

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN 2022

INFORME FINAL

ESTUDIO DEL GEN *slc45a2* QUE INDUCE DISMINUCIÓN DE LA PIGMENTACIÓN EN PECES AMAZÓNICOS DE INTERÉS PARA LA ACUICULTURA PERUANA

Resumen

Los peces albinos poseen mayor valor económico que los peces con coloración tanto a nivel ornamental como a nivel de consumo. El gen *slc45a2* está asociado a la inducción de un fenotipo de albinismo reportado en peces modelo como pez Cebra, pez Medaka y otros. Se diseñaron *primers* específicos a partir de la información reportada en Tilapia y fue utilizada para diseñar *in silico* otro juego de *primers* para Paco (*Piaractus brachypomus*). Ambos juegos de *primers* fueron utilizados en las especies: Paco (*Piaractus brachypomus*), Gamitana (*Colossoma macropomum*), Oscar (*Astronotus ocellatus*) y Tilapia (*Oerochromis niloticus*) dando una amplificación de una sola banda para Tilapia y Oscar y con el otro juego de *primers* para Paco y Gamitana con un tamaño aproximado de 120 nucleótidos. Los secuenciamientos obtenidos corroboraron que pertenecían solamente al gen *slc45a2* y no a otra secuencia del genoma. Asimismo, para las versiones albinas de algunas especies se obtuvieron los mismos resultados, pudiendo ser utilizados a futuro para identificar y amplificar este gen e iniciar la edición génica de otras especies de interés económico para la acuicultura peruana.

Palabras claves: albinismo, amazónico, peces, pigmentación, *slc45a2*

Abstract

Albino fish have greater economic value than colored fish, both at an ornamental level and at a consumption level. The *slc45a2* gene is associated with the induction of an albinism phenotype reported in model fish such as zebra fish, Medaka fish and others. Specific primers were designed from the information reported in Tilapia and used to design *in silico* another set of primers for the Paco fish species (*Piaractus brachypomus*). Both sets of primers were used on the species: Paco (*Piaractus brachypomus*), Gamitana (*Colossoma macropomum*), Oscar (*Astronotus ocellatus*) and Tilapia (*Oerochromis niloticus*) giving a single amplification for Tilapia with the Oscar fish and the other, with the fish Paco and Gamitana whose band was approximately 120 nucleotides. The sequencing obtained corroborated that they belonged only to the *slc45a2* gene and not to another genome sequence. Likewise, the albino versions of some species obtained the same results. Being able to be used in the future to identify and amplify this gene and initiate gene editing of other species of economic interest for Peruvian aquaculture.

Key words: albinism, amazonian, fish, pigmentation, *slc45a2*

INTRODUCCIÓN

El Perú cuenta con diversos grupos de peces comerciales y ornamentales muy cotizados dentro de la acuicultura. Sin embargo, a pesar de que el país es originario de mucha de esta diversidad biológica aún no figura en ningún caso como productor y sólo es proveedor de determinadas variedades extraídas o exportadas al mercado internacional para realizar cruces y obtener variedades mejoradas, que permita incrementar la variabilidad genética en los híbridos y evitar que las líneas obtenidas pierdan sus características.

En la Amazonía peruana se encuentran especies de alto valor comercial tanto para fines de consumo como ornamental, entre éstas se encuentra el pez Oscar *Astronotus Ocellatus* (García et al., 2009) perteneciente a la familia Cichlidae. Tanto Paco como gamitana que pertenecen a la familia Serrasalminidae son especies nativas de la Amazonía que han sido priorizadas para la acuicultura (Fernández et al., 2004). Por otro lado, la tilapia (*Oreochromis niloticus*) es una especie que fue introducida y es la cuarta de mayor producción en el Perú (Baltazar y Palacios, 2020).

La posibilidad de obtener individuos con mejores rasgos fenotípicos en cuanto al color corporal, utilizándose técnicas moleculares que identifiquen genes de interés como es el caso de los genes asociados a la pigmentación, podría aumentar el valor agregado de varias de nuestras especies ictícolas con alto potencial permitiendo incrementar las exportaciones. Así mismo, se evitaría la erosión genética por su sobreexplotación al reproducirse en cautiverio e iniciar programas de mejoramiento genético para la obtención de líneas comerciales.

El gen *slc45a2* codifica para la producción de una proteína que se encuentra en los melanocitos que son células especializadas para la coloración. El miembro 2 de la familia de transportadores de solutos 45 (*slc45a2*) es un transportador de membrana que media en la biosíntesis de melanina y se conserva evolutivamente desde los peces hasta los humanos.

