

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



***DETECCIÓN DE UN POLIMORFISMO MARCADOR DE SEXO
MEDIANTE CRISPR-CAS 12A EN SALMÓN COHO***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en
Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular y
Memoria para optar al título de Bioquímica por:**

CAMILA PAZ MONDACA CONTRERAS

Director de tesis: Dr. Víctor Martínez Moncada

Santiago, Chile 2023.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

CAMILA PAZ MONDACA CONTRERAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Víctor Martínez Moncada

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lorena García

Dr. Carlos Santiviago

Dra. Claudia Stange

Agradecimientos

Agradezco a mi familia, padres y hermana, por haberme apoyado durante todo este proceso, para cumplir mis objetivos académicos y personales, prestando consejo y palabras de ánimo, y cuidando de mí en los momentos más difíciles. Mi gratitud al laboratorio de investigaciones en biotecnología y genómica animal (Favet-Inbiogen) y a mi director de tesis, por darme la oportunidad de participar en su proyecto, que me permitió ampliar mi conocimiento y aplicar una técnica novedosa a desarrollar. Agradezco a docentes y compañeros que fueron parte de mi carrera universitaria.

Muchas gracias.

Índice general

Índice general.....	IV
Índice de figuras y tablas.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción.....	1
1.1. Salmonicultura: Salmón Coho.....	1
1.2. Técnicas de detección de ácidos nucleicos.....	3
1.3. Amplificación de polimerasa recombinasa (RPA).....	5
1.4. Sistema CRISPR-Cas.....	6
1.5. Sistema CRISPR-Cas para la detección de ácidos nucleicos.....	8
1.5.a. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 13.....	8
1.5.b. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 12a.....	9
1.5.c. CRISPR-Cas12a o CRISPR-Cas13 ¿Cuál utilizar?.....	9
2. Hipótesis.....	12
3. Objetivo General.....	12
4. Objetivos Específicos.....	12
5. Modelo Experimental.....	13
6. Métodos.....	14
6.1. Muestras.....	14
6.2. Reacción en cadena de la polimerasa PCR.....	14
6.3. Ensayo de Restricción.....	15
6.4. Ensayo de <i>High resolution melting</i>	15
6.5. Diseño de sgARN.....	15

6.6. Configuración del ensayo de detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a asociado a PCR convencional.....	15
6.7. Configuración del ensayo de detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a asociado a RPA.....	16
7. Resultados.....	18
7.1. Caracterización genotípica de la zona de detección de sexo en salmón Coho	18
7.1.a. Detección de sexo mediante ensayo de enzima de restricción.....	18
7.1.b. Secuenciación.....	18
7.1.c. Detección de sexo mediante HRM.....	19
7.1.d. Amplificación.....	19
7.2. Detección de una inserción sexo específica mediante sistema de CRISPR-Cas 12a en salmón Coho.....	23
7.2.a. Diseño de sgARN.....	23
7.2.b. Ensayo de detección mediante CRISPR-Cas 12 anclado a PCR convencional.....	23
7.2.c. Ensayo visualización UV.....	24
7.2.d. Ensayo de sensibilidad.....	24
7.3. Prueba prototipo de campo para la identificación de sexo en salmón Coho mediante sistema CRISPR-Cas 12a.....	27
7.3.a. Selección de partidores.....	27
7.3.b. Detección CRISPR-Cas 12a anclado a RPA.....	28
8. Discusión.....	29
8.1. Asociación genotípica de la secuencia del gen <i>GH-2</i> y la detección del sexo en salmón Coho	29
8.2. CRISPR-Cas 12a para la detección de sexo en salmón Coho.....	30
8.3. Procedimientos para el mejoramiento de la técnica.....	32
9. Conclusiones.....	34
10. Referencias.....	35
11. Anexo.....	41

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Secuencia del gen <i>GH-2</i> en salmón Coho.....	4
Figura 2. Mecanismo de amplificación isotérmica RPA.....	6
Figura 3. Biología del sistema CRISPR-Cas.....	7
Figura 4. Diagrama del sistema CRISPR-Cas 12a.	10
Figura 5. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 12a y CRISPR-Cas 13.....	11
Figura 6. Modelo experimental.....	13
Figura 7. Caracterización genotípica de la zona a detectar.....	20
Figura 8. Análisis de productos de PCR.....	22
Figura 9. Diseño de ARN guía para la detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a.....	23
Figura 10. Prueba de detección de sexo en salmón Coho mediante CRISPR-Cas 12a anclado a PCR	25
Figura 11. Ensayo de sensibilidad.....	26
Figura 12. Ensayo de prueba de partidores candidatos de RPA.....	27
Figura 13. Prueba de detección de sexo en salmón Coho mediante CRISPR-Cas 12a anclado a RPA.....	28
Figura 1. Anexo. Posicionamiento de los principales elementos en la secuencia del gen <i>GH-2</i>	42
Figura 2. Anexo. Cromatograma secuenciación SANGER.....	43
Figura 3. Anexo. Amplicones objetivo de reacción <i>HinfI</i> y CRISPR-Cas 12a en gel de agarosa.....	44
Figura 4. Anexo. Progresión en el tiempo de la fluorescencia del ensayo de sensibilidad.....	45
Tabla 1. Detección mediante HRM.....	21
Tabla 1. Anexo. Secuencias de partidores, sgARN y sonda utilizada.....	41
Tabla 2. Anexo. Resumen de resultados.....	46

Abreviaturas

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ATP:	Adenosín trifosfato
BSA:	Albúmina de suero bovino
CES:	Secuenciación de electroforesis capilar
CRISPR:	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<i>Et al:</i>	Y otros
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fw:	<i>Forward</i>
GH:	Hormona del crecimiento
HPV:	Virus del papiloma humano
HRM:	<i>High resolution melting</i>
LAMP:	Amplificación isotérmica mediada por bucle
LM:	Marcador inferior
Ns:	No significativo
PAM:	Motivo adyacente de protoespaciador
Pb:	Pares de bases
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PM:	Peso molecular
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RPA:	Amplificación de polimerasa recombinasa
RT:	Transcripción inversa
Rv:	<i>Reverse</i>
SARS-CoV-2:	Coronavirus de tipo 2 causante del síndrome respiratorio agudo severo
Sec:	Secuencia
sgARN:	Ácido ribonucleico guía
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido
UM:	Marcador superior
UV:	Ultravioleta

Resumen

En salmon Coho se ha identificado un marcador genético asociado al sexo que corresponde a la variación estructural del gen *GH-2*. Esta variante permite determinar el sexo considerando diversas metodologías, tales como PCR asociado a un ensayo de enzima de restricción y “high resolution melting” (HRM), no obstante requieren de equipos especializados y en algunos casos son muy laboriosas de implementar en la práctica. El sistema CRISPR-Cas permite la detección de nucleótidos utilizando el mecanismo de acción de la enzima Cas 12a, que reconoce una secuencia de ADN específica dirigido por un ARN guía, la cual desencadena una actividad colateral de corte permitiendo a través de reporteros detectar mediante fluorescencia las secuencia objetivo. Dado que esta técnica es posible de realizar de manera portátil sin comprometer parámetros analíticos, se propone a CRISPR-Cas 12a como candidato para la detección de nucleótidos. El objetivo de este trabajo es desarrollar un sistema de detección de secuencias específicas asociadas al sexo en salmon Coho mediante CRISPR-Cas 12a, acoplado a PCR o a la amplificación con recombinasa polimerasa (RPA), permitiendo la detección mediante fluorescencia directa.

En primer lugar, se determinó el sexo de muestras de individuos mediante ensayo de restricción *HinfI*, y se realizó el procedimiento de secuenciación SANGER para determinar los controles de reacción. Además, se desarrolló una prueba de identificación de sexo mediante HRM la cual es nuestro ensayo de referencia o “gold standard”.

El sistema CRISPR/cas12 se implementó para la detección de una inserción presente en machos, donde se diseñó un ARN guía adyacente a un sitio PAM. La visualización positiva de la fluorescencia discernible mediante un transiluminador UV se obtuvo utilizando relaciones mínimas de 20 nM, del complejo ARN guía y enzima Cas 12a, considerando una concentración mínima del amplicón obtenido mediante PCR a una concentración de 0,1 ng/μl. Los resultados fueron 10 positivos y 10 negativos considerando muestras de individuos control, definidas como macho y hembras respectivamente. Se generó un prototipo de campo mediante un ensayo CRISPR-Cas 12a acoplado a RPA. Los resultados señalaron diferencias en fluorescencia significativamente más altas en machos cuando se comparan con hembras.

Al aplicar las diferentes técnicas de determinación de sexo: ensayo de restricción mediante *HinfI*, HRM, CRISPR-Cas 12a acoplado a PCR y CRISPR-Cas 12a acoplado a RPA, se logró un 100% de consistencia entre los distintos análisis.

En conclusión, se desarrolló un prototipo de campo para la determinación del sexo en salmón Coho, el cual requiere como insumo el ADN de animales, obtenidos mediante un procedimiento estándar de extracción. Este método presenta un 100% de eficiencia para la detección temprana del sexo en esta especie, sin la necesidad de esperar grados avanzados de maduración gonadal, es de relevante para la implementación de poblaciones monosexo, lo cual permite un mejoramiento significativo de la rentabilidad del sector.

Abstract

DETECTION OF A SEX MARKER POLYMORPHISM BY A CRISPR-CAS 12A ASSAY IN COHO SALMO

A sex-associated genetic marker has been identified in Coho salmon which corresponds to the structural variation of the *GH-2* gene. This variant allows sex determination using different methodologies, such as PCR associated with a restriction enzyme assay and high resolution melting (HRM), but they require specialised equipment and in some cases are very laborious to implement in practice. The CRISPR-Cas system enables the detection of nucleotides using the mechanism of action of the Cas 12a enzyme, which recognises a specific DNA sequence directed by a guide RNA, which triggers a cleavage collateral activity allowing the target sequence to be detected by fluorescence through reporters. Since this technique can be performed in a portable format without compromising analytical parameters, CRISPR-Cas 12a is proposed as a candidate for nucleotide detection. The objective of this work is to develop a system for detection of sex-specific sequences in Coho salmon based on CRISPR-Cas 12a, linked to PCR or recombinase polymerase amplification (RPA), enabling detection by direct fluorescence.

The sex of individual samples was determined by *HinfI* restriction assay, and the SANGER sequencing procedure was performed to determine the reaction controls. In addition, an HRM sex identification test was developed which is our gold standard assay.

The CRISPR/cas12 system was implemented, for the detection of an insertion present in males, where a guide RNA was designed adjacent to a PAM site. The positive visualisation of the discernible fluorescence using a UV transilluminator was obtained using minimum ratios of 20 nM of the guide RNA and Cas12a enzyme complex, considering a minimum concentration of the amplicón obtained by conventional PCR at a concentration of 0.1 ng/µl. The results were 10 positive and 10 negative considering samples from control individuals, defined as male and female, respectively. A field prototype was generated using a CRISPR-Cas 12a linked to RPA assay. The results indicated significantly higher fluorescence differences in males when compared to females.

When applying the different sex determination techniques: *HinfI* restriction assay, HRM, CRISPR-Cas 12a coupled to PCR and CRISPR-Cas 12a coupled to RPA, 100% consistency between the different analyses was achieved.

In conclusion, a field prototype was developed for sex determination in Coho salmon, which requires as input DNA from animals obtained by a standard extraction procedure. This method is 100% efficient for the early detection of sex in this species, without the need to wait for advanced degrees of gonadal maturation, and is relevant for the implementation of monosex populations, which allows a significant improvement in the profitability of the sector.

1. Introducción

El objetivo de los programas de investigación y desarrollo en la acuicultura, están enfocados a encontrar recursos que mejoren parámetros industriales importantes, como el crecimiento, resistencia a enfermedades, calidad del producto, rentabilidad y sustentabilidad, entre otros. Si nos enfocamos en análisis genético, destacan los programas de mejoramiento, utilización de recursos genéticos y la selección habilitada por el genoma. La disponibilidad del genoma completo de especies acuícolas permite la identificación de variaciones en las secuencias de ADN, en una posición concreta del genoma. Estos polimorfismos pueden ser inserciones, deleciones de un fragmento de ADN, SNP (polimorfismo de un solo nucleotido), diferencias en el número de copias, microsatélites, *etc.*, los cuales son utilizados como marcadores para predecir fenotipos que tienen un impacto positivo en la producción industrial (Iniesta *et al*, 2005; Seal *et al*, 2014; Abdelrahman *et al*, 2017; Starks *et al*, 2016).

1.1. Salmonicultura: Salmón Coho.

La salmonicultura es la principal industria acuícola de Chile, y se distingue por ser el principal productor de salmón Coho (*Oncorhynchus kisutch*), el cual es una de las especies de salmón del Pacífico, que se encuentra de forma endémica en las cuencas de Norteamérica y Asia (Sandercock, 1991). El salmón Coho, se introdujo exitosamente en la década de los 70, y en 1992 fue establecido el primer programa de crianza (Martinez *et al*, 1999; Martinez *et al*, 2022; Lhorente *et al*, 2019). El cultivo se desarrolla principalmente en el sur del país, donde se encuentran centros desde la región de la Araucanía hasta Magallanes, produciendo el año 2020 204 mil toneladas de cosecha, que corresponde al 19% del total de salmónidos que produce la industria nacional (FAO, 2022).

El salmón es un pez carnívoro, que posee ciclos en agua dulce y salada. El proceso de cultivo comienza en las pisciculturas de agua dulce, donde se realiza la fertilización e incubación de las ovas, se desarrollan y eclosionan en alevines. Posteriormente este alevín crece, hasta una etapa de esmoltificación, etapa que son transportados al agua de mar para el proceso de crecimiento en los centros de engorda, hasta la cosecha y posterior procesamiento (Katz, 2006).

Un fenotipo importante para detectar en la industria corresponde al sexo, dado que permite gestionar los reproductores de forma más eficiente, determinando la proporción de sexo en las poblaciones de stock, y monitorear los procesos de maduración (Gordon *et al*, 1984). Dado que no existen características morfológicas que permitan diferenciar entre hembras y machos, la herramienta utilizada para la

identificación del sexo corresponde a una ecografía para observar las gónadas, procedimiento que no es posible desarrollar a edades tempranas, ya que es necesario que las gónadas estén en un estado de maduración avanzado (Araneda *et al*, 2018).

La temporada de cosecha en salmones posee una limitante que corresponde el periodo de maduración sexual de los individuos, debido principalmente a que los cambios fisiológicos y morfológicos que se realizan durante el proceso de maduración requieren la utilización de energía metabólica, por lo tanto, dejan de crecer y disminuye la calidad de la carne. Se ha descrito en salmones que los machos presentan niveles moderados de maduración temprana, que ocurre antes que se alcancen los tamaños de comercialización, mientras que las hembras maduran en una etapa tardía, por lo tanto, permite que alcancen mayor tamaño en la etapa de engorde antes de la cosecha. En la industria la separación en monocultivo de hembras y machos en la etapa de engorda, puede llegar a ser una herramienta llamativa para evitar los problemas que produce la maduración precoz. En primer lugar, pudiendo diferenciar los tiempos de cosecha de cada sexo, y aplicar diferentes técnicas para el retraso de la maduración en cultivos machos, como la utilización de fotoperiodos o diferenciación en la dieta. Otro recurso utilizado para evitar la maduración precoz es la producción de cultivos exclusivamente femeninos, mediante la masculinización de hembras, y posterior proceso de reproducción (Hunter *et al*, 1982; Fitzpatrick *et al*, 2005; Neira *et al*, 2005; Neira *et al*, 2014; Xu *et al*, 2023).

