



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE MIOSTATINA

ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN PACO (Piaractus

brachypomus; Cuvier, 1818)

**Línea de investigación:
Genética, Bioquímica y Biotecnología**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autora

Pajares Cárdenas, Génesis Gianella

Asesor

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurado

Sáez Flores, Gloria María

Robles Román, Margarita Elena

Rodrigo Rojas, María Elena

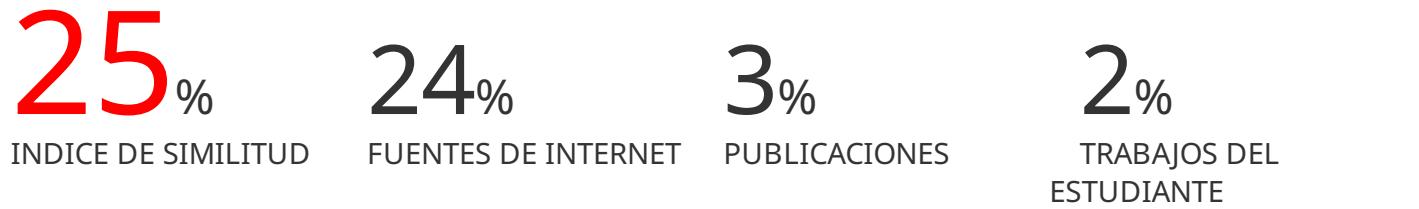
Lima - Perú

2024



SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE MIOSTATINA ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN PACO (*Piaractus brachypomus*; Cuvier, 1818)

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unfv.edu.pe	17%
2	vdocuments.es	<1%
3	sedici.unlp.edu.ar	<1%
4	Jean-Charles Gabillard, Peggy R. Biga, Pierre-Yves Rescan, Iban Seiliez. "Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes", General and Comparative Endocrinology, 2013	<1%
5	biotech-spain.com	<1%
6	patents.google.com	<1%
7	revistas.urp.edu.pe	

Fuente de Internet Fuente de Internet Fuente de Internet Publicación

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE MIOSTATINA ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN PACO (*Piaractus*

brachypomus; Cuvier, 1818)

Línea de Investigación:

Genética, Bioquímica y Biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor:

Pajares Cárdenas, Génesis Gianella

Asesor:

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurados:

Sáez Flores, Gloria María

Robles Román, Margarita Elena

Rodrigo Rojas, María Elena

Lima-Perú

2024

Índice

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
I. INTRODUCCIÓN	8
1.1 <i>Descripción y Formulación del Problema.....</i>	9
1.2 <i>Antecedentes.....</i>	10
1.3 <i>Objetivos</i>	14
1.3.1 <i>Objetivo General.....</i>	14
1.3.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	14
1.4 <i>Justificación</i>	15
1.5 <i>Hipótesis</i>	17
1.5.1 <i>Hipótesis nulas</i>	17
1.5.2 <i>Hipótesis alternativas</i>	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1 <i>Bases teóricas sobre el tema de investigación</i>	18
2.2 <i>Gen de miostatina.....</i>	20
2.3 <i>Promotor del gen de miostatina.....</i>	21
2.4 <i>Edición molecular del gen de Miostatina.....</i>	22
2.5 <i>Sobre la especie ictícola Paco (<i>Piaractus brachypomus</i>, Cuvier 1818).....</i>	23
III. MÉTODO	27
3.1 <i>Tipo de investigación</i>	27
3.2 <i>Ámbito temporal y espacial.....</i>	27
3.2.1 <i>Ámbito temporal</i>	27
3.2.2 <i>Ámbito espacial</i>	27
3.3 <i>Variables.....</i>	28
3.3.1 <i>Variable independiente</i>	28
3.3.2 <i>Variable dependiente</i>	28
3.4 <i>Población y muestra.....</i>	28
3.4.1 <i>Población</i>	28
3.4.2 <i>Muestra</i>	28
3.5 <i>Instrumentos.....</i>	28
3.5.1 <i>Materiales de Bioseguridad</i>	29
3.5.2 <i>Material Biológico</i>	29

3.5.3	<i>Materiales de laboratorio</i>	29
3.5.4	<i>Reactivos</i>	29
3.5.5	<i>Equipos</i>	30
3.6	<i>Procedimientos</i>	30
3.6.1	<i>Diseño de Primers</i>	30
3.6.2	<i>Técnica de recolección de datos</i>	30
3.6.3	<i>Toma de muestra de tejido</i>	31
3.6.4	<i>Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid</i> ..	31
3.6.5	<i>Determinación de la concentración y calidad de ADN</i>	32
3.6.6	<i>Amplificación mediante PCR</i>	32
3.6.7	<i>Evaluación del amplicón</i>	33
3.6.8	<i>Servicio de Secuenciamiento</i>	33
3.7	<i>Análisis de datos</i>	34
3.8	<i>Consideraciones éticas</i>	34
IV.	RESULTADOS	36
4.1	Extracción y Cuantificación de la Calidad de ADN	36
4.2	<i>PCR punto final</i>	37
4.3	<i>Análisis de Secuenciamiento Sanger</i>	38
4.4	<i>Análisis Filogenético</i>	44
V.	DISCUSIÓN	47
VI.	CONCLUSIONES	50
VII.	RECOMENDACIONES	52
VIII.	REFERENCIAS	53
IX.	ANEXOS	67

Índice de Tablas

Tabla 1. Primers utilizados para cada PCR en muestras de <i>Piaractus brachypomus</i>	30
Tabla 2. Preparación del máster mix para la Amplificación del promotor del gen de Miostatina en <i>Piaractus brachypomus</i>	33
Tabla 3. PCR convencional - Condiciones del ciclado.....	36

Índice de Figuras

Figura 1. Gel de electroforesis al 1% sobre el valor de 23 130 bp	37
Figura 2. Gel de electroforesis al 2% que evidencia al amplicón de aproximadamente 350 bp.....	38
Figura 3. Configuración de los parámetros para el ensamblado.....	39
Figura 4. Identificación y corrección de conflictos de las bases en las lecturas pareadas.....	40
Figura 5. Obtención de secuencias consenso.....	40
Figura 6. Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas en el NCBI.....	42
Figura 7. Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas en el BLASTn del pez Paco (<i>Piaractus brachypomus</i>).....	43
Figura 8. Árbol filogenético resultante de las secuencias del promotor del gen de Miostatina de las dos variedades “Silvestre” y “Albino” del pez Paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) y del pez Tilapia (<i>Oerochromis niloticus</i>).....	45
Figura 9. Contraste de las secuencias nucleotídicas del promotor del gen de la Miostatina de las dos variedades “Silvestre” y “Albino” del pez Paco (<i>Piaractus brachypomus</i>) y del pez Tilapia (<i>Oerochromis niloticus</i>). Longitud total = 307 nucleótidos.....	46

RESUMEN

La presente investigación, logra la identificación de un fragmento de la secuencia de ADN en el promotor del gen de la miostatina, relacionado con el desarrollo muscular en dos variedades (Silvestre y Albina) del pez Paco (*Piaractus brachypomus*; Cuvier, 1818) del Perú, considerado un recurso ictícola de gran importancia nutricional para la región de la selva peruana. Con la información reportada en el Genbank, se empleó la secuencia del promotor del gen de Miostatina del pez Tilapia (*Oerochromis niloticus*; Genbank con No. de acceso XM_003458832) para diseñar un juego de primers que amplificaba la secuencia promotora de la Tilapia. Y luego éstas fueron utilizadas en las dos variedades del pez Paco obteniéndose secuencias únicas de aproximadamente 350 pb. Un análisis bioinformático posterior de las secuencias promotoras amplificadas alineadas permitió establecer su alta homología conservada (98%) entre los promotores de ésta especie con la de Tilapia. Asimismo, la secuencia nucleotídica consenso de 307 pb del promotor del gen de Miostatina de las dos variedades del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) con la secuencia de la Tilapia generó un árbol filogenético acorde a la historia evolutiva predicha. Se concluye que éstas secuencias obtenidas del promotor del gen de Miostatina del pez Paco podrían ser útiles para su edición génica por *Crispr Cas* a futuro. Y generar una línea “hipermuscularizada” de interés comercial.

Palabras clave: *Piaractus brachypomus*, miostatina, acuicultura, promotor.

ABSTRACT

The present research has identified a fragment of the DNA sequence in the promoter of the myostatin gene, related to muscle development in two varieties (Silvestre and Albina) of the Peruvian Paco fish (*Piaractus brachypomus*; Cuvier, 1818), which is a fish resource of great nutritional importance for the Peruvian jungle region. With the information reported in Genbank, the promoter sequence of the Myostatin gene of Tilapia (*Oerochromis niloticus*; Genbank accession no. XM_003458832) was used to design a set of primers that amplify the promoter sequence of Tilapia. These sequences were used in the two strains of Paco fish obtaining unique sequences of approximately 350 bp. Subsequently, a bioinformatic analysis of the aligned amplified promoter sequences was performed, which allowed establishing their high conserved homology (98%) between the promoters of this species and that of Tilapia. Likewise, the consensus nucleotide sequence of 307 bp of the Myostatin gene promoter of the two varieties of the Paco fish (*Piaractus brachypomus*) with the Tilapia sequence generated a phylogenetic tree according to the predicted evolutionary history. It is concluded that the sequences obtained from the promoter of the Myostatin gene of the Paco fish could be useful for gene editing by Crispr Cas in the future and be able to generate a "hypermuscularized" line of commercial interest.

Keywords: *Piaractus brachypomus*, myostatin, aquaculture, promoter.

I. INTRODUCCIÓN

En Perú, en los últimos años, se ha experimentado un notable crecimiento en la industria de la acuicultura. siendo los principales grupos animales cultivados en agua dulce, los peces y crustáceos, con especies que cuentan como fuente importante de proteína animal y tienen un alto valor nutricional; estas especies cultivadas abastecen a las poblaciones de las zonas rurales directamente e indirectamente, a las personas que los consumen por compra de importación en sus localidades (Mendoza, 2011). Además, el cultivo de especies ictícolas y de algunos crustáceos son base principal de ingresos económicos para las poblaciones que habitan en las riberas de ríos y lagunas en todo el territorio peruano, sin embargo, existen signos de sobre pesca sobre estas especies que afectan los ecosistemas acuáticos de estas zonas (Kleeberg, 2019). En la última década, se está buscando peces nativos con mayor tasa reproductiva y de crecimiento, que incrementen la producción de la acuicultura peruana (Ruiz, 2012).

El gen de Miostatina produce crecimiento muscular cuando es inhibido por mutación de tipo espontánea o inducida (Ohama et al., 2020). Se ha realizado amplificación y secuenciamiento en algunas especies de peces comerciales como la tilapia, salmón y la trucha, u otros como medaka, donde se ha inhibido la expresión génica de la Miostatina por técnicas de edición de genes que producen mutaciones y están hoy disponibles comercialmente a nivel mundial (Sawatari, 2010). Como fin se obtienen líneas de peces de mayor tamaño y peso comercial, en menor tiempo y a menor costo; dando progresos significativos a la acuicultura del futuro (Mesa, 2007).

Es así que el presente estudio es una contribución a la acuicultura peruana, ya que la mejora en la producción, así como también en la economía nativa del sector amazónico, está

directamente relacionada con la dinámica de crecimiento de las especies de peces cultivados, iniciando con el proceso de identificación y caracterización de uno de los genes más destacados en el desarrollo de la masa muscular, como es el caso del gen de la miostatina.

1.1 Descripción y Formulación del Problema

La acuicultura es considerada una alternativa o suplemento que provee de proteína animal en áreas de la selva donde existe dependencia de estos peces como importante fuente de alimento cárnico. Lo mismo ocurre en algunas regiones de la costa norte y del centro del Perú donde han empezado a criarse en cautiverio.

Entre las especies de mayor producción en la acuicultura amazónica, se encuentran la gamitana con una tasa de crecimiento anual del 42% (en el período de 2002 a 2010), el sábalo cola roja con un crecimiento anual del 24%, el paco con un 13% de crecimiento anual, el boquichico con un 24%, y el paiche, que está emergiendo y tiene el potencial de convertirse en una de las especies clave en la acuicultura amazónica. (Mendoza, 2011).

Hasta la actualidad, en el Perú no se ha realizado ningún análisis genético molecular del gen de la Miostatina en especies de peces dulceacuícolas nativos más importantes como son el paiche, la gamitana, el boquichico, el zúngaro, la palometa y otros de la Amazonía como el Paco. El paco posee un crecimiento acelerado que lo hace candidato para ser editado genéticamente y obtener mejora en crecimiento a futuro. Por eso la caracterización de la variabilidad genético molecular del gen de Miostatina, constituye el primer paso crucial para obtener una nueva línea de peces nativos como el Paco con mayor ganancia de carne y mejor calidad proteica de la misma (Mesa, 2007).

La información que se conoce del gen de Miostatina en peces, es todavía muy limitada, ya que, si bien se ha descrito su secuencia nucleotídica y la conservación de esta, entre algunas

especies, falta dilucidar más a nivel de su funcionalidad en la proliferación celular y crecimiento en masa de tejidos, en peces con importancia económica (Gabillard et al., 2013). Si bien se han realizado estudios genéticos moleculares como la aplicación de herramientas para diferenciar entre especies de peces comerciales, por ejemplo, los llamados marcadores moleculares o códigos de barras (Flores, 2018), no se tiene estudios referentes al gen específico Miostatina, en *Piaractus brachypomus* (pez “Paco”). Por ello nos formulamos algunas preguntas como ¿Cuál es la variabilidad genética molecular del gen de la Miostatina en *Piaractus brachypomus* (paco) y qué implicancias tendría su caracterización para programas de mejoramiento genético en acuicultura amazónica?, ¿Es posible diseñar y validar primers específicos que amplifiquen la región promotora del gen de la Miostatina en el paco?, ¿Qué grado de conservación o variabilidad presenta la secuencia promotora de la Miostatina en comparación con otras especies de peces de interés acuícola?

El presente trabajo tratará de responder a estas preguntas y realizará un estudio genético molecular del gen de la Miostatina, mediante el uso del análisis del ADN por PCR con la finalidad de obtener primers que permitan la amplificación de la secuencia nucleotídica del promotor en este pez comercial y obtener información génica que pueda ser utilizada para el mejoramiento genético cárnico de esta especie ictícola.

1.2 Antecedentes

La miostatina (GDF8) es un miembro de la superfamilia de factores de crecimiento transformante- β y desempeña un papel fundamental en la regulación, desarrollo y funcionamiento del músculo esquelético. Se expresa de manera exclusiva y actúa inhibiendo el crecimiento y la diferenciación celular, como se documentó por primera vez en el estudio de Hanset et al. (1982). La deficiencia del gen de miostatina conlleva a una hipertrofia muscular,

lo que significa un aumento en el número de fibras musculares, como se descubrió en la investigación realizada por McPherron et al. (1997). Dentro de esta superfamilia de factores de crecimiento transformante- β , se han diseñado estrategias efectivas para bloquear la vía de señalización de la Miostatina. Los inhibidores de la Miostatina han mostrado un gran potencial para incrementar de manera significativa el desarrollo muscular en modelos animales, como se evidenció en el estudio de Xu et al. (2013). La Miostatina actúa como un regulador negativo del crecimiento del músculo esquelético. Así también, en el ganado de doble musculatura por la hipertrofia (aumento en el diámetro de fibras) y/o hiperplasia (aumento en el número de fibras) del músculo esquelético (Kambadur et al., 1997).

Radaelli et al. (2003), ha caracterizado la secuencia y patrón de expresión de la miostatina en varias especies de peces de importancia comercial.

Hasta la fecha, se ha llevado a cabo la caracterización molecular de la secuencia del gen de la miostatina a partir del músculo esquelético en diversas especies de peces de importancia comercial y ornamental. Estas especies incluyen Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) (Rodgers et al., 2001), Paco (*Piaractus mesopotamicus*) (Gutierrez de Paula et al., 2014), Trucha (*Onchorynchus mykiss*) (Rescan et al., 2001), salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Østbye et al. 2001), Bagre de Canal (*Ictalurus punctatus*) (Khalil et al. 2017), pez Cebra (*Danio rerio*) (Xu et al., 2007) y Medaka (*Oryzias latipes*) (Sawatari et al., 2010).

La miostatina es una proteína que forma parte de la familia TGF (Transforming Growth Factor), la cual engloba factores de crecimiento encargados de regular la proliferación y diferenciación celular. Estos factores también modulan la síntesis de la matriz extracelular y la función biológica de otros factores de crecimiento. Estas funciones se desempeñan tanto durante el desarrollo embrionario como en la vida adulta, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis y la regulación tisular, (Hogan, 1994; Fuente, 2016).

