

CRISPR-Cas9 como herramienta para describir la función genética en metazoarios marinos

CRISPR-Cas9: a genetic tool to study gene functions in marine metazoans

Sara Yexalén Morán-Garay¹ y Liliana Rojo-Arreola^{2*}

¹Departamento de Biología Marina, Universidad Autónoma de Baja California Sur, Carretera al Sur km. 5,5, La Paz, Baja California Sur 23080, México

²CONACYT- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mar Bermejo 195, Playa Palo de Santa Rita, La Paz, Baja California Sur 23090, México

*Autor correspondiente: lrojo@cibnor.mx

Abstract. Genetic tools have been of great use to describe in detail the gene function of biological systems, with a great expansion through the last years. Specially, CRISPR-Cas9 has grown in popularity since its discovery. CRISPR-Cas9 is often described as a revolutionary tool that unlocked the great potential of genetic edition due to the efficiency and feasibility of the method, allowing great advances in reverse genetics studies. In this work, the current insights about the use of CRISPR-Cas9 as molecular tool to elucidate the genetic function in model and non-model marine organisms were compiled. This gene edition tool has demonstrated its feasibility to describe in detail aspects of the biology, physiology, and ecology of marine species. Some general considerations that must be taken into account for the success of this approach are also addressed.

Key words: CRISPR-Cas9, genetic edition, marine sciences

Resumen. Las herramientas de edición genética han transformado la manera en que se estudia la función de los genes y proteínas de los sistemas biológicos. Especialmente CRISPR-Cas9 ha tenido un gran apogeo desde su descubrimiento, lo cual ha permitido un avance significativo de los estudios basados en la edición genética debido a la eficacia y relativa facilidad del procedimiento. En el presente trabajo se ha compilado la información actual sobre el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta molecular para elucidar la función genética en metazoarios marinos. La eficiencia de esta herramienta demuestra su factibilidad de ser utilizada para describir a detalle aspectos de la biología, fisiología, y ecología de organismos marinos. Se abordan también algunas consideraciones técnicas generales que deben ser tomadas en cuenta para el éxito de esta aproximación.

Palabras clave: CRISPR-Cas9, edición genética, ciencias marinas

INTRODUCCIÓN

Las bases para el desarrollo de la tecnología CRISPR (en la sigla inglesa- Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) son consideradas como uno de los descubrimientos más importantes del siglo XXI. El sistema CRISPR (grupo de repeticiones cortas palindrómicas regularmente espaciadas), derivado de bacterias y arqueas, ha sido adoptado como una herramienta para la edición genética que ha revolucionado la investigación científica, pues de manera muy precisa, permite realizar modificaciones en el genoma de diferentes especies, incluyendo los organismos marinos. Su aplicación ha permitido avances sustanciales en áreas como la medicina, agricultura y biotecnología, y de particular interés para esta revisión, en las ciencias marinas.

Por tanto, se presentan los avances del uso del sistema CRISPR-Cas9 en sistemas biológicos marinos *in vivo*, así como los retos particulares en la aplicación del sistema en metazoarios marinos. La mayoría de los estudios que se han realizado ofrecen pruebas de concepto con la finalidad de ponderar las variables que afectan la factibilidad práctica de aplicación del sistema. Para diversas especies marinas se han descrito las condiciones de transcripción y evaluación de la eficiencia del sistema en la edición genética, sentando bases sólidas para investigaciones futuras. Los avances se basan en el conocimiento previo sobre la función de los genes seleccionados y predominan los estudios sobre genes asociados a fenotipos visibles, pues esto facilita en gran medida la selección de especímenes de interés. Destacan también los estudios en especies de importancia acuícola, en donde se ha aplicado la tecnología CRISPR para modificación de rasgos de interés en dicha industria, como el crecimiento, resistencia a patógenos y reproducción.



BREVE HISTORIA DEL SISTEMA CRISPR-Cas9

Las secuencias CRISPR, fueron descubiertas por serendipia en 1987 por el equipo de investigadores del profesor Atsuo Nakata de la Universidad de Osaka, Japón; mientras decodificaban el genoma de *Escherichia coli* detectaron una serie de secuencias repetidas de manera organizada, separadas por pequeños fragmentos de secuencias variables (Ishino *et al.* 1987). Posteriormente se descubrieron secuencias repetitivas similares en varias cepas de *E. coli*, así como en algunas especies de enterobacterias, lo que evidenció la prevalencia de dichas secuencias en bacterias, aunque se observó que las unidades de repetición podían ser muy diferentes entre cepas relacionadas (Nakata *et al.* 1989). En 1993, el científico español Francisco Mojica identificó las secuencias en arqueas y acuñó el nombre CRISPR a este patrón de secuencias. Al mismo tiempo, se describieron por primera vez los genes Cas, los cuales codifican nucleasas que se asocian a las secuencias repetidas (CRISPR-associated), de allí el término CRISPR-Cas (Mojica *et al.* 1993, Jansen *et al.* 2002).

Posteriormente se descubrió que el sistema CRISPR-Cas es un tipo de sistema de defensa celular específico, encontrado en algunos procariontes, contra los virus (Barrangou & Doudna 2016). En términos generales, este sistema de defensa se puede dividir en tres etapas: la primera de adquisición o inmunización, en la cual se inserta información genética de virus en forma de espaciadores dentro del arreglo CRISPR, que se encuentra en el genoma bacteriano. En la segunda etapa, el operón CRISPR-Cas se expresa en forma de proteínas (Cas) y ARNs: un ARN de secuencia variable denominado crRNA (proveniente de la información adquirida en la etapa anterior) que interactúa con otra secuencia de ARN, el ARN trans-activador (tracrRNA), ambos ARNs forman el complejo crRNA:tracrRNA, que es requerido para la funcionalidad de la Cas. Finalmente, ante una invasión viral, los complejos activos crRNA:tracrRNA:Cas reconocen y destruyen el ADN viral (Horvath & Barrangou 2010) (Fig. 1).

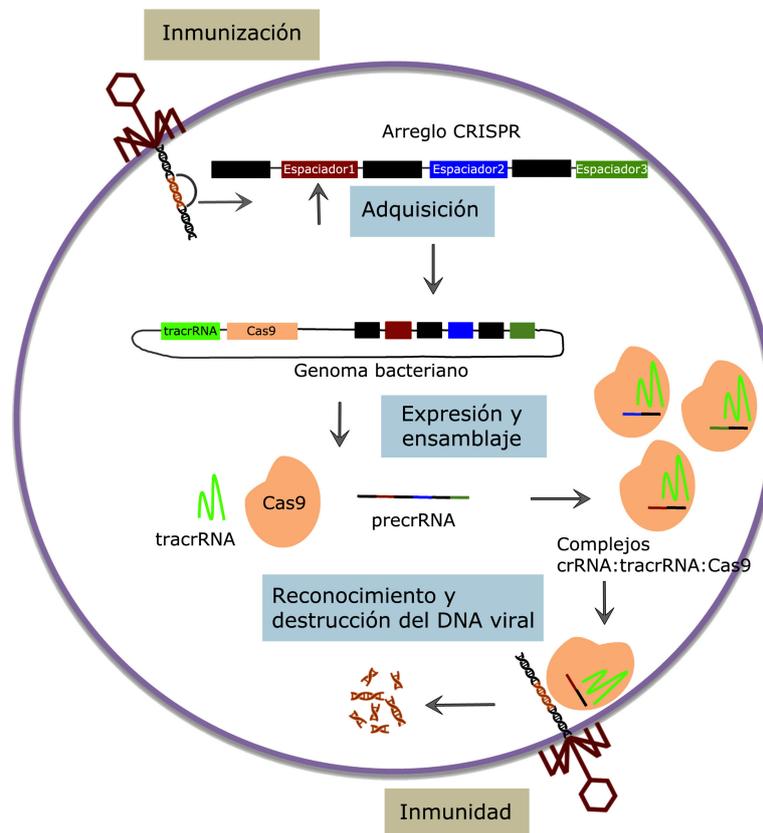


Figura 1. CRISPR-Cas9 como mecanismo de defensa en procariontes. El operón CRISPR-Cas está compuesto de regiones codificantes para genes Cas, para el ARN tracrRNA y los ARN del arreglo CRISPR, cada espaciador es obtenido de exposiciones virales pasadas e insertado al genoma bacteriano. A partir de estos se expresan y se forman los complejos funcionales crRNA:tracrRNA:Cas9 que detectan invasiones virales y catalizan el rompimiento del ADN viral, deteniendo la infección / CRISPR-Cas9 as a defense mechanism in prokaryotes. The CRISPR-Cas operon includes coding regions for Cas genes, for tracrRNA and for the crRNAs of the CRISPR array, each spacer is obtained from past viral exposures and inserted into the bacterial genome. From these, the functional complex crRNA:tracrRNA: Cas9 are expressed and assembled, they detect and catalyze the degradation of invading viral DNA and halt the infection

Se han descrito variantes de proteínas CRISPR-Cas. La clasificación general divide los sistemas en dos clases, que difieren radicalmente en la arquitectura de los dominios funcionales. Los sistemas de la clase I están compuestos por múltiples proteínas que tienen que ensamblarse para ser funcionales; en cambio, los sistemas clase II se componen de una sola proteína que tiene múltiples dominios funcionales que le confieren la capacidad de unirse con el sgRNA, reconocer el ADN blanco, y cortar al ADN de doble hebra (Perez *et al.* 2018). La proteína Cas más comúnmente usada en experimentos de edición genética, la Cas9, pertenece a la clase II.