Por lo tanto, dado que para la separación de monocultivos sexo específicos y el proceso de masculinización de hembras es necesario realizar la determinación de sexo a edades tempranas, es importante desarrollar una metodología para aplicar cuando las características sexuales no están desarrolladas (Araneda *et al*, 2018). Además, para que la metodología sea eficaz, y se pueda realizar de forma rutinaria, la prueba debe ser simple de realizar, inofensiva para el animal y útil para monitorear una gran cantidad de peces (Gordon *et al*, 1984). Una solución a esta problemática corresponde a la utilización de marcadores genéticos para la detección de sexo de los individuos. Cuando se requiere realizar análisis de ADN genómico a partir de muestras biológicas, es necesario la extracción de tejido que corresponde a un pequeño trozo de aleta adiposa, que no compromete el bienestar del animal (Araneda *et al*, 2018).

El salmón Coho posee un sistema de determinación del sexo XY, donde las hembras son XX y los machos XY, la búsqueda de los marcadores genéticos asociados al sexo se centra en regiones que se encuentran en el cromosoma Y, y ausentes en las hembras (Araneda *et al*, 2018). En el salmón Coho la secuencia del gen *GH-2* está asociada al sexo, el cual posee dos alelos *a y *b, el alelo *a está localizado en el cromosoma X en hembras homocigoto (*aa), y el alelo *b en el cromosoma Y en machos heterocigoto (*ab). Se describe

una frecuencia genética de *ab en alevines cercano a 0,5, que coincide con la proporción sexual de poblaciones de 1:1. Existen variados polimorfismos entre ambos alelos, entre ellos dos inserciones en el alelo *b, y un sitio de restricción para *HinfI* (**Figura 1; Anexo Figura 2**). Por lo tanto, esta secuencia se ha identificado como marcador de sexo en el salmón Coho (Forbes *et al*, 1994).

1.2. Técnicas de detección de ácidos nucleicos

Una vez identificado el polimorfismo determinado, es necesario el desarrollo de metodologías de detección, para que se pueda realizar de manera rutinaria, las cuales se basan principalmente en diferentes variaciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), entre ellas, convencional, en tiempo real cuantitativo y “*High Resolution Melting*” (HRM).

La PCR es una técnica para amplificar fragmentos cortos y específicos, de secuencias de ADN. Para el proceso es necesario el diseño de partidores específicos para la zona a amplificar, y una polimerasa ADN dependiente. El proceso de PCR se puede dividir en tres pasos: en primer lugar, el ADN de doble hebra se desnatura a temperaturas superiores a 90 ° C, posteriormente los partidores de oligonucleótidos se hibridan en un rango de temperatura de 50 a 60 °C, para finalizar con la extensión del partidor a 70°C. Los amplicones obtenidos se pueden observar mediante una electroforesis en gel (Mackay *et al*, 2004). La PCR es la técnica de referencia o “*gold estándar*” para la detección de ADN, dados sus rendimientos en sensibilidad y especificidad (Merchan *et al*, 2017).

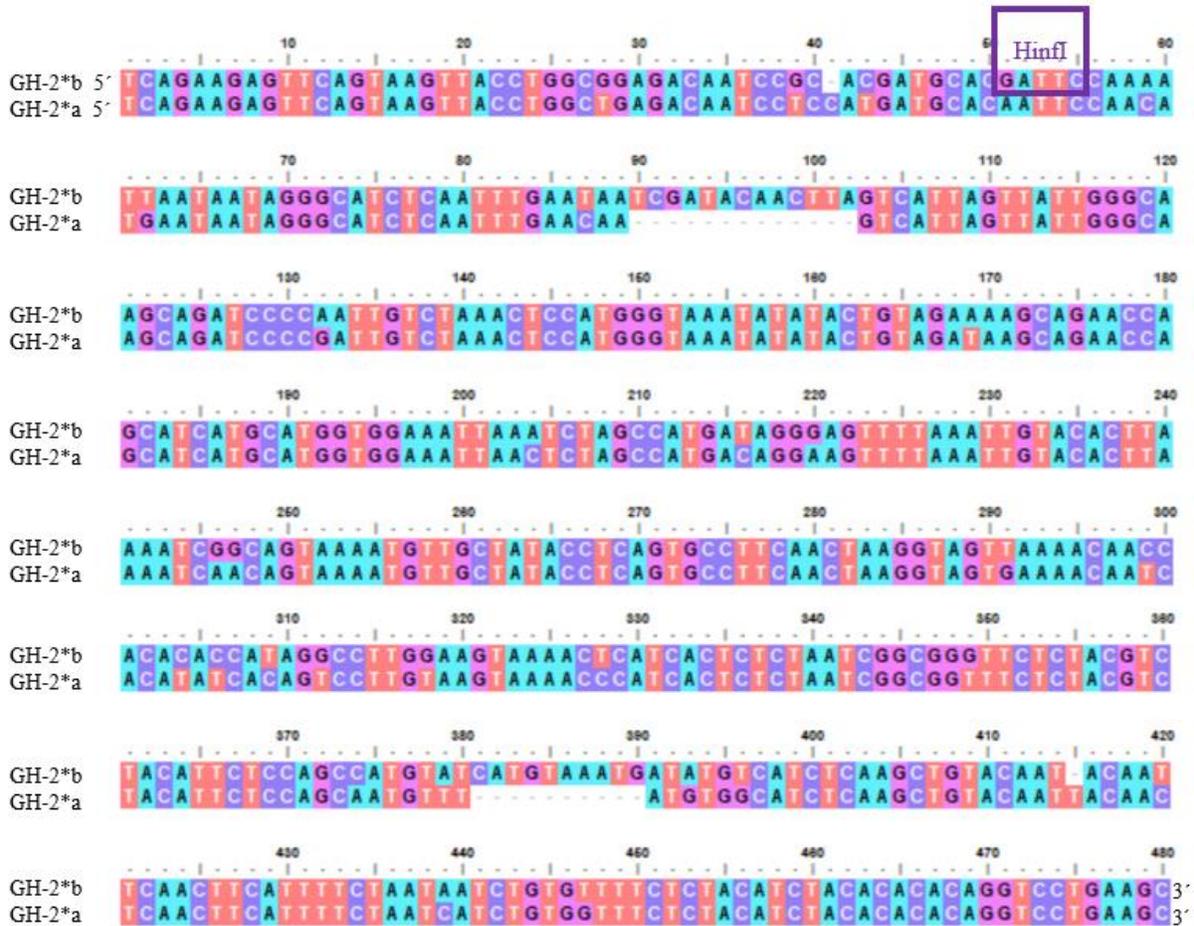


Figura 1. Secuencia del gen *GH-2* en salmón Coho. Se presenta el intrón C de la secuencia del gen *GH-2*, que codifica para la hormona del crecimiento 2, que presenta dos alelos *a y *b, donde se observa que el alelo *b presenta dos inserciones, y un sitio de restricción para *HinfI*, que está asociado al cromosoma Y en machos (Forbes *et al*, 1994).

Para la detección del polimorfismo descrito en salmón Coho se realiza un PCR convencional, y posteriormente se procede a una reacción de digestión de la secuencia del gen *GH-2*, la cual es posible visualizar mediante una electroforesis en gel de agarosa (Forbes *et al*, 1994). Este marcador no se utiliza de forma rutinaria en la industria, ya que no se puede realizar la detección de manera portátil y en tiempo limitado (Araneda *et al*, 2018). Otra variación de esta técnica corresponde a la PCR en tiempo real cuantitativa (qPCR), que combina las características ya mencionadas, con el uso de moléculas indicadoras fluorescentes para cuantificar y amplificar el ADN en el mismo proceso (Navarro *et al*, 2015).

Para identificar variaciones en la secuencia, la técnica principalmente utilizada es la de HRM. Es una metodología basada en la qPCR que permite detectar en una región específica alteraciones en la secuencia mediante el análisis de las curvas de fusión, las cuales consisten en los cambios que se producen en la disociación del ADN de doble hebra a altas temperaturas. El comportamiento de las curvas de fusión está relacionado principalmente al porcentaje de contenido GC, el largo de la secuencia, y característica de los alelos. El procedimiento realiza una qPCR, donde el ADN interactúa con agentes intercalantes que emiten fluorescencia, y que a medida que se va desnaturalizando, la fluorescencia va disminuyendo. Esta metodología es muy atractiva, ya que es un ensayo económico, sencillo y rápido; además de poseer alta sensibilidad y especificidad, pero presentan un problema que es la imposibilidad de realizarlas en campo. La PCR requiere sistemas e instrumentos sofisticados como los termocicladores, y tratamiento de muestras más complicado, lo que requiere de laboratorios bien establecidos (Reed *et al*, 2007; Li *et al*, 2019).

1.3. Amplificación de polimerasa recombinasa (RPA)

Dada la limitación de realización en campo del PCR, se han desarrollado plataformas de detección de ácido nucleicos de manera isotérmica, que implica el mantenimiento de una temperatura constante durante todo el proceso, y por lo tanto no es necesario la utilización de termocicladores.

La técnica de RPA consiste en la utilización de una proteína recombinasa, que se va a unir a dos partidores en presencia de ATP formando un complejo. Luego, este busca en la doble cadena de ADN la secuencia homóloga al partidador, una vez encontrada se produce una reacción de intercambio de cadena, y para dar estabilidad se utilizan proteínas de unión a ADN monocatenarias. Después la recombinasa se va a desensamblar, y una ADN polimerasa se va a unir al 3' de los partidores, para ser elongados en presencia de los dNTPs. La repetición cíclica de este proceso da como resultado una amplificación exponencial (**Figura 2**) (Lobato *et al*, 2018).

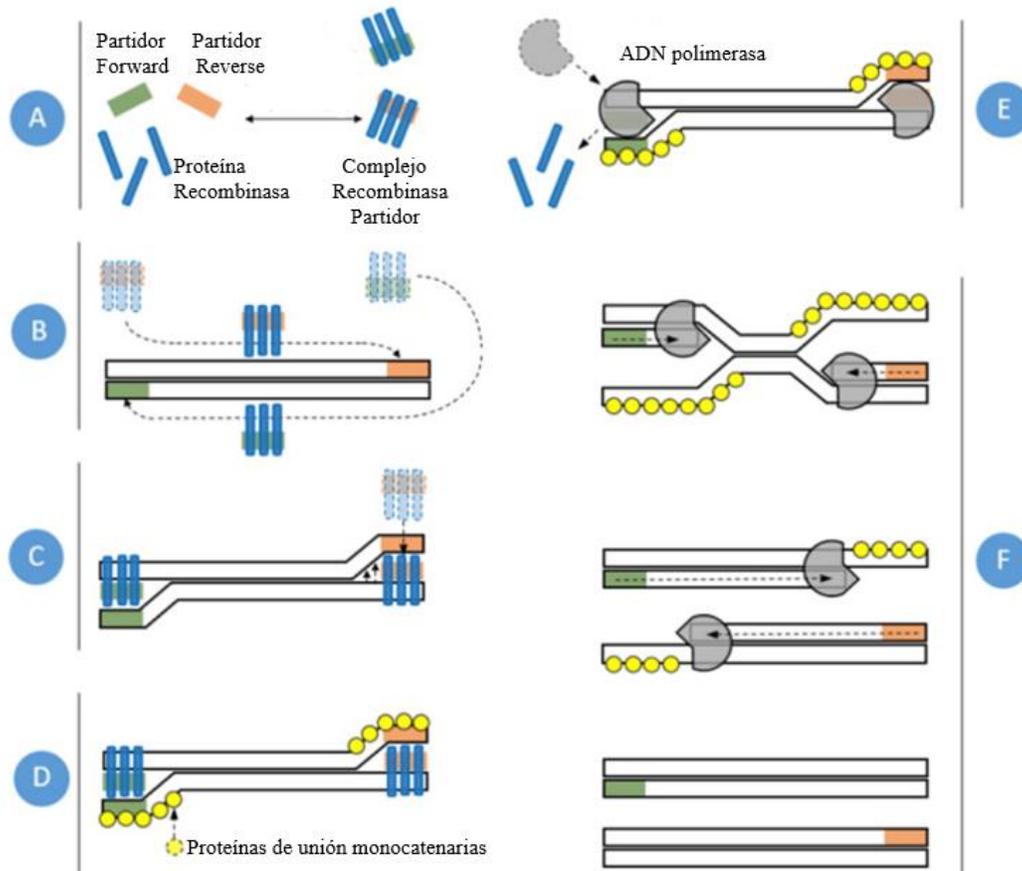
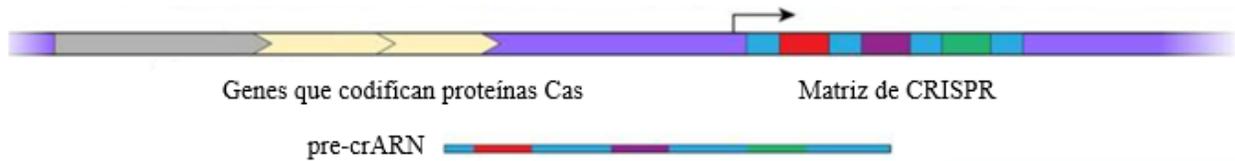


Figura 2. Mecanismo de amplificación isotérmica RPA. Una proteína recombinasa forma un complejo con los partidores, y cuando encuentra su secuencia homóloga, se produce un intercambio de cadena. Posteriormente proteínas de unión a ADN monocatenarias estabilizan el complejo, para que finalmente una ADN polimerasa extienda los partidores (Figura modificada de Lobato *et al*, 2018).

1.4. Sistema CRISPR-Cas

Las secuencias “*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*” (CRISPR) se encuentran en procariontes, y su función es la protección de los organismos frente a la introducción de ADN foráneo (Barrangou *et al*, 2007; Sander *et al*, 2017). En Jasen *et al*. (2002), se acuñó el término CRISPR, para los *loci* genéticos microbianos que tienen una matriz de secuencias repetidas palindrómicas, separados por secuencias únicas interespaciadoras. Posteriormente se determinó que las secuencias espaciadoras derivan de elementos móviles invasores, incluidos bacteriófagos, plásmidos y transposones, y que por lo tanto tienen un rol en la inmunidad bacteriana. Además, este sistema requiere genes asociados a CRISPR, que codifican las proteínas Cas, con el fin de destruir moléculas de ADN foráneo (**Figura 3A**). (Ishino *et al*, 2018).