Los investigadores Lee y McPherron (1997) de la Universidad Johns Hopkins descubrieron la GDF-8 (Factores de Crecimiento y Diferenciación), también conocida como MSTN, mientras exploraban posibles miembros de la superfamilia del TGF- β . Durante la investigación, el equipo identificó un nuevo gen que mostraba una sorprendente similitud con los miembros previamente estudiados de esta superfamilia. En el curso de este estudio, se demostró que la eliminación de la región que codifica el dominio C-terminal de la proteína provocaba un notorio aumento en la masa muscular esquelética en ratones. Este efecto se atribuyó a una combinación de hiperplasia e hipertrofia, revelando así que la MSTN desempeña el papel de un regulador negativo en el desarrollo del músculo esquelético.

Investigaciones posteriores confirmaron que las mutaciones en el gen MSTN eran responsables de fenotipos de "doble musculatura", como se observó en varios animales, incluyendo vacunos (McPherron y Lee, 1997), ovejas (Clop et al., 2006), perros (Mosher et al., 2007) y peces (Maccatrazzo et al., 2001).

La secuencia y la predisposición genética de la Miostatina han sido caracterizados en varias especies de peces de importancia comercial, según Maccatrazzo y colaboradores en 2001. Se ha observado una considerable similitud entre las secuencias nucleotídicas de este gen en vertebrados, especialmente dentro de la misma familia. Este alto grado de conservación en la secuencia sugiere que la relación entre la estructura y la función está ampliamente conservada entre los vertebrados. En mamíferos y peces, la secuencia nucleotídica del gen de la Miostatina se mantiene notablemente conservada, como se señala en el estudio de Gabillard et al. (2013).

En el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) se han descrito dos isoformas de miostatina mediante RT-PCR. Es así que, la isoforma I de la MSTN se transcribe en el músculo esquelético blanco como ARNm de 2346 nucleótidos que codifica una proteína precursora de 373 aminoácidos. Esta isoforma I presenta 93% de identidad de secuencia con la isoforma II que fue aislada del músculo blanco como una secuencia parcial de ADNc de 1409 nucleótidos. En comparación con los mamíferos, en los peces se identificó en más de 20 tejidos como el músculo blanco, el intestino, el cerebro, las branquias, la lengua y el ojo (Rinaldi, 2022).

La literatura científica ha informado sobre el aislamiento y la caracterización de copias idénticas de ADN de Miostatina obtenidos a partir del músculo esquelético de peces de importancia comercial, como la tilapia (*Oreochromis mossambicus*) y la basa (*Morone chrysops*) (Rodgers, 2001), el Paco (*Piaractus mesopotamicus*) (Gutiérrez de Paula et al., 2014), como también en la trucha (*Onchorynchus mykiss*) (Rescan et al., 2001), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Ostbye et al. 2001), la carpa común (*Cyprinus carpio L.*) (Sun, Yu, & Tong, 2012). Asimismo, en especies marinas de importancia comercial como el pez lenguado (*Paralichthys adspersus*) (Delgado et al., 2008). Incluso se ha estudiado el gen de Miostatina en peces modelo de laboratorio como el Medaka (*Oryzias latipes*) (Sawatari et al., 2010) y el pez Cebra (*Danio rerio*) (Xu et al., 2003; Acosta et al., 2005). Así también, en los últimos estudios respecto al gen de Miostatina en peces, se ve implementado el knockout del gen usando Sistema Crispr/ Cas9 en *Pagrus major* (Pargo japonés) y en *Paralichthys olivaceus* (Fletán japonés), logrando mutantes mejorados en cuánto al incremento de musculatura (Ohama et al., 2020).

El pez Paco (*Piaractus brachypomus*) es una especie ictícola nativa del Amazonas y del río Orinoco. Se considera una especie de gran importancia en la acuicultura nativa de varios

países como Colombia, Brasil, Perú y Venezuela. Este pez ha sido también introducido y cultivado en varios países asiáticos, como por ejemplo Vietnam, Tailandia, Malasia y Bangladesh. A pesar de encontrar otras condiciones en los países de introducción, son sus características biológicas como su naturaleza resistente, rápida tasa de crecimiento, calidad superior de la carne, hábito de alimentación omnívoro, factores que la convierten en una excelente opción para la acuicultura (Escobar et al., 2019).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General.

Identificar y analizar la secuencia nucleotídica del promotor del gen de miostatina involucrado en la generación de músculo de la especie ictícola Paco (*Piaractus brachypomus*) con potencial comercial para la acuicultura peruana.

1.3.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar primers específicos, diseñados para el pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y el pez Trucha (*Oncorhynchus mykiss*), en la secuencia promotora del gen de la Miostatina en la especie ictícola *Piaractus brachypomus* (pez Paco).
- Identificar y secuenciar parte del promotor del gen de la Miostatina en la especie ictícola *Piaractus brachypomus* (pez Paco).
- Comparar la variabilidad genética de las secuencias amplificadas del promotor del gen de Miostatina en la especie ictícola *Piaractus brachypomus* (pez Paco), con las

secuencias promotoras de especies ictícolas reportadas en los bancos de datos de genes.

1.4 Justificación

En la década de los 50', la acuicultura a nivel mundial representaba tan solo el 4 % de la producción de productos pesqueros destinados al consumo humano. En un periodo de solo 70 años, esta actividad ha experimentado un notable aumento, llegando a cubrir el 52 % de dicho consumo. Sin embargo, dada la disminución continua de las pesquerías y el aumento en el consumo per cápita de productos pesqueros a nivel global, se estima que es necesario quintuplicar la producción acuícola actual para satisfacer la demanda proyectada para el periodo 2030 y 2050. A pesar de ser una actividad relativamente nueva en comparación con otras prácticas de producción con milenios de antigüedad, el crecimiento de la acuicultura ha sido excepcional. No obstante, enfrenta desafíos comunes a otras actividades más tradicionales, como la necesidad de asegurar la sustentabilidad al mismo tiempo que se garantiza la seguridad alimentaria (Del Río-Rodriguez et al., 2023).

La acuicultura dulceacuícola en el Perú desempeña un papel crucial en la mitigación de la pobreza y la garantía de seguridad alimentaria en diferentes regiones del país. No obstante, las comunidades involucradas en esta actividad se enfrentan a diversos desafíos, que incluyen el agotamiento de los recursos hidrobiológicos con la consecuente pérdida de diversidad biológica debido a la sobreexplotación (FAO, 2020). También se destacan problemas como la contaminación ambiental derivada de la alteración de hábitats acuáticos por acciones humanas como la explotación minera ilegal y la deforestación en áreas vulnerables; asimismo, el ingreso de especies exóticas que afectan las poblaciones endémicas de peces, la baja productividad de

las especies cultivadas, y la carencia de identificación y conocimiento de genes asociados a características productivas, lo que conlleva a la falta de programas de mejora genética, entre otros asuntos (Berger, 2020).

El gen de la miostatina actúa como un regulador negativo del desarrollo de la masa muscular esquelética en diversas especies animales. La inactivación de este gen, ya sea por mutaciones naturales o inducidas en laboratorio, conduce a la expresión de un fenotipo hipermuscular , entendido como un gran desarrollo del músculo; ello ocurre mediante la multiplicación de células musculares en vertebrados, como peces. Este proceso resulta en un aumento significativo de la masa muscular, lo que se traduce en un beneficio económico al elevar el valor comercial de los animales, en términos de productividad y rentabilidad (McPherron et al., 1997).

En la presente investigación se ejecutará el secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina y se analizará comparativamente su secuencia nucleotídica con las de otras especies comerciales de interés, buscando la base para su edición génica futura como alternativa de elevar su producción y/o productividad (ganancia de peso del animal) aspecto gravitante para la acuicultura peruana.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis nulas

El secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en los ejemplares analizados del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) no presentaron variabilidad o mutaciones en su secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia reportada del pez Tilapia.

1.5.2 Hipótesis alternativas

El secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en los ejemplares analizados del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) presentaron variabilidad o mutaciones en su secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia reportada del pez Tilapia.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación

La miostatina se considera una proteína que pertenece a la superfamilia de los TGF β (Factor de Crecimiento Transformante β), grupo de proteínas que en su origen fueron denominadas como tal por su capacidad para inducir fenotipos transformadores en algunos cultivos celulares y por su papel en la regulación de la proliferación de diferentes tipos de células. Estos efectos fueron identificados inicialmente en los primeros miembros descritos en esta superfamilia. El conjunto TGF β está compuesto por diversas proteínas con multifunción de señalización célula-célula, cuya acción es fundamental en la regulación de las fases de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y en la homeostasis de tejidos. Se ha observado que estas proteínas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento y la transformación de células (Fernández, 2004).

La Miostatina (MSTN), también conocida como GDF8, desempeña un rol crucial en el desarrollo, regulación y funcionamiento del músculo esquelético. Es así que, su expresión actúa de manera exclusiva inhibiendo el crecimiento y la diferenciación celular (Torres, 2013). Se destaca como el principal factor que disminuye la cantidad de mioblastos en las divisiones de diferenciación terminal, así como en el grado de alargamiento de las fibras musculares (Xu et al., 2003). Como regulador negativo del desarrollo del músculo esquelético, la Miostatina es responsable del aumento adecuado de la masa muscular (Cabanillas et al., 2017).

La Miostatina fue inicialmente identificada en un proceso conocido como “doble musculatura”, producto de una mutación natural en ganado vacuno europeo, donde los especímenes que poseen dicha mutación expresan un fenotipo de doble crecimiento en su musculatura (Grobet et al., 1997). Esta mejora en el crecimiento muscular de los animales afectados por la mutación de la Miostatina se atribuye a dos eventos principales: la hiperplasia,

que implica un aumento en el número de células musculares, y la hipertrofia, que implica un aumento en el tamaño de cada célula. En conjunto, estos procesos conducen a la formación de miofibras más grandes y con mayor peso, contribuyendo significativamente al desarrollo de la llamada "doble musculatura" en estos animales (Rodgers y Garikipati, 2008).

Dentro de esta superfamilia, la Miostatina se ha caracterizado recientemente como un regulador negativo del desarrollo y crecimiento muscular esquelético en ejemplares de ratones (McPherron et al., 1997) y en el ganado caracterizado por doble musculatura que desarrolla hipertrofia del músculo esquelético extrema y/o hiperplasia (Kambadur et al., 1997). Así mediante una delección en el gen de la Miostatina, se observó un drástico crecimiento de la masa muscular. En ratones silvestres se ha demostrado un aumento significativo en la masa muscular, atribuido principalmente al incremento tanto en el número de fibras musculares (hiperplasia) como en su diámetro (hipertrofia). Resultados similares de aumento en la masa muscular se han observado también en perros y ovinos. Este fenotipo se correlaciona con mutaciones que afectan la expresión o función de la Miostatina, lo que subraya su papel clave como regulador negativo del crecimiento muscular en diversas especies (McPherron et al., 1997).

La identificación de un fuerte regulador negativo de la masa muscular, como MSTN ofreció la perspectiva de controlar la masa muscular. Enfocado en el sector agronómico, el manejo de la actividad de la MSTN puede ayudar a mejorar el manejo del crecimiento muscular de los animales, así como a definir una nueva estrategia para controlar la cantidad y la calidad de la carne. Además, debido a que la función de MSTN se conserva en humanos, enfoques terapéuticos pueden enfocarse en la actividad de MSTN como una estrategia eficaz para aumentar masa muscular en varias situaciones clínicas (regeneración, caquexia, etc.) (Gabillard et al., 2013).

En peces, la Miostatina desempeña un papel crucial en el crecimiento muscular, lo que sugiere su potencial aplicación como herramienta biotecnológica en diferentes especies de interés comercial (Nadjar y Funkenstein, 2011).

2.2 Gen de la Miostatina (MSTN)

McPherron et al. (1997) identificaron el gen de la Miostatina en mutaciones presentes en ganado vacuno. Este hallazgo estuvo asociado a un evento biológico conocido como "doble musculatura" o hipertrofia muscular. En el caso de los peces, se conocen las secuencias completas del gen de la MSTN en varias especies, como el pez cebra (*Danio rerio*) (Xu et al., 2003; Kerr et al., 2005), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Garikipati et al., 2007), el salmón del atlántico (*Salmo salar*) (Ostbye et al., 2007), el pez besugo (*Sparus aurata*) (Maccatrazzo et al., 2001), también en el medaka (*Oryzias latipes*) (Chisada et al., 2011) y el barramundi (*Lates calcarifer*) (De Santis y Jerry, 2011). Asimismo, en el pez bagre (*Ictalurus punctatus*) (Kocabas et al., 2002) y la mar perca (*Lateolabrax japonicus*) (Ye et al., 2007).

Todos estos genes de MSTN, mantienen su estructura en tres exones de tamaño comparable (300 a 400 nucleótidos) que están separados por dos intrones, una estructura similar se observa en el gen de Miostatina en los mamíferos (Ohama et al., 2020). Los peces expresan al menos dos genes para MSTN: MSTN-1 y MSTN-2. Hasta la fecha, los promotores de MSTN-2 se han clonado solo a partir de salmonídos y peces cebra (Nadjar y Funkenstein, 2011).

Un análisis filogenético completo (Kerr et al., 2006) sugirió que varios de los genes de los salmonídos, anteriormente identificados como MSTN-2, son en realidad ortólogos de MSTN-1, y se reclasificaron como MSTN-1a y MSTN-1b. Sin embargo, la similitud de

secuencia y la agrupación apoyaron la existencia de MSTN-2 en la dorada (*Sparus aurata*), tambor shi (*Umbrina cirrosa*), Fugu (*Takifugu rubripes*) y pez cebra (*Danio rerio*). En estudios posteriores identificó genes de MSTN-2 "verdaderos" también en la trucha arco iris (*Garikipati et al.*, 2007).

2.3 Promotor del gen de Miostatina

En eucariotas, la expresión genética depende del promotor, conocido como el segmento de ADN localizado al inicio de un gen, representado por una caja TATA que es reconocida por la proteína TBP (Tata binding protein) en el inicio de la transcripción. Asimismo, la estructura y secuencia del gen que codifica la miostatina, es muy conservada entre diversas especies de vertebrados; tal es el caso de la MSTN humana , cuyo gen esta formado por 2 intrones y 3 exones, que codifican un RNAm DE 2,8 kb. Un estudio específico de la región *upstream* del gen de MSTN, mostró la presencia de un segmento de ADN DE 260 pb que es conservado en el humano y que actúa como un promotor que cuenta con una caja TATA y diferentes sitios de ligación para distintos factores de transcripción (Alves, 2018).

Así también, algunos estudios funcionales de este segmento de ADN demostraron su capacidad para dirigir la transcripción tanto *in vitro* como *in vivo*, confirmando que se trata del promotor proximal del gen *Mstn* (Grade et al., 2009). Se demostró que además de contener el promotor, el fragmento estudiado presenta una región que actúa como potenciador, ya que ensayos de electroporación de embriones de pollo revelaron su actividad en las somitas, pero no en el tubo neural (Grade et al., 2009). Por este motivo, este fragmento se denominó P/E (promotor/ potenciador). Los factores de transcripción conservados, algunos no sólo entre amniotas, sino también en anfibios y en el gen *mstn b* de peces teleósteos, indica que existe un gran repertorio ancestral de factores de transcripción asociados en la regulación del gen *Mstn* (Mantovani, 2015).

2.4 Edición molecular del gen de Miostatina

En consideración de su papel fundamental en el dominio del crecimiento muscular, el gen de la Miostatina representa un locus potencial para el mejoramiento genético de los animales de crianza, debido a que realiza la misma función biológica. Tal aplicación potencial en la producción de animales ha llevado a su secuenciamiento génico en varias especies de mamíferos y aves, así como en peces (McPherron y Lee, 1997; Cheng, 2003).

Recientemente, la secuencia del gen de Miostatina y su comportamiento de expresión se han descrito en muchas especies de peces que destacan comercialmente (Maccatrazzo et al., 2001). Existe gran similitud entre las secuencias nucleotídicas de miostatina en animales vertebrados y más aún si pertenecen una misma familia (Ferragut, 2003). El alto nivel de conservación de la secuencia de la Miostatina indica que la relación entre su estructura y función está muy conservada entre los vertebrados (Gabillard et al., 2013).