FUNCIONAMIENTO DE CRISPR-Cas9

El complejo crRNA:tracrRNA brinda estabilidad y especificidad al sistema, también se le conoce como ARN guía (sgRNA). El sgRNA se une a la enzima Cas para formar el complejo ribonucleoproteico (RNP) CRISPR-Cas, que reconoce a la molécula de ADN (Nakanishi *et al.* 2014) (Fig. 2A). CRISPR-Cas reconoce unas pocas pares de bases (~20 pb) en el genoma, la especificidad está dictada por la secuencia del sgRNA. Un elemento indispensable es una secuencia de nucleótidos conocida como Motivo Adyacente al Protoespaciador (PAM en inglés: Protospacer Adjacent Motif), tres bases (con la secuencia NGG para el sistema Cas9) que se ubican en el ADN genómico justo al lado (extremo 5') de la secuencia que reconoce el sgRNA, el motivo PAM es necesario para el reconocimiento y especificidad de corte por del sistema Cas a la doble hélice del ADN (Fig. 2A). Este daño súbito en el ADN celular activa un mecanismo endógeno para su reparación.

Todos los organismos cuentan con sistemas de reconocimiento y reparación de daños en el ADN que suceden de manera súbita o por error en el proceso de replicación, se trata de proteínas cuya función es mantener la integridad del genoma. Existen tres sistemas generales de reparación de daños súbitos en el ADN que se diferencian en las proteínas que los conforman y el proceso general de reparación: recombinación homóloga, unión de extremos no homólogos y por apareamiento erróneo. El rompimiento en la doble hélice inducido por el sistema CRISPR-Cas inicia la cascada de reparación que no es 100% precisa y cuya eficiencia es menor que la de las nucleasas Cas, que además se mantienen activas por tiempo indeterminado. Típicamente, el éxito de los experimentos de edición genética con CRISPR-Cas se basa en los errores de los mecanismos de reparación que causan mutaciones (inserciones o deleciones) alrededor del sitio blanco, lo que, en consecuencia, interrumpe la función de la proteína codificada por el gen editado (Shen *et al.* 2017) (Fig. 2B).

CRISPR-Cas9 COMO HERRAMIENTA DE EDICIÓN GENÉTICA

Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier (Doudna & Charpentier 2014) demostraron en cultivos de células de humano y ratón que es posible manipular algunas secuencias específicas de ARN y que pueden funcionar como guía en el sistema CRISPR-Cas, resaltando su potencial como herramienta de edición genética, en especial usando la variante Cas9 que reconoce el ADN blanco, y corta la doble hebra actuando como una "tijera molecular" con una alta especificidad (Doudna & Charpentier 2014), los descubrimientos de estas dos científicas fueron reconocidos con el premio Nobel de Química en el 2020, aunque se reconoce que otros científicos como Feng Zhang y George Church contribuyeron de manera significativa al desarrollo de la biotecnología CRISPR (Ran *et al.* 2013).

En comparación con otras herramientas de edición genética como ZNFs (Zinc Finger Nucleases) y TALENs (Targeted Activator-like Effector Nucleases), que utilizan la unión de proteína-ADN y que requieren el diseño de una nueva proteína para cada gen que se pretenda editar, el sistema CRISPR-Cas es más sencillo y rápido, ya que se basa en la hibridación ARN-ADN (Barrangou & Doudna 2016), siendo entonces una molécula de ARN complementaria al ADN blanco, el componente variable.

Dada la capacidad de realizar cortes en las cadenas dobles de ADN de manera precisa y a la facilidad de manipulación, el sistema ha sido explotado para desarrollar herramientas potentes para la manipulación genética (sustituciones, deleciones o inserciones) en animales, plantas y microorganismos (Barrangou & Doudna 2016). Por otro lado, el sistema CRISPR-Cas es una herramienta recurrida en biotecnología que se ha aplicado a diversos campos de investigación, desde la descripción de la función de genes y proteínas, hasta en investigación clínica con perspectivas de tratamiento de enfermedades genéticas (Demirci *et al.* 2019).

RETOS EXPERIMENTALES EN LA EDICIÓN GENÉTICA POR CRISPR-Cas9 EN ORGANISMOS MARINOS

Aunque se ha demostrado que el sistema CRISPR-Cas9 es una herramienta de edición genética robusta, asequible y flexible; en la práctica suelen presentarse adversidades metodológicas que deben ser oportunamente resueltas (Gonzalez-Duarte *et al.* 2021). Entre algunos factores que limitan el éxito de CRISPR-Cas están el método de transfección, la variación en la eficiencia del sistema, la edición no específica y el mosaicismo. Además, para investigaciones de metazoarios marinos, es altamente deseable contar con las condiciones de cultivo y mantenimiento en laboratorio de la especie