A



B

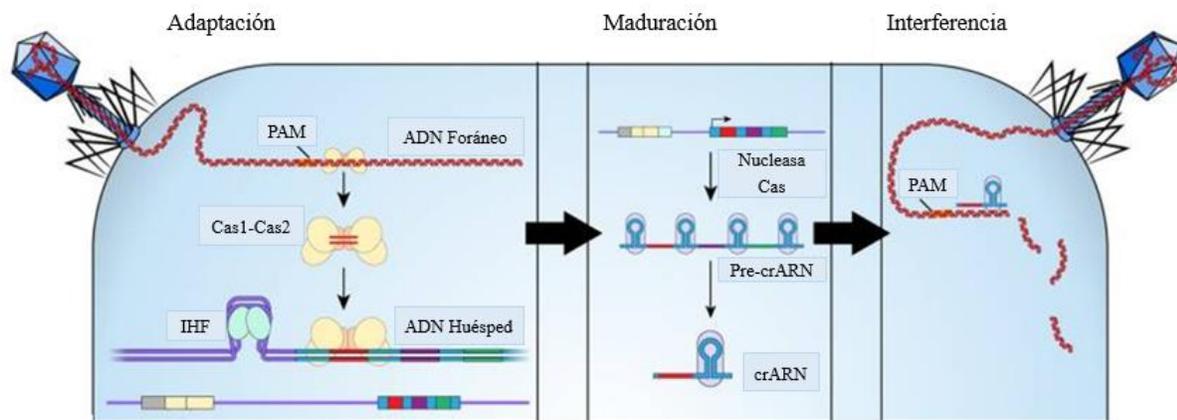


Figura 3. Biología del sistema CRISPR-Cas. A. Se presenta la matriz de CRISPR, donde en color azul se observan las secuencias repetidas palindrómicas, y en diversos colores los espaciadores, además río arriba se encuentran los genes que codifican para proteínas Cas. B. En primer lugar, ocurre el proceso de adaptación, donde luego de la entrada del ADN foráneo, Cas 1 y Cas 2, reconocen una secuencia por medio de PAM, la corta y la integra en la matriz de CRISPR del hospedero. Posteriormente procede la maduración del crARN, se transcribe a un pre-crARN, dónde proteínas Cas cortan cada espaciador para tener el crARN. Finalmente, el proceso de interferencia, donde el complejo crARN-Cas escinde la secuencia del fago (Ishino *et al*, 2018; Jolany *et al*, 2020; Figura modificada de Strich *et al*, 2019).

El mecanismo de acción de los sistemas CRISPR-Cas consiste en el proceso de adaptación, maduración e interferencia. El proceso de adaptación ocurre cuando se produce la infección de parte de un fago desconocido a la bacteria, donde no se encuentra su material genético en las secuencias interespaciadoras. En primer lugar, se expresa el complejo Cas1-Cas2, que va a interactuar con el material genético viral, en específico una secuencia PAM, donde se procederá a escindir esta zona e incorporarla en la matriz de interespaciadores de CRISPR. Posteriormente cuando el fago infecta nuevamente la bacteria, ésta será capaz de actuar, y procede al proceso de maduración, donde las secuencias CRISPR e interespaciadores se transcriben, y las secuencias repetidas forman una horquilla, a este estado se le determina pre-crARN. Después una nucleasa Cas, corta la secuencia interespaciadora y forma un crARN maduro. El complejo

formado por la proteína Cas y el crARN maduro, procederá al proceso de interferencia, que posee una alta afinidad con el material genético del virus, y por lo tanto, lo reconocerá mediante la presencia de la secuencia PAM, cortando el genoma de tal manera que queda inactivado (**Figura 3B**) (Strich *et al*, 2019; Jolany *et al*, 2020).

Se han descrito clases de sistemas CRISPR-Cas los sistemas de clase 1 incluyen los tipos I, III y IV, que utilizan una maquinaria de interferencia, compuesta por múltiples proteínas Cas, como Cas 3, Cas 10, Cas 8. Mientras que los sistemas de clase 2, incluidos los tipos II, V y VI, emplean una única proteína Cas para el proceso de interferencia, la cual posee múltiples dominios (Jinek *et al*, 2012; Hsu *et al*, 2014).

1.5. Sistema CRISPR-Cas para la detección de ácidos nucleicos

Las estrategias de detección de ácidos nucleicos basados en CRISPR aprovechan la característica de reconocimiento de una secuencia específica objetivo, por el complejo de enzima Cas-ARN guía (sgARN), para posteriormente producir una señal legible. Esta herramienta de diagnóstico tiene un gran potencial debido a que es rápida, sensible, específica, precisa y confiable. Es capaz de detectar diversas infecciones virales, diagnóstico de cáncer, enfermedades genéticas, o polimorfismos de un solo nucleótido (Khambhati *et al*, 2019). CRISPR-Cas utilizada por sí sola, no es capaz de producir una respuesta detectable, por lo tanto, es necesario aumentar la concentración del objetivo a detectar, para esto se utiliza el producto de amplificación, el cual se ha descrito mediante PCR, pero dado la necesidad de portabilidad de las pruebas, se utilizan principalmente técnicas de amplificación isotérmica.

1.5.a. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 13

Uno de los sistemas descritos para la detección de nucleótidos corresponde al de CRISPR de tipo IV, donde actúa la proteína Cas 13, la cual puede reconocer y ejecutar una actividad de corte de un ARN objetivo específico dirigido por un ARN guía (sgARN), que es diseñado y sintetizado de manera complementaria a la zona objetivo a detectar. Posteriormente a este corte se desencadena una actividad colateral de digestión de una molécula de ARN exógena, que se utiliza como reportero de ARN donde en un extremo ancla un fluoróforo y en el otro un apagador (East-Seletsky *et al*, 2016; Khambhati *et al*, 2019; Li *et al*, 2019). Gootenberg *et al*. (2017) desarrolló una plataforma de diagnóstico para la detección *in vitro* de secuencias de ácidos nucleicos, que combinada con el procedimiento de amplificación de la polimerasa recombinasa isotérmica (RPA), permite detectar concentraciones attomolares, y con resolución de una sola base, de los virus ZIKA y Dengue (Gootenberg *et al*, 2017; Li *et al*, 2019).

1.5.b. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 12a

De la familia de enzimas Cas V, el efector utilizado es Cas 12a (Cpf1) el cual reconoce y corta una secuencia de ADN específico, dirigido por un sgARN complementario. Esta enzima reconoce en el ADN un motivo adyacente de protoespaciador (PAM) rico en T, comúnmente utilizando TTTV, que es esencial para la unión complejo enzima-sgARN-ADN, y que es donde se genera la ruptura. Además, presenta una actividad colateral de corte, que se dirige a una molécula de ADN simple no específica, y que se aprovecha como reportero, anclando en un extremo a un fluoróforo y al opuesto a un apagador, donde la escisión de esta sonda libera el fluoróforo que genera una señal fluorescente, que puede ser detectada en un fluorómetro o mediante visualización luz UV (**Figura 4**) (Chen *et al*, 2018; Li, *et al*, 2018).

El sistema CRISPR Cas 12a descrito con actividad colateral para la detección de ácidos nucleicos, puede detectar virus de ADN y ARN, distinguir genotipos y SNP. Esta técnica combinada con diferentes métodos de amplificación como la PCR, o de manera isotérmica como RPA, logró detectar diferentes genotipos del virus del papiloma humano HPV16 y HPV18, en extractos de ADN crudo de células humanas cultivadas, y muestras clínicas (Chen *et al*, 2018). En los últimos años dada la pandemia por el virus SARS-CoV-2, se desarrollaron diferentes estrategias para el diagnóstico utilizando la proteína Cas 12a. Entre ellas utilizando amplificación isotérmica RT-LAMP, mediante una lectura del ensayo de tira de flujo lateral (Brouhton *et al*, 2020), y también utilizando RT-RPA asociado a detección fluorescente mediante fluorómetro o luz UV en un solo paso (Ding, *et al* 2020; Huang *et al*, 2020), Las cuales poseen las características de ser sensibles, rápidas, y resultados interpretables a simple vista (Verma *et al*, 2022).

1.5.c. CRISPR-Cas12a o CRISPR-Cas13 ¿Cuál utilizar?

Se han descrito diferentes metodologías para la detección de nucleótidos utilizando enzimas Cas, entre ellas Cas 12a y Cas 13, donde la principal diferencia entre ambas corresponde a la molécula blanco de la enzima, ADN y ARN respectivamente. En ambos casos, el complejo enzima-ARN guía detecta la secuencia objetivo y la corta, lo que desencadena una actividad colateral de digestión inespecífica de ácidos nucleicos, la cual se utiliza como reportero para la emisión de fluorescencia. Además, es necesario una preamplificación de la zona a detectar, la cual se ha descrito mediante PCR, o si se requiere la detección en terreno mediante amplificación isotérmica como RPA o LAMP (Jolany *et al*, 2020).

Por lo tanto, para seleccionar la metodología a utilizar es necesario observar las características de las secuencias. Se requiere tener en cuenta la presencia de secuencias específicas cercanas al blanco para

realizar la detección, donde en el caso de Cas 12a necesita una secuencia PAM TTTV adyacente, mientras que Cas 13 es libre de realizar la detección sin la necesidad de esta (Li *et al*, 2019).

En cuanto a el ácido nucleico ADN o ARN, no es limitante para ninguna de las dos enzimas, ya que es posible modificar procedimientos. Si se requiere detectar ADN, se puede utilizar Cas 12a en dos pasos: amplificación y reacción de Cas 12a, mientras que, si no está presente la secuencia PAM, es recomendable añadirla en los partidores o utilizar Cas 13. Para realizar la detección mediante Cas 13, se requiere amplificar la zona a detectar, se realiza una transcripción *in vitro*, y posteriormente la reacción de Cas 13. Por otra parte, cuando el material genético es ARN como en diferentes virus, para utilizar la detección mediante Cas 12a, es necesario un proceso de tres pasos: transcripción inversa, amplificación y reacción de Cas 12a. Mientras que para utilizar Cas 13 el proceso consiste en primer lugar transcripción inversa, posteriormente amplificación, transcripción *in vitro* y finalizando con la reacción de Cas 13 (**Figura 5**) (Li *et al*, 2019).

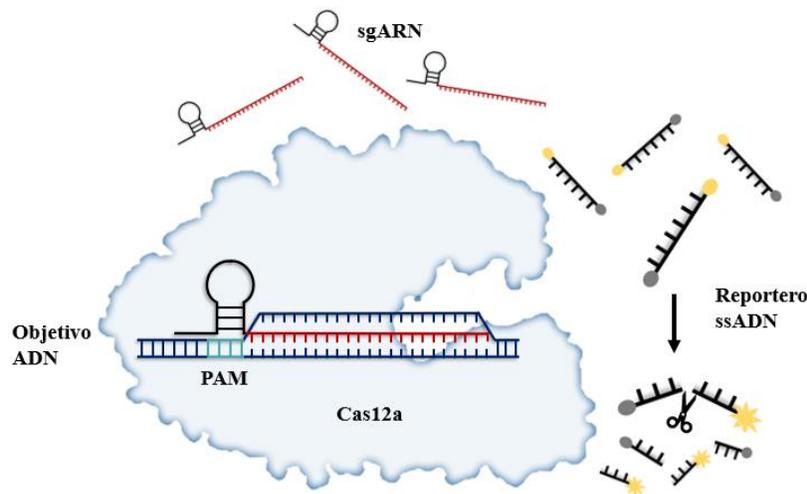


Figura 4. Diagrama del sistema CRISPR-Cas 12a. El complejo Cas12a-sgARN se une a su objetivo de manera específica en presencia de una secuencia PAM, y se produce un corte, lo que desencadena una actividad colateral que conduce a la digestión de un reportero de ssADN, tras lo cual se obtiene una señal fluorescente (Figura modificada de Chiu, 2018).

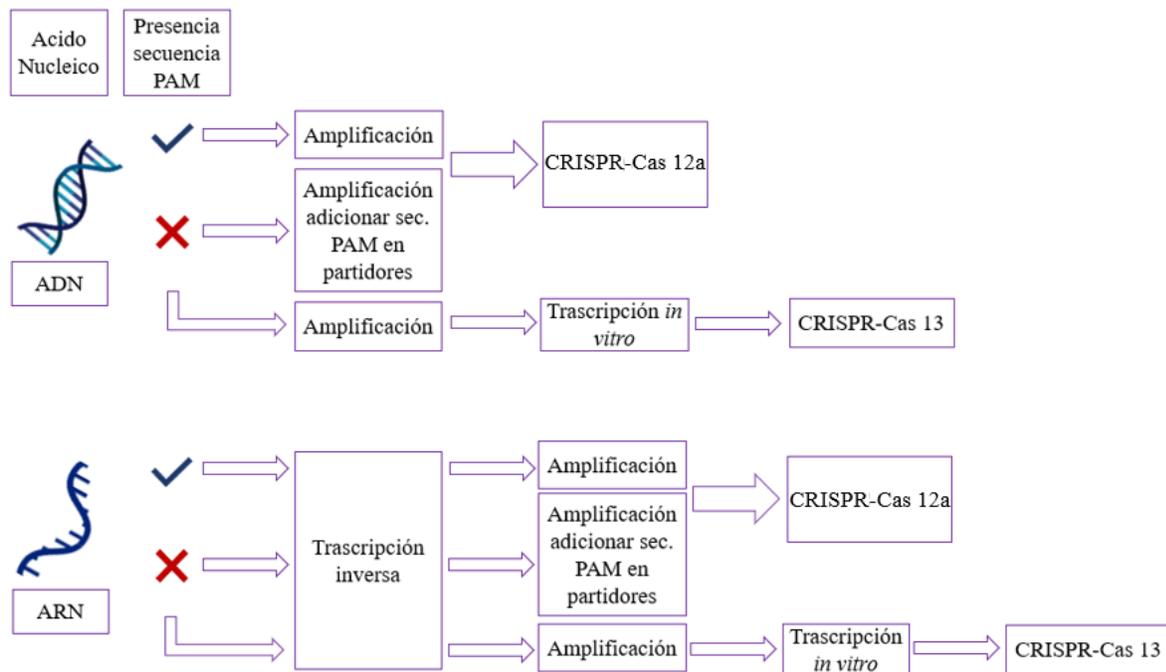


Figura 5. Detección de ácidos nucleicos mediante CRISPR-Cas 12a y CRISPR-Cas 13. Se presenta la secuencia de reacciones para realizar la detección de nucleótidos, mediante CRISPR-Cas 12 y CRISPR-Cas 13, a partir de ADN y ARN.

2. Hipótesis

Para la industria acuícola, el diseño y aplicación de ensayos de detección de marcadores de sexo es fundamental para la optimización de los procesos de maduración, y cosecha de peces en los centros de cultivo. Se ha descrito la presencia de un polimorfismo asociado a este fenotipo en salmón Coho, que consiste en una inserción de ADN en el alelo *b en secuencia del gen *GH-2* presente en machos. (Forbes *et al*, 1994). Existen diferentes técnicas de detección de este polimorfismo, pero estas no se pueden realizar en campo, dado la necesidad de termocicladores. Por lo tanto, se propone una posible solución a esta problemática, la detección de esta inserción mediante el sistema de CRISPR-Cas 12a.

Hipótesis: El sistema de CRISPR-Cas 12a permite detectar el polimorfismo tipo inserción presente en el alelo *b de la secuencia del gen *GH-2* asociado a los machos en salmón Coho.

3. Objetivo general

Desarrollar un ensayo basado en el sistema CRISPR-Cas 12a para la detección del polimorfismo asociado a la determinación de sexo en salmón Coho aplicable en terreno.