La literatura científica ha documentado el aislamiento y la caracterización de clones de ADN de Miostatina obtenidos a partir del músculo esquelético de peces de importancia comercial como: tilapia (*Oreochromis mossambicus*), pez basa (*Morone chrysops*) (Rodgers, 2001), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Ostbye et al. 2001), la trucha (*Onchorynchus mykiss*) (Rescan et al., 2001), la carpa común (*Cyprinus carpio L.*) (Sun, Yu, & Tong, 2012) y el Paco (*Piaractus mesopotamicus*) (Gutiérrez de Paula et al., 2014), . Así mismo, se ha llevado a cabo el estudio del gen de Miostatina en especies marinas de importancia comercial, como el lenguado (*Paralichthys adspersus*) (Delgado et al., 2008). Además, se ha investigado este gen en peces modelo de laboratorio, tales como el Medaka (*Oryzias latipes*) (Sawatari et al., 2010) y el pez Cebra (*Danio rerio*) (Xu et al., 2003; Cheng et al., 2003; Acosta et al., 2005).

El sistema CRISPR/Cas9 derivado de la bacteria *Streptococcus pyogenes* se ha convertido en una herramienta revolucionaria para la edición específica del genoma, lo que permite controlar de manera precisa la expresión génica (Haselkorn et al., 2018). Dentro de los últimos reportes, se ha implementado el knockout del gen de Miostatina usando Sistema Crispr Cas9, en *Pagrus major* (Pargo japonés) , en *Paralichthys olivaceus* (Fletán japonés), así mismo en *Channa maculata* (pez cabeza de serpiente manchada) (Ou et al., 2023) logrando mutantes mejorados en cuanto al incremento de musculatura (Ohama et al., 2020; Ou et al, 2023).

2.5 Sobe la especie ictícola Paco (*Piaractus brachypomus*, Cuvier 1818)

El Paco (*Piaractus brachypomus*, Cuvier, 1818) comúnmente conocido como “Paco” en el Perú, es un pez dulceacuícola perteneciente a la familia Caracidae, que tiene como hábitat a la cuenca del Amazonas y del Orinoco, por lo que se le conoce también con los nombres: “cachama blanca” en Venezuela y Colombia, o “pacú blanco” en Bolivia y en Brasil como “Caranha”, “pacu” y “pirapitinga” (Tafur, 2009). Esta especie nativa de la amazonia peruana, presenta hábitos alimenticios omnívoros con tendencia a lo frugívoro, por preferir frutas y semillas, pero que se adapta muy bien al alimento artificial (Guerra, 1996).

A los tres años de vida, logra la madurez sexual, etapa en la que cuenta con un peso que oscila de 2.5 a 3.0 kg, por ello. es una especie que aporta gran participación en la pesca, actividad comercial de la localidad. Debido a estas consideraciones, la cría en cautiverio de esta especie se ha venido desarrollando en la región del Amazonas desde la década del 50, con el propósito de satisfacer la demanda humana, ya sea en estado fresco o como pescado seco y salado. En cuanto a su reproducción, este pez presenta un comportamiento migratorio, con la

época de desove coincidiendo con la temporada de mayores precipitaciones pluviales, que se extiende de diciembre a abril (Tafur, 2009).

En la web FISHBASE (Froese & Pauly, 2021), se resalta que es una especie dulceacuícola y que alcanza una talla promedio de 88 cm, teniendo como indicadores óptimos el pH medianamente ácido en un intervalo de 4.8 a 6.8; de igual manera la temperatura debe mantenerse de 23 a 28° C.

El paco comparte el nicho ecológico con la Gamitana (*Colossoma macropomum*), presentando similitudes en la forma, aunque difiere en su patrón de coloración, siendo gris oscuro en el dorso y los lados con tonalidad anaranjada. Son estas dos especies las más importantes y cultivadas en la zona amazónica del país. Es por eso que en los últimos años se realizan trabajos de hibridación del Paco con la Gamitana obteniéndose la Pacotana y Gamipaco, que con cruces para buscar el aprovechamiento de las características de crecimiento de ambas especies (Ruiz, 2012).

P. brachypomus se diferencia de *P. orinoquensis* y *P. mesopotamicus* por poseer fila de 31 a 37 escamas sobre la línea lateral (23-30 y 50-60, respectivamente) y por tener fila de 33 a 37 escamas debajo de la línea lateral (22-32 y 49-56, respectivamente. Además, la presencia de un número intermedio de escamas en la línea lateral también contribuye a distinguir a *Piaractus brachypomus* de otras especies relacionadas, presentando de 84-100 escamas, frente a 72-89 de *P. orinoquensis*, y 107-128 escamas de *P. mesopotamicus*. En cuanto a la fisonomía corporal *P. brachypomus* tiene un cuerpo significativamente más profundo en la mitad y en el borde anterior del pedúnculo caudal y la distancia entre el hocico y el supraoccipital más

posterior es significativamente mayor. El maxilar es significativamente más largo que en *P. orinoquensis* (Escobar et al., 2019).

La descripción anatómica del pez indica que presenta un cuerpo comprimido y ovoide, más profundo en la vertical a través del inicio de la aleta pélvica. Tanto el origen predorsal como el postdorsal tienen igual longitud. El perfil dorsal de la cabeza es convexo desde la boca hasta la vertical a través de la porción anterior del ojo, sutilmente cóncavo desde el último punto hasta la base del proceso supraoccipital y convexo desde ese punto al origen de la aleta dorsal. El perfil dorsal del cuerpo es empinado desde el hocico hasta el origen de la aleta dorsal y tiene una ligera pendiente posteroventral después de este punto. La base de la aleta dorsal es convexa. El perfil corporal es casi recto desde la inserción de la aleta dorsal hasta el origen de la aleta adiposa. La base de la aleta adiposa es convexa. La cabeza es robusta, con el margen posterior rodeado por una amplia membrana opercular que cubre hasta la tercera escama horizontal en el punto de mayor longitud de la cabeza (Escobar et al., 2019).

Respecto a su coloración, el pez Paco tiene el cuerpo en general de plateado a gris oscuro, con región dorsal más oscuro. Cerca de la posición de las aletas, ventral, caudal y anal, presenta una coloración, anaranjada-amarillenta. (Escobar et al., 2019).

El paco es considerado como una especie rústica ya que se adapta fácilmente al cultivo en pozas o estanques con otras especies, donde por lo general la técnica de inducción de la reproducción y el mantenimiento de los estadios primarios de la especie, es conocida y fácil de adaptarse a los distintos ambientes en los que se realice el cultivo (Ruiz, 2012).

En cuanto al consumo en el país es limitado a la región amazónica, aunque recientemente ha sido introducida en Lima y otras ciudades del país. El cultivo de esta especie está localizado en la zona selvática de la Región.

Según el Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA., 2020), el producto del cultivo de *P. brachypomus* en las diferentes localidades de nuestro país, fue 1 871 (TM), cantidad menor a la obtenida un año antes. Con la Cantidad mencionada, el pez Paco ocupa un 1.2 % de las especies dulceacuícolas cosechadas dentro del país.

III. MÉTODO

3.1 Tipo de investigación

La investigación descrita se enmarca dentro de un enfoque exploratorio, cualitativo, descriptiva e hipotético-deductivo. Es de carácter exploratorio, ya que pretende obtener información específica sobre la especie objeto de estudio. Se considera cualitativa porque se centra en la caracterización del gen de la Miostatina, atendiendo a la naturaleza descriptiva de los datos que se buscan. Asimismo, adquiere un componente descriptivo, dado que implica la el análisis de la secuencia nucleotídica del promotor del gen de la Miostatina en el pez Paco (*Piaractus brachypomus*). Finalmente, se inscribe dentro del enfoque hipotético-deductivo, en tanto que plantea hipótesis que se pondrán a prueba mediante la observación objetiva y la experimentación, con el fin de obtener conclusiones verificables.

3.2 Ámbito temporal y espacial

3.2.1 Ámbito temporal

Se estudió la secuencia del promotor del gen de Miostatina en el pez Paco (*Piaractus brachypomus*) durante el intervalo de enero a abril del 2023.

3.2.2 Ámbito espacial

Se observó y evaluó el secuenciamiento del promotor del gen de la Miostatina en el pez Paco (*Piaractus brachypomus*), haciendo uso del Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Escuela Profesional de Biología en la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

3.3 Variables

3.3.1 Variable independiente

Variabilidad en el material genético de la secuencia nucleotídica del promotor del gen de Miostatina en la población de peces Paco (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la comunidad Santo Tomás en el distrito de Yurimaguas de la provincia Alto Amazonas del departamento de Loreto (Latitud: -6.00; Longitud: -76.26; Altura: 173 msnm).

3.3.2 Variable dependiente

Secuencias de nucleótidos, del promotor del gen de Miostatina del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la zona de Alto Amazonas- Loreto.

3.4 Población y muestra

3.4.1 Población

Se evaluó a partir de cuatro muestras de tejido de las aletas caudales de especímenes en estadio adulto del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la provincia Alto Amazonas de la región Loreto.

3.4.2 Muestra

Dos individuos en estadio adulto del pez Paco (*Piaractus brachypomus*). Una de la variedad Silvestre y otra de la variedad Albina.

3.5 Instrumentos

Los instrumentos utilizados en el presente estudio fueron de tipo metodológicos, como lo son la PCR realizada a las muestras de ADN extraídas, así como también el secuenciamiento del gen de la miostatina.

3.5.1 *Materiales de Bioseguridad*

- Mandil de laboratorio o guardapolvo.
- Guantes quirúrgicos talla M , de la marca R&G.
- Mascarilla quirúrgica 3 pliegues, de la marca R&G.
- Cofia o malla para el cabello, de la marca R&G.

3.5.2 *Material Biológico*

Especímenes adultos del pez Paco (*Piaractus brachypomus*).

3.5.3 *Materiales de laboratorio*

- Tubo para centrifugación o de fondo cónico, capacidad de 50 ml.
- Bisturí estéril N° 23 marca Surgical Blades.
- Tubo eppendorf de capacidad: 2.0 ml, 1.5 ml, 0.2 ml.

3.5.4 *Reactivos*

- Kit de extraction de ADN: Kid gSYNC DNA – extraction KIT- GENEaid.
- Agua de grado molecular en la marca BioRad de 500ml.
- Etanol absoluto alisado Merck.
- Agarosa – en la marca Cleaver Scientific CSL- AG 500.
- Red Safe TM Nucleic Acid Staining.
- Marcador Generuler DNA Ladder (100pb).
- Marcador Lambda HIND III – Thermo Scientific™
- Agente intercalante ECO-READY to use (2 000x)
- Buffer carga – Blue Juice Gel Loading (10x).
- 2Xpcr (i-STARMAX GH) – Master Mix – Intron

3.5.5 *Equipos*

- Agitador Vortex Mixer - WIZARD. Velp Scientific
- Centrifuga refrigerada Eppendorf
- Incubadora
- Termociclador punto final (Marca SimpliAmp. Life technologies)
- Campana de Flujo Laminar
- Cámara de electroforesis horizontal

3.6 Procedimientos

3.6.1 *Diseño de Primers*

El diseño de primers se realizó utilizando la secuencia del promotor del gen de Miostatina de la tilapia (*Oreochromis niloticus*), que fue descargada de la plataforma virtual GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la identificación de codificación KT987208.1. El proceso de diseño se realizó en el software virtual Primer3 Plus, según el método descrito por Untergasser et al. en 2012

Los primers del presente estudio, obtenidos bajo las condiciones y tamaño deseados, se encuentran descritos en la tabla 1, consiguiendo así primers con una temperatura de anillamiento no muy diferente entre los pares de primers.

Tabla 1

*Primers obtenidos y utilizados para cada PCR en muestras de *Piaractus brachypomus*.*

Primer	Forward (5'-3')	Long. pb	TM	%GC	Tamaño (pb)
Promotor (Forward)	TATCCCGTCAAGCACATGCC	20	60.46	52.63	359
Promotor (Reverse)	AGAAACTACTGGACCCAACGC	20	49.68	55	

3.6.2 Técnica de recolección de datos

Se obtuvieron de forma aleatoria, individuos del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) procedentes de la provincia Alto Amazonas de la región Loreto.

3.6.3 Toma de muestra de tejido.

Se separó las muestras del tejido del pez, haciendo uso de una hoja de bisturí estéril y se colocó dichas muestras tubos de 2ml que contenía en su interior, agua libre de nucleasas.

3.6.4 Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid.

Para la extracción de ADN de las muestras, se empleó el Kit de extracción GENEaid, y se siguieron las siguientes etapas:

1. Se utilizó 100 ul de la muestra (que fue previamente homogenizada en un tubo de 1,5 ml con 200 ul de buffer GT y 20 ul Proteinasa K). Posteriormente, se realizó la agitación del tubo usando el vortex, y se colocó el mismo en incubación a 60 °C durante un tiempo de 40 minutos, asimismo se consideró una agitación continua de 80 RPM (Este paso se repitió de forma simultánea en las 4 muestras).

2. Finalizando la incubación se adicionó 200ul de buffer GTB y se incubó nuevamente, pero esta vez a un tiempo de 20 minutos y a una temperatura de 60°C, manteniendo agitación continua de 80 rpm. Una vez finalizada la segunda incubación, se agregó 5 ul de Solución Rnase A (10mg/ml) y se agitó rápidamente por 10 segundos y se incubó una tercera vez, a temperatura ambiente durante un tiempo de 5 minutos.

3. Al finalizar la tercera incubación, se añadió 200 ul de etanol absoluto alisado y se agitó por un tiempo de 10 segundos. La mezcla obtenida fue colocada en la columna GS

evitando agregar los precipitados. Luego, se centrifugó por 1 minuto a 14 000 RPM y se descartó el tubo colector.

4. Se cambió a un nuevo tubo colector y se agregó 400 ul de buffer W1 para llevar a centrifugación por 30 segundos a 14 000 RPM. Se reemplazó nuevamente el tubo colector, y se adicionó 600 ul de buffer de lavado llevando a centrifugación nuevamente bajo las mismas condiciones. Para finalizar este paso, y obtener el secado de la columna GS, se reemplazó nuevamente el tubo colector y centrifugó durante 3 minutos a 14000 RPM.

5. Por último, la columna fue colocada en el tubo definitivo de capacidad 1,5 ml y el ADN obtenido, fue diluido usando 60 ul de buffer de elución precalentado a 60 °C, para ello se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos.

3.6.5 Descripción de la calidad y determinación de la concentración de ADN

Con el ADN extraído, se realizó la evaluación de la calidad de manera cualitativa empleando de un gel de agarosa de la marca Cleaver Scientific CSL-AG500 (1%), para ello se tomó 1 ul del ADN y se agregó 2 ul de buffer carga (Blue Juice Gel Loading 3X). Para la tinción se utilizó como agente, 10ul de RedSafe™ Nucleid Acid Staining. Para la referencia se tomó al marcador ThermoScientific™ Lambda DNA/HindIII Marker. Las muestras obtenidas fueron procesadas en una electroforesis a 90 voltios por un tiempo de 60 minutos, para luego hacer el revelado del gel a través de un fotodocumentador y donde determinó la integridad del ADN.

3.6.6 Amplificación mediante PCR

Para realizar la amplificación del promotor del gen de Miostatina mediante la técnica PCR (Reacción de Cadena de la Polimerasa) se empleó los primers o cebadores, diseñados con el software Primer 3 (ver Tabla 1). Asimismo, se describió los reactivos usados en el Marter

Mix para la amplificación, así como también las condiciones de ciclado para las muestras en estudio (ver Tabla 2).

Tabla 2

Preparación del máster mix para la Amplificación del promotor del gen de Miostatina en Piaractus brachypomus.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen x Muestra
2x PCR (i-STARMAX GH)	2X	1X	5 μ l
Master Mix – iNTRON			
Agua PCR	-	-	2 μ l
Primer F	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
Primer R	10 μ M	0.5 μ M	1 μ l
ADN			1 μ l
Volumen Final			10 μ l

3.6.7 Evaluación del amplicón

Una vez obtenido el resultado de PCR, este fue evaluado a través de electroforesis en un gel de agarosa Cleaver Scientific CSL-AG 500 (2%) utilizando 2 μ l del amplificado y 2 μ l de buffer carga (Blue Juice Gel Loading 3X), además se utilizó 10ul del Agente intercalante Eco-Ready to use (20000x), y se usó como referente al marcador Generuler DNA Ladder de 100 pb.

