciar la actividad endonucleasa tanto de Cas9-PvVg como de la Cas9 comercial aun cuando su actividad endonucleasa no fue capaz de fragmentar por completo la secuencia sustrato. Esta eficiencia parcial, podría ser una consecuencia de no haber incluido el uso de BSA, dado que fue la única diferencia con respecto al método empleado por Chaverra-Rodríguez *et al.* (2018). Este hallazgo resalta la necesidad continua de optimización y estandarización de los protocolos experimentales para garantizar la reproducibilidad y la comparabilidad entre diferentes estudios.

Por otro lado, la selección de las concentraciones de cloroquina en este estudio se basó en la información previa proporcionada por ReMOT, aunque es importante destacar que todos los

trabajos relacionados hasta ahora se han realizado en animales de tamaños considerablemente más pequeños que el camarón en cuestión. La cloroquina, una sustancia que ha sido ampliamente utilizada en el sector acuícola en peces, generalmente se administra en concentraciones seguras de 10-20 mg/L. Se ha observado que la toxicidad aumenta con concentraciones más altas y tiempos de exposición prolongados, superiores a las 24 horas (Ramesh *et al.*, 2018).

En un estudio reciente, la cloroquina se utilizó como agente disruptor endosomal en *Macrobrachium rosenbergii*, utilizando concentraciones finales de 2  $\mu$ M, y no se informaron efectos adversos (Cohen *et al.*, 2023). Estos resultados son consistentes con las concentraciones de cloroquina empleadas en este proyecto, ya que se sitúan muy por debajo de los niveles considerados nocivos, e incluso por debajo de los niveles seguros establecidos en estudios anteriores.

La aplicación exitosa y segura de la cloroquina en otros organismos acuáticos, como *Macrobrachium rosenbergii*, a concentraciones similares a las utilizadas en este estudio, sugiere una amplia tolerancia en diferentes especies acuáticas. Esto respalda la idea de que el uso de cloroquina en *P. vannamei*, a concentraciones aún más bajas, se mantiene dentro de rangos seguros y minimiza el riesgo de posibles efectos adversos. Sin embargo, es crucial continuar monitoreando y evaluando cualquier impacto potencial en la salud y el comportamiento de los camarones, y se sugiere la realización de estudios a largo plazo para confirmar la seguridad a lo largo del tiempo.

El fragmento de la proteína vitelogenina seleccionado, basado en los resultados de Roth *et al.* (2013) obtenidos en *M. rosenbergii*, resultó suficiente para otorgarle a Cas9-PvVg la capacidad de internalizarse en los ovocitos en hembras adultas de *Penaeus vannamei*. Para evitar falsos positivos por la autofluorescencia natural en este tipo de tejido (Palasin *et al.*, 2014), las imágenes obtenidas fueron ajustadas usando el software Leica Application Suite X Versión 3.5.7.23225 (2020), para eliminar el ruido de fondo que generaba esta fluorescencia, a excepción de las correspondientes a las de autofluorescencia y los controles negativos, que se

muestran sin modificación alguna. Sin embargo, la detección de Cas9-PvVg en las muestras de tejido gonadal fue poco frecuente, ya que de 66 cortes histológicos solo hubo 10 detecciones. Además, estas detecciones se vieron menos generalizadas que los trabajos anteriores de ReMOT, en los que se aprecia la fluorescencia en toda la extensión de los ovocitos (Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2018; Chaverra-Rodriguez *et al.*, 2020; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2023; Heu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2023; Macias *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022; Shirai *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). Dentro de las variables que pudieron impactar en una mayor detección es el tiempo entre la aplicación y la toma de muestra, dado que todos los estudios sobre ReMOT diseccionaron tejido a partir de las 24 h post-inyección, comparado a la espera de 12 h en este trabajo. Una hipótesis es que la dosis empleada (1 µg/g) haya sido un factor determinante en los resultados obtenidos. Este aspecto cobra relevancia al compararse con otro estudio en el que se administró a hembras adultas del camarón *Fenneropenaeus merguensis* una proteína recombinante con la capacidad de internalizarse en los ovocitos. En dicho trabajo, las dosis utilizadas superaron los 4 µg/g, y la detección de la proteína se observó de manera más amplia en el tejido gonadal (Palasin *et al.*, 2014).

Dentro del conjunto de detecciones obtenidas, algunas lograron visualizarse en los núcleos de los ovocitos. Este fenómeno sugiere la persistencia de la funcionalidad de la secuencia de localización nucleolar presente en la secuencia original de Cas9, extraída del vector pET28a-Cas9 (Addgene, No. de acceso: 53261; Castro-Obeso, 2021).