4. Objetivos específicos

4.1. Caracterizar el genotipo de la zona de detección de sexo en salmón Coho.

4.2. Evaluar la detección de una inserción sexo específica mediante sistema de CRISPR-Cas 12a en salmón Coho.

4.3. Validar prueba prototipo de campo para la identificación del sexo en salmón Coho mediante sistema CRISPR-Cas 12a.

5. Modelo experimental

Analizando la secuencia marcadora utilizada en Forbes *et al.* (1994) (**Figura 1; Anexo Figura 2**), y todos los polimorfismos presentes entre el alelo *a (hembras) y alelo *b (machos) se decidió trabajar, con una inserción presente en el alelo *b que comienza en la posición 90. Esto es dado la presencia de una secuencia PAM, que corresponde a TTTG, que está presente desde la posición 81. Posterior a la extracción de ADN, se realizará un proceso de amplificación, que corresponde a un procedimiento de PCR y RPA, se diseñan partidores que amplifiquen ambos alelos donde está presente la inserción a trabajar. El producto amplificado es el objetivo de la reacción de Cas 12a, la cual contiene el sgARN (que es específico para el alelo *b), la enzima Cas 12a, y la sonda que posee un fluoróforo y un apagador. Los resultados se observan en un equipo detector de fluorescencia o en un transiluminador luz UV. Las reacciones que poseen fluorescencia corresponden a las muestras machos (ensayo positivo), mientras que las que no presentan fluorescencia, corresponden a las hembras (ensayo negativo) (**Figura 6**).

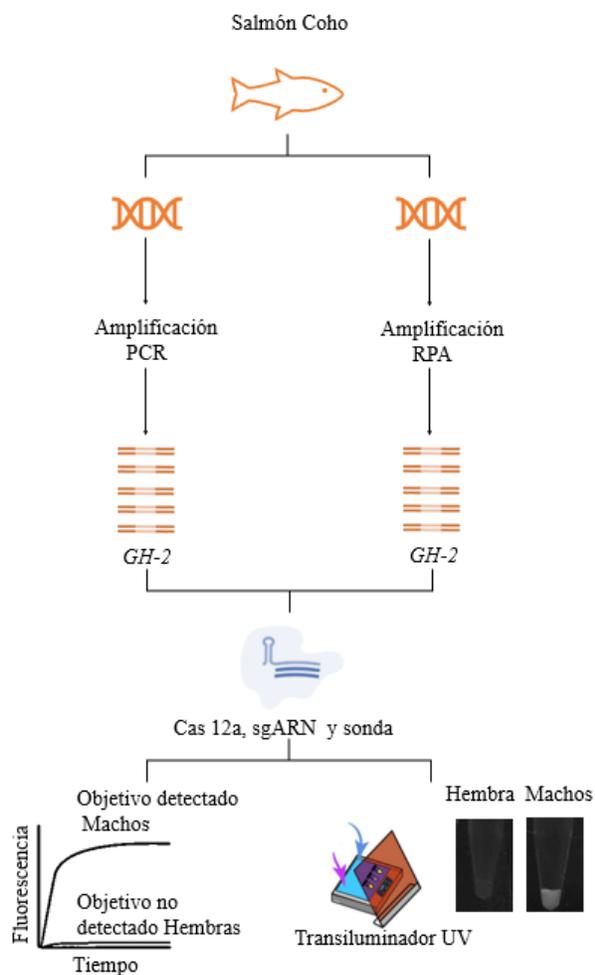


Figura 6. Modelo experimental. A partir de ADN genómico, se produce una amplificación mediante PCR o RPA, cuyo producto es el objetivo de la reacción de Cas 12a, la cual se puede detectar mediante un lector de fluorescencia o transiluminador UV.

6. Métodos

6.1. Muestras

A partir de tejido de aleta adiposa de individuos de salmón Coho catalogados como machos y hembras, se procesaron para la extracción y purificación de ADN mediante Kit Macherey Nagel NucleoSpin® Tissue, y se cuantificó el ADN obtenido utilizando Qubit™ fluorometer, el kit Quant-iT™ dsDNA BR assay, para ser llevadas a una concentración de 10 ng/μl y 30 ng/μl que fueron utilizadas para la reacción de PCR-RPA y HRM respectivamente.

6.2. Reacción en cadena de la polimerasa PCR

Una vez seleccionadas las muestras a trabajar, es necesario realizar una prueba de determinación de sexo, que corresponde a un ensayo mediante enzima de restricción. Para esto es necesario optimizar un PCR, por lo tanto, se diseñaron los partidores GH 185 (**Anexo Tabla 1**), a partir de las secuencias del gen *GH-2*, (alelo *a hembras (GH-2-a) Sequence ID: U04930, y el Alelo *b machos (GH-2-b) Sequence ID: U04931.1) presentes en la base de datos, que producen un amplicón de 173 pb en el alelo *a y 185 pb en el alelo *b. Cada PCR contiene el kit de Invitrogen™ ADN polimerasa *Taq*: MgCl₂ 50 nM, dNTP mix 10 nM, *Taq* DNA polimerase 5 U/μl, además de Thermo Scientific™ 10 X *Taq* Buffer (NH₄)₂SO₄, partidores Fw y Rv, y con 2 μl de ADN genómico 10 ng/μl como templado, con un volumen final de 20 μl. El Programa de temperatura consistió en 95°C por 5 minutos, con 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, finalizando a 72°C durante 10 minutos. Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y en un equipo de electroforesis capilar. Además, este amplicón fue el utilizado como blanco de la reacción de Cas 12a.

Para secuenciar y seleccionar controles de reacción se realizó otro PCR, donde se diseñaron los partidores GH 349 (**Anexo tabla 1**) que produce dos amplicones, para el alelo *b una longitud de 349 pb y para el alelo *a 337 pb. Cada PCR tiene un volumen final de 30 ul, utilizando kit de Invitrogen™ ADN polimerasa *Taq*, con Thermo Scientific™ *Taq* Buffer (NH₄)₂SO₄ y albúmina de suero bovino (BSA), con 3 ul de ADN genómico. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos alternando 95°C durante 30 segundos, 59°C durante 30 segundos y 72°C durante 45 segundos, para finalizar con una incubación adicional a 72°C durante 10 minutos para completar el paso de extensión. Posteriormente los amplicones fueron procesados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. A partir del gel se seleccionaron 2 muestras de cada sexo para secuenciar utilizando CES SANGER MacroGen™, como servicio externo.

6.3. Ensayo de restricción

Utilizando como objetivo de la digestión el amplicón anteriormente obtenido, se realizó un ensayo con la enzima de restricción *HinfI* Thermo Scientific™ 10 U/μl. Cada reacción contenía 2 μl de 10X buffer R, 3 μl de enzima *HinfI*, y 15 μl de producto de PCR. Posteriormente se incubó por 1 hora a 37°C. La digestión fue visualizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

6.4. Ensayo de *High resolution melting*

Para observar las curvas de fusión que presenta cada fenotipo hembras y machos, se diseñó un ensayo de HRM, donde se utilizaron los partidores presentes en **Anexo Tabla 1**. Utilizando kit HRM SensiFAST™, y muestras de ADN genómico de 30 ng/μl. La detección se realizó en un equipo Rotor-Gene Q. El programa de temperatura consistió en una desnaturalización inicial 95°C por 3 minutos, posteriormente 45 ciclos de 5 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C y 20 segundos a 72° C, y un golpe de temperatura a 95°C por 1 minuto. Seguido por un programa de HRM que posee un gradiente de temperatura de 65°C a 90°C. Cada reacción se realizó en duplicado y los controles correspondieron a las muestras de ADN de los individuos secuenciados. Los resultados se analizaron utilizando Rotor-gene Q software.

6.5. Diseño de sgARN

Dada la región de secuencia para la detección del sexo en salmón Coho, se diseñó un RNA guía (sgARN), que tiene características específicas para utilizar la enzima Cas 12a. En la secuencia a detectar en el extremo 5' debe tener una secuencia PAM que corresponde a TTTV, el ARN guía debe comenzar en la posición +1 de V, y debe ser complementario a la secuencia 3'-5', por lo tanto, homóloga a la 5'-3', puede variar entre 18 a 24 nucleótidos, dependiendo el polimorfismo a detectar, y en el extremo 5' debe tener una secuencia estabilizadora, que forma una horquilla que corresponde a 5'UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU3'.

6.6. Configuración del ensayo de detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a asociado a PCR convencional

La enzima Cas 12a que se utilizó para realizar el ensayo corresponde a EnGen® *Lba* Cas12a (NEB). En primer lugar es necesario la formación del complejo Cas12a-sgARN, por lo tanto se realizó un mix que contiene 1X buffer de enzima NEBuffer 2.1, Cas 12a y sgARN (IDT), se incubo en un baño termoregulado por 25 minutos a 37°C, la concentración de enzima Cas 12a y sgARN corresponde a una reacción 1:1. Para optimizar el proceso se realizó una prueba de concentración del complejo Cas12a-sgARN de 5, 10, 20, 30 nM, posteriormente se agregó al mix 0,4 μl de la sonda 56-FAM/TTATT/3IABkFQ (IDT) a una concentración final de 200 nM, y agua libre de nucleasas, para finalmente adicionar a la reacción 1μl del

producto de PCR llegando a un volumen final de 10 μ l. La detección se realizó en el equipo de qPCR Rotor-Gene Q, se incubó a 37°C por 40 minutos, donde se programó el canal verde como lector de fluorescencia, para luego pasado el tiempo de reacción se visualizó en un transiluminador UV. Los productos de PCR utilizados como objetivo de reacción fueron a partir de muestras de ADN de los individuos secuenciados, que corresponde a dos de cada sexo y cada uno en triplicado.

Además, se configuró un ensayo donde se pueda detectar en un transiluminador UV. Por lo tanto, se preparó una reacción donde se utilizó una concentración Cas12a-sgARN de 20 nM, se trabajó el mismo procedimiento anteriormente descrito, con la diferencia en que la incubación final se realizó por 30 minutos a 37°C en un baño termostático, y se visualizó el resultado en un transiluminador UV. Para este ensayo se utilizó el amplicón de PCR obtenido de las muestras de ADN de individuos sexados mediante HRM. Cada una de las reacciones se realizó en duplicado.

El ensayo de sensibilidad de la técnica se realizó mediante la dilución del producto de PCR, a partir de la concentración que fue obtenida en la electroforesis capilar del amplicón del alelo *b en machos, para posteriormente a cada dilución se realizó el ensayo de Cas 12a, incubando por 40 minutos en un equipo de detección de fluorescencia y visualizando en un transiluminador UV.

6.7. Configuración del ensayo de detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a asociado a RPA

Antes de comenzar a trabajar fue necesario optimizar y seleccionar los partidores a utilizar. Las características de los partidores deben tener una longitud desde 30 a 35 bases. Para lograr una formación óptima del complejo con la recombinasa, deben evitar tener repeticiones de un solo nucleótido, y deben tener un contenido de GC entre el 30% y el 70%. Si bien puede amplificar secuencias largas, la longitud óptima ocurre entre 100 a 200 pb. Con respecto a la temperatura óptima para la actividad de reacción de RPA corresponde a 37°C, y el tiempo de incubación entre 20 a 40 minutos (Lobato, *et al* 2018). Por lo tanto, se diseñó dos pares de partidores RPA1 y RPA2, donde se pueden obtener cuatro combinaciones de pares de partidores: RPA1Fw RPA1Rv, RPA1Fw RPA2Rv, RPA2Fw RPA2Rv y RPA2Fw RPA1Rv.

El kit de reacción de RPA corresponde al TwistAmp® Liquid Basic. El mix de reacción se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor, con un volumen final de reacción de 25 μ l. El ADN genómico utilizado como templado de reacción corresponde a el de los individuos secuenciados machos. La reacción de RPA se incubó por 40 minutos a 37°C. Posteriormente el ensayo de Cas 12a se realizó siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, con 20 nM de complejo Cas12a-sgARN, agregando 1 μ l de reacción de producto

de RPA, una incubación final de 40 minutos en un baño termorregulado a 37°C, y la detección en transiluminador UV. Las reacciones se realizaron en duplicado.

Una vez seleccionados los partidores a utilizar se repitió el ensayo. Para la detección en el lector de fluorescencia se utilizó los amplicones de RPA de individuos sexados, se empleó tras de cada sexo en triplicado. Mientras que para la detección en el trasiluminacion UV, se utilizó los productos de RPA de las muestras de los individuos sexados mediante HRM, que corresponde a diez de cada sexo, y cada una de ellas se realizó en duplicado.

7. Resultados

7.1. Caracterización genotípica de la zona de detección de sexo en salmón Coho

7.1.a. Detección de sexo mediante ensayo de enzima de restricción

La secuencia del gen *GH-2* presenta dos genotipos en salmón Coho, donde las hembras son homocigotas para el alelo *a, mientras que los machos son heterocigotos y por lo tanto, está presente ambos alelos *ab. El método descrito en la literatura para detectar el sexo en salmón Coho consiste en un ensayo de restricción de la enzima *HinfI*, que reconoce y corta la secuencia 5' GANTC 3', y que está presente en el alelo *b en macho (Forbes *et al*, 1994). Fueron seleccionadas muestras de ADN genómico de individuos de salmón Coho, y se procedió a realizar un PCR que produce a un amplicón de 173 pb en hembras, y dos amplicones de 173 y 185 pb en machos y posteriormente se realizó la reacción de *HinfI*. En la **figura 7A** se observa el resultado del proceso de digestión con la enzima en un gel de agarosa, donde las hembras presentan una banda de 173 pb, correspondiente al alelo a*, el cual no tiene presente en la secuencia el sitio de restricción, y que por lo tanto no se produce la digestión. Por otro lado, los machos heterocigotos *ab presentan dos bandas, la primera de 173 correspondiente al alelo *a, y la segunda de 140 pb que corresponde a la digestión del alelo *b, ya que el sitio de restricción está en la posición 45 del amplicón.

7.1.b. Secuenciación

Para verificar la secuencia de ADN estudiada en la identificación del sexo en salmón Coho, se seleccionó dos muestras de individuos sexados mediante el ensayo de enzima de restricción de cada sexo, se realizó un PCR convencional y se secuenció con el objetivo de obtener las muestras controles para los ensayos posteriores.

Para analizar los cromatogramas se utilizó el software Tracy-Pearl de GEAR-GENOMICS. Las características de éste en hembras donde está presente el alelo *a, posee picos bien definidos en cada base, separados y con una altura adecuada, presenta poco de ruido de fondo, y una relación entre señal y ruido alta (**Anexo Figura 2A**), mientras que los machos que corresponde a una secuencia heterocigota (*ab), se encuentran picos con una altura adecuada, pero presentan mucho ruido de fondo, y con una relación señal ruido baja, presenta picos dobles y no del todo separados. (**Anexo Figura 2B**).

En la **figura 7B** se presenta el alineamiento múltiple de la secuencia de ambos alelos descrita en la base de datos (GH-2-a, GH-2-b) y de las muestras de individuos secuenciados. Donde las hembras, coinciden con la secuencia del alelo *a, que está presente en la base de datos GH-2-a. En el caso de las muestras de

individuos machos, se verificó que poseen un polimorfismo correspondiente a una inserción de 13 nucleótidos, y que coinciden exactamente con la secuencia GH-2-b. Además, en todas las secuencias se encuentra el motivo PAM TTTG, que es esencial para la detección mediante CRISPR-Cas 12a.