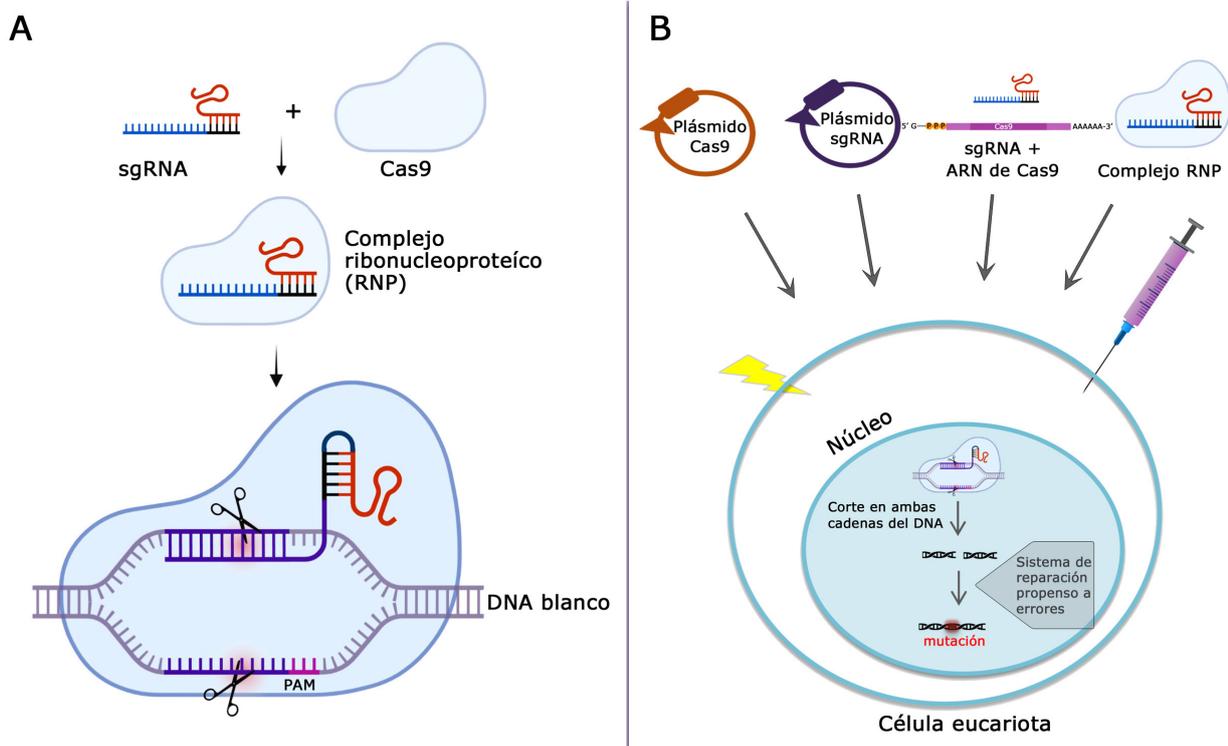


Figura 2. Sistema CRISPR-Cas9 como herramienta para edición genética. A) Ensamble del sistema CRISPR-Cas9 y reconocimiento del ADN blanco. B) Se pueden transfectar células (por inyección o electroporación) con plásmidos que contienen la información para que la célula exprese la proteína Cas9 y el ARN guía (sgRNA), también puede insertarse el ARN mensajero de Cas9 y el ARN guía, así como el complejo ribonucleico (RNP) que está formado por la proteína Cas9+sgRNA. Los compuestos CRISPR-Cas9 rompen la doble hebra del ADN de manera altamente específica, este daño es reconocido por el mecanismo de reparación celular que es propenso a cometer errores, lo que conlleva a mutaciones que suelen eliminar la función del gen editado. Los elementos de la imagen no se encuentran a escala / CRISPR-Cas9 system as tool for gene editing. A) CRISPR-Cas9 system assembly and recognition of target DNA. B) In eukaryotic cells this system is used as a tool for gene editing. Cells can be transfected (by microinjection or electroporation) with plasmids that contain the information for the expression of Cas9 protein and guide RNA (sgRNA); Cas9 mRNA and guide RNA can also be inserted independently, as well as the ribonucleic complex (RNP), which is the Cas9 protein + sgRNA. The CRISPR-Cas9 compounds break the DNA double strand in a highly specific way, this damage is recognized by the cellular repair mechanism that is error prone and lead to mutations that usually eliminate the function of the edited gene. Image elements are not at scale

de estudio, esto incluye la posibilidad de obtener desoves predecibles y la fertilización controlada, pues los componentes CRISPR-Cas9 deben ser introducidos en cigotos fertilizados, de preferencia antes de la primera división celular. Otro aspecto crítico a considerar es la selección de los genes a editar, se debe tener en cuenta la presencia de alelos (homocigotos o heterocigotos) y de genes parálogos. Una caracterización detallada dependerá de la disponibilidad de secuencias genómicas de suficiente calidad y correctamente anotadas, lo que permitirá la identificación y selección de los genes a evaluar, e influirá en gran medida en el diseño apropiado de los sgRNA (Campenhout *et al.* 2019), afortunadamente, la genómica de metazoarios marinos es una disciplina en expansión y las bases de datos crecen de forma exponencial (Laumer *et al.* 2019).

La transfección es el proceso por el cual se introducen ácidos nucleicos o proteínas a células eucariotas con el propósito de manipular la expresión genética *in vivo* o

in vitro. Existen varias técnicas de transfección que se dividen en dos grandes categorías, transfección física y transfección química, ambas son ampliamente usadas para introducir moléculas CRISPR-Cas9 (Sato *et al.* 2016). En la transfección física se irrumpe la membrana celular, entre las más empleadas están la microinyección y la electroporación, en la primera se usa un capilar de calibre micrométrico para inyectar directamente al citoplasma, soluciones en el rango de pico litros que contienen los componentes del sistema CRISPR-Cas9. Aunque esta técnica es muy eficaz, tiene la desventaja de requerir equipo especializado, debe ser realizada por un técnico experimentado y tiene una mayor eficiencia en cigotos relativamente grandes y resistentes. La electroporación se refiere a la aplicación de pulsos eléctricos a las células, con los que se crean (de manera temporal) poros en la membrana a través de los cuales se introduce el material genético (Zhang *et al.* 2021). Por otro lado, la transfección química se refiere al uso de lípidos o polímeros que tienen carga positiva, y al interactuar con los ácidos nucleicos (de

carga negativa) se forman complejos o nanopartículas que, además de protegerlos de la degradación, son capaces de interactuar con la membrana celular e introducirse a la célula vía endocitosis (Fajrial *et al.* 2020), las casas comerciales han desarrollado formulaciones eficientes como Lipofectamine™, CalFectin™, jetPEI™ entre otros. La principal ventaja de la electroporación y la transfección química es la posibilidad de manipular decenas o centenas de cigotos a la vez. Adicionalmente, los vectores virales son también utilizados para introducir moléculas CRISPR-Cas, esta vía es conocida como transducción y es muy recurrida para manipular células en cultivo y algunos organismos modelo, (Zhang *et al.* 2021), la transducción raramente es aplicada a especies no-modelo, pues su uso está basado en un importante cúmulo de conocimiento para determinar la eficiencia, facilidad de producción, toxicidad, estabilidad y bio-seguridad.

Como se mencionó en párrafos anteriores, los componentes CRISPR-Cas9 son comúnmente introducidos en cigotos, previo a la primera división celular, idealmente el sistema debe activarse y realizar el corte en el ADN blanco en este reducido lapso, sin embargo, rara vez sucede así. Una vez funcional, el sistema puede mantenerse activo por tiempo indeterminado y permanece haciendo cortes en el ADN en las siguientes etapas del desarrollo embrionario, lo que puede resultar en mosaicismos, es decir, especímenes con más de un genotipo; algunas células tendrán una mutación causada por CRISPR-Cas mientras que otras mantienen la secuencia original, o una mutación diferente, lo que resulta en especímenes F0 (la generación manipulada) con un genotipo no homogéneo o mosaico. El fenómeno de mosaicismos es relativamente común, aunque se han desarrollado algunas estrategias para evitarlo, como la introducción de los componentes en formato ribonucleoproteína (ver Fig. 2B) y en etapas tempranas del blastocisto, así como la edición directa en células germinativas primordiales (Mehra *et al.* 2019).

El éxito de CRISPR-Cas9 depende en gran medida de la selección del sitio a editar y del diseño de los sgRNA, lo que influirá en la especificidad y eficiencia del sistema, por lo tanto, el sitio a editar debe ser meticulosamente seleccionado, pues el complejo RNP es capaz de reconocer e hidrolizar el ADN en regiones que no son 100% complementarias, con diferencias entre 3-5 pb. La edición en sitios diferentes al deseado (en inglés *Off-target effects*) es uno de los principales retos en la aplicación de CRISPR-Cas; se sabe que el número, la posición y la distribución de los sitios no complementarios son los principales parámetros que influyen en ediciones no deseadas y también en la eficacia de las mutaciones (Ren *et al.* 2014). El adecuado diseño de los sgRNA influirá en gran medida en estos efectos no deseados, esto puede ser optimizado con apoyo de herramientas bioinformáticas que están en constante actualización y que permiten optimizar este parámetro, como CRISPOR y CHOPCHOP (Haeussler *et al.* 2016, Labun *et al.* 2016).

Finalmente, en cada caso debe implementarse una estrategia adecuada de validación para cuantificar la actividad y el éxito en edición genética por CRISPR-Cas. La mayoría de los métodos se basan en el análisis de amplificaciones de PCR de las regiones que flanquean el sitio diana, entre otros están, la secuenciación directa, la clonación y secuenciación, el análisis de curvas de disociación, y los ensayos con endonucleasa T7E1, una enzima que detecta errores de complementariedad en el ADN; una genotipificación por secuenciación de alta resolución es deseable para identificar posibles ediciones fuera del sitio diana (Nussbaum *et al.* 2018).

Una de las principales vertientes que ha tenido el uso de CRISPR-Cas en las ciencias marinas, es la utilización del sistema en especies marinas modelo y no modelo para la descripción de la función de diversos genes (Fig. 3). Para fines prácticos, se presenta también la información compilada organizada de acuerdo al Phylum en el que son clasificadas las especies, más una lista de las especies estudiadas, gen editado y método de transfección (Tabla 1).

PHYLUM CNIDARIA

CLASE ANTHOZOA

Coral duro *Acropora millepora* (Ehrenberg, 1834)

Cleves *et al.* (2018) realizaron un experimento en larvas de *A. millepora* usando CRISPR-Cas9 para generar mutaciones en los genes que codifican el factor de crecimiento de fibroblastos (*FGF1a*), la proteína verde fluorescente (*GFP*, por sus siglas en inglés) y la proteína rojo fluorescente (*RFP*, por sus siglas en inglés). Estos genes fueron seleccionados por la factibilidad al seguimiento visual y debido a que, en otros cnidarios, controlan la formación del órgano apical sensorial confiriendo sensibilidad al medio durante el asentamiento en estadios larvarios y la metamorfosis (Rentsch *et al.* 2008). Se inyectaron cerca de 400 cigotos, de los cuales sobrevivieron y eclusieron entre el 50-75%. Aproximadamente la mitad de las larvas estudiadas presentaron deficiencias en el crecimiento o fluorescencia provocadas por las mutaciones en los genes blanco cerca del sitio predicho para la inducción del sistema CRISPR-Cas9, y aunque la presencia de genes parálogos probablemente enmascaró el verdadero efecto del sistema en los fenotipos, en general se obtuvo una alta eficacia en la edición genómica, sentando una base sólida para el uso de esta herramienta en el estudio de la función de genes en corales. Esta metodología fue después usada para describir la función de un factor de transcripción como regulador de la respuesta al estrés por aumento de temperaturas, dicha respuesta está mediada por proteínas HSPs (en la sigla inglesa- Heat Shock Proteins), estos resultados son de especial relevancia dada la afectación de los arrecifes de coral provocada por el calentamiento global (Cleves *et al.* 2020).