También es conocida como proteína transportadora asociada a la membrana (MATP), ausente en melanoma-1 (Aim-1), albinismo oculocutáneo tipo 4 (OCA4), gen B y albino (alb). Es un mediador clave conservado evolutivamente de la biosíntesis de melanina. Esta proteína probablemente transporta moléculas necesarias para el funcionamiento normal de los melanosomas, que son las estructuras de los melanocitos donde se produce la melanina. Los estudios sugieren que ciertas variaciones comunes (polimorfismos) en el gen *slc45a2* pueden estar asociadas con diferencias normales en la coloración de la piel, el cabello y los ojos (Dooley et al., 2013).

Existen casi una docena de genes que estarían contribuyendo al patrón cromático de los peces como son: *SLC24A5*, *Mir*, *Tyrp1*, *Sox10*, *Mitf*, *Slc45a2* y *Ednrb* (Braasch, 2007). Los estudios de la mutación en el pez Cebra variedad “Golden o Dorada” que aclaran el color normalmente oscuro del cuerpo del animal posee un 69% de similaridad con el gen *slc24a5* de humano, lo cual demuestra su grado de conservación evolutiva de éste y otros genes asociados al color (Basolo, 2006; Miller et al., 2007; Izagirre et al., 2006; Han et al., 2008). Los mutantes albinos homocigóticos en pez Cebra carecen por completo de melanosomas sin defectos evidentes en los otros dos tipos de células pigmentarias o asociadas al color (xantóforos e iridóforos) (Streisinger et al., 1986; Tsetskhladze et al., 2012).

La síntesis de pigmentos es un proceso complejo que implica la acción de múltiples genes, la mayoría de los cuales tienen múltiples copias como resultado de duplicaciones genómicas específicas de peces. Sin embargo, los genes *slc45a2*, albinismo oculocutáneo tipo 2 (OCA 2) y el miembro 5 de la familia de transportadores de solutos 24 (también conocido como OCA 6) son excepcionales entre los genes relacionados con la melanina de los teleósteos, que tienen una sola copia. Planteándose la hipótesis de que la pérdida de función las mutaciones en el exon 1 del gen *slc45a2* que darían como resultado albinismo (Braasch, 2007).

Según Segev-Hadar y colaboradores (2021) se identificó el gen *slc45A2* de la tilapia del Nilo, mediante una búsqueda en la base de datos utilizándose la secuencia de ARNm de *slc45a2* del pez Cebra (*Danio rerio*) previamente identificada (NM_001110377; XM_680834.4). Como era de esperar, esta búsqueda arrojó un único ARNm de *slc45a2* predicho (XM_003451484), y compartió >77% de identidad. El análisis filogenético de secuencias de ARNm de *slc45a2* de varias especies de vertebrados, incluidos mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces, utilizando la lamprea marina como raíz filogenética, mostró que *slc45a2* se estaba conservada evolutivamente desde el pez hasta el ser humano.

El presente trabajo tuvo como objetivo general la amplificación e identificación molecular del polimorfismo genético del gen del color *Slc45a2* en cuatro peces amazónicos de interés comercial para la acuicultura peruana (Paco, Gamitana, Tilapia y Oscar). Que permitan dar las bases genético-moleculares sobre las cuales se puedan iniciar diversos estudios referidos a la potenciación de la acuicultura mediante el mejoramiento genético por cruce dirigido y/o selección dirigida o artificial.

OBJETIVOS

Objetivo General

Amplificar e identificar molecular del polimorfismo genético del gen del receptor *Slc45a2 a* asociado a la pigmentación en los peces de interés comercial para la acuicultura peruana.

Objetivos Específicos

- a. Amplificar molecularmente el gen *Slc45a2* que está asociado al albinismo y la presencia de ojos rojos en especies de peces de interés comercial para la acuicultura peruana como Paco, Gamitana, Oscar y Tilapia.

- b. Identificar y comparar las variantes de la secuencia nucleotídica del gen *Slc45a2* en Paco, Gamitana, Oscar y Tilapia, especies de interés comercial para la acuicultura peruana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ámbito espacial y temporal del estudio

El presente proyecto de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la UNFV entre enero y octubre del año 2022.

Muestreo

Se tomaron muestras al azar de la aleta caudal de las especies ictícolas previamente identificadas tomando las fotografías correspondientes.

Unidad de análisis

Se trabajó con las especies Paco (*Piaractus brachypomus*), Gamitana (*Colossoma macropomum*), Oscar (*Astronotus ocellatus*) y Tilapia (*Oerochromis niloticus*).

Instrumento

Los especímenes fueron adquiridos de dos centros de crianza acuícola:

- LAS PALMAS AQUA INVERSIONES Y PROYECTOS, Jr. San Martín N°484, La Banda de Shilcayo, San Martín.
- Dirección Regional IIAP Huánuco, Jr. Tingo Maria Mz. C Lt. 20, Castillo Grande Huánuco, Leoncio Prado, Huánuco

Los especímenes fueron fotografiados antes de la toma de muestra de las aletas para la extracción del ADN.

Materiales

Material biológico

Estuvo conformado por especímenes de Paco, Gamitana, Oscar y Tilapia, especies de importancia comercial para la acuicultura peruana.