Un patrón discernible en las detecciones de Cas9-PvVg fue la mayor frecuencia de estas en organismos en estadios previtelogénicos. Esta tendencia podría atribuirse a la competencia por el sitio de unión del receptor de vitelogenina. La concentración de vitelogenina en circulación y la síntesis de su receptor en los ovocitos aumentan de manera paralela a medida que los ovocitos avanzan en su maduración (Arcos *et al.*, 2011; Ruan *et al.*, 2020). Por lo tanto, en estadios previtelogénicos, aunque la cantidad de receptores en las membranas sea menor, la cantidad de vitelogenina que llega a los ovarios también es menor, lo que podría haber facilitado la competencia exitosa de las concentraciones de Cas9-PvVg utilizadas.

Cabe destacar que la mayoría de las detecciones en el estadio previtelogénico ocurrieron en la periferia de los ovocitos o en el espacio intercelular, por donde se moviliza la hemolinfa. Este fenómeno podría explicarse por el crecimiento significativo de los ovocitos en estadios más avanzados de maduración gonadal, resultando en la casi desaparición de los espacios intercelulares. La observación de detecciones en la periferia y en el espacio intercelular destaca la dinámica de movilidad de Cas9-PvVg en función de la maduración gonadal, ofreciendo valiosas perspectivas sobre los posibles mecanismos de interacción en distintos estadios de desarrollo.

Recientemente una metodología desarrollada por Cohen *et al.* (2023) presentó similitudes con la aplicada en este proyecto, donde utilizaron el péptido reportado por Roth *et al.* (2013) que interactúa con el receptor de vitelogenina del langostino *M. rosenbergii*. La diferencia clave radica en la introducción de ARN de interferencia (ARNi) mediante adhesión electrostática con el péptido, inyectándolo en hembras previtelogénicas. Sin embargo, la comparación directa de los resultados se ve limitada por las disparidades en el tiempo de aplicación *in vivo*.

Cohen *et al.* (2023) prolongaron la aplicación *in vivo* durante algunos días hasta el desove, para evaluar la progenie fenotípicamente, mientras que en este proyecto se tomaron muestras apenas 12 horas después de la inyección. Además, llevaron a cabo aplicaciones en cultivos de tejido gonadal, evaluando estas 5 horas post incubación. Este último ensayo reveló que la internalización de los componentes era dependiente de la dosis, mostrando que, a mayor concentración de proteína aplicada, mayor era la internalización.

Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las detecciones menos generalizadas en el trabajo actual podrían atribuirse al efecto combinado de una concentración baja de proteína con el tiempo reducido de internalización y el suministro de una única dosis. Es interesante notar cómo el tiempo de evaluación y la concentración de la proteína aplicada pueden influir significativamente en los resultados obtenidos, destacando la importancia de considerar estos factores al interpretar y comparar los datos entre diferentes estudios, así como para futuras aplicaciones.

Respecto a otros métodos de entrega del sistema CRISPR, ReMOT resuelve desventajas en la aplicación en *P. vannamei* como la necesidad de equipo especializado, de tiempo de aplicación y daño celular que tienen la microinyección y la electroporación (Marín-Carrasco, 2021; Sun *et al.*, 2005). Por su parte, comparado con métodos de entrega masivos como el uso de nanopartículas y reactivos de transfección (Men *et al.*, 2024), el uso de ReMOT evita el proceso de recolección y mantenimiento de embriones. Dado que para aplicar la metodología de Men *et al.* (2024) a un desove completo, habría que filtrar decenas de litros de agua donde normalmente se realizan los desoves, mientras que ReMOT puede ser aplicado a todo un desove en una sola inyección. Sin embargo, como se ha visto en los trabajos anteriores, el aplicarlo a una hembra no garantiza que todos los gametos internalicen o sean modificados genéticamente, por lo que el análisis de cada progenie es necesario para corroborar eventos de éxito (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2018; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2020; Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2023; Heu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2023; Macias *et al.*, 2020; Sharma *et al.*, 2022; Shirai *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). Finalmente, aun cuando la proteína Cas9-PvVg mostro ser capaz de internalizarse en ovocitos de *P. vannamei*, su potencial como herramienta de edición genómica aún necesita ser evaluada y optimizada.

Así mismo, futuros ensayos a concentraciones más altas de la proteína y tiempos más largos entre la administración y la toma de muestras deben ser realizados. También incluir un grupo control al cual se le administre la variante nativa de Cas9 y evaluar la posibilidad de aplicar la técnica DIPA, que ha mostrado ser suficiente para la transducción a ovocitos no mediada por receptor (Shirai *et al.*, 2022; Shirai *et al.*, 2023); trabajos en los cuales la inyección del sistema CRISPR/Cas9, sin el ligando de vitelogenina, a hembras de vitelogénicas de *Blattella germanica* y *Aedes aegypti* ha sido suficiente para que el sistema se internalice a los ovocitos. Sin embargo, la técnica DIPA ha tenido sus excepciones (Chaverra-Rodríguez *et al.*, 2020; Heu *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2023).