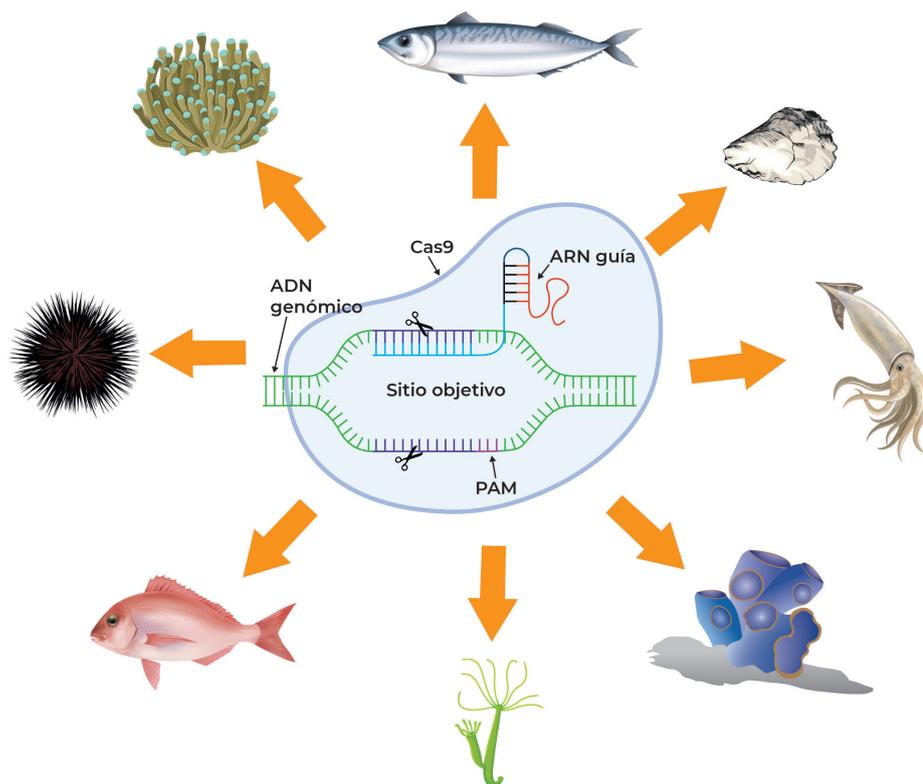


Figura 3. Ilustración esquemática del sistema CRISPR-Cas9 y algunos ejemplos de metazoarios marinos en donde ha sido utilizada como herramienta de edición genética. Se muestran los componentes del sistema: la proteína Cas9 interactuando con el ARN guía y la región complementaria al ADN genómico a editar. Se indica el motivo PAM: una secuencia de 3 nucleótidos adyacente al ADN a editar que es esencial para el correcto reconocimiento y orientación de la Cas9. Los elementos de la imagen no se encuentran a escala / Schematic illustration of CRISPR-Cas9 system and some examples of genetically edited marine metazoan species. The components of the system are shown: the Cas9 protein interacting with the guide RNA (sgRNA) and the complementary target genomic DNA. The PAM motif is indicated: a sequence of 3 nucleotides adjacent to the target DNA, essential for the correct recognition and orientation of Cas9. Image elements are not at scale

CLASE HIDROZOA

Hidrozoo marino *Hydractinia symbiolongicarpus* (Buss & Yund, 1989)

Los estudios de algunas especies de la clase Hydrozoa han montado importantes bases para la comprensión de la regeneración de tejidos, se reconoce el potencial de este taxón como modelo para los estudios de biología regenerativa, por lo que existe una creciente demanda de desarrollo de herramientas que permitan realizar pruebas de la función genética. Antes del desarrollo de la tecnología CRISPR-Cas, no existían reportes de modificaciones genéticas hereditarias para este taxón.

Sanders *et al.* (2018) desarrollaron un protocolo basado en CRISPR-Cas9 para edición del genoma de *H. symbiolongicarpus*, el equipo de trabajo logró insertar genes de las proteínas fluorescentes *eGFP* y *tdTomato* en el locus del gen de Factor de Elongación Eucariota 1 Alfa (*Eef1a*). Esto fue logrado mediante la inyección del complejo ribonucleoproteína Cas9:sgRNA dirigido a *Eef1a*, simultáneamente se introdujo un plásmido que contiene la señal que, mediante reparación dirigida por homología,

logra la recombinación homóloga. Así, se insertaron 815 pb que contienen la información del gen *eGFP* que actuó como un marcador fluorescente indicando la presencia de cigotos genéticamente editados.

Los autores Sanders *et al.* (2018) dejaron claro el reto metodológico que representó este logro, inyectaron un número indeterminado de cigotos, de los cuales sobrevivieron 321, y únicamente 14 embriones (4,4%) fueron *eGFP+* (positivos para la proteína verde fluorescente), y aunque algunas larvas se lograron fijar y desarrollar a pólipos primarios *eGFP+*, conforme avanzó el desarrollo a colonias la señal fluorescente fue perdiéndose dado que la mayoría de cigotos editados resultaron en larvas con mosaicismo y las células con el gen editado fueron perdiéndose durante la maduración. No obstante, los adultos de una colonia lograron mantener la señal fluorescente, estos fueron entrecruzados con organismos silvestres obteniendo algunas larvas *eGFP+*, de esta manera los autores lograron establecer una línea germinal genéticamente modificada usando CRISPR-Cas9, sentando así las bases para la edición genética en corales como una herramienta para enriquecer el entendimiento de los procesos regenerativos de *H. symbiolongicarpus* y otros cnidarios (Sanders *et al.* 2018).

Tabla 1. CRISPR-Cas en metazoarios marinos / CRISPR-Cas9 in marine metazoans

Phylum	Especie	Gen editado	Método de transfección	Referencias
Cnidaria	<i>Acropora millepora</i>	<i>FGF1a</i>	Microinyección	(Cleves <i>et al.</i> 2018)
		<i>GFP</i>		
		<i>RFP</i>		
		<i>HSF1</i>	Microinyección	(Cleves <i>et al.</i> 2020)
	<i>Hydractinia symbiolongicarpus</i>	<i>Eef1a</i>	Microinyección	(Sanders <i>et al.</i> 2018)
	<i>Clytia hemisphaerica</i>	<i>GFP CheRfx:123</i>	Microinyección	(Momose <i>et al.</i> 2018)
Mollusca	<i>Crassostrea gigas</i>	<i>Twist myostatin</i>	Microinyección	(Yu <i>et al.</i> 2019)
		<i>CgMELC</i>	Microinyección	(Li <i>et al.</i> 2021)
		<i>TDO</i>	Microinyección	(Crawford <i>et al.</i> 2020)
Rotifera	<i>Brachionus koreanus</i>	<i>Bk-CYP3045C1</i>	Electroporación en adultos	(Kim <i>et al.</i> 2019a)
Arthropoda	<i>Exopalaemon carinicauda</i>	<i>EcChi4</i>	Microinyección	(Gui <i>et al.</i> 2016)
		<i>EcEy</i>	Microinyección	(Gao <i>et al.</i> 2020)
		<i>EcNinaB-XI</i>	Microinyección	(Sun <i>et al.</i> 2020)
	<i>Parhyale hawaiiensis</i>	<i>Hox: Ubx, Antp, Scr, Dfd abdominal-A abdominal-B</i>	Microinyección	(Martin <i>et al.</i> 2016)
	<i>Eriocheir sinensis</i>	<i>Scarlet</i>	Microinyección	(Li <i>et al.</i> 2022)
Echinodermata	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	<i>Nodal</i>	Microinyección	(Lin & Su 2016)
		<i>Pks1</i>	Microinyección	(Oulhen & Wessel 2016)
		<i>Sp-Delta</i>	Microinyección	(Mellott <i>et al.</i> 2017)
		<i>SpAlx1, SpDsh, SpPks</i>	Microinyección	(Shevidi <i>et al.</i> 2017)
	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	<i>Pks1</i>	Microinyección	(Liu <i>et al.</i> 2019)
		<i>FMO3</i>	Microinyección	(Wessel <i>et al.</i> 2020)
		<i>GCM</i>		
Chordata	<i>Ciona intestinalis</i>	<i>Ebf</i>	Electroporación	(Stolfi <i>et al.</i> 2014)
		<i>Hox3</i>	Microinyección y	(Sasaki <i>et al.</i> 2014)
		<i>Hox5</i>	Electroporación	
	<i>Ciona robusta</i>	<i>Tcf</i>	Electroporación	(Kaplan <i>et al.</i> 2019)
		<i>Neurog</i>	Electroporación	(Kim <i>et al.</i> 2020)
		<i>Efcab6-related</i>	Electroporación	(Gibboney <i>et al.</i> 2020)
		<i>Netrin1</i>		
	<i>Salmo salar</i>	<i>Tyrosinase slc45a2</i>	Microinyección	(Edvardsen <i>et al.</i> 2014)
		<i>Dnd</i>	Microinyección	(Wargelius <i>et al.</i> 2016) (Güralp <i>et al.</i> 2020)
<i>Paralichthys olivaceus</i>	<i>Mstn</i>	Microinyección	(Kim <i>et al.</i> 2019b)	
	<i>Myomaker</i>	Electroporación	(Wang <i>et al.</i> 2021)	
<i>Pagrus major</i>	<i>Mstn</i>	Microinyección	(Kishimoto <i>et al.</i> 2018)	