Reactivos

- RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution de 20000X de 1mL.
- Blue Juice Gel Loading Buffer (10X). 3 unidades de 1 mL.
- Marcador de peso molecular de 100pb de 50µg x 500µL.
- Marcador de peso molecular Generuler de 100pb DNA Ladder (KIT de 50ug).
- Kit de PCR Master Mix Solution 2X (i-StarMAX GH) para 100 reacciones.
- Servicio de Secuenciamiento con purificación de producto amplificado.
- Genomic DNA Mini Kit (Tissue) para 100 muestras.
- Rack Cool Storage.
- Tiras Strip de 8 tubos de 0,2 mL para PCR Bolsas de 125 tiras.
- Tiras Strip Caps de 8 tubos de 0,2 mL para PCR Real time
- Paquete de 125 tiras.
- Puntas tips de 1mL. TipOne® 101-1000 µL.
- Bolsas de 1000 tips.
- Puntas tips de 100uL. TipOne® 1-100 µL Bolsas de 1000 tips.
- Puntas tips de 10uL. TipOne® 0,1-10 µL Bolsas de 1000 tips.

- Puntas tips de 10ul extralargos. 0,1-10 μ l Bolsas de 1000 tips.
- Microtubos de 0,5 ml para extracción de ADN.
- 1000 tubos por caja.
- 500 microtubos de 1,5 mL para Extracción de ADN.
- 500 microtubos de 2,0 mL para Extracción de ADN.
- 500 tubos por caja.
- Agarosa grado molecular para electroforesis
- Marcador de peso molecular de 100pb de Fermentas®
- Agua desionizada grado molecular

Equipos

- Termociclador para PCR
- Espectrofotómetro UV
- Fuente de poder
- Cámara electroforética horizontal
- Refrigeradora de -20 °C
- Compresora de aire
- 10 Termostatos de 100W

Otros materiales

- 04 peceras de 10 litros
- Alimento seco importado de la marca SERA
- Medicamentos varios
- 1000 tubos ependorff de 1.5ml estériles
- Tijeras estériles

- Cámara digital de 10 megapíxeles (12X)

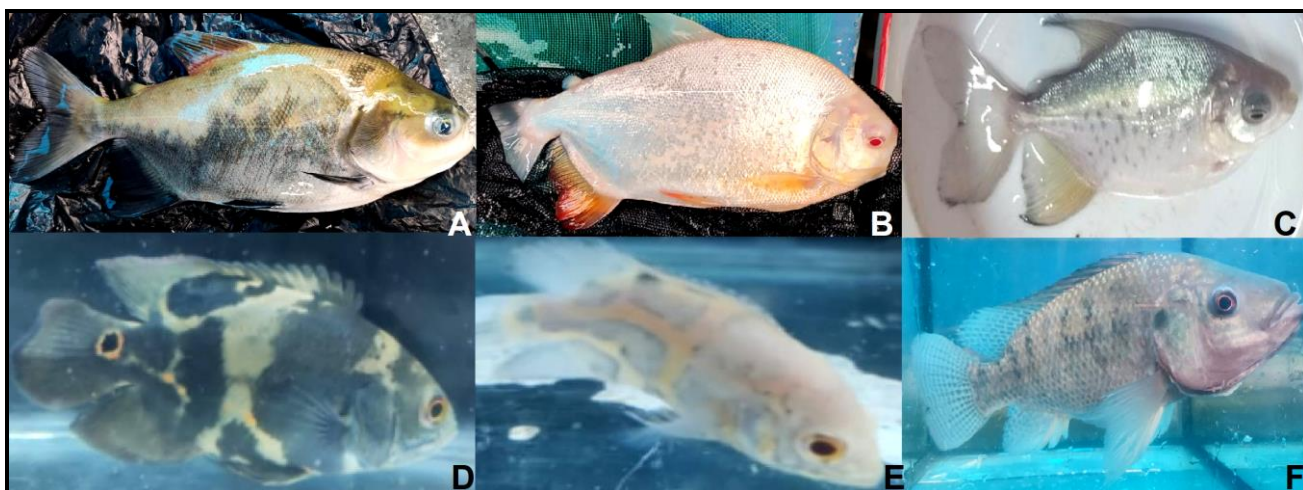
Procedimiento

Identificación del color corporal en peces ornamentales

Se realizó el fotografiado del color corporal (con pigmentación versus sin pigmentación) y color de ojos (ojos negros versus ojo rojos) de cada pez y se armó un dossier (Figura 1). Para fotografiar cada pez se utilizó una cámara digital de 10 megapíxeles (12X), empleando luz natural y fondo blanco para lograr un contraste estándar adecuado.