3.6.8 Servicio de Secuenciamiento

Las muestras puras obtenidas y una solución de los primers, fue enviado al exterior del país mediante una empresa nacional que brinda el servicio de secuenciamiento. Posteriormente, los resultados fueron enviados por vía correo electrónico por la empresa Macrogen para su análisis *in silico*.

3.7 Análisis de datos

A través del uso del software de QIAGEN CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5), se realizó la alineación, edición y determinación de la diversidad nucleotídica de las secuencias del promotor de Miostatina de la especie en evaluación.

3.8 Consideraciones éticas

La bioética es importante porque aplica a todas las fases y procesos de la investigación, cuyo objetivo base es generar información que mejore el bienestar de los animales que intervienen en la investigación, la calidad del estudio científico y el desarrollo del conocimiento (Hoyos, 2000; Salazar, Icaza y Alejo, 2018). Por ello, la bioética logra los principios primordiales como evitar el innecesario sufrimiento animal, asimismo se llega a reducir riesgos en la manipulación de los mismos, y fomentar la aplicación de la regla de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) (OIE, 2019). Todo lo anterior, siempre y cuando haya que recurrir a su sacrificio en condiciones confinadas. Dichas consideraciones han sido aprobadas para la experimentación con animales, de tal forma que se ocasioné el mínimo dolor durante la experimentación con peces (Manrique et al., 2018).

La frase “animales de laboratorio” refiere a cualquier animal vertebrado que son comúnmente utilizados en experimentación (como roedores, conejos, aves y primates no humanos), también animales de granja o pecuarios, animales de vida silvestre y animales acuáticos (peces, moluscos o crustáceos) que se usen en investigación científica, en enseñanza de ciencias o en pruebas o ensayos de laboratorio. En este estudio se empleó peces comerciales de importancia alimenticia, obtenidos de crianza en cautiverio (no son peces

silvestres) y que habitualmente son sacrificados diariamente para el autoconsumo o venta en las piscigranjas que son criados, acorde a la Ley 30407 (2016).

Asimismo, precisar que los experimentos con los peces usados en la presente investigación, estarán acorde con todos los procedimientos y protocolos recomendados por la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2017) y respaldada por la ASOPEBAID (Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú, 2017).

IV. RESULTADOS

4.1 Extracción y Cuantificación de la Calidad del ADN

La extracción de ADN, se realizó en las instalaciones del laboratorio de Mejoramiento Genético y Reproducción Animal, de dos ejemplares del pez Paco (*Piaractus brachypomus*). Usando las condiciones de amplificación por PCR que se encuentran referenciadas en la Tabla 3.

Tabla 3

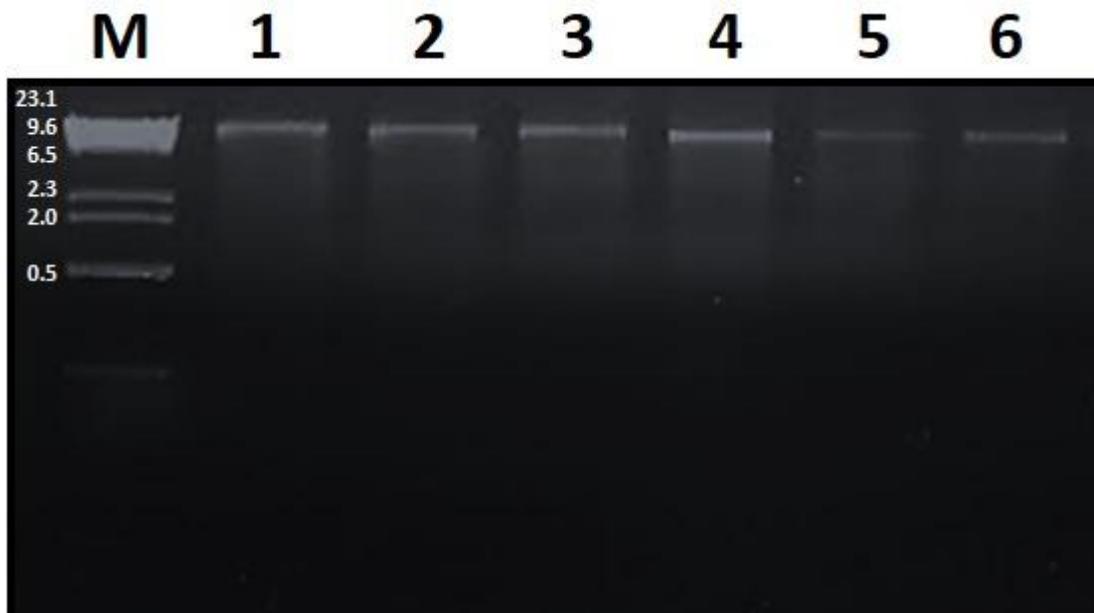
Condiciones del ciclado-PCR Convencional.

Paso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Denaturacion Inicial	2.5 min.	95°C	1
Denaturacion	15 seg.	94°C	40
Alineamiento	35 seg.	62.2	40
Extensión	20 seg.	72°C	40
Extensión final	10 min	72°C	1
Conservación	∞	4°C	1

Para el análisis cualitativo de la calidad de ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se utilizó un marcador de peso molecular denominado *fago Lambda DNA/HindIII* que reconoce fragmentos de ADN que se caracterizan por un tamaño de 564 a 23,130 bp; de tal forma se evidenció ADN genómico, como se logra observar en la Figura 1.

Figura 1

Corrida en gel de electroforesis al 1% sobre el valor de 23 130 bp.



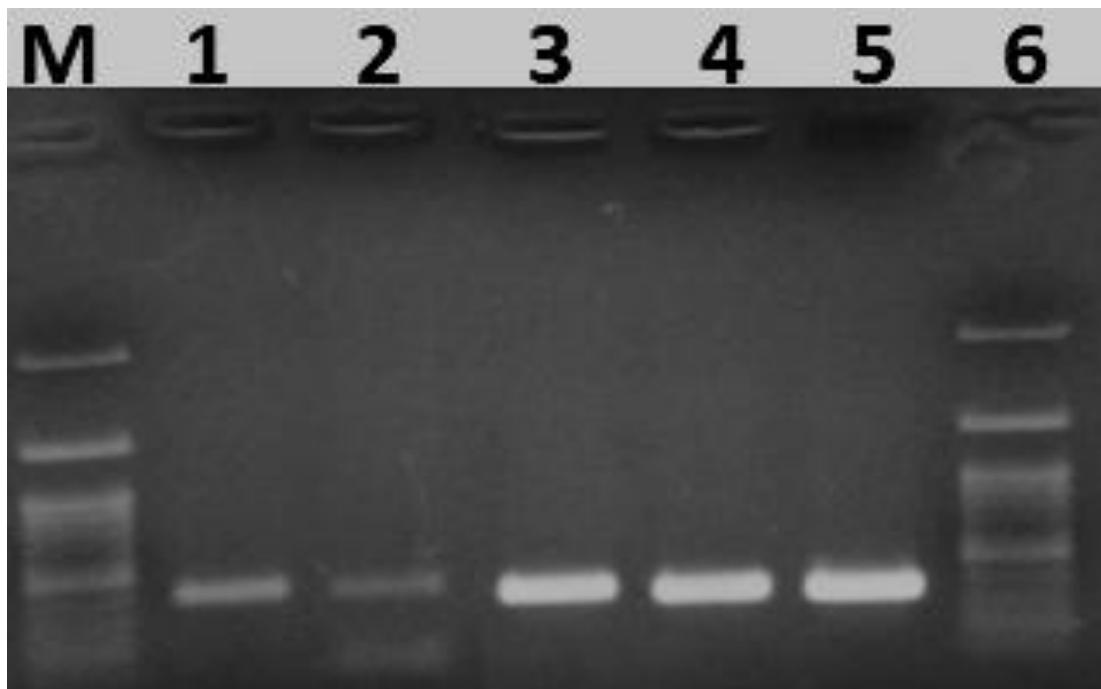
Nota. Se logra la visualización de una banda próxima a la banda de 23 130 bp que corresponde al ADN genómico purificado. (M = Marcador Molecular).

4.2 PCR punto final

Después de evaluar la calidad del ADN de las muestras, se procedió con la amplificación del promotor del gen de la Miostatina, a través de un procedimiento de PCR convencional, utilizando el set de primers definidos en la tabla 1 y las condiciones del ciclado consideradas en la tabla 2. Se observó la amplificación de un fragmento de ADN, cuyo tamaño se calcula de 359 bp, tanto para la muestra del pez Paco y la muestra de Tilapia (control positivo), para el promotor del gen de la Miostatina (véase Figura 2).

Figura 2

Gel de electroforesis al 2% que evidencia al amplicón de aproximadamente 350 bp.



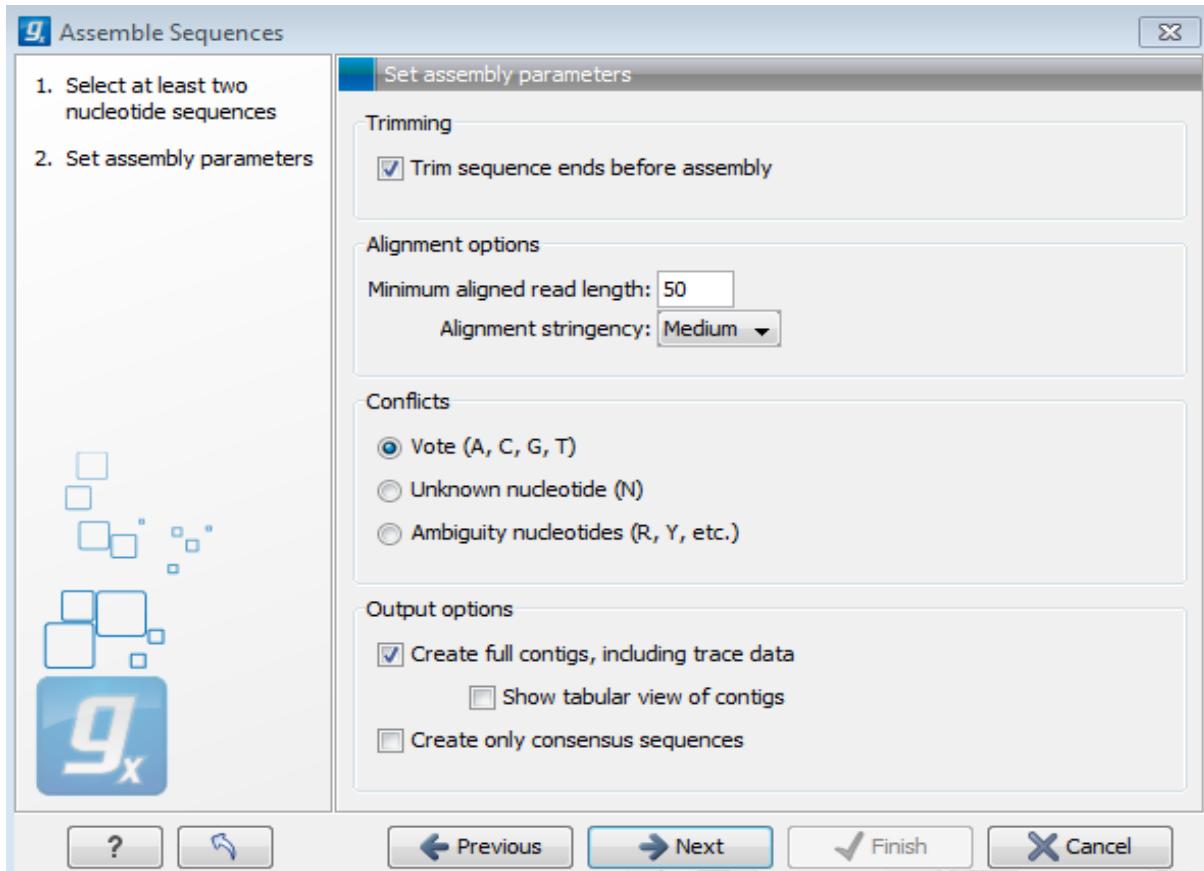
Nota. Obsérvese un amplicón de aproximadamente 350 bp, correspondiente al promotor de la Miostatina: Carril 1 = Pez Paco variedad silvestre, Carril 2 = Pez Paco variedad albina, Carril 3, 4 y 5 = Tilapias (Control Positivo) y M = Marcador Molecular de 100 bp.

4.3 Análisis del Secuenciamiento Sanger

Se procedió al montaje o ensamblado de las secuencias, usando el programa CLC Genomics Workbench v3.6.5 en <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/> (Ver Figura 3).

Figura 3

Configuración de los parámetros para el ensamblado.



Nota. Control de calidad del secuenciamiento con FastQC obtenido por la plataforma Illumina Análisis con FastQC.

<https://sites.google.com/site/b22aggoabms1516/home/analisis-de-la-calidad-de-la-secuenciacion-de-un-archivo-de-secuencias-fastq-obtenido-con-la-plataforma-illumina>

Después de definirse los parámetros se realizó el trimado (*eliminación de regiones de baja calidad*) de los extremos antes del ensamblaje. Luego, se procede al sobreapamiento mínimo de 50 nucleótidos de longitud entre los segmentos Forward y Reverse de cada muestra.

En el ensamblaje se visualizan anotaciones marcadas como conflictos (“Conflict”). Las que hacen denotación a cambios de una base nitrogenada entre las lecturas y la secuencia de referencia (ver Figura 4).

Figura 4

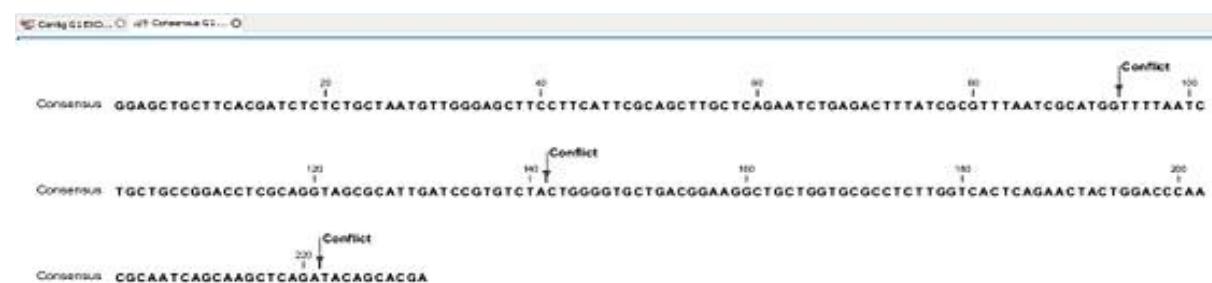
Identificación y corrección de conflictos de las bases en las lecturas pareadas.



Continuamente, se realizó la corrección de los conflictos detectados, para identificar la base específica en la secuencia Consenso (Consensus) y así mejorar el análisis del ensamblado con la referencia. Posterior al ensamblaje de las secuencias, se procede a verificar los conflictos (diferencias encontradas entre las lecturas Forward y Reverse) encontrados en la secuencia consenso. Estos conflictos se deben a las diferencias de bases o entre una base y un gap en el sobrelape de las lecturas. Estos conflictos se corrigen mediante la verificación de los picos y la calidad de los mismos en las lecturas de Forward y Reverse, a fin de obtener la base nucleotídica correcta (Figura 5).

Figura 5

Obtención de secuencias consenso.



Luego de la resolución de los sitios de conflictos, se identificaron las siguientes secuencias de consenso para la región promotora de la Miostatina de:

Paco variedad Silvestre (351 pb):

5'-ACTTCTGGACCCAACGCCATCAGCAAGCTCAGATACAGCACGATTGAGA CAGATGCATTGTCTCTAGGTGTGAAGTGTGGTTAAAAATACGTTTGTAA AAAAAAAAATCCTTGCACGTGTGCGGAGCTGATGCGCGACTGAACGGGG TTGGATTAATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTATTAGCGCGCACCTT TTTATACTCCAACTTAGCCTCTTGTGTCGTCAAAATCTATGATTGGCTGG ACAGGCAACAATGAATTAAACCGACTGACATGAAAACTTTTTCGCTGT CAACCCATAAGGAACGGAGGTTGTGGGCATGTGCTTGACGG-3'

Paco variedad albina (345 pb):

5'-AGAAACTACTGGACCCAACGCAATCAGCAAGCTCAGATACAGCACGATCTG AGACAGATGCATTGTCTCTAGGTGTGAAGTGTGGTTAAAAATACGTTTGT TTTAAAAAAAATCCTTGCACGTGTGCGGAGCTGATGCGCGACTGAACGGGG TTGGATTAATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTATTAGCGCGCACCTT TTTATACTCCAACTTAGCCTCTTGTGTCGTCAAAATCTATGATTGGCTGG ACAGGCAACAATGAATTAAACCGACTGACATGAAAACTTTTTCGCTGT CAACCCATAAGGAACGGAGGCTGTGGGCATGT-3'

Ya con las secuencias consenso, se realizó el análisis de similitud (Altschul et al., 1997; <http://ncbi.nlm.nih.govblast/>), usando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y empleando secuencias ya expresadas en la base informativa del NCBI (National Center for Biotechnology Information) en el sitio web. A fin de obtener la información de las secuencias ensambladas (Figura 6).