Medusa *Clytia hemisphaerica* (Linnaeus, 1767)

Momose *et al.* (2018) inyectaron el complejo ribonucleoproteico Cas9-sgRNA en huevos de *C. hemisphaerica* observando que este método causa deleciones muy específicas (cinco bases) en los genes blanco, gen de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) y el gen *CheRfx123*, observando también los fenotipos correspondientes. Los autores resaltan haber encontrado las condiciones metodológicas para eliminar el fenómeno de mosaicismo.

PHYLLUM MOLLUSCA

CLASE BIVALVIA

Ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793)

C. gigas es una especie de gran importancia para la acuicultura. Yu *et al.* (2019) realizaron pruebas de concepto para el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta de edición genética, los genes *Twist* y *myostatin* fueron seleccionados como blanco. Probaron tres concentraciones de cada sgRNA a tres diferentes proporciones respecto a la proteína Cas9, los constructos fueron insertados en embriones por medio de microinyección, además de pruebas control de transfección que contenía únicamente material genético para síntesis de la Proteína Verde Fluorescente. Los autores evaluaron por secuenciación las ediciones alrededor del sitio blanco encontrando que sólo una de las 9 condiciones probadas fue efectiva. La tasa de mutación resultó entre el 18,2 al 26,7% (Yu *et al.* 2019). Por otro lado, la función de una proteína involucrada en la contracción muscular y por lo tanto en la movilidad, la miosina de cadena ligera, fue comprobada al editar el gen *CgMELC*. Las larvas con disrupción de dicho gen mostraron musculatura con defectos y movilidad reducida (Li *et al.* 2021).

CLASE CEPHALOPODA

Calamar de aleta larga *Doryteuthis pealeii* (Lesueur, 1821)

D. pealeii llega a su madurez sexual a los 6 meses, sus embriones son transparentes y es posible fertilizar *in vitro* a los ovocitos, lo que ha permitido el estudio de su biología del desarrollo. En esta especie se utilizó la tecnología CRISPR-Cas9 para demostrar la función de la enzima triptófano 2-3 dioxigenasa (TDO), que cataliza el primer paso en la biosíntesis del pigmento de los cromatóforos y los ojos de los calamares (Figon & Casas 2018). Embriones de esta especie fueron inyectados con el sistema CRISPR-Cas9 en diferentes etapas de división embrionaria. Se obtuvieron embriones que carecieron de cromatóforos, mostrando una coloración corporal blanca y los ojos de color rojo claro, demostrando así, la función en la pigmentación de la TDO. Aproximadamente en un 90% de los embriones se logró la disrupción de la TDO, resultando en casi una completa carencia de la pigmentación, la eficiencia fue mayor en los embriones inyectados 2 h después de la fertilización. Los autores remarcan que la habilidad de eliminar genes en calamares abre la posibilidad a explorar nuevas preguntas, por

ejemplo, ¿cómo es el camuflaje producido estructuralmente y controlado por el cerebro?, o ¿qué controla el desarrollo del arquetipo en cefalópodos? Este estudio marcó el camino para la aplicación en especies con importancia ecológica o económica en las que su desarrollo embrionario está todavía poco estudiado (Crawford *et al.* 2020).

PHYLLUM ROTIFERA

Rotífero marino *Brachionus koreanus* (Hwang, Dahms, Park & Lee, 2013)

Un estudio de concepto fue realizado en *B. koreanus* en el cual se probó la eficacia del sistema CRISPR-Cas9 en la edición del gen *Bk-CYP3045C1*. Kim *et al.* (2019a) utilizaron rotíferos adultos, insertaron por electroporación la proteína Cas9 modificada para dar señal fluorescente, lo que permitió un seguimiento visual de la eficiencia del sistema, la fluorescencia fue visible por un periodo de 24 h, después del cual se perdió. Probaron cinco sgRNA, encontrando que tres provocaron deleciones en el sitio blanco. Este estudio demuestra que CRISPR-Cas9 puede aplicarse en estudios de genética funcional de rotíferos (Kim *et al.* 2019a).

PHYLLUM ARTHROPODA

ORDEN DECAPODA

Camarón *Palaemon carinicauda* (Holthuis, 1950)

P. carinicauda es un decápodo carídeo de gran importancia comercial en China para la cual se ha logrado la edición genética de diversos genes usando CRISPR-Cas9. Gui *et al.* (2016) editaron la quitinasa-4 (*EcChi4*); se inyectaron 247 cigotos, el 35,62% eclosionaron a la larva zoea y únicamente el 14,17% se desarrolló a post-larva, de las cuáles en el 7,29% se detectaron mutaciones y sobrevivieron a la etapa adulta. Los promedios de peso y talla no difirieron significativamente con los adultos normales, los autores especulan que el gen *EcChi4* no tienen una influencia significativa en el desarrollo y crecimiento de esta especie, aunque este estudio no aporta información sobre la función del gen *EcChi4*, resulta metodológicamente valioso para la introducción del sistema en decápodos, pues por primera vez se probó una eficiencia alta en inducción de mutaciones por CRISPR-Cas9 (Gui *et al.* 2016).

El protocolo ha sido replicado para describir la función genética de otros genes. La formación del ojo compuesto en artrópodos es atribuida al gen de la familia *Pax6*, esta función fue confirmada en *P. carinicauda* editando y eliminando la función del gen *EcEy*. Los especímenes mutantes (8,7%) mostraron fenotipos con los ojos deformes y la mayoría no sobrevivió más allá del estadio mysis (Gao *et al.* 2020). En otro trabajo, se identificó por primera vez una relación con la respuesta inmune del gen de la enzima carotenoide isómero oxigenasa (*EcNinaB-X1*), pues los individuos mutantes mostraron mayor sobrevivencia ante una infección bacteriana inducida (Sun *et al.* 2020).

Cangrejo *Eriocheir sinensis* (Milne Edwards, 1853)

El gen *Scarlet* está involucrado en el transporte de precursores de pigmentos derivados del triptófano hacia los cromatóforos, la eliminación de la función de este gen en el decápodo *E. sinensis* por CRISPR-Cas9 resultó en individuos cuya coloración de los ojos se redujo notablemente (Li *et al.* 2022). Los autores hacen un especial hincapié en las dificultades metodológicas encontradas durante la microinyección para la transfección de los componentes del sistema CRISPR-Cas en este crustáceo y en otro decápodo de agua dulce (*Neocaridina heteropoda*), así como en la alta mortalidad observada. Esto indica que aún es necesario adecuar las estrategias para la aplicación exitosa de la técnica en decápodos, un grupo muy importante en acuicultura.