Figura 1

Especímenes empleados en la investigación



Nota. A. Paco silvestre (*Piaractus brachypomus*), B. Paco albino (*Piaractus brachypomus*), C. Gamitana (*Colossoma macropomum*), D. Oscar silvestre (*Astronotus ocellatus*). E. Oscar albino (*Astronotus ocellatus*). F. Tilapia (*Oerochromis niloticus*).

Extracción de ADN de tejido muscular del pez

Para la estandarización del protocolo de extracción de ADN (Geneaid Biotech, 2017), se obtuvo aproximadamente un centímetro del músculo de cada pez (Lopera-Barrero, 2008). Se transfirió la porción del músculo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y seguidamente se agregó 200 μ L de tampón GST y 20 μ L de la proteinasa K. Luego se incubó a 60 °C durante 30 minutos para la digestión del músculo.

Luego de la incubación se realizó la centrifugación durante dos minutos a 15 000g para la lisis celular y cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Adicionando luego 200 μ L de GSB Buffer y agitando durante 10 segundos. Se añadió 200 μ L de etanol absoluto al lisado de la muestra y se mezcló nuevamente durante 10 segundos, colocando una columna GS en un tubo de colecta de 2 mL para transferir toda la mezcla a esta. La centrifugación se realizó a 15 000 g durante un minuto en una centrífuga refrigerada marca Centurión. Se desechó el tubo de recogida de 2 ml que contenía el sobrenadante.

A continuación, se transfirió la columna GS a un nuevo tubo de recogida de 2 mL, se añadió 400 μ L de tampón W1 a la columna GS y se centrifugó posteriormente a 15 000g durante 30 segundos. El flujo sobrante se desechó y la columna GS se colocó nuevamente en el tubo de recogida de 2 mL. Se añadió 600 μ L de tampón de lavado a la columna GS, centrifugando nuevamente a 15 000 g durante 30 segundos y se desechó el flujo sobrante. La columna GS se colocó nuevamente en el tubo de recogida de 2 mL y se volvió a centrifugar durante tres minutos para el secado de la columna. La columna GS seca fue transferida a un tubo limpio de microcentrífuga y se añadió 100 μ L de Elution Buffer precalentado dejando reposar durante al menos 3 minutos, finalmente se centrifugó a 15 000g durante 30 segundos para diluir el ADN purificado.

Diseño de Primers para slc45a2

Para determinar la presencia del gen slc45a2 se sintetizaron cebadores o *primers* específicos comerciales reportados por la literatura científica diseñando las secuencias *in silico*: Las secuencias para Tilapia fueron:

SLC-1F: 5'- TGTACAGCTTGGTGTGGTTGAT -3'

SLC-1R: 5'- GTGCCAGGATGTAAGGCCTCC -3'

Las secuencias para Paco fueron:

SLC-1F: 5'- TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT -3'

SLC-1R: 5'- GTGACAGTATGTAGGGTCTCC -3'

Los primers seleccionados fueron probados en el programa Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y comparados con la base de datos nr y se seleccionó a la Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (taxid:8128).

Análisis molecular por PCR para la amplificación del gen Slc45a2

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando la polimerasa ADN polimerasa i-Taq™ termoestable de 94KDa en un termociclador MultiGene™ OptiMax Thermal Cycler. Se preparó una mezcla o maestra Master mix Solution calculándose de acuerdo al número de muestras utilizadas. Luego se dispensó 5 µL de 2X PCR Master mix Solution en tubos de PCR, seguidamente se agregó la muestra de ADN y los primers Forward y Reverse en los mismos tubos de PCR. El ADN genómico de cada muestra para cada especie utilizada fue de 1 µL. La cantidad apropiada de primer Forward y Reverse fue de 0,5 µL en ambos casos. Se agregó 2 µL de agua libre de nucleasas en los tubos a un volumen total de 10 µL y se realizó una breve centrifugación en una centrifugadora refrigerada marca Centurión.

Las fases y condiciones del PCR se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1

Condiciones de PCR

Etapa	Temperatura y tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95 °C x 10 minutos	1
Desnaturalización	95 °C x 15 minutos	35
Alineación	62 °C x 30 segundos	1
Extensión	72 °C x 10 minutos	1
Conservación	4 °C x infinito	1

Nota. Se corrieron los geles de agarosa al 1,5% durante 40 minutos a 70 V.

Se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 100 bp DNA Ladder by Thermo Fisher Scientific. Los geles se visualizaron bajo luz ultravioleta en un transiluminador Cleaver Scientific.

Los amplificadores de Slc45a2 fueron purificados y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen de Corea del Sur. Las secuencias Consenso fueron obtenidas utilizándose el programa CLC Genomics Workbench (Versión 3.6.5) (<https://digitalinsights.qiagen.com/>).

Análisis *in silico* de las variantes del gen de Slc45a2

Con la información molecular se buscó la secuencia de consenso y se editó las secuencias con el programa BioEdit (Hall, 1999). Luego se alineó las secuencias con el Programa Clustal X (Jeanmougin et al., 1998). Posteriormente se alineó las secuencias nucleotídicas de las variantes del gen investigado con el programa Mega X para obtener el árbol filogenético comparativo con otras secuencias nucleotídicas de otras especies ictícolas (Kumar et al., 2018).