7.1.c. Detección de sexo mediante HRM

Se realizó un ensayo de HRM para la detección de hembras y machos en salmón Coho, y diferenciar mediante análisis de curvas de fusión, la presencia de cada alelo característico de cada fenotipo. En este caso, machos heterocigotos (*ab) y hembras homocigotas que poseen el alelo *a. Los resultados se analizaron utilizando Rotor-gene Q software. Se realizó un ensayo con 20 muestras de individuos (10 hembras y 10 machos), de las cuales dos de cada sexo corresponde a los controles. En la **figura 7C** se observa la curva de fusión normalizada de los controles utilizados, que permite detectar pequeños cambios en la curva con respecto a la temperatura, y por lo tanto identificar diferencias en la secuencia. (Reed *et al*, 2007). En la tabla 1 se especifica los resultados de la reacción de HRM de los individuos sexados, en cuanto al fenotipo catalogado, y el porcentaje de confianza del fenotipo confirmado a partir de la comparación de las curvas de fusión con los controles asignados, donde se observa una confianza mayor al 90 %.

7.1.d. Amplificación

Para realizar la detección de sexo mediante CRISPR-Cas 12a, es necesario realizar una amplificación de ADN genómico de las muestras a trabajar, cuyo producto se utiliza como objetivo de la reacción. El producto de amplificación mediante PCR corresponde a una longitud de 185 pb del alelo *b, y 173 pb el alelo *a. Se analizó el amplicón mediante la utilización de un analizador de fragmentos, el cual consiste en un sistema de electroforesis de análisis capilar, que permite la separación de fragmentos de ADN marcados con un fluoróforo, clasificando sus tamaños acordes a un estándar interno. En la **figura 8** se presenta el electroferograma obtenido, donde en el eje x se observan los tamaños de fragmentos de ADN, mientras que en el eje Y, las unidades relativas de fluorescencia que corresponde al amplicón obtenido en la posición del tamaño correspondiente. Las muestras de individuos hembras destaca un pico de 174 pb (**Figura 8A**), debido a que es una muestra homocigota correspondiente al alelo *a, mientras que las muestras de individuos machos se destacan dos picos de fluorescencia importante, de 174 y 186 pb (**Figura 8B**) que corresponde al alelo *a y *b respectivamente, ésta diferencia de tamaño corresponde a la inserción en el alelo *b, para la cual está diseñado el ensayo de CRISPR-Cas 12a. La visualización en gel de agarosa se presenta en el **anexo figura 3**.

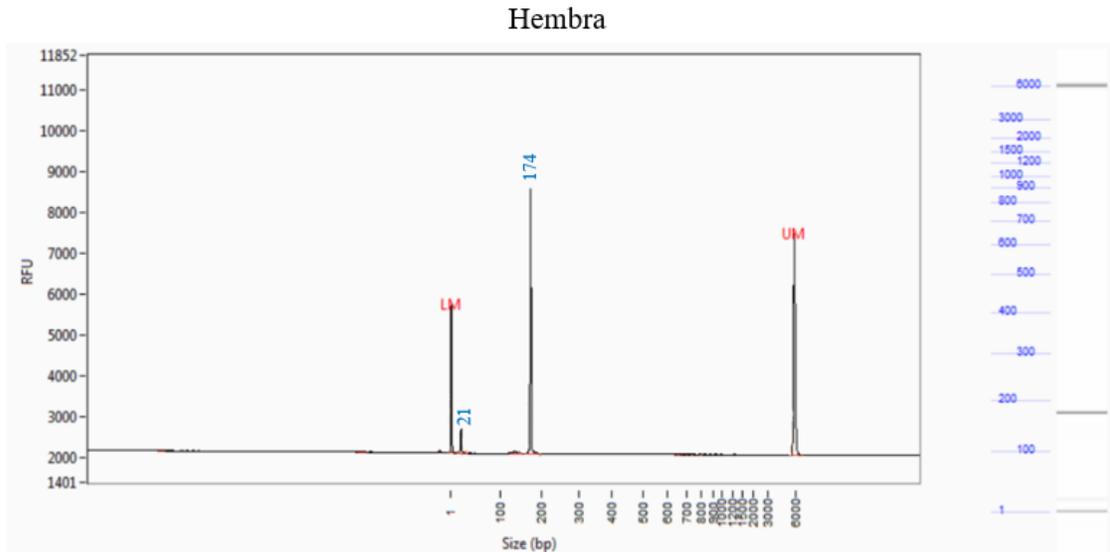
Tabla 1. Detección mediante HRM**A. Hembras.**

Fenotipo catalogado	Hembra Control	Hembra Control	Hembra	Hembra	Hembra
Fenotipo confirmado	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra
% de confianza	99,68	99,86	98,60	93,3	95,87
Fenotipo catalogado	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra
Fenotipo confirmado	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra	Hembra
% de confianza	96,48	94,14	91,58	96,48	90,74

B. Machos.

Fenotipo catalogado	Macho Control	Macho Control	Macho	Macho	Macho
Fenotipo confirmado	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
% de confianza	99,77	99,55	95,75	92,10	92,84
Fenotipo catalogado	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
Fenotipo confirmado	Macho	Macho	Macho	Macho	Macho
% de confianza	97,50	93,91	95,11	98,79	91,95

A



B

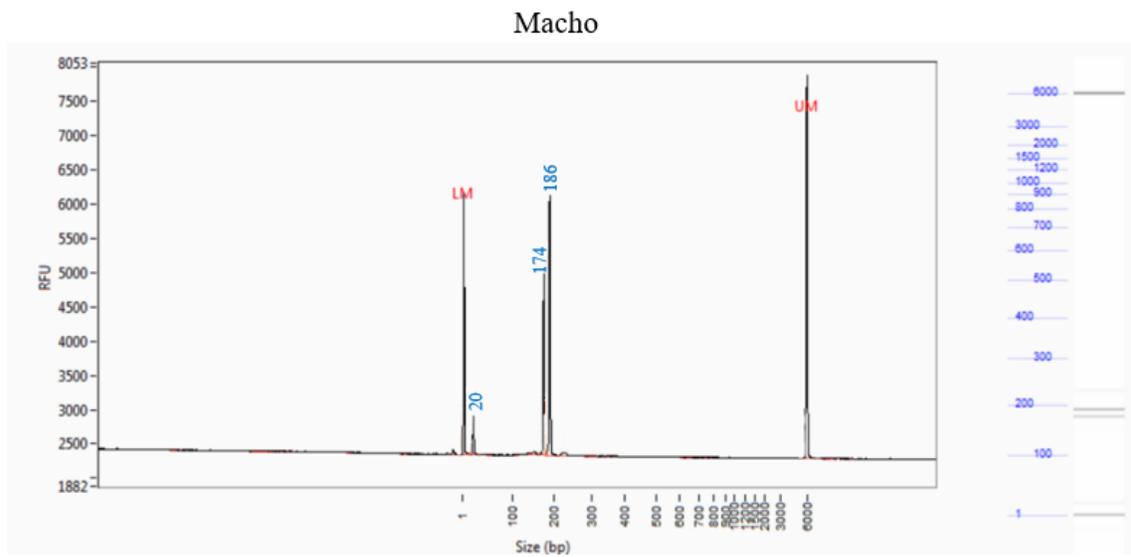


Figura 8. Análisis de productos de PCR. Datos de la electroforesis capilar, donde el pico de unidad fluorescente relativa está posicionado con respecto al tamaño de un estándar interno. **A.** Hembras presentan un amplicón de 174 pb. **B.** Machos presentan dos amplicones de 174 y 186 pb. LM: Marcador inferior. UM: Marcador superior.

fluorescencia entre hembras y machos, donde la diferencia de valores fue evaluada utilizando la prueba de t de Student de dos colas, y un valor $P < 0,05$ considerado como estadísticamente significativo. Al evaluar la reacción mediante visualización directa en un transiluminador UV, solamente se puede observar la diferencia a simple vista cuando se utiliza 20 y 30 nM del complejo.

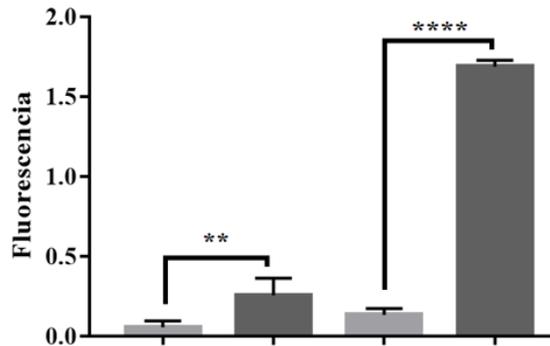
7.2.c. Ensayo visualización UV

Dados los resultados anteriores, se optimizó la reacción seleccionando la concentración de 20 nM del complejo Cas12a-sgARN, para realizar una prueba de ensayo donde se observe el resultado en un transiluminador UV, y acortando el tiempo de incubación a 30 minutos en un baño termorregulado a 37°C. En la **figura 10C** se observa que las muestras de individuos machos presentan una fluorescencia, que es capaz de distinguir y diferenciar con las muestras de individuos hembras a simple vista.

7.2.d. Ensayo de sensibilidad

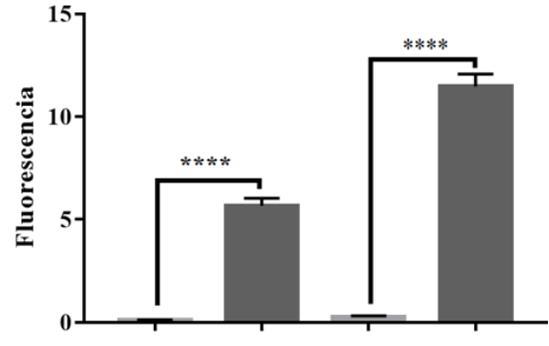
Unos de los datos importantes que entrega el analizador de fragmentos es la concentración de cada amplicón de la reacción de PCR. Por lo tanto, se realiza un ensayo de sensibilidad, para determinar la concentración de amplicón del alelo *b mínima necesaria para realizar una detección mediante fluorescencia y a luz UV. Se observó una diferencia en los valores de fluorescencia entre hembras y machos, utilizando cada amplicón hasta una concentración de 0,05 ng/μl. (**Figura 11A**). Mientras que al observar la fluorescencia a simple vista en luz UV, es posible diferenciar hasta una concentración de 0,1 ng/μl. (**Figura 11B**). Además, en el **Anexo figura 4**, se presenta la progresión en el tiempo de la fluorescencia de cada concentración utilizada.

A



Fenotipo	Hembra	Macho	Hembra	Macho
Concentración del complejo Cas12a-sgARN	5 nM		10 nM	
Visualización UV	No		No	

B



Fenotipo	Hembra	Macho	Hembra	Macho
Concentración del complejo Cas12a-sgARN	20 nM		30 nM	
Visualización UV	Si		Si	

C

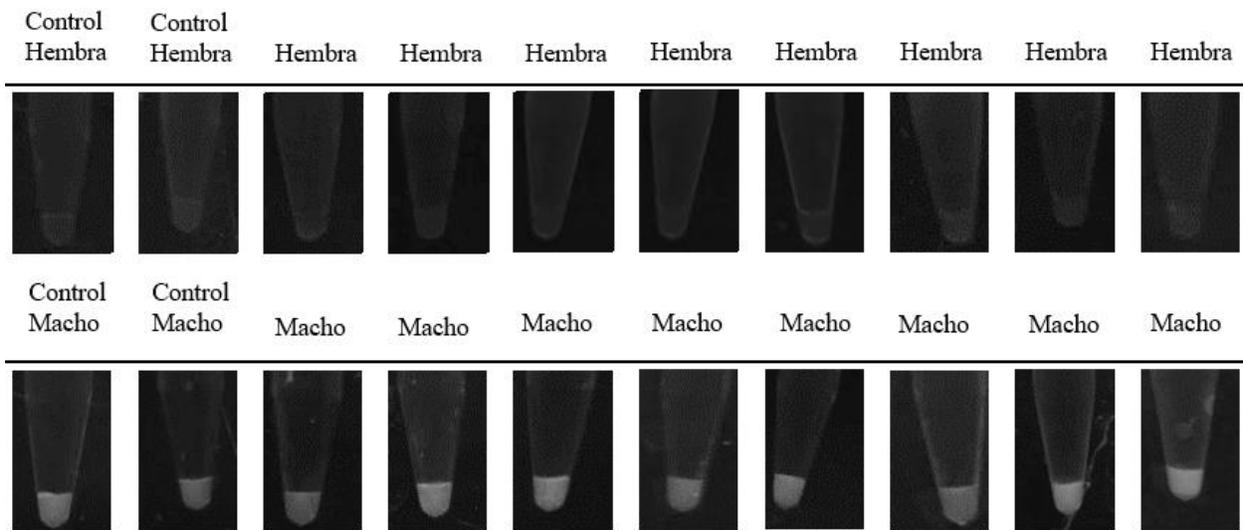
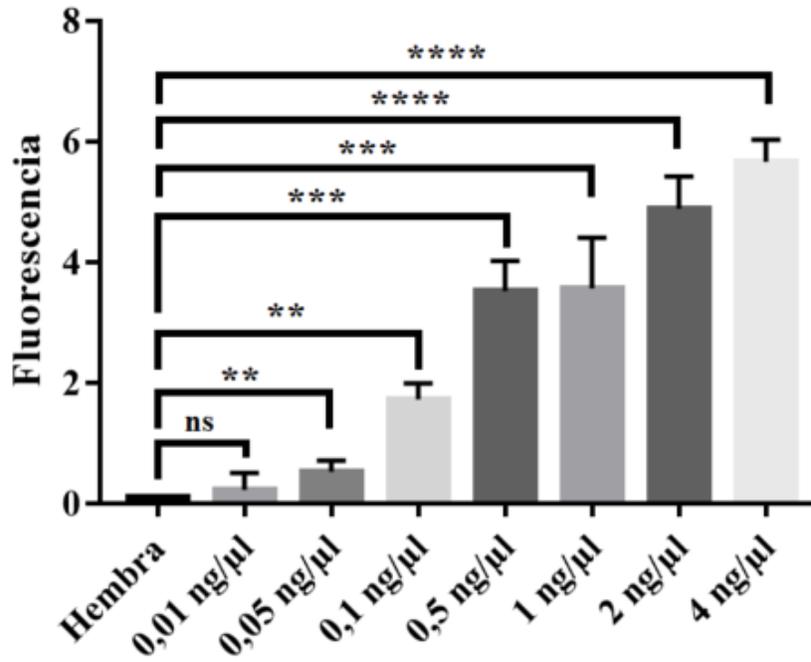


Figura 10. Prueba de detección de sexo en salmón Coho mediante CRISPR-Cas 12a anclado a PCR.

A y B. Ensayo CRISPR-Cas 12a mediante detección de fluorescencia, se destaca el sexo hembras y machos, la concentración del complejo, y posibilidad de visualización en transiluminador UV. Se trabajó con las muestras de individuos control secuenciados, dos de cada sexo y cada una en triplicado. Las barras de error representan los promedios \pm desviación estándar. Prueba de significancia t de Student de dos colas $P < 0,05$, donde *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ****: $P < 0,0001$ y ns: No significativa $P > 0,05$.