## 9. CONCLUSIONES

La proteína Cas9-PvVg construida a partir de una Cas9 nativa y el fragmento ligando de la vitelogenina de *P. vannamei*, tiene la capacidad de llevar a cabo su actividad endonucleasa *in vitro* y de internalizarse en ovocitos, así como en sus núcleos, de hembras adultas *in vivo*. Optimizaciones a la metodología son necesarias para ajustar dosis y tiempos de acción, así como otro tipo de análisis que corroboren la presencia de Cas9-PvVg, por ejemplo, ensayos de Western blot de extractos proteicos de tejido gonadal y otros tejidos del organismo. Aún con las limitantes mencionadas, este trabajo presenta una herramienta biotecnológica con el potencial de realizar edición genómica en *P. vannamei*.

## 10. LITERATURA CITADA

- Adhikari, P. y Poudel, M. (2020). CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. *Malaysian Journal of Halal Research*, 3(1): 6-16.
- Arao, T., Kato, Y., Nong, Q. D., Yamamoto, H., Watanabe, H., Matsuura, T., Tatarazako, N., Tani, K., Okamoto, A., Matsumoto, T. y Watanabe, H. (2020). Production of genome-edited *Daphnia* for heavy metal detection by fluorescence. *Scientific Reports*, 10(1): 1-10.
- Arcos, F. G., Ibarra, A. M. y Racotta, L. S. (2011). Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus (Penaeus) vannamei* shrimp. *Aquaculture*, 316(1-4): 93-98.
- Babin, P. J., Carnevali, O., Lubzens, E. y Schneider, W. J. (2007). Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. En: *The fish oocyte: from basic studies to biotechnological applications*. Springer, Berlin, pp. 39-76.
- Benchling [Biology software]. (2021). Disponible en: <https://benchling.com> [consulta: 17 febrero 2021].
- Bruce, H. S. y Patel, N. H. (2020). Knockout of crustacean leg patterning genes suggests that insect wings and body walls evolved from ancient leg segments. *Nature Ecology & Evolution*, 4(12): 1703-1712.
- Burstein, D., Harrington, L. B., Strutt, S. C., Probst, A. J., Anantharaman, K., Thomas, B. C., Doudna J. A. y Banfield, J. F. (2017). New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes. *Nature*, 542(7640): 237-241.
- Castro-Obeso, J. (2021). *Desarrollo de la proteína de fusión Cas9-Ligando del receptor de vitelogenina de Penaeus vannamei*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa, Laboratorio de Biomedicina, Culiacán.
- Cebrian-Serrano, A. y Davies, B. (2017). CRISPR-Cas orthologues and variants: optimizing the repertoire, specificity and delivery of genome engineering tools. *Mammalian Genome*, 28: 247-261.
- Chaverra-Rodriguez, D., Bui, M., Gilleland, C. L., Rasgon, J. L. y Akbari, O. (2023). CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the Asian Citrus Psyllid, *Diaphorina citri*. *GEN Biotechnology*, 2: 1-31.
- Chaverra-Rodriguez, D., Dalla Benetta, E., Heu, C. C., Rasgon, J. L., Ferree, P. M. y Akbari, O. S. (2020). Germline mutagenesis of *Nasonia vitripennis* through ovarian delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein. *Insect Molecular Biology*, 29(6): 569-577.
- Chaverra-Rodriguez, D., Macias, V. M., Hughes, G. L., Pujhari, S., Suzuki, Y., Peterson, D. R., Kim, D., McKeand, S. y Rasgon, J. L. (2018). Targeted delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein into arthropod ovaries for heritable germline gene editing. *Nature Communications*, 9(1): 3008.
- Chen, S., Zhao, X., Chen, J., Chen, J., Kuznetsova, L., Wong, S. S. y Ojima, I. (2010). Mechanism-based tumor-targeting drug delivery system. Validation of efficient vitamin receptor-mediated endocytosis and drug release. *Bioconjugate Chemistry*, 21(5): 979-987.
- Clark-Hachtel, C. M. y Tomoyasu, Y. (2020). Two sets of candidate crustacean wing homologues and their implication for the origin of insect wings. *Nature Ecology & Evolution*, 4(12): 1694-1702.
- Clark Jr, W. H., Yudin, A. I., Lynn, J. W., Griffin, F. J. y Pillai, M. C. (1990). Jelly layer formation in Penaeoidean shrimp eggs. *The Biological Bulletin*, 178(3): 295-299.