RESULTADOS

Diseño de *primers* y amplificación del gen *slc45a4* para especies ictícolas de interés

Se demostró que los *primers*: SLC_F_SEQ1 y SLC_R_SEQ1 diseñados para identificar el gen *slc45a4* de Tilapia son conservados y específicos (Segev-Hadar et al. 2021). Cuya secuencia tuvo un tamaño de 120 nucleótidos (Anexo 1).

Con estos resultados se procedió a la búsqueda por homología del gen *slc45a4* en el GenBank (2022) en otras especies dulceacuícolas de interés. La única especie cercana fue el pez Paco (*Piaractus brachypomus*).

Se comparó la secuencia homóloga del gen *slc45a4* en la especie (*P. brachypomus*) con la secuencia (*O. niloticus*) usándose el programa bioinformático BLASTn (Altschul et al., 1990) (Figura 2).

Figura 2

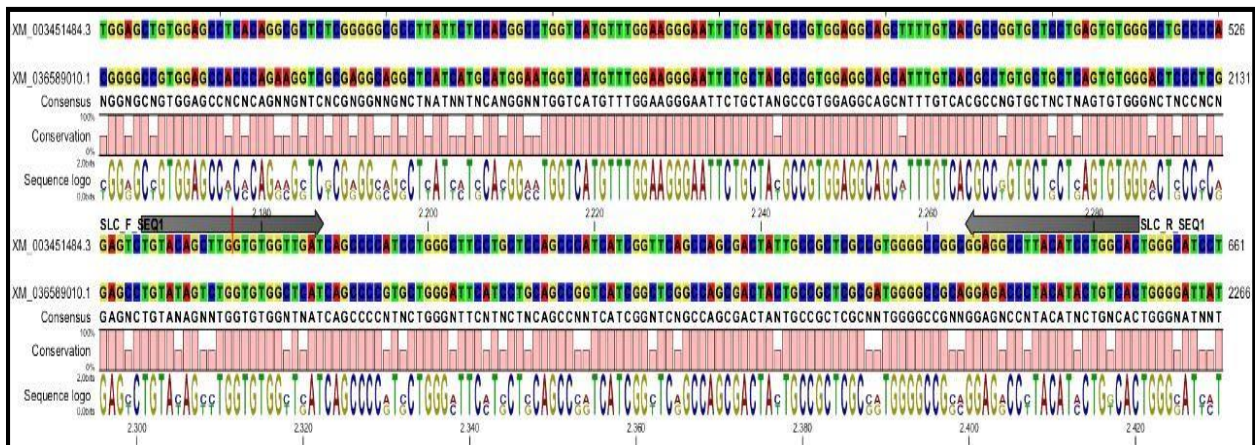
Secuencia del gen *slc45a4* identificado en Paco (*Piaractus brachypomus*).