C. Visualización en luz UV en escala de grises de la detección de sexo en salmón Coho, se utilizaron diez amplicones de cada sexo, donde hembras y machos control corresponde a las muestras de individuos secuenciados.

A



B

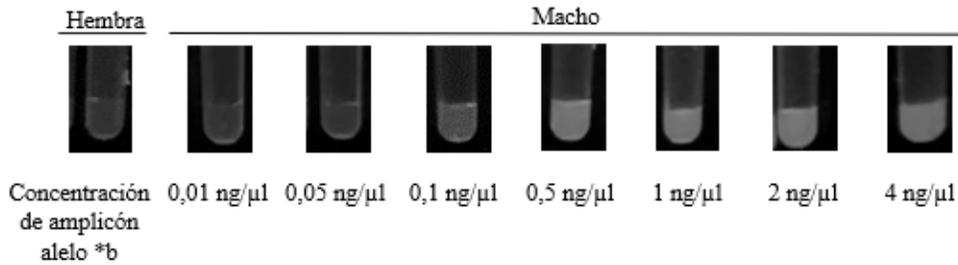


Figura 11. Ensayo de sensibilidad. A. Ensayo de sensibilidad mediante detección de fluorescencia, utilizando diferentes concentraciones del amplicón del alelo *b (0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2, 4 ng/μl) de tres muestras de individuos machos, y tres amplicones de individuos hembras, cada uno en triplicado, las barras de error representan los promedios \pm desviación estándar de las muestras. Prueba de significancia t de Student de dos colas $P < 0,05$, donde *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ****: $P < 0,0001$ y ns: No significativa $P > 0,05$. B. Visualización mediante luz UV en escala de grises del ensayo de sensibilidad, de destaca las concentraciones del amplicón de individuo macho y amplicón de hembra.

7.3. Prueba prototipo de campo para la identificación de sexo en salmón Coho mediante sistema CRISPR-Cas 12a

Para definitivamente dejar de depender de un termociclador, y poder realizar el procedimiento en campo, es importante poder reemplazar el PCR mediante otra técnica de amplificación. En este caso se utilizará RPA, que consiste en un procedimiento que se realiza de forma isotérmica a 37°C por 30 minutos, y donde nuestro producto de RPA es el blanco de la reacción CRISPR-Cas 12a, utilizando 20 nM del complejo Cas12a-sgARN.

7.3.a. Selección de partidores

Los partidores a diferencia de una PCR normal deben ser más largos, para facilitar el procedimiento de intercambio de cadena (**Figura 2**). En primer lugar, es importante evaluar y comparar la actividad de pares de partidores, ya que pequeñas variaciones en la secuencia de éstos, puede llegar a afectar la sensibilidad y especificidad de la reacción (Bentahir *et al*, 2018). Por lo tanto, se diseñaron 2 pares de partidores (RPA1 y RPA 2) (**Anexo Tabla 1**), cada uno con una longitud de 32 nucleótidos y que amplifican la zona a detectar, los cuales se combinan logrando 4 posibilidades, para posteriormente realizar la prueba de detección CRISPR-Cas 12a visualizando los resultados en transiluminador UV. Las muestras utilizadas son los controles de individuos machos secuenciados. Se concluyó que los partidores seleccionados para esta determinación son el par RPA1Fw y RPA2Rv, ya que poseen a simple vista una fluorescencia mayor, y reproducible en ambas muestras analizadas (**Figura 12**).

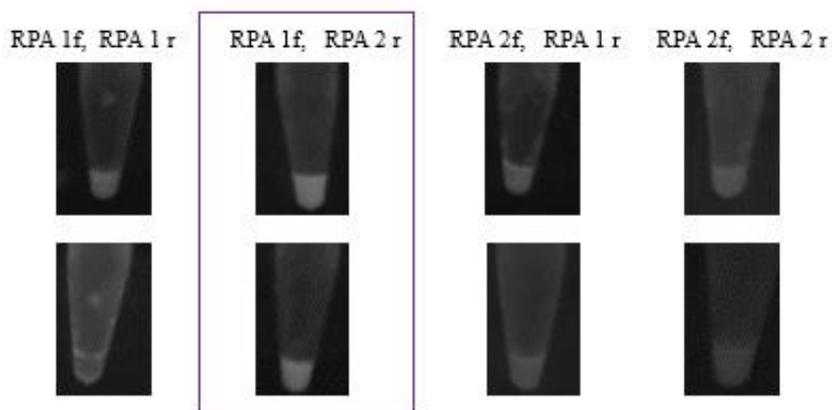
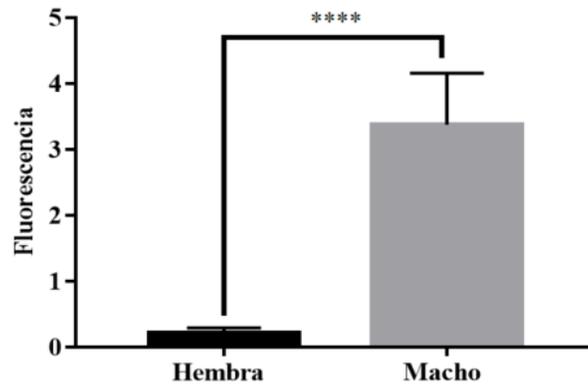


Figura 12. Ensayo de prueba de partidores candidatos de RPA. Se realiza prueba de cuatro combinaciones de partidores en la reacción de RPA (RPA1Fw RPA1Rv, RPA1Fw RPA2Rv, RPA2Fw RPA1Rv y RPA2Fw RPA2Rv), utilizando las dos muestras controles de reacción de individuos machos, para posteriormente realizar la detección mediante Cas 12a y se visualiza en un transiluminador UV.

7.3.b. Detección CRISPR-Cas 12a anclado a RPA

Una vez seleccionados los partidores, se procedió a aplicar el ensayo de CRISPR-Cas12a a tres individuos de cada sexo, se realizó la reacción de RPA, y posteriormente la de CRISPR-Cas12a incubando durante 40 minutos. Se observó una diferencia significativa entre la fluorescencia de hembras y machos (**Figura 13A**). Además, en la **figura 13B** se presenta la determinación del sexo de 10 muestras de individuos de cada sexo, donde el resultado fue visualizado en un trasiluminador UV, y se observa que los machos presentan una fluorescencia distintiva al compararlas con las hembras analizadas.

A



B

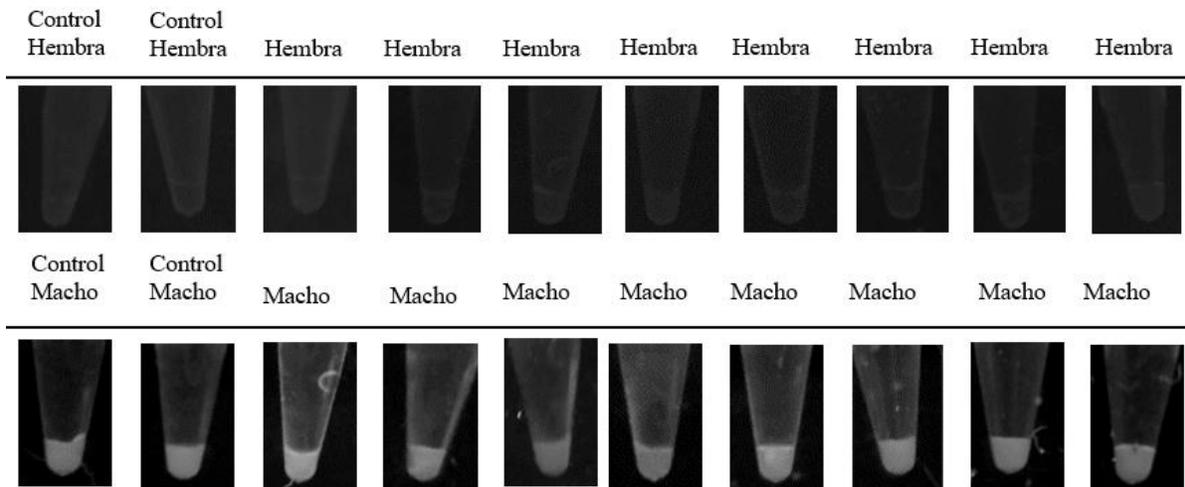


Figura 13. Prueba de detección de sexo en salmón Coho mediante CRISPR-Cas 12a anclado a RPA.

A. Ensayo de fluorescencia CRISPR-Cas 12a, utilizando producto de RPA de tres muestras de individuos de cada sexo, cada una en triplicado. Las barras de error representan los valores promedios de las determinaciones \pm desviación. Prueba de significancia t de Student de dos colas $P < 0,05$, donde *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$, ****: $P < 0,0001$ y ns: No significativa $P > 0,05$. B. Visualización UV en escala de grises, de la detección de sexo en salmón Coho, de 10 muestras de individuos de cada sexo, donde hembras y machos control corresponden a las muestras secuenciadas.

8. Discusión

8.1. Asociación genotípica de la secuencia del gen *GH-2* y la detección del sexo en salmón Coho

La determinación sexual de los peces posee múltiples mecanismos de control, desde condiciones ambientales, hormonales y genéticos. Diferentes estudios mostraron pequeñas diferencias moleculares limitadas por sexo, entre los cromosomas sexuales X e Y, donde los marcadores sexuales cromosómicos utilizados para determinar el sexo genotípico de los individuos, están altamente asociados al *locus* del gen determinante del sexo o físicamente cercanos (Devlin *et al*, 2001; Devlin *et al*, 2002; Muttray *et al*, 2017).

Dado que el salmón Coho, no posee características morfológicas que permita determinar el sexo a los individuos a edades tempranas, es necesario desarrollar otras metodologías que permita el sexado. En la actualidad se utiliza una ecografía para observar las gónadas, pero esto se puede realizar cuando se está en una etapa del desarrollo sexual avanzado y es complicado realizar este proceso de manera rutinaria. Esta es la razón por lo que es esencial basar el sexado en marcadores genéticos. Forbes *et al*. (1994), determinó una secuencia específica del gen *GH-2* que está asociada al sexo, donde el alelo *a corresponde al cromosoma X, en hembras como homocigoto (*aa), mientras que el alelo *b está presente en el cromosoma Y, en machos heterocigotos (*ab). Existen variados polimorfismos entre ambos alelos: un sitio de restricción y dos inserciones presentes en el alelo *b, los cuales se pueden aprovechar para realizar una prueba de detección de sexo macho específica (Forbes *et al*, 1994; Araneda *et al*, 2018).

En salmones el gen de la hormona del crecimiento 2 está posicionado en una región del cromosoma Y, donde la recombinación está suprimida, dado su alta asociación con la región determinante del sexo, y que por lo tanto permite la diferencia alélica entre los cromosomas X e Y. La asociación funcional entre este gen *GH-2* y el sexo, se atribuye principalmente a que la hormona del crecimiento está implicada en el proceso de desarrollo y maduración sexual, donde el macho madura antes que las hembras, y una mayor tasa de crecimiento se asocia a una madurez temprana en salmones (Forbes *et al*, 1994; Muttray *et al*, 2017).

Se utilizó tres metodologías de determinación de sexo en salmón Coho: enzima de restricción, HRM, y CRISPR-Cas12a. A partir de la prueba de detección de sexo mediante enzima de restricción, que es la caracterizada por Forbes *et al*. (1994), se logró el patrón de restricción esperado, donde las muestras de individuos machos presentan dos bandas en el gel de agarosa, la primera de 173 pb correspondiente al alelo *a, y la segunda de 140 pb que corresponde a la digestión del alelo *b. Si se quiere aplicar esta metodología de sexado, es importante utilizar el porcentaje de agarosa adecuado para visualizar los resultados en el gel,

ya que, la diferencia de longitud de ambos fragmentos de ADN posterior a la digestión del alelo *b en machos es pequeña, al utilizar un porcentaje de agarosa menor al 2% se observó una falta de resolución entre ambas bandas de ADN que puede llevar a la interpretación de los resultados de manera incorrecta, en cambio, al aumentar el porcentaje de agarosa al 2% las bandas se pudieron separar de manera clara, permitiendo la discriminación entre hembras y machos. Se seleccionaron dos muestras catalogadas de cada sexo, y se secuenciaron para poseer los controles de las pruebas futuras de HRM y CRISPR-Cas. Se destaca que las muestras de individuos analizadas mediante enzima de restricción y que fueron secuenciadas, contienen el genotipo descrito asociado a cada fenotipo.

En el cromatograma de secuenciación SANGER (**Anexo figura 2**), que corresponde a un individuo macho presenta ruido, picos dobles y sobrepuestos. Esto es debido principalmente al factor heterocigoto de la secuencia, ya que se encuentran dos amplicones que corresponden a ambos alelos, siendo secuenciados al mismo tiempo. Además, esto se puede comprobar al analizar el amplicón mediante electroforesis capilar, donde se observan dos picos que corresponden a los dos amplicones. (**Figura 8B**).

Al analizar el ensayo de HRM se observa una amplia diferencia en las curvas de fusión normalizadas entre ambos genotipos (**Figura 7B**). Se debe principalmente a la presencia de variados polimorfismos entre ambos alelos, los cuales se destaca: el sitio de restricción y la inserción en el alelo *b. El ensayo logró un porcentaje de confianza del genotipo-fenotipo confirmado mayor al 90%, de los individuos sexados al compararla con los controles de cada sexo (**Tabla 1**). Se destaca que los individuos analizados mediante enzima de restricción obtuvieron el mismo resultado fenotípico utilizando HRM.

8.2. CRISPR-Cas 12a para la detección de sexo en salmón Coho

Como se observa en la **figura 1**, existen variados polimorfismos entre ambos alelos, pero dado que la enzima Cas 12a, posee la limitante de la secuencia PAM adyacente al objetivo, las posibilidades se restringen. Otro factor a tener en cuenta, y que puede ser más complicado y costoso la puesta en marcha del ensayo, es utilizar variaciones de un solo nucleótido (SNPs) como polimorfismo para la detección, ya que, para lograr una respuesta de fluorescencia que se puede diferenciar entre individuos hembras y machos, se requiere diseñar variados sgARNs con un desajuste sintético adicional en diferentes posiciones. Este desajuste va a generar una burbuja, que cuando el par de bases de interés no está presente, permite una selección más estricta de la secuencia objetivo (Kellner *et al*, 2019; Huang *et al*, 2021).

En la secuencia *GH-2*, existe dos inserciones en el alelo *b (machos), que no está presente en el alelo *a (hembras), una comienza en la posición 90 y la otra en la posición 381. La primera posee una secuencia

PAM cercana, y dado que la diferencia entre ambos alelos es de 13 nucleótidos, no es necesario diseñar múltiples sgARN con desajuste sintético adicional como en el caso de los SNPs (**Figura 1, Anexo figura 1**), mientras que la segunda inserción, y el sitio de restricción, no está presente la secuencia PAM. Por lo tanto, se escoge la primera inserción como el sitio a detectar en la reacción de detección de sexo en salmón Coho utilizando Cas 12a.