ORDEN AMPHIPODA

Anfípodo marino *Parhyale hawaiiensis* (Dana, 1853)

Martin *et al.* (2016) utilizaron metodología CRISPR-Cas9 y RNAi (ARN de interferencia) para identificar la participación de seis genes *Hox* en el desarrollo, morfología y funcionalidad de cada extremidad del anfípodo *Parhyale hawaiiensis*. Los autores remarcan la diversificación funcional de los apéndices en los crustáceos, siendo un modelo adecuado para estudiar los genes *Hox*, un grupo de genes relacionados entre sí, que determinan el desarrollo del plan corporal de un embrión en su eje anteroposterior. Con una serie de minuciosos experimentos, los autores lograron descifrar la intrincada participación de cada uno de los genes *Hox* (tanto de manera individual como colectiva) en el desarrollo de cada segmento, en el eje antero-posterior y próximo-distal. Con esta tecnología lograron definir que los genes *abd-A* y *Abd-B* están encargados de la especialización de los apéndices abdominales y torácicos. *Ubx* es necesario para el desarrollo de las branquias. *Antp* dicta la morfología de las quelas de manera individual; y de manera modular con *Scr* confieren la identidad híbrida de los maxilípedos (una parte mandibular y otra torácica). Finalmente, el gen *Scr* se expresa de manera secuencial con *Dfd*, ambos contribuyen a la heteronomía de los segmentos de la boca. Con los resultados anteriores, los investigadores resaltan el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta para la mutagénesis somática en organismos modelos emergentes y cómo el conocer las funciones de los genes *Hox* nos puede llevar a un mejor entendimiento en la evolución de los apéndices en crustáceos.

PHYLLUM ECHINODERMATA

CLASE ECHINOIDEA

Erizo morado *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson, 1857)

Los erizos son quizá los organismos marinos mejor estudiados con base en técnicas de edición genética. Además, la vasta información de genómica y transcriptómica

disponible para este taxón, ha contribuido a la comprensión de redes regulatorias de expresión genética en los procesos del desarrollo embrionario, incluyendo la especificación y morfogénesis. La especie más estudiada es *Strongylocentrotus purpuratus* y se considera especie modelo en estudios de biología del desarrollo embrionario, pues las larvas presentan patrones de pigmentación que son útiles para entender las bases moleculares de los mecanismos de especificación de cada tipo celular.

Lin & Su (2016) marcaron un hito probando por primera vez la eficiencia de CRISPR-Cas9 en la edición de cigotos de *S. purpuratus*, estos autores lograron editar el gen *nodal*, que determina el patrón de organización de estructuras en el eje dorso-ventral, encontrando que, en 5 de 6 tratamientos, las larvas no mostraron un desarrollo normal de algunas estructuras; por ejemplo, no ocurrió la inclinación del archenteron, la cavidad alimentaria rudimentaria de los embriones en etapa gástrula. Como fue previsto por los autores, los métodos descritos catalizaron el uso de CRISPR-Cas9 para la edición genética de erizos marinos. Más tarde en el mismo año, Oulhen & Wessel (2016) eliminaron los genes *Pks1* de *S. purpuratus*, un gen que codifica para la enzima policétido sintasa-1, involucrada en la síntesis de un pigmento embrionario, la disrupción de este gen resultó en larvas albinas, generando así una aproximación que permite evaluar el éxito de edición genética con una lectura simple de cambios en la coloración en las larvas. Mellott *et al.* (2017) usaron CRISPR-Cas9 para editar el gen *Sp-Delta*, y en combinación con otros métodos lograron identificar los precursores embrionarios de las células neuronales. En esta misma especie, Shevidi *et al.* (2017) utilizaron una variante de la Cas9, Cas9-DA un sistema fusionado con una citidina-deaminasa que tiene la ventaja de inducir cambios de una sola base en lugar de indels (inserciones y deleciones) largos que la Cas9 típica suele causar. Los autores lograron editar los genes *SpAlx1*, *SpDsh*, y *SpPks* involucrados en la formación del exoesqueleto, la orientación del eje embrionario y la síntesis de pigmentos, respectivamente, obteniendo larvas con los fenotipos correspondientes (Shevidi *et al.* 2017).

Erizo de mar *Hemicentrotus pulcherrimus* (A. Agassiz, 1864)

CRISPR-Cas9 también ha sido utilizado para editar genes asociados a la pigmentación del erizo marino japonés *H. pulcherrimus*. Liu *et al.* (2019) editaron el gen *Pks1* obteniendo erizos albinos que sobrevivieron hasta adultos. Wessel *et al.* (2020) editaron además los genes *FMO3* (monooxidasa dependiente de flavina) y *GCM* (Glial cell missing), encontrando que *FMO3* es esencial para la pigmentación en larvas, pero en etapas juveniles y adultos pierde participación en esta función. Los autores encontraron también que los adultos albinos que carecían de estos genes fueron menos resistentes a condiciones ambientales estresantes como cambios en la intensidad de la luz, proponiendo que estos genes de pigmentación tienen un papel importante en la

defensa inmune y otros mecanismos de sobrevivencia de los adultos. De esta manera, se comprueba la eficiencia del sistema para este taxón y se abren posibilidades para los estudios de procesos tardíos en el desarrollo, como la formación del rudimento adulto, el mecanismo de la metamorfosis, entre otros.

PHYLLUM CHORDATA

CLASE ASCIDIACEA

Ascidia Ciona intestinalis (Linnaeus, 1767)

Sasaki *et al.* (2014) y Stolfi *et al.* (2014) reportaron de manera independiente la viabilidad de edición genética mediada por CRISPR-Cas9 en la ascidia *Ciona intestinalis*, una especie considerada como modelo para estudios de biología del desarrollo, ambos reportes representan las primeras pruebas de concepto a partir de las cuales se ha definido la función de varios genes de *Ciona* (Kaplan *et al.* 2019, Gibboney *et al.* 2020, Kim *et al.* 2020).

Sasaki *et al.* (2014) seleccionaron los genes *Hox3*, *Hox* y *Hox12* probando un total de 8 ARN guía y dos métodos de transfección: electroporación y microinyección. Aunque no se detectó ningún fenotipo asociado con la edición de estos genes, las pruebas de concepto y las condiciones metodológicas descritas (concentración de componentes, método de transfección y eficiencia), sentaron las bases para investigaciones subsecuentes. Por otra parte, Stolfi *et al.* (2014), usando electroporación en embriones de *C. intestinalis* lograron la edición del gen *Ebf*, los fenotipos observados sugieren que la función de *Ebf* es el desarrollo de tejidos durante la embriogénesis como las neuronas motoras ganglionares y los músculos del sifón atrial.

CLASE TELEOSTEI

Salmón del Atlántico *Salmo salar* (Linnaeus, 1758)

S. salar es un pez de gran relevancia para la acuicultura, en numerosos reportes se han presentado grandes avances en su edición genética mediante el uso de CRISPR-Cas9. Uno de los aspectos más relevantes es que en ésta y otras especies de peces, se ha logrado la transmisión de las modificaciones genéticas hacia la línea germinal, es decir, a las células sexuales, encargadas de heredar la información a la siguiente generación, abriendo grandes posibilidades hacia el aseguramiento alimentario sostenible. Se mencionan algunos ejemplos seleccionados.

El primer reporte fue en el 2014 por Edvardsen *et al.* (2014) lograron la eliminación de la función de los genes *Tyrosinase* (*tyr*) y *slc45a2*, ambos con un rol importante en la pigmentación del pez. Los componentes del sistema CRISPR-Cas9 fueron inyectados en embriones dos semanas posteriores a la fertilización. En el 22% de las larvas inyectadas para edición del gen *tyr*, y en el 40% de las inyectadas para el gen *slc45a2* se observó algún defecto en la pigmentación. Al paso del tiempo sólo el 8,7 y 5,1% de los juveniles mantenían estos defectos de la pigmentación. Cabe señalar que la edición de

ambos genes resultó en varios fenotipos con diferentes grados de pérdida de pigmentación, los análisis de las secuencias genéticas alrededor de los sitios blancos demostraron la presencia de un alto grado de mosaicismo. Los autores resaltan el uso de CRISPR-Cas9 como una herramienta con un gran potencial tecnológico para especies con importancia comercial con el fin de comprender mejor su salud, tasa de crecimiento, inmunología, entre otras.

S. salar suele mantenerse para engorda en jaulas flotantes en aguas costeras, esta práctica representa un riesgo de escape de ejemplares lo cual a su vez puede impactar negativamente en las poblaciones silvestres. Bajo este precepto el grupo de Anna Wargelius del Institute of Marine Research en Noruega (Wargelius *et al.* 2016, Güralp *et al.* 2020) realizaron experimentos de pérdida y recuperación de la función del gen *Dnd*, un factor de transcripción requerido en la estabilidad de las células de los ovarios, al eliminar este gen mediante tecnología CRISPR-Cas9 se produjeron salmones estériles, que pueden ser revertidos temporalmente a fértiles mediante otras técnicas de manipulación genética como ARN de interferencia, ofreciendo así una posible solución a el riesgo de entrecruzamiento entre especímenes cultivados y silvestres.