Figura 6

Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas en el NCBI.

The screenshot shows the NCBI BLAST search interface. The top navigation bar includes tabs for blastn, blastp, blastx, tblastn, and tblastx. The 'blastn' tab is selected.

Enter Query Sequence

- Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s):
- Query subrange: ,
- Or, upload file: Ninguno archivo selec.
- Job Title:
- Enter a descriptive title for your BLAST search:
- Align two or more sequences

Choose Search Set

- Database: Standard databases (nr etc.) rRNA/ITS databases Genomic + transcript databases Betacoronavirus Nucleotide collection (nr/nt)
- Organism: exclude
- Exclude: Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences
- Limit to: Sequences from type material
- Entrez Query:

Program Selection

- Optimize for: Highly similar sequences (megablast) More dissimilar sequences (discontiguous megablast) Somewhat similar sequences (blastn) Choose a BLAST algorithm

BLAST Search database Nucleotide collection (nr/nt) using Megablast (Optimize for highly similar sequences) show results in a new window

Para finalizar, se alinearon las secuencias consenso en el BLASTn a fin de obtener la secuencia precisa coincidente (Figura 7).

Figura 7

Análisis de similitud de las secuencias consenso obtenidas en el BLASTn del pez Paco (*Piaractus brachypomus*).

A.

BLAST® > blastn suite > results for RID-22WPSK9C013

Home Recent Results Saved Strategies Help

◀ Edit Search Save Search Search Summary ▾

Job Title Nucleotide Sequence

RID [22WPSK9C013](#) Search expires on 03-28 18:41 pm [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID IclQuery_44915

Description None

Molecule type dna

Query Length 351

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name [+ Add organism](#)

Percent Identity E value Query Coverage

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100 [?](#)

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

select all 100 sequences selected

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED_Oreochromis niloticus myostatin (mstn).mRNA	Oreochromis niloticus	616	616	100%	1e-171	98.86%	3560	XM_003458832.5
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus myostatin gene_complete cds	Oreochromis aureus x Oreoch...	616	616	100%	1e-171	98.86%	3939	KC583258.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis niloticus MSTN gene_promoter region and partial cds	Oreochromis niloticus	611	611	100%	4e-170	98.58%	2413	FJ972683.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis niloticus myostatin (MSTN) gene_complete cds	Oreochromis niloticus	596	596	100%	1e-165	97.73%	3215	KT987208.1

B.

BLAST® > blastn suite > results for RID-22X19AGW013

Home Recent Results Saved Strategies Help

◀ Edit Search Save Search Search Summary ▾

Job Title Nucleotide Sequence

RID [22X19AGW013](#) Search expires on 03-28 18:47 pm [Download All](#) ▾

Program BLASTN [Citation](#) ▾

Database nt [See details](#) ▾

Query ID IclQuery_22851

Description None

Molecule type dna

Query Length 345

Other reports [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#) [?](#)

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name [+ Add organism](#)

Percent Identity E value Query Coverage

Filter Reset

Descriptions Graphic Summary Alignments Taxonomy

Sequences producing significant alignments

Download Select columns Show 100 [?](#)

GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer

select all 100 sequences selected

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED_Oreochromis niloticus myostatin (mstn).mRNA	Oreochromis niloticus	623	623	100%	7e-174	100.00%	3560	XM_003458832.5
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus myostatin gene_complete cds	Oreochromis aureus x Oreoch...	623	623	100%	7e-174	100.00%	3939	KC583258.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis niloticus MSTN gene_promoter region and partial cds	Oreochromis niloticus	618	618	100%	3e-172	99.71%	2413	FJ972683.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Oreochromis niloticus myostatin (MSTN) gene_complete cds	Oreochromis niloticus	603	603	100%	6e-168	98.84%	3215	KT987208.1
<input checked="" type="checkbox"/>	PREDICTED_Simochromis diagramma myostatin b (mstnb).mRNA	Simochromis diagramma	480	480	79%	2e-130	98.90%	1663	XM_040027551.1

Nota. A. Paco variedad Silvestre. B. Paco variedad albina.

Los resultados de BLAST obtenidos de las secuencias consensos del promotor no se obtuvieron resultados. Lo cual implicó que las lecturas no corresponden a ninguna especie ictícola reportada en el GenBank (2023). Es decir, en la actualidad no hay reportadas secuencias del promotor de la Miostatina del pez Paco (*Piaractus brachypomus*).

Con los resultados obtenidos sin especificar especie, se obtuvieron para el Paco Silvestre resultados de identidad de 98.86% (Per. Ident) y coberturas del 100% (Query cover) con las secuencias consenso del promotor de la Tilapia. Y para el Paco Albino los resultados de identidad fueron de 100% (Per. Ident) con una cobertura del 100% (Query cover) con las secuencias consenso del promotor de la Tilapia.

Para ambos casos, se obtuvo una alta coincidencia con secuencias descritas en el pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) para el promotor del gen de la miostatina (mstn). Por tanto, las secuencias ensambladas tienen una alta homología a la especie indicada.

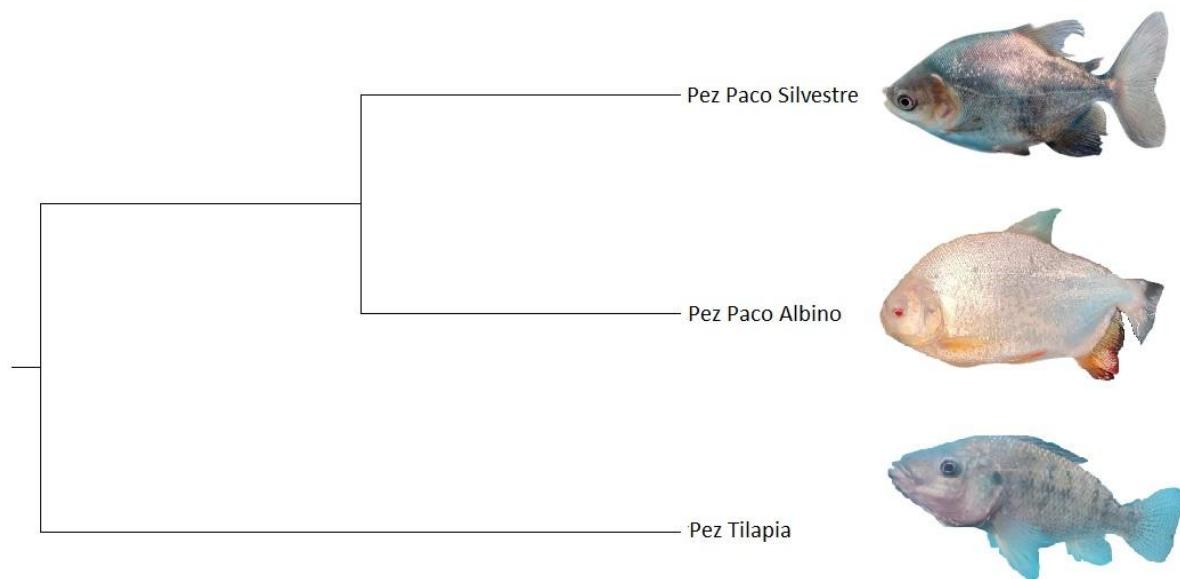
4.4 Análisis Filogenético

Con la información molecular de las tres secuencias , se alinearon las tres secuencias con el programa Clustal X (Versión 2.1) (Larkin et al., 2007). Después, se procedió con la eliminación de los “Gaps”, dando como resultado una secuencia consenso de 307 nucleótidos. A partir de ello, se confecciónó el árbol filogenético usando el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Además se compararon las secuencias nucleotídicas alineadas de la secuencia del promotor del gen de Miostatina de 307 nucleótidos de las dos ejemplares del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) con la secuencia nucleotídica de la Tilapia publicado en el Genbank (No. de acceso XM_003458832).

Asimismo, en la Figura 8, se observa el árbol filogenético resultado de la comparación de las secuencias del promotor del gen de Miostatina de las dos variedades (Silvestre y albina) del pez Paco y del pez Tilapia como grupo externo.

Figura 8

*Árbol filogenético resultante de las secuencias del promotor del gen de Miostatina de las dos variedades “Silvestre” y “Albino” del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) y del pez Tilapia (*Oerochromis niloticus*).*



Nota. La historia evolutiva de la especie se infirió utilizando el método UPGMA. El cálculo de las distancias evolutivas se realizó usando el método de Máxima Verosimilitud Compuesta (Tamura et al., 2004). Se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares). Se registró un total de 307 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar et al., 2018).

En la Figura 9, se compara las tres secuencias alineadas sin Gaps de las dos variedades del pez paco (Silvestre y Albina) con la secuencia reportada de la Tilapia. Entre las dos variedades sólo se visualiza dos nucleótidos diferentes entre las secuencias de ambas. Pero, hay 157 nucleótidos de 307 que son distintas de las secuencias de la Tilapia con respecto a la secuencias promotoras del pez Paco.

Figura 9

*Contraste de las secuencias nucleotídicas del promotor del gen de la Miostatina de las dos variedades “Silvestre” y “Albino” del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) y del pez Tilapia (*Oerochromis niloticus*). Longitud total = 307 nucleótidos.*

Silvestre	AGCAAGCTCA GTACAGCACG AT	T GAGACA GATGCATTGT	CTCTTATGTG AGTGGTTAA	AAATACGTT TGTTAAAAAA
Albino	AGCAAGCTCA GTACAGCACG AT	T GAGACA GATGCATTGT	CTCTTATGTG AGTGGTTAA	AAATACGTT TGTTAAAAAA
Tilapia	CACA GC CT C GT T C TT AT G	GG TT GAC AG GC	GA AAA AA AG TT TC AT GTC	AG T GG TTAA A AT TC AT GT TG CC A
Silvestre	AAAATCCTTT GACTGTGTGCG GAGCATGCGC	GA	CTGAACTG GGGTTGGATT	AATGTCACA CTGATAGGCA TCATAGTTA
Albino	AAAATCCTTT GACTGTGTGCG GAGCATGCGC	GA	CTGAACTG GGGTTGGATT	AATGTCACA CTGATAGGCA TCATAGTTA
Tilapia	GCC AA TC AT A	T TT G AC AC AA AG A	G C T A A G T GG AG T AA AA	GG GT CC CC C CT A ATA A AC T AT GAT G CT A
Silvestre	TTAGCGCGCA CCTTTTATA	CTCCA	ACTTTT AGCCTTTT	GTGTCGCAA AATCTATGAT TGGCTGGACA GGCAACAATG
Albino	TTAGCGCGCA CCTTTTATA	CTCCA	ACTTTT AGCCTTTT	GTGTCGCAA AATCTATGAT TGGCTGGACA GGCAACAATG
Tilapia	T CAG TG GG A	C TT A AT CCA ACCC CAG TG CA	G CTCCG ACAC AG TCAAAG GA TT TT TT TT AA ACAA AC GT	T TT TT AA AC CA CT AC AT A AG AA AT G TC TC TT
Silvestre	AATTTAACC GACTGACATG AAAACTTTT	TTTCGCTGTC	AACCCATAAG GAAGGGAGG	T GTGGGCA
Albino	AATTTAACC GACTGACATG AAAACTTTT	TTTCGCTGTC	AACCCATAAG GAAGGGAGG	T GTGGGCA
Tilapia	A TTT AA AC CA CT AC AT A	AG AG ACA AT G	CA T CTG T TC A G AT GG CT GA AT GAGC TT G TC ATT	

*Nota. Sombreado de color verde son los nucleótidos diferentes entre las dos variedades del pez Paco (*Piaractus brachypomus*). Y el sombreado de color fucsia son los nucleótidos diferentes de las secuencias del pez Paco con el pez Tilapia (*Oerochromis niloticus*).*

V. DISCUSIÓN

Dentro del análisis cualitativo de la calidad de ADN extraído a través de un gel de agarosa, se evidencia ADN de alto peso molecular, ello puede corroborarse con la presencia de una banda por encima de los 20 000 bp. Este análisis fue fundamental para detectar la no presencia de “*smear o chorreo*” que representa ADN degradado y que involucra una dificultad para el proceso de PCR (Figura 1).

Para el diseño de primers referenciados en la Tabla 1, se dispone el uso de la temperatura de anillamiento o hibridación 5 °C menor a la temperatura de fusión más baja del par de primers utilizados, lo que se logró usando el programa virtual de ThermoFisher Scientific, T_m Calculator (En: <https://www.thermofisher.com>), donde se tomó especificaciones dependiendo del kit de amplificación y los μM de primer agregados en las condiciones del ciclado de PCR (Innis y Geldand, 1990). En este paso se utilizó como referencia la secuencia del gene de Miostatina ya reportada en el Genbank (Conte et al., 2017). Cabe resaltar que en estudios similares realizados con muestras de mamíferos (búfalos), se realiza una estandarización de la temperatura de fusión, a fin de favorecer la amplificación correcta de exones de miostatina (Reyes, 2014), siendo esta etapa del estudio, crucial para la correcta amplificación en la PCR.

La amplificación por PCR de cada fragmento del promotor del gen de la Miostatina, mostraron amplicones con alta homología, de aproximadamente 351 pb para la variedad Silvestre y de 345 pb para la variedad Albina (Figura 2). No obstante, para confirmar que eran las secuencias de interés, se continuó con la secuenciación Sanger. Con esta etapa se logró

obtener la secuencia completa de cada uno de los amplicones resultantes, con el set de primers analizados en el presente estudio.

Una vez obtenidas las secuencias consenso del promotor del gen de Miostatina para ambas variedades del pez Paco. Se procedió a utilizar diferentes programas ya descritos en los resultados para el proceso de análisis de similitud de la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Luego el secuenciamiento del promotor del gen, se realizó un blaseo de la secuencia obtenida en el NCBI (Altschul et al., 1997). No se obtuvo resultados. Ante ello, para finalizar se empleó un alineamiento de las secuencias consenso en el BLASTn a fin de obtener la secuencia específica. Coinciendo con la secuencia reportada (*Código Genbank: XM_003458832, Anexo 2*) de miostatina del pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y guardando una alta homología del 98.86% de la secuencia obtenida con la especie indicada (Figura 7).

Del mismo modo, del análisis filogenético se encontró más similitud entre las secuencias nucleotídicas del promotor del gen de Miostatina entre las dos variedades del pez Paco (*Piaractus brachypomus*) con cerca de 99.35%. Que con respecto a la secuencia de la Tilapia que fue alrededor del 48.86% de similitud (Figura 9).

Por otro lado, actualmente las estrategias de edición génica efectiva de un gen buscan que la secuencia de ARN guía del sistema Crispr Cas tenga como “secuencia blanco” una zona cercana al promotor del gen cuya expresión se desea regular. Para crear este tipo de escenario, se recomienda que el ARN guía sea diseñado para sitios blancos ubicados lo más cerca posible del extremo N-terminal de la proteína que se modificará (Lo más cerca al promotor). De esta

manera, se asegura la disfunción total del gen blanco (Bortesi y Fischer, 2015; Cong *et al.*, 2013). Este hecho tiene especial aplicación para generar el “knock-out” de un gen disrupiendo la secuencia de su promotor (Jacobs *et al.*, 2015). En la Figura 4 se visualiza este aporte aplicable para la edición génica a futuro del gen de Miostatina en el pez Paco en el Perú.