El prototipo de diagnóstico mediante Cas 12a, permite el sexado de manera específica en salmón Coho, donde las muestras de individuos machos emiten fluorescencia y las hembras no, ya que el sgARN no reconoce la secuencia del alelo *a. Se destaca que se logró un resultado similar al utilizar amplicones de PCR y RPA, por lo tanto, si es posible reemplazar el PCR y realizar la metodología en campo.

Al comparar la sensibilidad de la prueba se observa una mayor sensibilidad al utilizar el detector de fluorescencia que mediante transiluminador luz UV. La visualización en el transiluminador UV utilizando el fluoróforo FAM produce a un color verde fluorescente, cuya intensidad es constante en todas las concentraciones de amplicón del alelo *b analizadas, hasta llegar a una de 0,5 ng/μl, y disminuye cuando la concentración corresponde a 0,1 ng/μl, que corresponde a la concentración más baja que se permite observar una diferencia entre hembras y machos. Por otra parte, cuando la detección se realiza en el equipo detector de fluorescencia, el mínimo umbral de detección se alcanza a una concentración de 0,05 ng/μl, esta discrepancia se debe principalmente a la imposibilidad del ojo humano de diferenciar la fluorescencia en una escala pequeña (**Figura 11**).

Se destaca que los individuos analizados mediante enzima de restricción, HRM y Cas 12a comparten el mismo resultado fenotípico (**Anexo Tabla 2**).

Para evaluar el potencial de aplicabilidad de la metodología, se utiliza estadística diagnóstica, en cuanto a sensibilidad y especificidad. La sensibilidad corresponde a la capacidad de la prueba de detectar un verdadero positivo (verdaderos machos), mientras que la especificidad corresponde a la capacidad de la prueba de detectar un verdadero negativo (verdaderas hembras). De estas métricas se pueden obtener los falsos positivos y falsos negativos en cuestión, al comparar los resultados con la técnica de referencia o “gold standard”, la cual en este caso corresponde a HRM. (Trevethan *et al*, 2017). Los individuos sexados mediante HRM como macho, obtuvieron el mismo resultado mediante CRISPR-Cas 12a, por lo que se puede afirmar que son realmente machos y por lo tanto no existen falsos positivos que pudieran ser hembras. Se observa algo parecido con respecto a las hembras, donde no existen falsos negativos que pudieran ser machos. (**Anexo Tabla 2**).

8.3. Procedimientos para el mejoramiento de la técnica

Las ventajas de la metodología de detección mediante Cas 12a, consisten en la sensibilidad, especificidad, y si el diagnóstico está acoplado a RPA, da la posibilidad de realizarla en terreno y de manera rápida, ya que se puede completar el diagnóstico en 60 minutos, sin considerar el tiempo de extracción de ADN, que dependiendo del kit utilizado puede llegar a tomar más de un día. Este procedimiento se podría llegar a simplificar en tiempo y procedimiento, utilizando una extracción rápida que consiste en un choque de temperatura con NaOH y TRIS, que no demora más de 20 minutos.

Además, en cuanto a la prueba acoplada a RPA, el próximo paso sería lograr resultados realizando el procedimiento en un solo paso, desde RPA y Cas 12a. Dado que ambas técnicas trabajan a la misma temperatura 37°C, sin la necesidad de abrir los tubos de RPA para extraer el amplicón y adicionarlo a la prueba de Cas 12a. De esa manera se simplificará el procedimiento, además evitando cualquier tipo de contaminación que se podría producir al abrir los tubos, proceso que es importante considerando que se suele trabajar con un número elevado de muestras.

Uno de los inconvenientes de la técnica de Cas 12a corresponde a la imposibilidad de realizar una detección múltiple, y por lo tanto, no es posible poseer un control interno positivo en cada muestra. La importancia de un control positivo interno recae en controlar la integridad de la muestra de ADN utilizada, y con mayor razón cuando se realizan variados pasos para obtener un resultado. En este caso, saber si las muestras de individuos detectados como hembras, que no producen fluorescencia, es porque efectivamente son hembras, y no debido a problemas en el proceso de amplificación. La solución que se dio a esta problemática en este caso en particular, corresponde a que en cada una de las rondas de detecciones realizadas, es necesario tener dos controles positivos de machos y dos de hembras, que pasan por todos los procesos, desde PCR/RPA hasta Cas 12a. Además, los amplicones de PCR se analizaron en un gel de agarosa para tener como antecedente que existe una amplificación en las muestras de individuos hembras que no poseen fluorescencia (**Anexo figura 3**), procedimiento que no es posible realizar para RPA, ya que se necesita realizar una purificación del producto de amplificación antes de analizar el amplicón en el gel de agarosa.

Una de las alternativas para poseer un control positivo interno, es diseñar un sgARN que detecte el alelo *a, de manera que desde el mismo amplicón caracterizado se pueda realizar la prueba de Cas 12a separada, donde se esperaría que en muestras de individuos hembras y machos produjesen fluorescencia. Otra solución posible corresponde utilizar Cas 12a y Cas 13 para realizar una detección múltiple, de manera que una enzima reconozca la secuencia blanco de la detección, y la otra una secuencia control positivo, que puede ser la secuencia genómica del 18 S ribosomal o GAPDH, esto es posible dado que ambas enzimas

utilizan diferentes características en cuanto de sgARN y el reportero. El procedimiento de amplificación se puede realizar como un PCR doble o RPA múltiple, e insertar en el partidor en la secuencia a detectar mediante Cas 13 el promotor de T7 para realizar una transcripción *in vitro*. (**Figura 5**). En este caso la detección se debe realizar en un equipo lector de fluorescencia, ya que es importante que los reporteros de ssADN y ssARN estén acoplados a diferentes fluoróforos, con una longitud de onda de emisión en diferentes canales, para poder detectar ambos amplicones en un solo ensayo.

9. Conclusiones

- Se logró una detección de sexo mediante HRM en salmón Coho, con un porcentaje de confianza mayor al 90%, metodología que es utilizada como “*gold standard*” para la detección de diferencias en la secuencia de ADN.
- El sistema CRISPR-Cas12a acoplado a PCR, es capaz de detectar la inserción sexo específica, observando una diferencia significativa de valores de fluorescencia entre muestras de individuos hembras y machos, además permitiendo distinción bajo luz UV a simple vista entre ambos sexos.
- El sistema CRISPR-Cas 12a acoplado a RPA, permitió identificar el sexo de los individuos sin la necesidad de utilizar aparatos de laboratorio complejos como termocicladores, y por lo tanto fue posible aplicar la prueba como prototipo de campo.

10. Referencias

- Araneda, C., Lam, N., Iturra, P. (2018) Development and Application of Sex-Linked Markers in Salmonidae. *Sex Control in Aquaculture*, 12: 281-291
- Abdelrahman, H., ElHady, M., Alcivar-Warren, A., Allen, S., Al-Tobasei, R., Bao, L., Beck, B., Blackburn, H., Bosworth, B., Buchanan, J., Chappell, J., Daniels, W., Dong, S., Dunham, R., Durland, E., Elasad, A., Gomez-Chiarri, M., Gosh, K., Guo, X., ... Zhou, T. (2017). Aquaculture genomics, genetics and breeding in the United States: current status, challenges, and priorities for future research. *BMC genomics*, 18(1), 191.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709–1712.
- Bentahir, M., Ambroise, J., Delcorps, C., Pilo, P., & Gala, J. L. (2018). Sensitive and Specific Recombinase Polymerase Amplification Assays for Fast Screening, Detection, and Identification of *Bacillus anthracis* in a Field Setting. *Applied and environmental microbiology*, 84(11), e00506-18.
- Broughton, J. P., Deng, X., Yu, G., Fasching, C. L., Servellita, V., Singh, J., Miao, X., Streithorst, J. A., Granados, A., Sotomayor-Gonzalez, A., Zorn, K., Gopez, A., Hsu, E., Gu, W., Miller, S., Pan, C. Y., Guevara, H., Wadford, D. A., Chen, J. S., & Chiu, C. Y. (2020). CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nature biotechnology*, 38(7), 870–874.
- Bonini, A., Poma, N., Vivaldi, F., Kirchhain, A., Salvo, P., Bottai, D., Tavanti, A., & Di Francesco, F. (2021). Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 192, 113645.
- Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. (2018). CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387), 436–439.
- Chiu C. (2018). Cutting-Edge Infectious Disease Diagnostics with CRISPR. *Cell host & microbe*, 23(6), 702–704.

Devlin, R., Biagi, C. & Smailus, D. (2001). Genetic mapping of Y-chromosomal DNA markers in Pacific salmon. *Genetica* 111, 43–58.

Devlin, R., Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture*, 208 (3-4), 191-364.

Díaz, NF y Neira, R. (2005). Biotecnología aplicada a la acuicultura: I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. *Cien Inc. Agr.* 32(1):45–49

Ding, X., Yin, K., Li, Z., & Liu, C. (2020). All-in-One Dual CRISPR-Cas12a (AIOD-CRISPR) Assay: A Case for Rapid, Ultrasensitive and Visual Detection of Novel Coronavirus SARS-CoV-2 and HIV virus. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2020.03.19.998724.

East-Seletsky, A., O'Connell, M. R., Knight, S. C., Burstein, D., Cate, J. H., Tjian, R., & Doudna, J. A. (2016). Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 538(7624), 270–273.

FAO (2022). FAO Statistics Database. Global aquaculture production Quantity (2020) [Cited 21 Sep 2022.] Available from URL: https://www.fao.org/fishery/statisticsquery/en/aquaculture/aquaculture_quantity.

Fitzpatrick, J. L., Henry, J. C., Liley, N. R., & Devlin, R. H. (2005). Sperm characteristics and fertilization success of masculinized coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 249(1-4), 459-468.

Forbes, S. H., Knudsen, K. L., North, T. W., Allendorf, F. W. (1994). One of two growth hormone genes in coho salmon is sex-linked. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1628–1631.

Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Lee, J. W., Essletzbichler, P., Dy, A. J., Joung, J., Verdine, V., Donghia, N., Daringer, N. M., Freije, C. A., Myhrvold, C., Bhattacharyya, R. P., Livny, J., Regev, A., Koonin, E. V., Hung, D. T., Sabeti, P. C., Collins, J. J., Zhang, F. (2017). Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science*, 356(6336), 438–442.

- Gordon, M., Owen, T., Ternan, T., Hildebrand, L. (1984). Measurement of a sex-specific protein in skin mucus of premature coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 43(1-3), 333–339.
- He, Q., Yu, D., Bao, M., Korensky, G., Chen, J., Shin, M., Kim, J., Park, M., Qin, P., Du, K. (2020). High-throughput and all-solution phase African Swine Fever Virus (ASFV) detection using CRISPR-Cas12a and fluorescence-based point-of-care system. *Biosensors bioelectronics*, 154, 112068.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278.
- Huang, Z., Tian, D., Liu, Y., Lin, Z., Lyon, C. J., Lai, W., Fusco, D., Drouin, A., Yin, X., Hu, T., & Ning, B. (2020). Ultra-sensitive and high-throughput CRISPR-powered COVID-19 diagnosis. *Biosensors & bioelectronics*, 164, 112316.
- Hunter, G. A., Donaldson, E. M., Goetz, F. W., & Edgell, P. R. (1982). Production of all-female and sterile coho salmon, and experimental evidence for male heterogamety. *Transactions of the American Fisheries Society*, 111(3), 367-372.
- Iniesta, R., Guinó, E., Moreno, V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4), 333-341.
- Ishino, Y., Krupovic, M., Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *Journal of bacteriology*, 200(7), e00580- 17.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12), 5429–5433.
- Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W., Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular microbiology*, 43(6), 1565–1575.
- Jolany Vangah, S., Katalani, C., Booneh, H. A., Hajizade, A., Sijercic, A., Ahmadian, G. (2020). CRISPR-Based Diagnosis of Infectious and Noninfectious Diseases. *Biological procedures online*, 22, 22.

Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821.

Katz, J. (2006). *Technology, Adaptation, and Exports: How Some Developing Countries Got it Right* (1.^a ed., pp. 193-222). Washington DC: Vandana Chandra.

Kellner, M. J., Koob, J. G., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., & Zhang, F. (2019). SHERLOCK: nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nature protocols*, 14(10), 2986–3012.

Khambhati, K., Bhattacharjee, G., & Singh, V. (2019). Current progress in CRISPR-based diagnostic platforms. *Journal of cellular biochemistry*, 120(3), 2721-2725.

Lhorente, JP, Araneda, M., Neira, R. and Yáñez, JM (2019), Avances en mejoramiento genético para la acuicultura de salmón y trucha: situación y perspectivas de Chile. *Rev Aquacult*, 11: 340-353.

Li, S. Y., Cheng, Q. X., Wang, J. M., Li, X. Y., Zhang, Z. L., Gao, S., Cao, R. B., Zhao, G. P., & Wang, J. (2018). CRISPR-Cas12a-assisted nucleic acid detection. *Cell discovery*, 4, 20.

Li, Y., Li, S., Wang, J., Liu, G. (2019). CRISPR/Cas Systems towards Next-Generation Biosensing. *Trends in biotechnology*, 37(7), 730–743

Lobato, M., O'Sullivan, K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends in analytical chemistry: TRAC*, 98, 19–35.

Mackay I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical microbiology and infection. The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(3), 190–212.

Martínez, V., Neira, R., Gall, G.A.E., (1999). Estimation of genetic parameters from pedigreed populations: lessons from analysis of alevin weight in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 180, 223–236.

Martinez, V., Dettleff, P. J., Galarce, N., Bravo, C., Dorner, J., Iwamoto, R. N., & Naish, K. (2022). Estimates of Effective Population Size in Commercial and Hatchery Strains of Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch* (Walbaum, 1792)). *Animals: an open access journal from MDPI*, 12(5), 647.

Merchán, A., Torres, M., Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5), 796-807.

Muttray, A. F., Sakhrani, D., Smith, J. L., Nakayama, I., Davidson, W. S., Park, L., & Devlin, R. H. (2017). Deletion and copy number variation of Y-chromosomal regions in coho salmon, chum salmon, and pink salmon populations. *Transactions of the American Fisheries Society*, 146(2), 240-251.

Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 439, 231–250.

Neira, R., Lhorente, J. P., Newman, S., Yáñez, J. M., Araneda, M., & Filp, M. (2014). Evolution of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) breeding programs. In *Proceedings, 10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production*.

Pardee, K., Green, A. A., Takahashi, M. K., Braff, D., Lambert, G., Lee, J. W., Ferrante, T., Ma, D., Donghia, N., Fan, M., Daringer, N. M., Bosch, I., Dudley, D. M., O'Connor, D. H., Gehrke, L., Collins, J. J. (2016). Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell*, 165(5), 1255–1266.

Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608.
<https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>

Sander, J. D., Joung, J. K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating, and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347–355.

Sandercock, F. (1991). *Pacific Salmon Life Histories* (2.^a ed., pp. 397–399). British Columbia: C. Groot, L Margolis.

Seal, A., Gupta, A., Mahalaxmi, M., Aykkal, R., Singh, T. R., Arunachalam, V. (2014). Tools, resources, and databases for SNPs and indels in sequences: a review. *International journal of bioinformatics research and applications*, 10(3), 264–296.