PREDICTED: Colossoma macropomum solute carrier family 45 member 2 (slc45a2), mRNA					
Sequence ID: XM_036589010.1 Length: 4099 Number of Matches: 1					
Range 1: 2050 to 2657 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
486 bits(263)	8e-136	496/611(81%)	6/611(0%)	Plus/Plus	
Query 445	TGGTCATGTTTGGAAAGGGAATTC	TGCTATGCCGTGGAGGCAGCTTTT	TGTCACGCCCGGTGC	504	
Sbjct 2050	TGGTCATGTTTGGAAAGGGAATTC	TGCTACGCCGTGGAGGCAGCA	TGTCACGCCCGGTGC	2109	
Query 505	TCCTGAGTGTGGGCCGCCCCAGAGT	CTGTACAGCTTGGTGTGGTTGAT	CAGCCCCATCC	564	
Sbjct 2110	TGCTCAGTGTGGGACTCCCTCGGAGC	TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT	CAGCCCCGTGC	2169	
Query 565	TGGGCTTCCTGCTCCAGCCCATCAT	CGGTTCCAGCCAGCGACTATT	GCCGCTCGCCGTGGG	624	
Sbjct 2170	TGGGATTCATCCGTCAGCCGGTCA	TGGCTCGGCCAGCGACTACT	GCCGCTCGCGATGGG	2229	
Query 625	GCCGGCGGAGGCCTTACATCCTGG	CAGTGGGCATCCTCATGCTTGT	GGGAATCACCCCTGT	684	
Sbjct 2230	GCCGCGAGGAGACCCTACATAC	TGTCAGTGGGGATTATGATGCT	GGTGGGCATCACCATGT	2289	
Query 685	TCCTTAATGGAGATGCTGTCATCT	CAGCACTCGT-CAG-AGATAGGT	CGCTGAAGAGCAT	742	
Sbjct 2290	TTCTCAATGGAGATGCAGTGGT	TTCAGCCAAGTGCGGCACAGGGGT	-G-TGAAGAGGAC	2347	
Query 743	ATGGGCCATCGTGGTGGTGGTGGT	GTTGGAGTCTGCTGTTTGACT	TTTGCTGCCGACTTCAT	802	
Sbjct 2348	ATGGTCCATAGTAGTGGTCA	TGTTGGAGTCTGCTGTTGACT	TGACAGCAGACTCAT	2407	
Query 803	CGATGGACCCATTAAGGCCTACCT	GTTTTGATGTGTGTTACAT	GAAGACAAGGAAAGAGG	862	
Sbjct 2408	AGACGGGCCTGTCAAGGCCTAC	CTGTTGATGTGCTCGTACC	AGGACAAGGAAAGAGG	2467	
Query 863	CTTGCACTACCATGCTCTCCTC	CAGGCCTGGCCGGAGCATGT	GGTTACCTGGTGGGAGC	922	
Sbjct 2468	CTTCACTATCATGCACTGCT	TACCGGTCTGGGTGGCGCAT	GTGGTACCTGATTGGTGC	2527	
Query 923	CATGGACTGGGGTCACTCCGT	GTTGGGCCGTCTC-CTTGGAT	CCGAGTACCAGGTCATCT	981	
Sbjct 2528	GATGGACTGGGGTCACTCTG	CTCTCGGT-GTCTGCTGGGC	TCCGAAACCAGGTGATCT	2586	
Query 982	ATTTCTTTCAGCGCTGACCT	GGGCATCTCCTCACTGTG	CACCTCTTCAGTATCCAG	1041	
Sbjct 2587	ATTTCTTTCAGCGCTGACCT	GGAGCTCTCTCCACCGT	ACATCTCTCAGTATACCCG	2646	
Query 1042	AGCAACCTCTG	1052			
Sbjct 2647	AGAAGCCTCTG	2657			

Se descargó la secuencia homologa y se identificaron las regiones de los *primers* mediante el alineamiento de las secuencias empleando el programa bioinformático CLC genomics Workbench 3.6.5 (QIAGEN) (Figura 3).

Figura 3

Alineamiento de las secuencias del gen slc45a4 identificado en Paco (P. brachypomus)



Se utilizó la misma región para el diseño de *primers* específicos para Paco (*P. brachypomus*), dichas secuencias se analizaron en el programa BLAST-Primers (Ye et al., 2012), obteniéndose los resultados mostrados en la figura 4a.

Figura 4a

Secuencias de los primers predecidos para el gen slc45a4 identificado en Paco (P. brachypomus)

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT	22	58.63	45.45	4.00	2.00
Reverse primer	GTGACAGTATGTAGGGTCTCC	21	56.92	52.38	4.00	2.00
Products on target templates						
>XM_036589010.1 PREDICTED: Colossoma macropomum solute carrier family 45 member 2 (slc45a2), mRNA						
product length = 120						
Forward primer	1	TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT	22			
Template	2137	2158			
Reverse primer	1	GTGACAGTATGTAGGGTCTCC	21			
Template	2256	2236			

Basados en el análisis anterior se pudieron seleccionar dos juegos de *primers* específicos de aproximadamente 120 nucleótidos (Figura 4 b).

Figura 4b

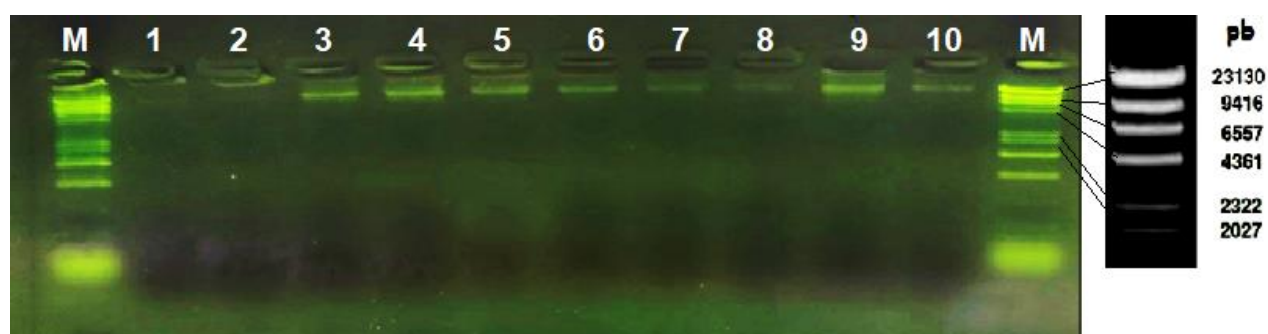
Secuencias de los *primers* para el gen *slc45a4* para Tilapia (*O.niloticus*) y Paco (*P. brachypomus*)