VI. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo de investigación se logró identificar y secuenciar con intervención de los primers diseñados de la especie ictícola Tilapia reportada en el Genban (No. de acceso XM_003458832), a la región promotora del gen de miostatina de dos variedades (Silvestre y Albina) del pez Paco (*Piaractus brachypomus*; Cuvier, 1818).
- Se confirmó que el diseño de primers empleados para parte de la región promotora son específicos para las dos variedades de Paco. Por ende, al observarse el perfil electroforético de productos amplificados en el gel de agarosa, se distingue una sola banda nítida sin presentar “smearing o chorreo”. Asimismo, tampoco se observa dímeros u otros productos que puedan crear la suspicacia de que no son específicos para la región promotora diseñada.
- Se obtuvieron ampliaciones muy semejantes de 351 pb para la variedad Silvestre y de 345 pb para la variedad Albina del pez Paco. Y cuyas secuencias fueron:

Paco variedad Silvestre (351 pb):

5'-ACTTCTGGACCAACGCCATCAGCAAGCTCAGATACAGCACGATTGAGA
CAGATGCATTGTCTCTTAGGTGTGAAGTGTGGTTAAAAATACGTTTGTAA
AAAATCCTTGCACTGTGCGAGCTGATGCGCGACTGAACCTGGGTTGGATT
GTCCCCACACTGATAGGCATCATAGTTATTAGCGCGCACCTTTATACTCCAA
TAGCCTCTTTGTGTCGTCAAAATCTATGATTGGCTGGACAGGCAACAATGAATT
AACCGACTGACATGAAAACCTTTTCGCTGTCAACCCATAAGGAACGGAGGTTGT
GGGCATGTGCTTGACGG-3'

Paco variedad albina (345 pb):

5'-AGAAACTACTGGACCAACGCAATCAGCAAGCTCAGATACAGCACGATCTG
AGACAGATGCATTGTCTCTTAGGTGTGAAGTGTGGTTAAAAATACGTTTGTAA
AAAAAAATCCTTGCACTGTGCGAGCTGATGCGCGACTGAACCTGGGTTGGATT
AATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTATTAGCGCGCACCTTTATACTCCAA
CTTAGCCTCTTTGTGTCGTCAAAATCTATGATTGGCTGGACAGGCAACAATGAAT
TTAACCGACTGACATGAAAACCTTTTCGCTGTCAACCCATAAGGAACGGAGGC
TGTGGGCATGT-3'

- Lo reportado en el análisis del secuenciamiento de los amplicones, indican que el gen de miostatina presenta un alto grado de conservación, debido al porcentaje de similitud dado por el NCBI, que se estima alrededor del 98.86 al 100% en todos los secuenciamientos resultantes para el promotor. Se puede confirmar esto último, ya que no se hallaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos del secuenciamiento Sanger para las secuencias de la región promotora, con las registradas para la Tilapia en el NCBI. Lo que también indica que existe relación filogenética
- Asimismo, la secuencia consenso de 307 nucleótidos fue del 99.35% entre las dos variedades del pez Paco que con respecto a la secuencia de la Tilapia permitió identificar una similitud aproximada del 48.86%. Estos resultados, complementados con el árbol filogenético obtenido, sugieren una relación evolutiva coherente con la historia filogenética de ambas especies, aunque se recomienda realizar estudios más exhaustivos que incluyan otras especies nativas para dilucidar con mayor precisión los elementos regulatorios del gen MSTN en peces amazónicos. En conjunto, los hallazgos del presente estudio satisfacen el objetivo general y los específicos, al demostrar que es posible secuenciar y comparar la región promotora del gen de la Miostatina en *Piaractus brachypomus* mediante el uso de herramientas moleculares disponibles.
- Finalmente, la información generada constituye una base científica relevante para futuros programas de mejoramiento genético orientados a incrementar la calidad cárnica y el potencial productivo del pez Paco, consolidando su importancia como recurso estratégico en la acuicultura amazónica peruana.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda proponer y realizar análisis en la misma línea de estudio, en otras especies de peces comerciales alimenticios en el Perú, con la finalidad de poder obtener un banco de datos del gen de Miostatina. Ello, permitirá el desarrollo de programas de mejoramiento genético de líneas superiores para ganancia de peso en estas especies y de tal forma generar una mayor rentabilidad económica en la Amazonía peruana.
- Es de gran importancia tener en cuenta la diferencia en factores de transcripción, para poder maximizar la caracterización del gen de MSTN en peces nativos dulceacuícolas, de tal manera aportar en el desarrollo de inhibidores de la MSTN para la mejora genética de las cualidades alimenticias y de cultivo de dichas especies.

VIII. REFERENCIAS

Acosta, J., Carpio, Y., Borroto, I., González, O., & Estrada, M. P. (2005). Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology*, 119(4), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.023>.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 402-3389. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.

Alves, M. (2018). *Caracterização do papel de GSK-3β sobre o promotor gênico da Miostatina e seus possíveis transreguladores* [Tesis para optar el grado de magister]. Universidad Estadual de Campinas.

Ansai, S. y Kinoshita, M. (2014). Mutagénesis dirigida utilizando el sistema CRISPR/Cas en medaka. *Biología abierta*, 3 (5), 362-371. <https://doi.org/10.1242/bio.20148177>.

ASOPEBAID, Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú (2017). <https://asopebaid.org.pe/>.

Berger, C. (2020). La acuicultura y sus oportunidades para lograr el desarrollo sostenible en el Perú. *South Sustainability*, Vol 1(1). [doi: 10.21142/SS-0101-2020-003](https://doi.org/10.21142/SS-0101-2020-003)

Blast NCBI. (s. f.). Blast NCBI. Recuperado 10 de marzo de 2023, de https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome

Bono, J., Olesnický, E. & Matzkin, L. (2015). Connecting genotypes, phenotypes and fitness: harnessing the power of CRISPR/Cas9 genome editing. *Mol Ecol.* Vol 24 (15): 3810-22 pp. <https://doi.org/10.1111/mec.13252>

Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 1, pp. 41–52). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.006>

Cabanillas, E. & Córdova, A., Pineda R. (2017). La Miostatina: Regulador del crecimiento muscular y alternativa para la salud. [Artículo de Revisión]. *Rev. Fac. Med. Hum*, Vol 17(2), 75-80. [doi: 10.25176/RFMH](https://doi.org/10.25176/RFMH)

CAMBIA. (2003). Promoters used to regulate gene expression. http://www.patentmaze.cougarlaw.com/linked_files/promoters-for-gene-regulation.pdf Consultado: enero de 2022.

Cheng, X., Gang, W., Yonathan, Z. & Shao-Jun, D. (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *Journal of Experimental Biology*. Vol 206, 4067-4079. [doi: 10.1242/jeb.00635](https://doi.org/10.1242/jeb.00635)

Chisada, S., H. Okamoto, Y. Taniguchi, Y. Kimori, A. Toyoda, Y. Sakaki, S. Takeda, and Y. Yoshiura. (2011). “Myostatin-deficient medaka exhibit a double-muscling phenotype with hyperplasia and hypertrophy, which occur sequentially during post-hatch development”. *Developmental Biology*. Vol. 359: 82-94.

<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.08.027>

Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibe, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., Charlier, C. & Georges, M. (2006). A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat. Genet*, Vol 38, 813-818. <https://doi.org/10.1038/ng1810>

Clustal X. <http://www.clustal.org>

Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>

Conte, M., Gammerdinger, W., Bartie, K., Penman, D. & Kocher, T. (2017). A high quality assembly of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) genome reveals the structure of two sex determination regions. *BMC Genomics*, 2;18(1):341. DOI: [10.1186/s12864-017-3723-5](https://doi.org/10.1186/s12864-017-3723-5)

Delgado, I., Fuentes, E., Escobar, S., Navarro, C., Corbeaux, T. (2008). Temporal and spatial expression pattern of the Chilean flounder (*Paralichthys adspersus*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. Chile*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.07.003>

Del Río-Rodríguez, R. E., Navarro-Flores, J., Paredes-Trujillo, A., Mendoza-Carranza, M., Cobos-Pox, J. M., Ávila-Castillo, R. A., & Gómez-Solano, M. I. (2023). Estrategias y tendencias de la acuicultura en el camino hacia la sustentabilidad y la seguridad alimentaria. *LA DÉCADA DE LOS OCÉANOS EN MÉXICO 2021-2030: La Ciencia que Necesitamos*, 157. DOI: [10.26359/EPOMEX01202305](https://doi.org/10.26359/EPOMEX01202305)

De Santis, C. y Jerry, DR (2011). Regulación tisular diferencial de genes de miostatina en el pez teleósteo *Lates calcarifer* en respuesta al ayuno. Evidencia de diferenciación funcional. *Endocrinología molecular y celular*, 335 (2), 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.01.011>

Escobar, M., Ota, R., Machado, A., Farias, I. & Hrbek, T. (2019). A new species of *Piaractus* (Characiformes: Serrasalmidae) from the Orinoco Basin with a redescription of *Piaractus brachypomus*. *Journal of Fish Biology*. [doi: 10.1111 / jfb.13990](https://doi.org/10.1111/jfb.13990)

FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. Disponible En: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>

Fernández, C. (2004). *Comportamiento “in vitro” de alelos recombinantes del gen de la miostatina para su aplicación en producción animal* [Memoria para optar el grado de doctor]. Universidad Complutense de Madrid. En: <https://core.ac.uk/download/pdf/19709837.pdf>

Fernández, S. (2011). Papel de la Miostatina en la regulación de la hematopoyesis (Tesis de Doctorado). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/a89d/53aa62609c8ccb506b6aade7d062324a43e.pdf?fbclid=IwAR1KqneDlQcSpfRWJW1seaDNfT9RkyLCdZq7JXuIqr1NK6Lj4umozYBwGuk>

Ferragut, F. (2003). La Miostatina y el Crecimiento Muscular – Myostatin and Muscle Growth. Laboratorio de Rendimiento Humano. Departamento de Educación Física. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Froese, R. & Pauly (febrero del 2022). *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818). Fishbase. Recuperado el 20 de Marzo del 2022 de: www.fishbase.org

Flores, M. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de las especies de peces de consumo comercializados en la ciudad de Iquitos (Amazonía Peruana), 2016.* [Tesis para optar Título Profesional de Licenciado en Ecología]. Universidad Científica del Perú. <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/545>

Fuente, M. (2016). Evolución del silenciamiento génico de la Miostatina en el músculo aductor de *Nodipecten subnodosus* (Tesis de Maestría). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, México. Recuperado de https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/46/1/fuent_m.pdf?fbclid=IwAR1e3RWRPupULqrgEDg0CQ5sDEb4Z3SS4wKZrUJPm3FirLThWEg9DVvAjjE

Gabillard, J., Biga, P., Rescan, P. & Seiliez, I. (2013). Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. *General and Comparative Endocrinology*, Vol 194, 45-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012>

García, C., Sánchez, H., Flores, M., Mejia, J., Angulo, C., Castro-Ruiz, D., Estivals, G., García, A., Vargas, G., Nolorbe, C., Núñez, J., Mariac, C., Duponchelle, F. & Renno, J. (2018). Peces de consumo de la Amazonía Peruana. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Iquitos, Perú, 218 pp Revisado en: https://www.researchgate.net/profile/Fabrice-Duponchelle/publication/328538539_Peces_de_consumo_de_la_Amazonia_peruana/links/5bd8bff3a6fdcc3a8db17310/Peces-de-consumo-de-la-Amazonia-peruana.pdf

Garikipati, DK, Gahr, SA, Roalson, EH y Rodgers, BD (2007). Caracterización de los genes de miostatina-2 de trucha arcoíris (rtMSTN-2a y-2b): organización genómica, expresión diferencial y pseudogenización. *Endocrinología*, 148 (5), 2106-2115. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1299>

Genbank. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Geneaid (2020). gSYNC™ DNA Extraction Kit. Instruction Manual Ver. 02.10.17. <https://www.geneaid.com/data/files/1605679909234517178.pdf>

Grade C., Salerno M., Schubert F., Dietrich S, Alvares LE. An evolutionarily conserved Myostatin proximal promoter/enhancer confers basal levels of transcription and spatial specificity in vivo. *Development Genes and Evolution*. 2009; 219(9-10):497-508. DOI:

<https://doi.org/10.1007/s00427-009-0312-x>

Guerra, F. H., Alcántara, B. F., & Campos, B. L. (1996). Piscicultura amazónica con especies nativas. Tratado de Cooperación Amazónica. Secretaría Pro Tempore. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). United Nations Development Programmo. UNDP. IDE-Banco Mundial. *FAO. UNAMAZ. DGIS. Lima. Perú.*

Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio & Institute for Laboratory Animal Research Division on Earth and Life Studies. (2017). Front Matter. In Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio: Octava Edición (1st ed., pp. i–xiv). Ediciones UC. p. 87-99; 198-199. <https://doi.org/10.2307/j.ctt20fw832.1>

Gutierrez de Paula, T., Losi Alves de Almeida, F., Carani, F., Vechetti-Júnior, I., Padovani, C., Simões, R., Mareco, E., dos Santos, V. & Dal-Pai-Silva, M. (2014). Rearing temperature induces changes in muscle growth and gene expression in juvenile pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 169: 31-37.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.12.004>.

Hanset, R., Michaux, C., Dessy-Doize, C., Burtonboy, G. (1982). Studies on the 7th Rib Cut in Double Muscled and Conventional Cattle. Anatomical, Histological and Biochemical Aspects. In: King, J.W.B., & F. Ménissier (Eds.), *Muscle Hypertrophy of Genetic Origin and its use to Improve Beef Production. Current Topics in Veterinary*

Medicine and Animal Science, (Vol 16, pp. 341–349). Springer, Dordrecht.

https://doi.org/10.1007/978-94-009-7550-7_30

Haselkorn, R., Doudna, J., & Sternberg, S. (2018). A Crack in Creation: Gene Editing and the Unthinkable Power to Control Evolution. (Jennifer, D. & Samuel H. Sternberg) (Vol 32). <https://cutt.ly/4F0wNU3>

Hogan, B., Blessing, M., Winnier, G., Suzuki, N., & Jones, C. (1994). Growth factors in development: the role of TGF-beta related polypeptide signalling molecules in embryogenesis. *Dev. Suppl.* 53-60 pp.

<https://doi.org/10.1242/dev.1994.Supplement.53>

Hoyos, J. G. O. (2000). Principios éticos de la investigación en seres humanos y en animales. *Medicina* (Buenos Aires), 60(2), 255-258.

Innis, M. A. & Gelfand, D. H. (1990). Optimization of PCRs, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. In Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., Innis, M. A., & White, H. (Eds.), Academic Press (pp. 3–12). [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(91\)90165-5](https://doi.org/10.1016/0307-4412(91)90165-5)

Jacobs, T. B., LaFayette, P. R., Schmitz, R. J. & Parrott, W. A. Targeted genome modifications in soybean with CRISPR/Cas9. *BMC Biotechnol.* 15, 1–10 (2015).

DOI: [10.1186/s12896-015-0131-2](https://doi.org/10.1186/s12896-015-0131-2)

Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome research*, 7(9), 910-915. [doi: 10.1101/gr.7.9.910](https://doi.org/10.1101/gr.7.9.910)

Kerr, T., Roalson, EH y Rodgers, BD (2005). Análisis filogenético de la subfamilia de genes de miostatina y la expresión diferencial de un nuevo miembro en el pez

cebra. *Evolución y desarrollo*, 7 (5), 390-400. <https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2005.05044.x>

Khalil, K., Elayat, M., Khalifa, E. *et al.* Generation of *Myostatin* Gene-Edited Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) via Zygote Injection of CRISPR/Cas9 System. *Sci Rep* 7, 7301 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07223-7>

Kleeberg, F. (2019). Productividad y competitividad del sector acuícola en el Perú. *CAF Banco de Desarrollo de America Latina*, 57. <http://www.cieplan.org/wp-content/uploads/2019/09/PAPER-FERNANDO-KLEEBERG.pdf>

Kocabas, AM, Kucuktas, H., Dunham, RA y Liu, Z. (2002). Caracterización molecular y expresión diferencial del gen de la miostatina en bagre de canal (*Ictalurus punctatus*). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Estructura y expresión génica*, 1575 (1-3), 99-107. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00289-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00289-0)

Kolmann, M., Hughes, L., Hernandez, L., Arcila, D., Betancur, R., Sabaj, M., López, H. & Ortí, G. (2021). Phylogenomics of Piranhas and Pacus (Serrasalmidae) Uncovers How Dietary Convergence and Parallelism Obscure Traditional Morphological Taxonomy, *Systematic Biology*, Vol 70(3). 576–592. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa065>

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549. DOI:[10.1093/molbev/msy096](https://doi.org/10.1093/molbev/msy096)

Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGgettigan, P., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J., Gibson, T., Higgins, D.

(2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.