Lenguado *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846)

En cigotos de *P. olivaceus* se han probado dos métodos de transfección del sistema CRISPR-Cas9, la microinyección obteniendo un 9,1% de sobrevivencia al primer estadio larvario (Kim *et al.* 2019b) y la electroporación, con un 7-12% de sobrevivencia (Wang *et al.* 2021). En ambos trabajos se editaron genes involucrados en el correcto desarrollo muscular, como una primera aproximación para el mejoramiento de la productividad en el cultivo de esta especie. El gen *Mstn* un gen regulador negativo del desarrollo del músculo esquelético cuya edición resultó en peces con mayor masa muscular (Kim *et al.* 2019b) y el gen *myomaker* involucrado en la fusión de células musculares y por lo tanto la formación del músculo (Wang *et al.* 2021). Se destaca que, aunque la sobrevivencia de los cigotos a ambos métodos de transfección es similar (7 vs. 12%), la eficiencia en la edición es mucho mayor cuando se usa la microinyección, obteniendo un 40-75% de individuos editados a diferencia del 5-10% cuando se inserta el sistema por electroporación. Los resultados de ambos estudios aportan información para comprender el mecanismo que causa la asimetría en la distribución del músculo esquelético en esta especie de lenguado.

Pargo *Pagrus major* (Temminck & Schlegel, 1843)

P. major es un pez de importancia económica en Japón, donde se cultiva y se ha generado por medio de CRISPR-Cas9 una variante de *P. major* mutada en el gen *Mstn*, gen regulador negativo del desarrollo del músculo esquelético que, al eliminarse acelera el crecimiento del músculo esquelético en peces. Además de comprobar la función de este gen en *P. major*, Kishimoto *et al.* (2018) obtuvieron como resultado final 39 adultos de la generación F1 (hijos de los especímenes manipulados en etapa cigoto) que resultaron

homocigotos (alelos iguales) editados en ambos alelos del gen *Mstn*, estableciendo así la primera variante de *P. major* que muestra un incremento del 16% respecto al control en la masa muscular comestible (Kishimoto *et al.* 2018). El estudio demostró que la edición genética puede acelerar el mejoramiento genético de especies de importancia en la acuicultura.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Comparado con organismos modelos tradicionales de investigación en biología, tales como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) o la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1839), el uso de CRISPR-Cas9 como herramienta de genética funcional ha sido escasamente utilizada en organismos marinos, aun así se ha comprobado la viabilidad técnica que posee, lo que vaticina su enorme potencial para aplicaciones futuras. La información biológica generada por CRISPR-Cas9 estaría considerada como base para el manejo, protección y conservación de especies marinas. El sistema de edición genética CRISPR-Cas9 ya tiene una categoría de herramienta viable ante la posibilidad de mejoramiento de especies de importancia para la acuicultura (*e.g.*, en *C. gigas*, *S. salar* y *P. major*), con el resultado de aumento de la producción y, en consecuencia, la disponibilidad estable, suficiente y sustentable de alimentos de origen marino; así como para el desarrollo de métodos específicos para el tratamiento de enfermedades causadas por infecciones virales o bacterianas.

Cada avance en la aplicación de ediciones genéticas puede ser utilizado incluso en estudios de respuestas adaptativas de los metazoarios marinos ante presiones ambientales de origen antropogénico (*e.g.*, cambio o crisis climática). Aunque la aplicación de CRISPR-Cas en metazoarios marinos crece a ritmo menos acelerado que en especies terrestres, se han establecido en el medio científico las bases técnicas para su desarrollo en *taxa* marinos, por lo que en un futuro esta metodología podrá ser complemento a investigar y resolver preguntas, problemáticas ambientales y múltiples aplicaciones biotecnológicas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Lic. Gerardo Hernández del departamento de Extensión y Divulgación Científica del CIBNOR por el apoyo brindado para ilustrar la Figura 3. A los proyectos CONACYT CB-2015-01-256318 y A1-S-7729 a cargo de Liliana Rojo Arreola.

LITERATURA CITADA

Barrangou R & JA Doudna. 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology* 34(9): 933-941.

- Campenhout CV, P Cabochette, AC Veillard, M Laczik, A Zelisko-Schmidt, C Sabatel, M Dhainaut, B Vanhollebeke, C Gueydan & V Kruys. 2019.** Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. *Biotechniques* 66(6): 295-302.
- Cleves PA, ME Strader, LK Bay, JR Pringle & MV Matz. 2018.** CRISPR/Cas9-mediated genome editing in a reef-building coral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(20): 5235-5240.
- Cleves PA, AI Tinoco, J Bradford, D Perrin, LK Bay & JR Pringle. 2020.** Reduced thermal tolerance in a coral carrying CRISPR-induced mutations in the gene for a heat-shock transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(46): 28899-28905.
- Crawford K, JF Diaz-Quiroz, KM Koenig, N Ahuja, CB Albertin & JJC Rosenthal. 2020.** Highly efficient knockout of a squid pigmentation gene. *Current Biology* 30(17): 3484-3490.
- Demirci S, A Leonard, JJ Haro-Mora, N Uchida & JF Tisdale. 2019.** CRISPR/Cas9 for sickle cell disease: Applications, future possibilities, and challenges. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1144: 37-52.
- Doudna JA & E Charpentier. 2014.** The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346 (6213), 1258096. <doi: 10.1126/science.1258096>
- Edvardsen RB, S Leininger, L Kleppe, KO Skaftnesmo & A Wargelius. 2014.** Targeted mutagenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) using the CRISPR/Cas9 system induces complete knockout individuals in the F0 Generation. *PLoS ONE* 9(9), e108622. <doi: 10.1371/journal.pone.0108622>
- Fajrial AK, QQ He, NI Wirusanti, JE Slansky & X Ding. 2020.** A review of emerging physical transfection methods for CRISPR/Cas9-mediated gene editing. *Theranostics* 10(12): 5532-5549.
- Figon F & J Casas. 2019.** Ommochromes in invertebrates: biochemistry and cell biology. *Biological Reviews* 94: 156-183.
- Gao Y, X Zhang, X Zhang, J Yuan, J Xiang & F Li. 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.
- Gibboney S, J Orvis, K Kim, CJ Johnson, P Martinez-Feduchi, EK Lowe, S Sharma & A Stolfi. 2020.** Effector gene expression underlying neuron subtype-specific traits in the Motor Ganglion of *Ciona*. *Developmental Biology* 458(1): 52-63.
- Gonzalez-Duarte RJ, W Espinosa de Aquino, F García-Carreño & L Rojo-Arreola. 2021.** The hurdles of delivery CRISPR-Cas9 components for gene editing in penaeid shrimps. *Aquaculture Research* 52(11): 5297-5306. <https://doi.org/10.1111/are.15398>
- Gui T, J Zhang, F Song, Y Sun, S Xie, K Yu & J Xiang. 2016.** CRISPR/Cas9-mediated genome editing and mutagenesis of EcChi4 in *Exopalaemon carinicauda*. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 6(11): 3757-3764.