Primers ID	Strand	Lentgh	Tm	GC	Self Complementa ry	Self 3' complementar y	Product length	Species
TGTACAGCTTGGTGTGGTTGAT	F	22	60.16	45.45	6.00	2.00	120	<i>O.niloticus</i>
GTGCCAGGATGTAAGGCCTCC	R	21	62.80	61.90	6.00	2.00		
TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT	F	22	58.63	45.45	4.00	2.00	120	<i>P. brachypomus</i>
GTGACAGTATGTAGGGTCTCC	R	21	56.92	52.38	4.00	2.00		

En la figura 5, se visualiza los resultados de las corridas electroforéticas para las muestras de ADN extraídos de las cuatro especies ictícolas. Se obtuvo una banda única amplificada de aproximadamente 21 000 pb que demuestra que no hay degradación del material genético.

Figura 5

Corrida electroforética de las muestras de ADN extraídas (Banda amplificada de 21 000 pb aproximadamente).



Nota. Especímenes de peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco silvestre; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar silvestre; 10 = Oscar albino (M = Marcador de peso molecular fago lambda digerido con Hind III).

En la figura 6, se observa que las bandas del ADN amplificadas del gen *slc45a4* con los primers para Tilapia (*O. niloticus*) tuvieron un tamaño aproximado entre 100 a 200 pb.

Figura 6

Gel de amplificación de los primers para el gen *slc45a4* de tilapia

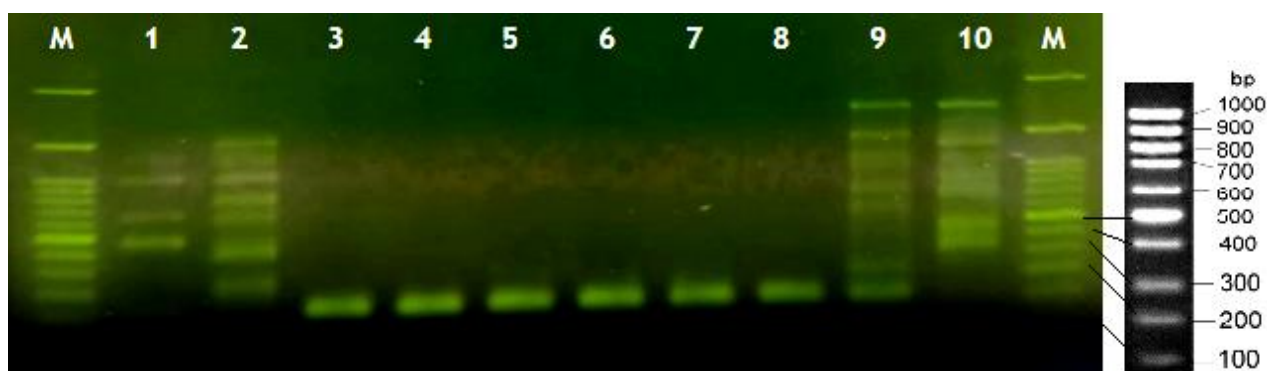


Nota. Gel de amplificado con los primers para el gen *slc45a4* del pez Tilapia y probado para los peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar; 10 = Oscar albino (M = Marcador de peso molecular de 100pb).

En la figura 7, se observa que las bandas del ADN amplificadas del gen *slc45a4* con los primers para Paco (*P. brachypomus*) tuvieron un tamaño aproximado entre 100 a 200 pb.

Figura 7

Gel de amplificación para los primers del gen *slc45a4* de Paco.