- Clarke, R., Heler, R., MacDougall, M. S., Yeo, N. C., Chavez, A., Regan, M., Hanakahi, L., Church, G. M., Marraffini, L. A. y Merrill, B. J. (2018). Enhanced bacterial immunity and mammalian genome editing via RNA-polymerase-mediated dislodging of Cas9 from double-strand DNA breaks. *Molecular Cell*, 71(1): 42-55.
- Crispo, M., Mulet, A. P., Tesson, L., Barrera, N., Cuadro, F., dos Santos-Neto, P. C., Nguyen, T. H., Crénéguy, A., Brusselle, L., Aneón, I. y Menchaca, A. (2015). Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR/Cas9 technology and microinjection into zygotes. *PLOS ONE*, 10(8): e0136690.
- Cohen, S., Hasan, M., Frishman, N., y Khalaila, I. (2023). A crustacean vitellogenin-derived peptide as an oocyte-specific delivery vehicle for gene silencing. *Frontiers in Marine Science*, 10: 1128524.
- CONAPESCA (2021). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca Edición 2021*. Disponible en: [https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO\\_ESTADISTICO\\_DE\\_ACUA\\_CULTURA\\_Y\\_PESCA\\_2021.pdf](https://nube.conapesca.gob.mx/sites/cona/dgppe/2021/ANUARIO_ESTADISTICO_DE_ACUA_CULTURA_Y_PESCA_2021.pdf) [consulta: 10 febrero 2024].
- Concordet, J. P. y Haeussler, M. (2018). CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Research*, 46(1): 242-245.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. y Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340): 602-607.
- FAO (2022). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation*. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/cc0461en> [consulta: 5 febrero 2024].
- Gao, Y., Zhang, X., Zhang, X., Yuan, J., Xiang, J. y Li, F. (2020). CRISPR/Cas9-mediated mutation reveals Pax6 is essential for development of the compound eye in Decapoda *Exopalaemon carinicauda*. *Developmental Biology*, 465(2): 157-167.
- Garneau, J. E., Dupuis, M. È., Villion, M., Romero, D. A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A. H. y Moineau, S. (2010). The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468(7320): 67-71.
- Gratacap, R. L., Wargelius, A., Edvardsen, R. B. y Houston, R. D. (2019). Potential of genome editing to improve aquaculture breeding and production. *Trends in Genetics*, 35(9): 672-684.
- Grimm, D., Lee, J. S., Wang, L., Desai, T., Akache, B., Storm, T. A. y Kay, M. A. (2008). *In vitro* and *in vivo* gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. *Journal of Virology*, 82(12): 5887-5911.
- Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual Review of Cell Biology*, 1(1): 1-39.
- Gui, T., Zhang, J., Song, F., Sun, Y., Xie, S., Yu, K. y Xiang, J. (2016). CRISPR/Cas9-mediated genome editing and mutagenesis of EcChi4 in *Exopalaemon carinicauda*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(11): 3757-3764.
- Heu, C. C., McCullough, F. M., Luan, J. y Rasgon, J. L. (2020). CRISPR-Cas9-based genome editing in the silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci*). *The CRISPR Journal*, 3(2): 89-96.
- Hiruta, C., Kakui, K., Tollefsen, K. E. y Iguchi, T. (2018). Targeted gene disruption by use of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes in the water flea *Daphnia pulex*. *Genes to Cells*, 23(6): 494-502.
- Hsu, P. D., Lander, E. S. y Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6): 1262-1278.