- Güralp H, KO Skaftnesmo, E Kjærner-Semb, AH Straume, L Kleppe, RW Schulz, RB Edvardsen & A Wargelius. 2020.** Rescue of germ cells in *dnd* crispant embryos opens the possibility to produce inherited sterility in Atlantic salmon. *Scientific Reports* 10(1), 18042. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-74876-2>>
- Haussler M, K Schönig, H Eckert, A Eschstruth, J Mianné, JB Renaud, S Schneider-Maunoury, A Shkumatava, L Teboul, J Kent, JS Joly & JP Concordet. 2016.** Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* 17(1), 148. <doi 10.1186/s13059-016-1012-2>
- Horvath P & R Barrangou. 2010.** CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science* 327(5962): 167-170.
- Ishino Y, H Shinagawa, K Makino, M Amemura & A Nakamura. 1987.** Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology* 169(12): 5429-5433.
- Jansen R, JDA van Embden, W Gaastra & LM Schouls. 2002.** Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 43(6): 1565-1575.
- Kaplan NA, W Wang & L Christiaen. 2019.** Initial characterization of Wnt-Tcf functions during *Ciona* heart development. *Developmental Biology* 448(2): 199-209.
- Kim DH, J Yu, JC Park, CB Jeong, S Bae & JS Lee. 2019a.** Targeted cytochrome P450 3045C1 (CYP3045C1) gene mutation via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Hydrobiologia* 844: 117-128.
- Kim J, JY Cho, JW Kim, HC Kim, JK Noh, YO Kim, HK Hwang, WJ Kim, SY Yeo, CM An, JY Park & HJ Kong. 2019b.** CRISPR/Cas9-mediated myostatin disruption enhances muscle mass in the olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 512, 734336. <<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734336>>
- Kim K, S Gibboney, F Razy-Krajka, EK Lowe, W Wang & A Stolfi. 2020.** Regulation of neurogenesis by FGF signaling and neurogenin in the invertebrate chordate *Ciona*. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, 477. <<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00477>>
- Kishimoto K, Y Washio, Y Yoshiura, A Toyoda, T Ueno, H Fukuyama, K Kato & M Kinoshita. 2018.** Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture* 495: 415-427.
- Labun K, TG Montague, JA Gagnon, SB Thyme & E Valen. 2016.** CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research* 44(W1): W272-W276. <doi: 10.1093/nar/gkw398>
- Laumer CE, R Fernández, S Lemer, D Combosch, KM Kocot, A Riesgo, SC Andrade, W Sterrer, MV Sørensen & G Giribet. 2019.** Revisiting metazoan phylogeny with genomic sampling of all phyla. *Proceedings of the Royal Society B* 286(1906), 20190831. <<http://doi.org/10.1098/rspb.2019.0831>>
- Li H, H Yu, S Du & Q Li. 2021.** CRISPR/Cas9 mediated high efficiency knockout of myosin essential light chain gene in the Pacific oyster (*Crassostrea Gigas*). *Marine Biotechnology* 23(2): 215-224.
- Li R, Q Meng, J Qi, L Hu, J Huang, Y Zhang, J Yang & J Sun. 2022.** Microinjection-based CRISPR/Cas9 mutagenesis in the decapoda crustaceans *Neocaridina heteropoda* and *Eriocheir sinensis*. *Journal of Experimental Biology* 225(6), jeb243702. <doi: 10.1242/jeb.243702>
- Lin CY & YH Su. 2016.** Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Developmental Biology* 409(2): 420-428.
- Liu D, A Awazu, T Sakuma, T Yamamoto & N Sakamoto. 2019.** Establishment of knockout adult sea urchins by using a CRISPR-Cas9 system. *Development Growth and Differentiation* 61(6): 378-388.
- Martin A, JM Serano, E Jarvis, HS Bruce, J Wang, S Ray, CA Barker, LC O'Connell & NH Patel. 2016.** CRISPR/Cas9 mutagenesis reveals versatile roles of Hox genes in crustacean limb specification and evolution. *Current Biology* 26(1): 14-26.
- Mehravar M, A Shirazi, M Nazari & M Banan. 2019.** Mosaicism in CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Developmental Biology* 445(2): 156-162.
- Mellott DO, J Thisdelle & RD Burke. 2017.** Notch signaling patterns neurogenic ectoderm and regulates the asymmetric division of neural progenitors in sea urchin embryos. *Development* 144(19): 3602-3611.
- Mojica FJM, G Juez & F Rodríguez-Valera. 1993.** Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology* 9(3): 613-621.
- Momose T, AD Cian, K Shiba, K Inaba, C Giovannangeli & JP Concordet. 2018.** High doses of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein efficiently induce gene knockout with low mosaicism in the hydrozoan *Clytia hemisphaerica* through microhomology-mediated deletion. *Scientific Reports* 8: 11734. <10.1038/s41598-018-30188-0>
- Nakanishi T, Y Kato, T Matsuura & H Watanabe. 2014.** CRISPR/Cas-mediated targeted mutagenesis in *Daphnia magna*. *PLoS One* 9(5), e98363. <10.1371/journal.pone.0098363>
- Nakata A, M Amemura & K Makino. 1989.** Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Journal of Bacteriology* 171(6): 3553-3556.
- Nussbaum L, JM Telenius, S Hill, PP Hirschfeld, MC Suci, WIGWAM Consortium, DJ Downes & JR Hughes. 2018.** High-throughput genotyping of CRISPR/Cas edited cells in 96-well plates. *Methods and Protocols* 1(3), 29. <doi: 10.3390/mps1030029>
- Oulhen N & GM Wessel. 2016.** Albinism as a visual, in vivo guide for CRISPR/Cas9 functionality in the sea urchin embryo. *Molecular Reproduction and Development* 83(12): 1046-1047.
- Perez RF, RKM Nyman, AAT Johnson, MP Navarro, MH Ryan, W Erskine & P Kaur. 2018.** CRISPR-Cas systems: ushering in the new genome editing era. *Bioengineered* 9(1): 214-221.

- Ran FA, PD Hsu, J Wright, V Agarwala, DA Scott & F Zhang. 2013.** Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 8(11): 2281-2308.
- Ren X, Z Yang, J Xu, J Sun, D Mao, Y Hu, SJ Yang, HH Qiao, X Wang, Q Hu, P Deng, LP Liu, JY Ji, JB Li & JQ Ni. 2014.** Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in *Drosophila*. *Cell Reports* 9(3): 1151-1162.
- Rentzsch F, JH Fritzenwanker, CB Scholz & U Technau. 2008.** FGF signalling controls formation of the apical sensory organ in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Development* 135(10): 1761-1769.
- Sanders SM, Z Ma, JM Hughes, BM Riscoe, GA Gibson, AM Watson, H Flici, U Frank, CE Schnitzler, AD Baxevanis & ML Nicotra. 2018.** CRISPR/Cas9-mediated gene knocking in the hydroid *Hydractinia symbiolongicarpus*. *BMC Genomics* 19(649): 1-17.
- Sasaki H, K Yoshida, A Hozumi & Y Sasakura. 2014.** CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the ascidian *Ciona intestinalis*. *Development Growth and Differentiation* 56(7): 499-510.
- Sato M, M Ohtsuka, S Watanabe & CB Gurumurthy. 2016.** Nucleic acids delivery methods for genome editing in zygotes and embryos: the old, the new, and the old-new. *Biology Direct* 11(1), 16. <doi: 10.1186/s13062-016-0115-8>
- Shen H, GD Strunks, BJPM Klemann, PJJ Hooykaas & S de Pater. 2017.** CRISPR/Cas9-induced double-strand break repair in *Arabidopsis* nonhomologous end-joining mutants. *G3: Genes, Genomes and Genetics* 7(1): 193-202.
- Shevidi S, A Uchida, N Schudrowitz, GM Wessel & M Yajima. 2017.** Single nucleotide editing without DNA cleavage using CRISPR/Cas9-deaminase in the sea urchin embryo. *Development Dynamics* 246(12): 1036-1046.
- Stolfi A, S Gandhi, F Salek & L Christiaen. 2014.** Tissue-specific genome editing in *Ciona* embryos by CRISPR/Cas9. *Development (Cambridge)* 141(21): 4115-4120.
- Sun Y, C Yan, M Liu, Y Liu, W Wang, W Cheng, F Yang & J Zhang. 2020.** CRISPR/Cas9-mediated deletion of one carotenoid isomeroxygenase gene (EcNinaB-X1) from *Exopalaemon carinicauda*. *Fish & Shellfish Immunology* 97: 421-431.
- Wang L, X Tan, Z Wu, L Wang, S Jiao, Y Zou, G Ji & F You. 2021.** Targeted mutagenesis in the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) using the CRISPR/Cas9 system with electroporation. *Biologia* 76: 1297-1304.
- Wargelius A, S Leininger, KO Skaftnesmo, L Kleppe, E Andersson, GL Taranger, RW Schulz & RB Edvardsen. 2016.** *Dnd* knockout ablates germ cells and demonstrates germ cell independent sex differentiation in Atlantic salmon. *Scientific Reports* 18(6), 21284. <doi: 10.1038/srep21284>
- Wessel GM, M Kiyomoto, T-L Shen & M Yajima. 2020.** Genetic manipulation of the pigment pathway in a sea urchin reveals distinct lineage commitment prior to metamorphosis in the bilateral to radial body plan transition. *Scientific Reports* 10(1), 1973. <doi.org/10.1038/s41598-020-58584-5>
- Yu H, H Li, Q Li, R Xu, C Yue & S Du. 2019.** Targeted gene disruption in Pacific oyster based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Marine Biotechnology* 21(3): 301-309.
- Zhang S, J Shen, D Li & Y Cheng. 2021.** Strategies in the delivery of Cas9 ribonucleoprotein for CRISPR/Cas9 genome editing. *Theranostics* 11(2): 614-648. <doi: 10.7150/thno.47007>

Recibido el 10 de noviembre 2021

Acceptado el 24 de mayo 2022