Ley 30407. Ley de protección y bienestar animal (2016, 8 de enero). Congreso de la República. Diario oficial del Bicentenario: El Peruano N° 574725. <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>

Maccatrazzo, L., Bargelloni, L., Cardazzo, B., Rizzo, G., Patarnello, T. (2001). A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *FEBS Letta*. Vol 509. 36–40 pp. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03124-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03124-6)

Manrique, J., Ianaconne, J & Alvariño, L. (2018). Toxic effect of lufenuron on six bioindicators of environmental quality efecto tóxico del lufenurón sobre seis bioindicadores de calidad ambiental. <https://doi.org/10.24039/rtb2018162249>

Mantovani, C. (2015). Estudio de regiones evolutivamente conservadas de factores de transcripción posiblemente envueltos en la regulación y expresión del gen de la miostatina en vertebrados. [Tesis para optar el grado de Magister]. Universidad Estadual de Campinas.

McPherron, A. C., Lawler, A., & Lee. S. (1997a). Regulation of Skeletal Muscle Mass in Mice by a New TGF-β Superfamily Member. *Nature*, 387(6628), 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>

McPherron A. C, Lawer A. M, & Lee S.J. (1997b). Double Muscling in Cattle Due to Mutations in The Myostatine Gene. *Proceedings Of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12457-12461. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.23.12457>

Mendoza, D. (2011). Informe Panorama de la acuicultura mundial, America Latina y El Caribe y en el Perú. *Dirección General de Acuicultura-MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN*. Lima. 66pp.

<https://aquadocs.org/bitstream/handle/1834/8418/informe-sobre-la-acuicultura-en-el-peru.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Mesa, M. & Botero, M. (2007). La cachama blanca (*Piaractus brachypomus*), una especie potencial para el mejoramiento genético. *Rev Col Cienc Pec.* 20(1): 79-86. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902007000100010

Ministerio de Producción (2021). *Anuario estadístico Pesquero y Acuícola 2020* [Archivo PDF]. <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/1001-anuario-estadisticoo-pesquero-y-acuicola-2020>

Mosher, DS, Quignon, P., Bustamante, CD, Sutter, NB, Mellersh, CS, Parker, HG y Ostrander, EA (2007). Una mutación en el gen de la miostatina aumenta la masa muscular y mejora el rendimiento en carreras en perros heterocigotos. *Genética PLoS*, 3 (5), e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030079>

Nadjar-Boger, E. y Funkenstein, B. (2011). Estructura del gen de la Miostatina-2 y polimorfismo del promotor y el primer intrón en el pez marino *Sparus aurata*: evidencia de duplicaciones y / o translocaciones del ADN. *BMC Genetics*, 12 (1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-22>

Ohama, M., Washio, Y., Kishimoto, K., Kinoshita, M. & Kato, K. (2020). Growth performance of myostatin knockout red sea bream *Pagrus major* juveniles produced by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, Vol 529. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735672>

OIE, (2019). Utilización de animales en la investigación y educación. Organización Mundial de Sanidad Animal.

http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/es_chapitre_1.7.8.htm#article_1.7.8

Østbye, T. K., Galloway, T. F., Nielsen, C., Gabestad, I., Bardal, T., & Andersen Ø (2001).

The two myostatin genes of Atlantic salmon (*Salmo salar*) are expressed in a variety of tissues. *European journal of biochemistry*, 268(20), 5249–5257.

<https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02456.x>

Ou, M., Wang F., Li K., Wu Y., Huang S., Luo Q., Liu H., Zhang X., Fei S., Chen K., Zhao J. (2023) Generation of myostatin gene-edited blotched snakehead (*Channa maculata*) using CRISPR/Cas9 system, *Aquaculture*, Volume 563, Part 1., 738988, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738988>.

Pan, J., Wang, W., Song, W., Chen, J., Li, C. and Zhao, Q. (2007). Molecular cloning and expression pattern of myostatin gene in yellow catfish (*Pelteobratus fulvidraco*).

DNA Sequence. Vol. 18. 279–87 pp. <https://doi.org/10.1080/10425170701243492>

Primer3Plus - Pick Primers. (s. f.). Primer 3 Plus. Recuperado 28 de febrero de 2023, de <https://www.primer3plus.com>

QIAGEN CLC Genomics Workbench | QIAGEN Digital Insights. (s. f.). Bioinformatics Software and Services (CLC Genomics Workbench). Recuperado 8 de enero de 2023, de <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>

Radaelli, G., Rowlerson, A., Mascarello, F., Patruno, M., & Funkenstein, B. (2003). Myostatin precursor is present in several tissues in teleost fish: a comparative immunolocalization study. *Cell and tissue research*, 311(2), 239–250.

<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0668-y>

Rescan, P., Jutel, I., & Rallière, C. (2001). Two myostatin genes are differentially expressed in myotomal muscles of the trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of experimental biology*, 204(Pt 20), 3523–3529. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.20.3523>.

Reyes, M., & Rojas, N. J. (2014). Secuenciación y análisis del gen de la miostatina GDF 8 en búfalos de la raza murrah y sus cruces para determinar la existencia de posibles mutaciones que se expresen en doble musculatura en el departamento de Antioquia [Tesis de Grado, Universidad de LaSalle]. Programa de Medicina Veterinaria.

https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/237

Rinaldi, G. (2022). *Associação do Polimorfismo de Microssatélites no Gene da Miostatina com Peso corporal e Medidas morfométricas de uma população sintética de pacu (Piaractus mesopotamicus)*. [Tesis para optar el grado de magister en acuicultura]. Universidade Estadual Paulista (Unesp). <http://hdl.handle.net/11449/234775>

Rodgers, B. D., Weber, G. M., Sullivan, C. V., & Levine, M. A. (2001). Isolation and characterization of myostatin complementary deoxyribonucleic acid clones from two commercially important fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. *Endocrinology*, 142(4), 1412–1418.

<https://doi.org/10.1210/endo.142.4.8097>

Rodgers, B., Roalson, E., Weber, G., Roberts, S. & Goetz, F. (2007). A proposed nomenclature consensus for the myostatin gene family. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. Vol. 292: E371–2. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00395.2006>

Ruiz, L. (2012). Estado de la acuicultura en el Perú. *Revista AquatIC*. N° 37: pp. 99-106.

<http://www.revistaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/149/138>

Sawatari, E., Ryoko, S., Tomoko, A., Hisashi, H., Susumu, U., Yuko, W., Takahiro, N., & Masato, K. (2010). Overexpression of the Dominant-Negative Form of Myostatin Results in Doubling of Muscle-Fiber Number in Transgenic Medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 155(2), 89 - 183. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.10.030>

Salazar, M., Icaza, M., y Alejo, O. (2018). La importancia de la ética en investigación. Rev. Universidad de Sociedad, 10(1), 305-311. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2218-36202018000100305

Secuencia de miostatina (mstn) de Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Recuperado 02 de marzo de 2023, de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003458832

SERNAPESCA. (2020). Anuario Estadístico de Pesca y Acuicultura 2019. <https://ogejee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oee-documentos-publicaciones/publicaciones-anales/item/949-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2019>

Sun, Y.; Yu, X. & Tong, J. (2012). Polymorphisms in myostatin gene and associations with growth traits in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). International Journal of Molecular Sciences 13: 14956-14961. <https://doi.org/10.3390/ijms131114956>

Tafur, J. et all. (2009). PACO *Piaractus brachypomus* Y GAMITANA *Colossoma macropomum* criados en policultivo con el bujurqui-tucunaré, *Chaetobranchus semifasciatus* (CICHLIDAE). *Folia Amazónica*. Vol. 18 (1-2): 97 – 104 pp. <https://doi.org/10.24841/fa.v18i1-2.336>

Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (USA) 101:11030-11035.

Torres, J. (2013). *Caracterización y expresión del gen de Miostatina de pargo flamenco (*Lutjanus guttatus*) durante el desarrollo embrionario, larvario y juvenil* (Tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, México. https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/154/1/Torres%20Velarde%20Julia%20Mar%C3%ADa.pdf?fbclid=IwAR2lbt9sJzxyV2_pGHV7QpM_XsJR_GIJtUULWtC3x4bG2dXk7jztcK5qJnTk

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic acids research*, 40(15), 115. <https://www.primer3plus.com>. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Tm Calculator. (s. f.). Tm Calculator - Thermo Fisher. Recuperado 1 de marzo de 2022, de <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>

Xu, Ch., Wu, G., Zohar, Y., & Jun Du, Sh. (2003). Analysis of Myostatin Gene Structure, Expression and Function in Zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 206 (22), 79 – 4067. <https://doi.org/10.1242/jeb.00635>

Xu, L., Zhao, P., Mariano, A., & Han. R. (2013). Targeted Myostatin Gene Editing in Multiple Mammalian Species Directed by a Single Pair of TALE Nucleases. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 2,112. <https://doi.org/10.1038/mtna.2013.39>

Xu, X., Scott-Scheiern, T., Kempker, L. & Simons, K. (2007). Active Avoidance Conditioning in Zebrafish (*Danio rerio*). *Neurobiology of Learning and Memory*, 87(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2006.06.002>

IX. ANEXOS

Anexo 1

*Imagen de la especie del pez Paco (*Piaractus brachypomus*). A. Variedad Silvestre. B. Variedad Albina.*



Nota. Autoría propia (2022).

Anexo 2

Secuencia nucleotídica del gen de Miostatina de la Tilapia (Oreochromis niloticus). Código de acceso al Genbank: XM_003458832 (Longitud 3560 bp).

```

1 ttgaattctt tgccaccctc atgctaagaa aatttctcta gatccgcccc tggttactgt
61 tctatcagct ttaggttgtc cagccattct ccttgcacct ctgacatcg caggcatttt
121 gacccagaga agtgttgctc gctggatatt ttttcccccc tgggcattc tctaattggct
181 aagtatattt atctgaagca ctgccacaca gaacaactac acagaacaac tttagatgtt
241 acagaatttt aaagtacata cagtgcataa aaattaaaga catacatttt caaatgcct
301 tgacaccagc aatttatttt tctgtatgtt gtgttactaa ctggccacac gatggcgctc
361 tgctctcatg tcgttcaacc aactgactat tttgaaaagt cctggggccaa gtattttcta
421 catttttagtt attctctttt gccctgacgt cgttgccttgc tgctctttt agaaatatttt
481 tatttcaga ttttcatgtt agattatttt ttcgttgccttgc acagaaagcc tgacctcaac
541 aaagcagatg atttaattgc cacttcgtaa cattacaact gtcattttt ttcaggtgg
601 aaattcattt agaaaatttac atttgaatgc agaatgcaaa tccaaaacgc tgccctttct
661 caaggacgca gaaagacatg cgagcaaaga tatgactgac tattggatat tcttttagaga
721 agatacgcattt tgtaaaagttt aagaaaatgtt agaatgcac ttctatctt attcaagact
781 tgcatcattttt tattttttt tgggtgatattt aaaaacattttt gtgagtgaga ttatcccgtc
841 aagcacatgc ccacagcctc cgttccttgc ggggtgacag cgaaaaaaaaaaa gttttcatgt
901 cagtcggtt aaatttcattt ttgcctgtcc agccaatcat agatttttgc gacacaaaag
961 aggctaaagt tggagtataa aaaggtgcgc gctaataaac tatgtatgcct atcagtgtgg
1021 gacattaaatc caaccccaagt tcagtcgcgc atcagctccg acacagtgc aaggattttt
1081 ttttaaaacaa aacgtatattt taaaccacac ttcacacactt agagacaatg catctgtctc
1141 agatcgtgtt gtatctgac ttgtgttgc ttgtgggtcc agtagttctg agtgcaccaag
1201 aggccgcacca gcagcccttc gtcagcaccac cagtagacac ggtatcaatgc gctacctgcg
1261 aggtccggca gcagattaaa accatgcgtt taaacgcgtt aaagtctcg attctgagca
1321 agtcgcgaat gaaggaagctt cccacacattt gcagagagat cgtgaagcag ctcctgccc
1381 aagcgcggcc getgcagcagc cttctggatc agtacgcgt gctgggagat gacaacaggg
1441 aagaagtctt ggaggacgac gacgagcacg caaccacggaa gacaattgtt atgatggcaa
1501 ctgaacctga ttccgcgttc caggtggac ggcacccaaa gtgcgtctt ttctcaattt
1561 cgcagaagtt tcaagccagt cgcgttagttc gagcgcagct ttgggtgcattt ctgcgtccat
1621 cggagaagttt gaccaccgtt ttccctgcattt tctccggct tataccggc acagacgggaa
1681 acagacacat acgaatccgc tccttgcattt tcgacgtgaa tgccggggcc agctcttggc
1741 aaagtataga cgtcaagcaa gtgttgcactt tgcgtgcgtt gcagccggag accaactggg
1801 gcatcgagat caacgcatttcc gattcgaggg gaaatgactt agctgtgacc ttgcagagc
1861 cgggagagga gggcttgcaaa ccgttcatgg aggtgaagat ttcaaggggc cccaggcgtg
1921 cccggagaga ctcgggcctt gactgcgtt agaactctcc agagtccgg tgctgtcgct
1981 acccacttcac tgcgttgcattt gaggactttt gctggactt gattattgc cccaaacgcct
2041 acaaggccaa ctattgcattt ggggagtttgc agtacatgc cttacagaag taccacacaa
2101 cccacctggt gaacaaagcc aaccccaagag ggactgcagg tccctgttgc accccaacaa
2161 agatgtcgcc aatcaacatg ctctactttt accgcaaaaga gcaaatcatc tatggcaaga
2221 tcccctccat ggtgggtggac cgttgcattt gctcctgttgc tggatggag agagaaaggg
2281 ggtggggccg aaggggccga ggcgccttcc agcacccttcc tttaagactt tttcacacca
2341 ccaatccacc agttccagttt ctttcctgcattt gaacacgggtt caatagaatc agagtagagg
2401 ccacaaacag cccgacccattt ctgcagggttca atgcatttttcat agttcttactt tttctttctt
2461 ccagtgaaat cttagccata gaggcttgcattt gccaggtggat tgcacaaattt caaacacacaa
2521 cacacacaca caccgacaca tataacacat gctggacccat gaagtgaatg tagccagaaaa
2581 tgatcacatg tttccaaaac agtgttattt ttctttgtt tttaatgtt ctgtgtcgct
2641 tccattttata ccaacatgc gtcgcattt acaccactcc acttgcgtt gatatacaag
2701 ctatcacact tgatgcattt gttttgttgcattt aatcattttt ttagttttt tttcagactt
2761 aaaccaggaa tcctcaagggaa ctttttgcattt gggctggaa aaacacagct ggagactctt
2821 tagggtgata ttccacactt gtagaacatg tttagtacc cctaagtgtc cccaaagatgc
2881 aatgaaaagt taaactgcac aaaagactaa ctaatctggat gattaatctc tcttgcatttgc
2941 ctcaaaggattt cagtttcaat gttttctccc cccaaaatgtt tgcgtgggtt aatctcttgc
3001 cagagccatggatccatc atgttccacc agtctgaatgtt accacttttgc gtcttgcatttgc
3061 gtccctcattt attctgtcat acatacatgc aacaatataat ccaacccgaga gatcgttctc
3121 cctcagtcgc aattgtcattt atccaaacccaa acagcccgac ctggccgata cacttgcatttgc
3181 attctgattt taaatttcaca tgactggacaa gaaggacttgc aactgaaggc acgtatgcatttgc

```

3241 cagcctccaa atgaaagtgt gtttaagaca gaaaacgatg tgaatgtcga aatcatgcct
3301 agactctgtc ttacaaacac agtttgcact atggcacacc aatagaaaga attgggttgct
3361 aaaaaaaaaa gttgtaaaaa ctgatttga tatgtttgct aatttgtatt gtattcatat
3421 gccatttgtt tccagtagga gttgccttc tgaaccattg ttggtaataata tataaaactg
3481 caaccttagca agataaatgt tgtaatgcag caactctata tacttgtttt aacaaataaa
3541 gtttctagct tgtttgaaga

Nota. Dirección: 5' → 3'

Anexo 3

Identificación de la secuencia nucleotídica amplificada de los primers diseñados en base a la secuencia del gen de Miostatina de la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) en el Genbank.