- Jansen, R., Embden, J. D. V., Gastra, W. y Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6): 1565-1575.
- Jin, Y. H., Robledo, D., Hickey, J. M., McGrew, M. J. y Houston, R. D. (2021). Surrogate broodstock to enhance biotechnology research and applications in aquaculture. *Biotechnology Advances*, 49: 107756.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. y Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096): 816-821.
- Jinek, M., Jiang, F., Taylor, D. W., Sternberg, S. H., Kaya, E., Ma, E., Anders, C., Hauer, M., Zhou, K., Lin, S., Kaplan, M., Iavarone, A. T., Charpentier, E., Nogales, E. y Doudna, J. A. (2014). Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343(6176): 1247997.
- Kosicki, M., Allen, F., Steward, F., Tomberg, K., Pan, Y. y Bradley, A. (2022). Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion. *Nature Communications*, 13(1): 3422.
- Kumagai, H., Nakanishi, T., Matsuura, T., Kato, Y. y Watanabe, H. (2017). CRISPR/Cas-mediated knock-in via non-homologous end-joining in the crustacean *Daphnia magna*. *PLoS One*, 12(10): e0186112.
- Lee, K., Conboy, M., Park, H. M., Jiang, F., Kim, H. J., Dewitt, M. A., Mackley, V. A., Chang, K., Rao, A., Skinner, C., Shobha, T., Mehdipour, M., Liu, H., Wang, W., Lan, F., Bray, N. L., Li, S., Corn, J. E., Kataoka, K., Doudna, J. A., Conboy, I., Murthy, N. (2017). Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA *in vivo* induces homology-directed DNA repair. *Nature Biomedical Engineering*, 1(11): 889.
- Li, X., Xu, Y., Zhang, H., Yin, H., Zhou, D., Sun, Y., Ma, L., Shen, B. y Zhu, C. (2021). ReMOT control delivery of CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complex to induce germline mutagenesis in the disease vector mosquitoes *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 58(3): 1202-1209.
- Lima, L., Berni, M., Mota, J., Bressan, D., Julio, A., Cavalcante, R., Macias, V., Li, Z., Rasgon, J. L., Bier, E. y Araujo, H. M. (2023). Gene editing in the Chagas disease vector *Rhodnius prolixus* by Cas9-mediated ReMOT Control. *bioRxiv*, 2023-08.
- Liu, C., Zhang, L., Liu, H. y Cheng, K. (2017). Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *Journal of Controlled Release*, 266: 17-26.
- Lozano-Fernandez, J., Giacomelli, M., Fleming, J. F., Chen, A., Vinther, J., Thomsen, P. F., Glenner, H., Palero, F., Legg, D. A., Illiffe, T. M., Pisani, D. y Olesen, J. (2019). Pancrustacean evolution illuminated by taxon-rich genomic-scale data sets with an expanded remipede sampling. *Genome Biology and Evolution*, 11(8): 2055-2070.
- Macias, V. M., McKeand, S., Chaverra-Rodriguez, D., Hughes, G. L., Fazekas, A., Pujhari, S., Jasinskiene, N., James, A. A., y Rasgon, J. L. (2020). Cas9-mediated gene-editing in the malaria mosquito *Anopheles stephensi* by ReMOT Control. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 10(4): 1353-1360.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., y Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9): 833-838.
- Marín-Carrasco, D. M. (2021). *Microinyección como metodología de entrega de material de edición a través de CRISPR/Cas9 en Penaeus vannamei*. Tesis de Maestría. Centro de

Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México.  
<http://dspace.cibnor.mx:8080/handle/123456789/3112>

- Martin, A., Serano, J. M., Jarvis, E., Bruce, H. S., Wang, J., Ray, S., Barker, C. A., O'Connell, L. C. y Patel, N. H. (2016). CRISPR/Cas9 mutagenesis reveals versatile roles of Hox genes in crustacean limb specification and evolution. *Current Biology*, 26(1): 14-26.
- Men, J. L., Zhang, Y. T., Pei, Y. B., Li, N., Xiang, J. H. y Zhou, H. L. (2024). Development of a PEI-coated SWNTs Nanocarrier for efficient delivery of CRISPR/Cas9 in early embryos of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 581: 740424.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. y Almendros, C. (2009). Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*, 155(3): 733-740.
- Molcho, J., Manor, R., Shamsian, M., Sudarshan, G., Ofir, R., Parker, D., Weil, S., Wattad, H., Hayun, E., Levy, T., Aflalo, E. D., Hendel, A. y Sagi, A. (2022). On genome editing in embryos and cells of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 558: 738391.
- Nakanishi, T., Kato, Y., Matsuura, T. y Watanabe, H. (2014). CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS One*, 9(5): e98363.
- Nelson, K. (1990). Scheduling of reproduction in relation to molting and growth in malacostracan crustaceans. En: *Crustacean egg production*. CRC Press, Florida, pp. 77-114.
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F. y Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5): 935-949.
- Palacios, E., Racotta, I. S. y Villalejo, M. (2003). Assessment of ovarian development and its relation to mating in wild and pond-reared *Litopenaeus vannamei* shrimp in a commercial hatchery. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34(4): 466-477.
- Palasin, K., Makkapan, W., Thongnoi, T. y Chotigeat, W. (2014). Stimulation of ovarian development in white shrimp, *Fenneropenaeus merguensis* De Man, with a recombinant ribosomal protein L10a. *Aquaculture*, 432: 38-45.
- Permyakova, N. V. y Deineko, E. V. (2024). Crop Improvement: Comparison of Transgenesis and Gene Editing. *Horticulturae*, 10(1): 57.
- Ramakrishna, S., Dad, A. B. K., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K. y Kim, H. (2014). Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Research*, 24(6): 1020-1027.
- Ramesh, M., Anitha, S., Poopal, R. K., y Shobana, C. (2018). Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine (C18H26ClN3) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Toxicology Reports*, 5: 18-27.
- Raviv, S., Parnes, S., Segall, C., Davis, C. y Sagi, A. (2006). Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. *General and Comparative Endocrinology*, 145(1): 39-50.
- Roth, Z., Weil, S., Aflalo, E. D., Manor, R., Sagi, A. y Khalaila, I. (2013). Identification of receptor-interacting regions of Vitellogenin within evolutionarily conserved  $\beta$ -sheet structures by using a peptide array. *ChemBiochem*, 14(9): 1116-1122.
- Ruan, Y., Wong, N. K., Zhang, X., Zhu, C., Wu, X., Ren, C., Luo, P., Jiang, X., Ji, J., Wu, X., Hu, C. y Chen, T. (2020). Vitellogenin receptor (VgR) mediates oocyte maturation and ovarian development in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Physiology*, 11: 485.