Starks, H. A., Clemento, A. J., Garza, J. C. (2016). Discovery and characterization of single nucleotide polymorphisms in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Molecular ecology resources*, 16(1), 277–287.

Strich, J. R., Chertow, D. S. (2019). CRISPR-Cas Biology and Its Application to Infectious Diseases. *Journal of clinical microbiology*, 57(4), e01307-18.

Trevethan R. (2017). Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Plabilities, and Pitfalls in Research and Practice. *Frontiers in public health*, 5, 307.

Verma, M. K., Roychowdhury, S., Sahu, B. D., Mishra, A., & Sethi, K. K. (2022). CRISPR-based point-of-care diagnostics incorporating Cas9, Cas12, and Cas13 enzymes advanced for SARS-CoV-2 detection. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 36(8), e23113.

Xu, L., Zhao, M., Ryu, J. H., Hayman, E. S., Fairgrieve, W. T., Zohar, Y., ... & Wong, T. T. (2023). Reproductive sterility in aquaculture: A review of induction methods and an emerging approach with application to Pacific Northwest finfish species. *Reviews in Aquaculture*, 15(1), 220-241.

11. Anexo

Tabla 1. Secuencias de partidores, sgARN y sonda utilizada

Partidores Amplicón enzima de restricción, HRM y Cas 12a (GH 185)	Fw: AGAGTTCAGTAAGTTACCTGGC
	Rv: ATGCATGATGCTGGTTCTGC
Partidores secuenciación (GH 349)	Fw: AGAGTTCAGTAAGTTACCTGGC
	Rv: AGAGAACCCGCCGATTAGAGA
Partidores RPA 1	Fw: TCAGAAGAGTTCAGTAAGTTACCTGGCGGAGA
	Rv: AATTTCCACCATGCATGATGCTGGTTCTGCTT
Partidores RPA 2	Fw: GAGACTCAGAAGAGTTCAGTAAGTTACCTGGC
	Rv: TACAGTATATATTTACCCATGGAGTTTAGACA
sgARN	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUAAUAAUCGAUACAACUUAGUCA U
Sonda	56-FAM/TTATT/3IABkFQ

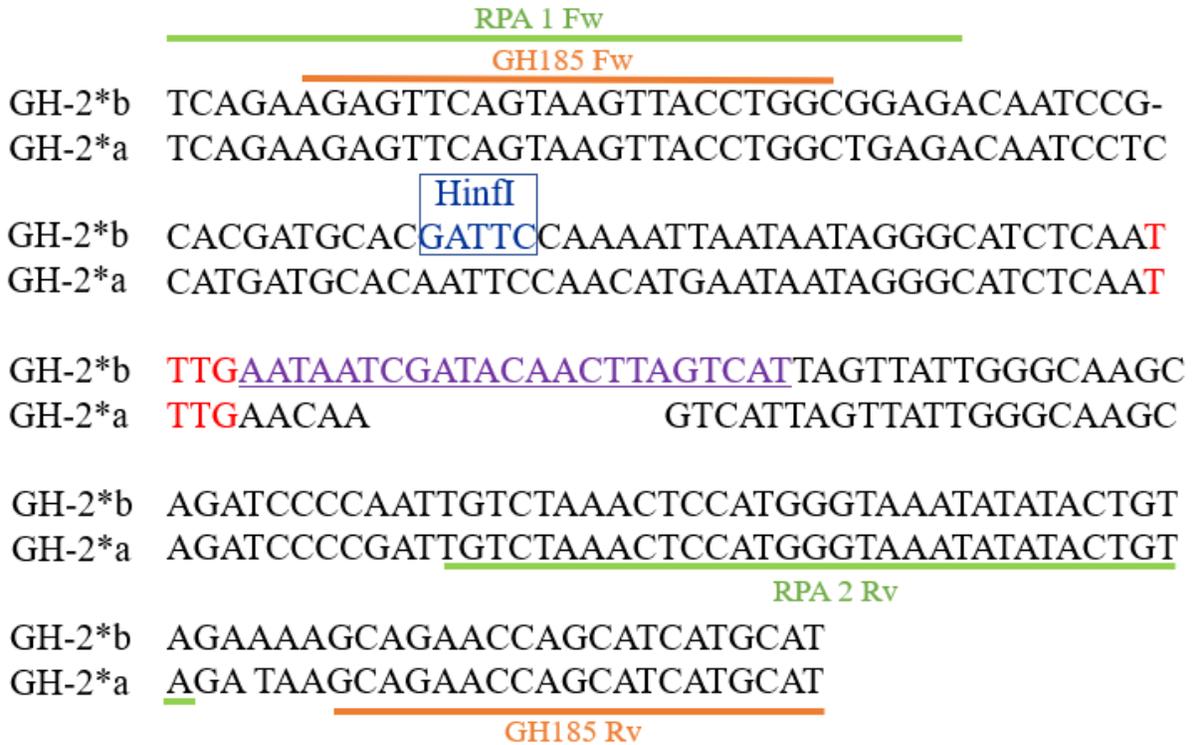
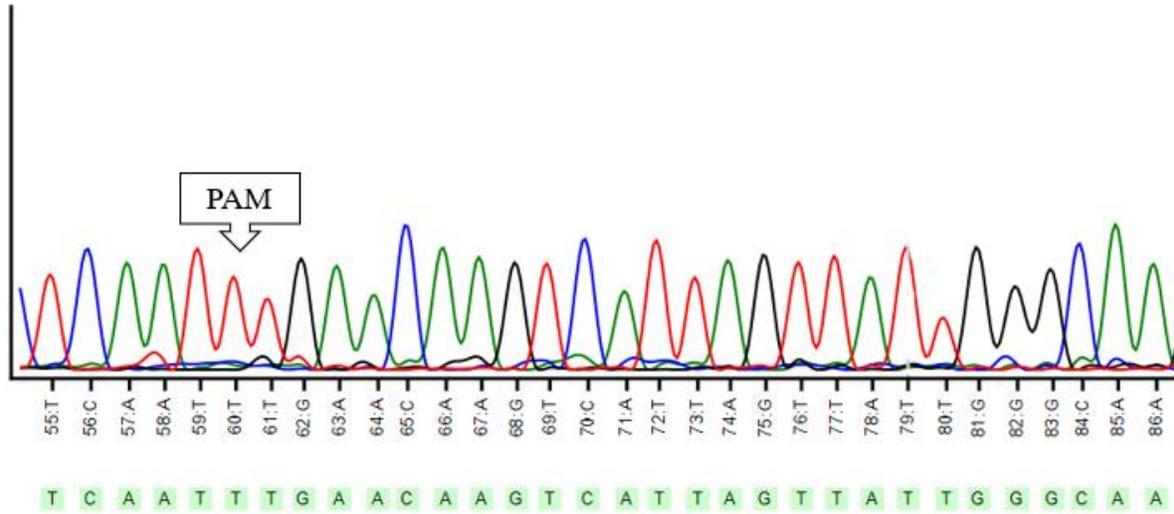


Figura 1. Posicionamiento de los principales elementos en la secuencia del gen *GH-2*. Se presenta el alineamiento de ambos alelos *a y *b donde en color verde se observa los partidos de RPA utilizados (RPA 1 Fw, RPA 2 Rv), en color naranja partidos GH 185, en azul el sitio de restricción para *HinfI*, rojo la secuencia PAM TTTG, y en morado la posición del sgARN.

A

Hembra



B

Macho

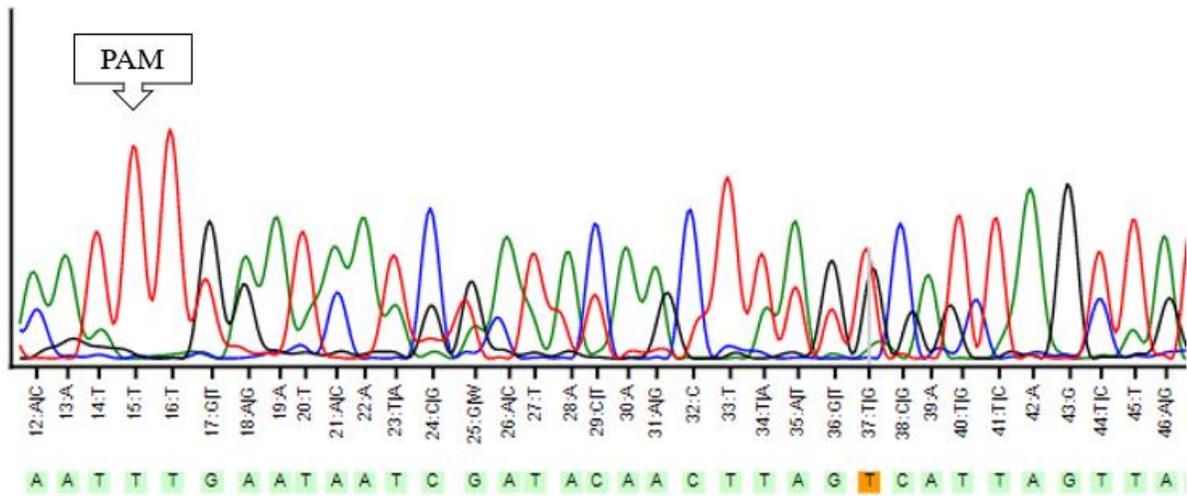


Figura 2. Cromatograma de secuenciación SANGER. A Hembra y B Macho. Se observa el motivo PAM TTTG, y los nucleótidos presentados en picos de color. A: verde, T: rojo, C: Azul, G: negro.

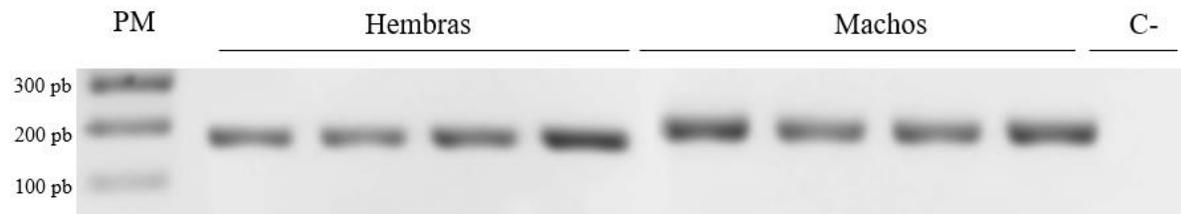


Figura 3. Amplicones objetivo de reacción *HinfI* y CRISPR-Cas 12a en gel de agarosa. Amplicón obtenido a partir de los partidores GH 185, que en hembras presenta un tamaño de 173 pb y en machos 185 pb. PM corresponde al estándar de peso molecular, y C- al control negativo de reacción.

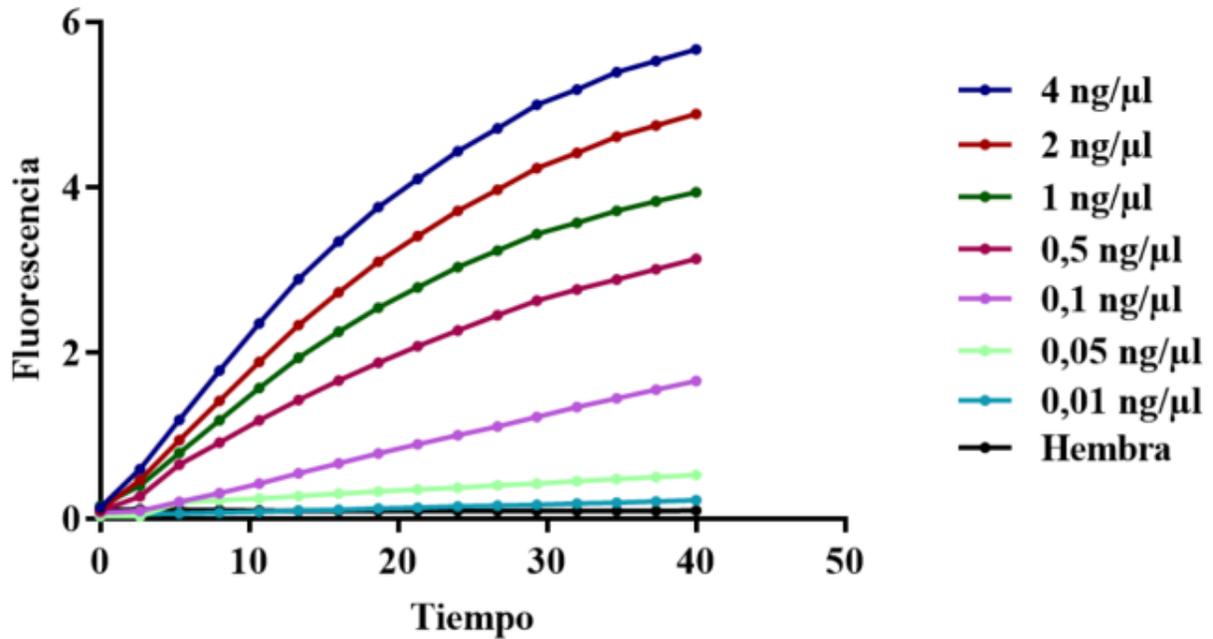


Figura 4. Progresión en el tiempo de la fluorescencia del ensayo de sensibilidad. Se utiliza diferentes concentraciones del amplicón del alelo *b presente en machos de la secuencia del gen *GH-2* y el control hembra. Cada punto corresponde a la media de tres amplicones de diferentes muestras.

Tabla 2. Resumen de resultados.

A. Hembras.

Muestra	Enzima de restricción	Secuenciación	HRM	CRISPR-Cas12a-PCR	CRISPR-Cas12a-RPA
1	Hembra	Hembra GH-a Control	Hembra Control Confianza: 99,68%	Hembra Control	Hembra Control
2	Hembra	Hembra GH-a Control	Hembra Control Confianza: 99,86%	Hembra Control	Hembra Control
3	Hembra		Hembra Confianza: 98,60 %	Hembra	Hembra
4	Hembra		Hembra Confianza: 93,3%	Hembra	Hembra
5	Hembra		Hembra Confianza: 95,87%	Hembra	Hembra
6			Hembra Confianza: 96,48%	Hembra	Hembra
7			Hembra Confianza: 94,14%	Hembra	Hembra
8			Hembra Confianza: 91,58%	Hembra	Hembra
9			Hembra Confianza: 96,48%	Hembra	Hembra
10			Hembra Confianza: 90,74%	Hembra	Hembra

B. Machos.

Muestra	Enzima de restricción	Secuenciación	HRM	CRISPR-Cas12a-PCR	CRISPR-Cas12a-RPA
11	Macho	Macho GH-b Control	Macho Control Confianza: 99,77%	Macho Control	Macho Control
12	Macho	Macho GH-b Control	Macho Control Confianza: 99,55%	Macho Control	Macho Control
13	Macho		Macho Confianza: 95,75%	Macho	Macho
14	Macho		Macho Confianza: 92,10%	Macho	Macho
15	Macho		Macho Confianza: 92,84%	Macho	Macho
16			Macho Confianza: 97,50%	Macho	Macho
17			Macho Confianza: 93,91%	Macho	Macho
18			Macho Confianza: 95,11%	Macho	Macho
19			Macho Confianza: 98,79%	Macho	Macho
20			Macho Confianza: 91,95%	Macho	Macho