Forward: 5'-TATCCCGTCAAGCACATGCC-3', Reverse: 5'-GGCGTTGGGTCCAGTAGTTCT-3'

TTGAAATTCTTGCCACCCCTCATGCTAAAGAAAATTCTCTAGATCCGCCCTGGTTACTGTTCTATCAGCTTCTAGGTTGCTCCAGCCATTCTCCTTGACCTCTGACATCAGCAGGCATTTGACCCAGAGAAGTGTGCTCGCTGGATATT
TTTTTCCCCCTGGGCCATTCTCTAATGGCTAAAGTATATTATCTGAAGCAGTACAGTCATAAAAATTAAAGACATACATTTCAAAATAGCCT
TGACACCAGCAATTATTTCTGATGTTAGTGTACTAACTGGCCACACGATGGCGCTCTGCTCTCATGTCGTT
CAACCAACTGACTATTTGAAAAGTCTGGCCAAGTATTTCTACATTAGTTATTCTCTTTGCCCTGACGT
CGTTGCCCAATGCTCTTTGAGAAATTATATTCCAGATTTCATGTAAGATTATTATTGCTTTGACAGA
AAGCCTGACCTCAACAAAGCAGATGATTTAACATTGCCACTTCGTAACATTACAACACTGTCATTTCAGGTGGT
AAATTCAATTAGAAATTAAACATTGAATGCAGAAATGCAAATCCAAAAGCTGCCCTTCTCAAGGACGCAGAAAG
ACATGCGAGCAAAGATATGACTGACTATTGGATATTCTTAGAGAAGATACGCATTGTAAGTTAAAGAAAATGA
AGAATGCAACTTCTATCTTATTCAAGACTTGCAATTAAATTATTGTTTTGGGTGATATAAACATTGTTGAG
TGAGAT **TATCCCCTGCAAGCACATGCC** CACAGCCTCGTCCCTTATGGGGTACAGCAGGAAAAAAAGTTTCTG
CAGTCGGTTAAATTCAATTGTTGCCTGTCAGGCCATAGATTGACGACACAAAAGAGGCTAAAGTTGGAG
TATAAAAAGGTGCGCGCTAATAAACTATGATGCCATTAGTGTGGGACATTAATCCAACCCCAGTTCAGTCGCGC
ATCAGCTCCGACACAGTCAAGGATTTTTAAACAAAACGTATTAAACACACTTCACACCTAACAGAGA
CAATGCACTGTCAGATCGTGTATCTGAGCTGCTGATT **GCCTGGTCCAGTAGTTCTGAGT** GACCAAG
AGGCGCACCAGCAGCCTCCGTCAAGCACCCCAGTAGACACGGATCAATGCGTACCTGCGAGGTCCGGCAGCAGA
TTAAAACCATGCGATTAAACCGATAAAAGTCTCAGATTCTGAGCAAGCTGCAATGAAGGAAGCTCCAACATTA
GCAGAGAGATGTAAGCAGCTCTGCCAAAGGCCGCCGTCAGCAGCTCTGGATCAGTACGACGTGCTGG
GAGATGACAACAGGGAAGAAGTCTGGAGGACGACGACGAGCACGCAACCACGGAGACAATTGTAATGATGGCAA
CTGAACCTGATTCCGCTGTCAGGTGGACGGCAACCAAAGTGTGCTTTCTCAATTACGCAAGTTCAG
CCAGTCGCTAGTTGAGCGCAGCTTGGGTGCATCTGCTCATCGGAAGAAGTGACCACCGTGTCTGCAA
TCTCCGGTTATACGGTCACAGACGGAAACAGACACATACGAATCCGCTCCTGAAAGATCGACGTGAATGCCG
GGGCCAGCTTGGCAAAGTATAGACGTCAGCAAGCAAGTGTGACTGTGTGGCTGCCAGCCGGAGACCAACTGGG
GCATCGAGATCAACGCTTCGATTGAGGGGAAATGACTTAGCTGTGACCTTCGAGAGCCGGGAGAGGAGGGTC
TGCACCGTTCATGGAGGTGAAGATTCAAGAGGGCCCCAGGCGTCCCCGGAGAGACTCGGGCCTGGACTGCGATG
AGAAACTCTCCAGAGTCCGGTGTGCTACCCACTCACTGTGGACTTCGAGGACTTGGCTGGACTGGATTA
TTGCACCAAAACGCTACAAGCCAACATTGCTCTGGGAGTGTGAGTACATGCACTTACAGAAGTACCCACACA
CCCACCTGGTAACAAAGCCAACCCCAGAGGGACTGCAGGTCCTGCTGTACCCCAACAAAGATGTCGCGAATCA
ACATGCTCTACTTTAACCGAAAGAGCAAATCATCTATGGCAAGATCCCTCATGGTGGGACCGTTGTGGAT
GCTCTGAGTTGGGATGGAGAGAGAAAGGGGGTGGGGCGAAGGGGCCAGGCGCCATCCAGCACCCACTTTAA
GAECTGTTTACACCACCAATCCACCGATTCCAGTGTGCTTCTGCAGAACACGGTCAATAGAATCAGAGTAGAGG
CCACAAACAGCCGACCTCTGCAGGCAATGCTTCACTAGTTCTCATTTCTCCAGTGAATCTTAA
CCATAGAGGCTGAGCCAGGTGGATGCAAGAATTCAAACACACACACACACACCACATATAACACAT
GCTGGACCTTGAAGTGAATGTAGCCAGAAATGATCACAGTTTCAAAACAGTGTATTATTCTTGTGTTTAA
ATGATCTGTGCTCTGTCATTATACCAACATGCCGTCGTTATACACCACTCCACTGTGAGTGTGATATAACAG
CTATCACACTTGATGCTCTGTTGTGATAATCATTTTTAGTTGTTTCAGAGTGAAACCAGGAATCCTC
AAGGACTTTGAAAGGGCTGGAAAACACAGCTGGAGACTCTTAGGGTGTATTTACACTGGTAGAACATG
TTTAGTACCCCTAACGTGTCCCCAAGAGTCAATGAAAAGTTAAACTGCACAAAAGACTAACTAATCTGGAGATTA
ATCTCTTGTATTGCTCAAAGTTCACTGTTCAATGTTCTCCCCAAAATGATGTGGTGGTTAATCTCTT
CAGAGCCTATGGATACAAACATGTTCCACCGAGTCAGTACCACTTAAAGTCTGCTCAGGTCCTCATTATTCT
GTCATACATACATGCAACAAATATCCAACCGAGAGATCGTCTCCCTCAGTCGAATTGTCAGTATCCAACCAA
ACAGCCCGACCTGCCGATACACTGAAATTATTCTGATTGTAATTACAGTCAGTACTGGACAGAAGGACTTGAAC
AAGGCACGATGAATGCAAGCTCCAAATGAAAGTGTGTTAAGACAGAAACAGATGTGAATGTGAAATCATGCCT
AGACTCTGTCTAACAAACACAGTTGCACTATGGCACACCAATAGAAAGAATTGGTTGCTACAAAAAAAGTTGT
AAAAACTGATTTGATATGTTGCTAAATTGTTGATTCATATGCCATTGTTCCAGTAGGAGTTGCCTTC
TGAACCAATTGTTGTAATATAAAACTGCAACCTAGCAAGATAATGTTGTAATGCAACTCTATATAACTT
GTTTAACAAATAAAAGTTCTAGCTTGTGTTGAAGA

Anexo 4

Secuencia nucleotídica de la región promotora y de la región codificadora del gen de Miostatina de la Tilapia (Oreochromis niloticus) y la ubicación de los primers:

Forward: 5'-TATCCCGTCAAGCACATGCC-3', Reverse: 5'-GCGTTGGGTCCAGTAGTTCT-3'

TTGAATTCTTGCACCCCATGCTAAGAAAATTCTAGATCCGCCCTGGTTACTGTTCTATCAGCT
 TTAGGTTGTCAGCCATTCTGACATCAGCAGGATTTGCTAATGGCTAAGTATTATCTGAAGCAGTGGCCACACA
 GCTGGATATTTCCTGGCATTCTGAATGGCTAAGTATTATCTGAAGCAGTGGCCACACA
 GAACAACATCACAGAACAACTTAGATGTTACAGCATACAGTCATAAAAATAAAGA
 CATAACATTCAAAATAGCCTGACACCAAGCAATTATTTCTGATGTTAGTGTACTAAGTGGCCACAC
 GATGGCGCTCTGCTCATGTCGTTAACCAACTGACTATTGAAAGAAGTCTGGCCAAAGTATTCTA
 CATTAGTATTCTCTGCTGACAGCTGCTTACAGCTGAAAGAATGAAAGTCTGGCCAAAGTATTCTA
 CATTAGTATTCTCTGCTGACAGCTGCTTACAGCTGAAAGAATGAAAGTCTGGCCAAAGTATTCTA
 TTTTCATGTAAGATTATTATTCGCTTACAGCTGCTTACAGCTGAAAGAATGAAAGTCTGGCCAAAGTATTCTA
 CACTTCGTAACATTACAACTGTCATTTCTCAGGGTGTAAATTCTAGAAATTAAACATTGAATGC
 AGAAATGCAAATCCAAAAGCTGCCCTTCAAGGACCGAGAAAGACATGCGAGCAAAGATATGACTGAC
 TATTGGATATTCTTAGAGAAGATACTGCTTAAAGTTAAAGGATGAAAGAATGCAAACCTTATCTA
 ATTCAAGACTGCTTAAATTATTGTTGGTGTAAACATGTTGAGTGGAGAT **TATCCCGTCAAGCACATGCC**
AAGCACATGCCACACAGCTCCGTTCTATGGGTGACAGCGAAAAAAAGTTCTAGTCAGTCGGGTTA
 AAATTCTATTGCTGCTGCCAGCAATCATAGATTGACGACACAAAGAGGCTAAAGTTGGGATATAA
 AAAGGTGCGGCTAATAAACTATGATGCTTACAGTGTGGGACATTAAATCAACCCAGTTCTAGTCGCGC
 ATCAGCTCCGACACAGTGCAGGATTTTTAAACAAAACGTTTAAACCCACACTTCACACCTA
 AGAGACA **TATCTGCTCATGCTGCTGATCTGAGCTTGTGATT**GGCTTGGGTCCAGTAGTCTG
 AGTGACCAAGAGGCGCACAGCAGCCTCGTCAGCACCCAGTAGACACGGATCAATGCGTACCTCG
 AGGTCCGGCAGCAGATTAAACCATGCGATTAAACCGATAAAAGTCTCAGATTCTGAGCAAGCTCGAAT
 GAAGGAAGCTCCAACATAGCAGAGGATCGTAAGGAGCTCTGCCAAAGCGCCCGCTGAGCAG
 CTTCTGGATCAGTACGAGCTGCTGGGAGATGACAACAGGGAAAGGCTCTGGAGGAGCAGCAGCAG
 CAACCCAGGAGACAATTGTAATGATGCAACTGACCTGATCTGAGCTTCGAGGTGGAGCGACGGGAA
 CAAACAAAGTCTCAATTACGAGAAGTTCAAGCCAGTCGCGTAGTCGAGCGCAGCTTGGGTGCAT
 CTGCGTCCATCGGAAGAAGTGAACCCGCTTCTGCAATCTCCGGCTTACCGGTACAGACGGGA
 ACAGACACATACAGCAATCTGGGAGATGCAATGCGAGCTCTGGGAGCAGCTTGGCAAAAGTATAGA
 CGTCAAGCAAGTGTGACTGTGGCTGGCAGCCGGAGACCAACTGGGAGCATCGAGATCAACGCTTC
 GATTGAGGGAAATGACTTAGCTGTGACCTTCGAGAGCCGGAGAGGGGGCTGCAACCCTCATGG
 AGGTGAAGATTCAAGAGGCCAGCGTGGCCGGAGAGACTGGGCTGGACTCGCATGAGAAACTCTCC
 AGAGTCCGGTGTGCTGCTACCCACTACTGTTGGACTTGAGGACTTGGGACTGGATTATGCA
 CCAAACAGCTACAAGGCCAACTTGTGCTGGGAGTGTGAGTACATGCACTACAGAAAGTACCCACACA
 CCCACCTGGTAACAGCAAGGCCAACTGGGAGGGACTGCAAGTCCCTGCTGATCCCCAAAGATGTCGCC
 AATCAACATGCTCTACTTTAACCGCAAAAGCAGCAATCATCTATGGCAAGATCCCCTCATGGGG
 CGTGTGGATGCTCC **AGTGGATGGAGAGAAGGGGGTGGGGCGAAGGGGGCGAGGGCCATCC**
 AGCACCCCTACTTTAAGACTGTTACACCCACCAATCCACCCAGTGTGCTTCTGCAGAACACGGTG
 CAAATGAGATGAGTAGAGGCCACAAACAGCCGACCTTCTGCAGGGCAATGCTTCAAGTCTCA
 TTTCTTCTCCAGTGAATCTAGCCATAGAGGCTGAGGCCAGGGTGAAGCCAGGGTGAAGAATTCAA
 AACACACA

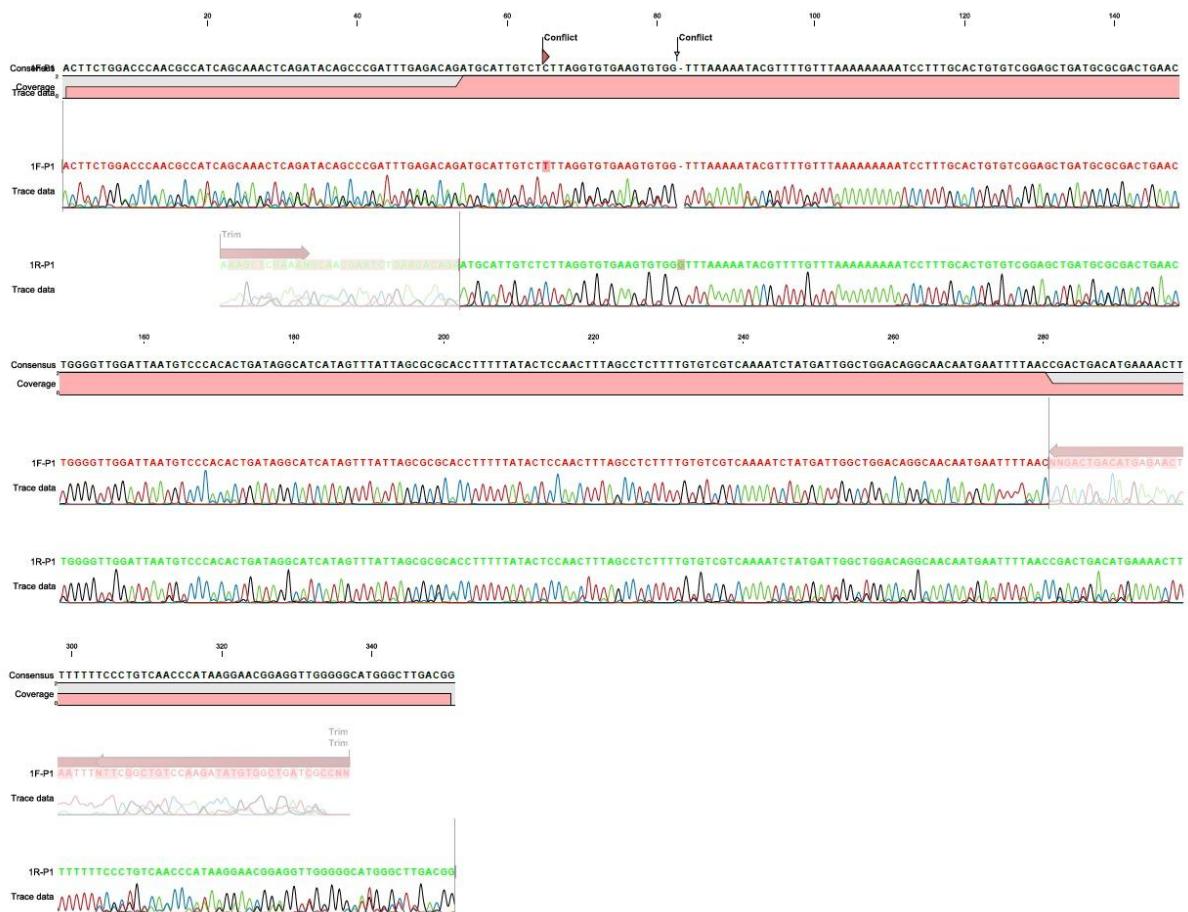
Secuencia Codificadora

ATG = Codon de inicio
 TGA = Último codon

Nota. Sombreado de color verde es el codon de inicio y el último codon de la proteína de la Miostatina de Tilapia.

Anexo 5

Obtención de la secuencia nucleotídica consenso del pez Paco Silvestre.



Anexo 6

Obtención de la secuencia nucleotídica consenso del pez Paco Albino.