- Sharma, A., Pham, M. N., Reyes, J. B., Chana, R., Yim, W. C., Heu, C. C., Kim, D., Chaverra-Rodriguez, D., Rasgon, J. L., Harrell II, R. A., Nuss, A. B. y Gulia-Nuss, M. (2022). Cas9-mediated gene editing in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*, by embryo injection and ReMOT Control. *iScience*, 25(3).
- Shirai, Y. y Daimon, T. (2020). Mutations in cardinal are responsible for the red-1 and peach eye color mutants of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 529(2): 372-378.
- Shirai, Y., Piulachs, M. D., Belles, X. y Daimon, T. (2022). DIPA-CRISPR is a simple and accessible method for insect gene editing. *Cell Reports Methods*, 2(5).
- Shirai, Y., Takahashi, M., Ote, M., Kanuka, H. y Daimon, T. (2023). DIPA-CRISPR gene editing in the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Applied Entomology and Zoology*, 1-6.
- Shou, J., Li, J., Liu, Y. y Wu, Q. (2018). Precise and predictable CRISPR chromosomal rearrangements reveal principles of Cas9-mediated nucleotide insertion. *Molecular Cell*, 71(4): 498-509.
- Song, M. (2017). The CRISPR/Cas9 system: Their delivery, in vivo and ex vivo applications and clinical development by startups. *Biotechnology Progress*, 33(4): 1035-1045.
- Spencer, B. J. y Verma, I. M. (2007). Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *PNAS*, 104(18): 7594-7599.
- Subramoniam, T. (2011). Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. *Fisheries Science*, 77: 1-21.
- Sun, P. S., Venzon Jr, N. C., Calderon, F. R. y Esaki, D. M. (2005). Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 243(1-4): 19-26.
- Sun, W., Ji, W., Hall, J. M., Hu, Q., Wang, C., Beisel, C. L. y Gu, Z. (2015). Self-assembled DNA nanoclews for the efficient delivery of CRISPR-Cas9 for genome editing. *Angewandte Chemie*, 127(41): 12197-12201.
- Tan-Fermin, J. D. y Pudadera, R. A. (1989). Ovarian maturation stages of the wild giant tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. *Aquaculture*, 77(2-3): 229-242.
- Tortorella, S. y Karagiannis, T. C. (2014). Transferrin receptor-mediated endocytosis: a useful target for cancer therapy. *The Journal of Membrane Biology*, 247: 291-307.
- Urnov, F. D., Rebar, E. J., Holmes, M. C., Zhang, H. S. y Gregory, P. D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9): 636-646.
- Venslauskas, M. S. y Šatkauskas, S. (2015). Mechanisms of transfer of bioactive molecules through the cell membrane by electroporation. *European Biophysics Journal*, 44: 277-289.
- Wallace, R. A., Walker, S. L. y Hauschka, P. V. (1967). Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry*, 6(6): 1582-1590.
- Warrier, S., Subramoniam, T. (2002). Receptor mediated yolk protein uptake in the crab *Scylla serrata*: crustacean vitellogenin receptor recognizes related mammalian serum lipoproteins. *Molecular Reproduction and Development*, 61(4): 536-548.
- Xu, S., Pham, T. P. y Neupane, S. (2020). Delivery methods for CRISPR/Cas9 gene editing in crustaceans. *Marine Life Science & Technology*, 2: 1-5.
- Xue, C. y Greene, E. C. (2021). DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends in Genetics*, 37(7): 639-656.

- Yang, X., Ling, X., Sun, Q., Qiu, P., Xiang, K., Hong, J., He, S., Chen, J., Ding, X., Hu, H., He, Z., Zhou, C., Chen, B. y Qiao, L. (2023). High-efficiency gene editing in *Anopheles sinensis* using ReMOT Control. *bioRxiv*, 2023-08.
- Yano, I. (1988). Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 99: 547-553.
- Yin, H., Kauffman, K. J. y Anderson, D. G. (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6): 387-399.
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V. y Zhang, F. (2015). Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3): 759-771.
- Zhang, J., Song, F., Sun, Y., Yu, K. y Xiang, J. (2018). CRISPR/Cas9-mediated deletion of EcMIH shortens metamorphosis time from mysis larva to postlarva of *Exopalaemon carinicauda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 77: 244-251.

## 11. ANEXOS

### Anexo A.-Extracción de ADN genómico: Método salting out

#### -Lisis

1. Agregar 400  $\mu$ L de buffer de lisis (5 M NaCl, 1 M Tris pH 8, 0.5 M EDTA pH 8, 10% SDS) y 20  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/mL) a un fragmento de musculo e incubar a 55 °C entre 30 min y 1 hora, hasta que el tejido se disuelva. Agitar el tubo cada 15 min
2. Centrifugar por 2 min a 10 000 rpm y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo

#### -Precipitación de proteínas

3. Añadir 200  $\mu$ L de 5 M NaCl
4. Refrigerar 15 min a -20 °C
5. Centrifugar, preferentemente a 4 °C, a 10 000 rpm por 10 min
6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo

#### -Precipitación del ADN

7. Añadir dos volúmenes de etanol absoluto, mezclar por inversión
8. Refrigerar a -20 °C por 15 min
9. Centrifugar, preferentemente a 4 °C, a 10 000 rpm por 10 min
10. Desechar el sobrenadante
11. Agregar 200  $\mu$ L de etanol 70% y centrifugar a 10 000 rpm por 5 min
12. Repetir el paso 11
13. Resuspender en 20  $\mu$ L de agua libre de nucleasas

## Anexo B.-Construcción de Cas9-PvVg

### Subclonación del fragmento de vitelogenina de *P. vannamei*

→ Preparar reacciones de PCR con los siguientes reactivos: 1 µL de Buffer 10×, 1 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0.8 µL de mix de dNTPs 10 mM, 0.06 µL polimerasa Taq 5 U/µL, 1 µL de cada *primer* 10 mM, 1 µL de ADN genómico y 5.2 µL de agua libre de nucleasas.

→ Se diseñaron *primers* para PCR aninada, donde los que contienen los sitios de restricción para enzimas digestivas son los *primers* interiores

<i>Primer</i>	Secuencia	Tamaño del amplicón
Vg_partial-F	5'-ACCCGCTCATATACCTGCAC	564 pb
Vg_partial-R	5'-GTTGCTCGTCCATTCTGGAT	
Frag1_vg-IF	5'-CATGCTGGATCCGACAAGAACATCGTTCGACC	96 pb
Frag1_vg-IR	5'-TGCATGGAGTCGCGAAGTGTGAATCCTGAC	

Sitios de restricción para *BamHI* (rojo) y para *SacI* (verde) en *primers* internos.

→ Las condiciones de reacción fueron las siguientes

	<i>Primers</i> exteriores		<i>Primers</i> interiores	
Desnaturalización inicial	94 °C	10 min	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	15 s	94 °C	10 s
Alineamiento	45 °C	30 s	50 °C	15 s
Amplificación	72 °C	1 min	72 °C	35 s
Amplificación final	72 °C	10 min	72 °C	1:30 min

### Digestión enzimática secuencial del amplicón y del vector pET28a/Cas9

	<i>SacI</i>	<i>BamHI</i>
Agua mili Q	15 µL	15 µL
Buffer	2 µL (Buffer <i>Sac I</i> )	2 µL (Buffer FastDigest)

ADN (vector o amplicón)	2 $\mu$ L	2 $\mu$ L
Enzima	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Total</b>	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L

→Debido a que ambas enzimas no funcionan con el mismo buffer, la primera reacción se realizó con la que necesitara menor concentración de sales: *SacI*

1. Agregar el agua mili Q, el ADN, el buffer *SacI* y la enzima *SacI* y dejar reposar durante 15 min a temperatura ambiente
2. Inactivar la enzima *SacI* calentado la reacción a 65° C durante 20 min
3. Agregar el volumen correspondiente del buffer FastDigest y la enzima *BamHI* y se deja reposar 15 min a temperatura ambiente

#### Ligación del amplicón y el vector pET28a/Cas9

Buffer ligasa T4 10	2 $\mu$ L
Vector	1 $\mu$ L
Amplicón	1 $\mu$ L
Ligasa T4	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasas	5 $\mu$ L
Volumen final	10 $\mu$ L

→Se prepararon diluciones tanto del vector como del amplicón digeridos para que en la mezcla de reacción de ligación estuvieran en relación 10:1 (amplicón:vector)

→La cantidad de ADN total en la reacción no debe superar los 50-60 ng

1. Se mezclan todos los componentes en un microtubo en hielo, agregando la ligasa hasta el final
2. Mezclar gentilmente con micropipeta, luego centrifugar brevemente
3. Incubar a 16 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente por 10 min
4. Inactivar a 65 °C durante 10 min

**Anexo C.-Preparación de PBS 10× – 1 L**

- NaCl 80 g.
- KCl 2 g.
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 14.4 g.
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.4 g.
- HCl 1M
- NaOH 1M

→Disolver las sales, una por una, en 800 mL. de agua destilada. Usando mosca magnética

→Ajustar el pH a 7.4, con HCl o NaOH

→Aforar a 1 L

→Esterilizar en autoclave para almacenar a temperatura ambiente. Luego de abrir, almacenar en refrigeración

**Anexo D.-Comprobación de inyección por el uso de azul de metileno****Anexo E.-Corte del cordón nervioso de *P. vannamei*****Anexo F.-Diseción de fragmentos de gónada de *P. vannamei***

**Anexo G.-Preparación de paraformaldehído 4% en PBS 2× – 1 L**

- Paraformaldehído 40 g.
- PBS 2× 1 L
- NaOH 5M
- 0.5% de Tritón X-100

→ Calentar 800 mL. de PBS 2× a 60° C, dentro de una campana de extracción

→ Pesar 40 g. de paraformaldehído dentro de la campana y agregarlo al PBS. Agitar con mosca magnética

→ Agregar NaOH 5M gota a gota, hasta que la solución de aclare

→ Agregar 0.5% de Tritón X-100 (5 mL.)

→ Ajustar el pH a 7.4

**Anexo H.-Tinción Hematoxilina y Eosina**

- 1- Tres inmersiones en xileno de 10 min
- 2- Inmersiones en concentraciones descendientes de etanol: 96%, 70% (1), 70% (2). 2 min cada una
- 3- 5 min en agua destilada
- 4- 12 min en hematoxilina
- 5- Enjuagues en agua de la llave
- 6- 5 min en agua destilada
- 7- 18 s en alcohol ácido (1 L de alcohol 96% con 5 gotas de HCl)
- 8- 5 min en agua destilada
- 9- 18 s en agua amoniacal (0.5 L de agua destilada con 5 gotas de hidróxido de amonio)
- 10- 5 min en agua destilada
- 11- 2 min en etanol 50%
- 12- 2 min en etanol 70%
- 13- 12 min en eosina/floxina alcohólica
- 14- 1 min de etanol 96% (x2)
- 15- 1 min en etanol 100% (x2)
- 16- 4 min en citrosol (x3)
- 17- Montaje con resina sintética

**Anexo I.-Inmunohistología en gónada de camarón**

- 1-** Partiendo de cortes histológicos de 4  $\mu\text{m}$ , desparafinizar con tres inmersiones de xilol 100% de 10 min
- 2-** Inmersión en etanol:xilol (1:1) de 2 min (x2)
- 3-** Rehidratar en concentraciones descendientes de etanol: 100%-2 min (x2), 96%-2 min (x2), 90%-2 min (x2), 80%-2 min (x2), 70%-2 min (x2)
- 4-** Sumergir en agua destilada durante 2 min (x2)
- 5-** Inmersión en PBS 1X por 2 min (x2)
- 6-** Permeabilizar el tejido colocándolos en PBS 1X con 0.5% de tritón X-100 durante 10 min
- 7-** Lavar con PBS 1X por 2 min (x2)
- 8-** Bloquear sitios de unión inespecíficos usando BSA 3% en PBS 1X durante 1 h, a 37° C, sumergiendo por completo las laminillas en un volumen pequeño y colocándolas en agitación (50 rpm)  
(Diluir 15 g de BSA en 300 mL de PBS 1X con agitador magnético. Aforar hasta 500 mL con PBS 1X)
- 9-** Lavar con PBS 1X por 1 min (x1)
- 10-** Agregar 60  $\mu\text{L}$  del anticuerpo primario 1:10000, disuelto en 3% BSA/PBS 1X, y cubrir con Parafilm para esparcirlo por la laminilla por completo. Incubar durante 2-4 h a 37° C o durante toda la noche a 4° C, en cámara húmeda. Si a pesar de la cámara húmeda el Parafilm se pega (la laminilla se seca), cambiar a una cámara más pequeña o incluso cubrir el fondo de la cámara con papel humedecido en PBS 1X y colocar las laminillas sobre el papel.
- 11-** Lavar con PBS 1X por 1 min (x5)
- 12-** Agregar 60  $\mu\text{L}$  del anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 1:5000, disuelto en 3% BSA/PBS 1X, y cubrir con Parafilm para esparcirlo por la laminilla. Incubar en oscuridad durante 2-4 h a 37° C o durante toda la noche a 4°C, en cámara húmeda.
- 13-** Lavar con PBS 1X por 1 min (x5), en oscuridad
- 14-** OPCIONAL. Incubar con DAPI 0.1% (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en PBS 1X durante 5 min, en oscuridad  
(Solución stock DAPI: disolver 0.1 mg en 10 mL de PBS 1X. Solución de trabajo: disolver 100  $\mu\text{L}$  en 900  $\mu\text{L}$  de PBS 1X)
- 15-** Lavar con PBS 1X por 1 min (x5)

**16-** Enjuagar en agua destilada

**17-** Agregar 25  $\mu$ l de medio de montaje Vectashield Vibrance al cubreobjetos y sobreponer la laminilla

**18-** Colocar las laminillas en un lugar seco y en oscuridad hasta que se sequen

**19-** Se pueden observar 30 min después del montaje, pero el desempeño optimo se alcanza a las 2 h