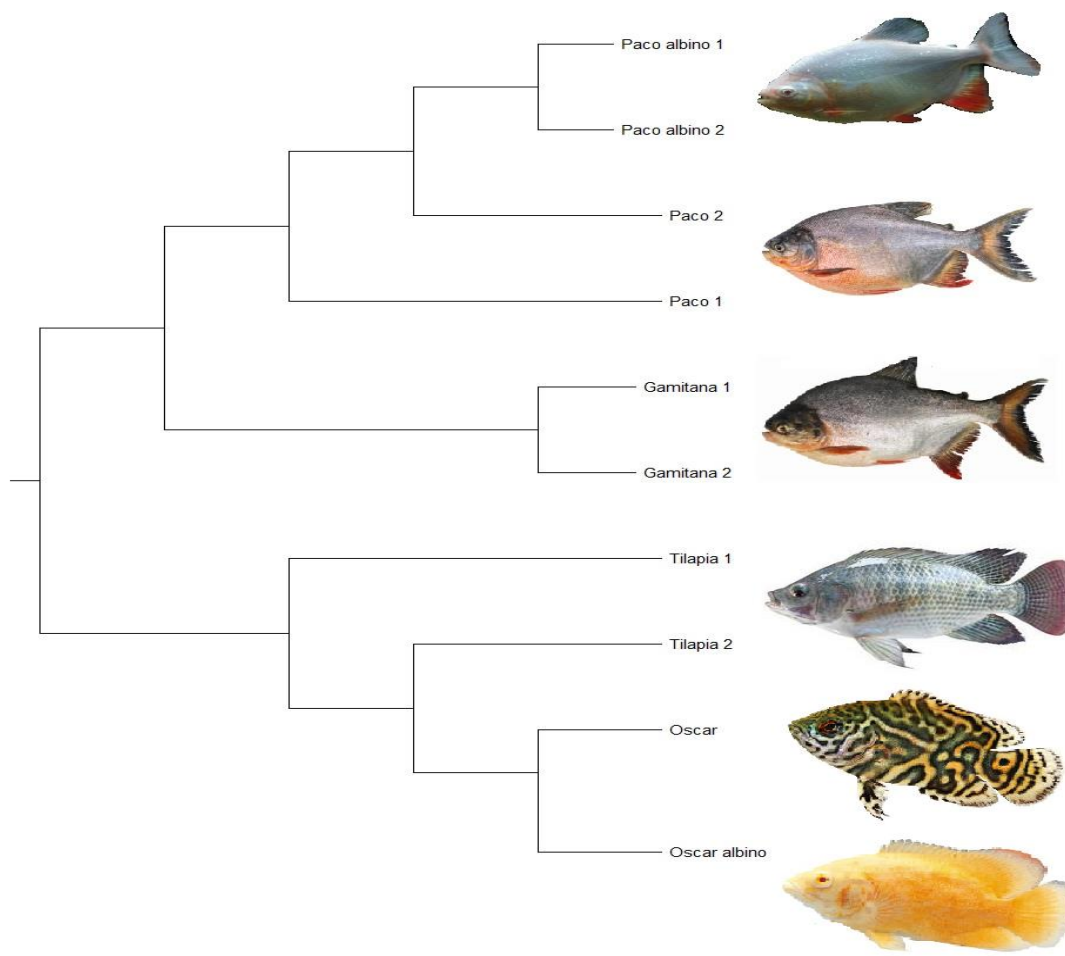
Nota. Gel de amplificado con los primers para el gen *slc45a4* del pez Paco y probado para los peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar; 10 = Oscar albino (M = Marcador de peso molecular de 100pb).

Análisis de la secuencia nucleotídica del gen *slc45a4*

Se comparó las secuencias nucleotídicas consenso del gen *slc45a4* de las cuatro especies de peces: Paco (*P. brachypomus*), Gamitana (*C. macropomum*), Tilapia (*O. niloticus*) y Oscar (*A. ocellatus*). Se utilizó el programa Bioedit para alinear y eliminar los “Gaps” quedando una secuencia consenso de 103 nucleótidos. Con el programa MEGA se realizó el análisis filogenético (Anexo 1). En la Figura 8, se observa el árbol filogenético obtenido de la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen de *slc45a4*.

Figura 8

Árbol filogenético obtenido de las secuencias del gen *slc45a4* de las cuatro especies de ictícola.



Nota. De arriba hacia abajo Paco albino, Paco, Gamitana, Tilapia, Oscar y Oscar albino.

DISCUSIÓN

La coloración está determinada principalmente por diversos pigmentos sintetizados por cromatóforos o células pigmentarias. Una diversidad de células pigmentarias, asociadas con una serie de factores celulares, nutricionales, fisiológicos, genéticos y ambientales, hacen que la piel de los peces se pigmente en un proceso biológico complicado. Hasta ahora, seis tipos de células pigmentarias, incluidos los melanocitos (negro, oscuro marrón), xantóforos (amarillo), eritróforos (rojo y naranja), iridóforos (reflectantes), leucóforos (blanco) y cianóforos (azul), se han reportado en vertebrados. Los peces teleósteos, que reflejan iridóforos, poseen los seis tipos de células pigmentarias (Kelsh, 2004). Se ha reportado que docenas de genes están involucrados en el proceso de pigmentación a través de la identificación de las mutaciones de pigmentación, pero los mecanismos moleculares del color de la piel de los peces son los menos comprendidos (Braasch et al., 2007; Parichy, 2006). No hay evidencia empírica de este gen con relación al fenotipo. Hay un mutante OCA4 único en el pez Medaka (*Oryzias latipes*) que exhibe albinismo solo en la piel. Existen algunos trabajos que establecen la relación causal *slc45a2*-OCA4 que generaría la mutación específica de la piel produciendo albinismo (Iida et al., 2004; Fukamachi et al., 2008).

En los últimos diez años, combinando bioinformática, biología computacional, secuenciación de genes o genoma y genómica funcional, se ha generado información de las secuencias para peces teleósteos. Con algunas excepciones, la mayor parte de esta información está disponible a la comunidad científica, sin embargo, en los teleósteos las secuencias a menudo carecen de un apoyo adecuado o anotación por lo que no siempre es fácil decidir qué secuencia es la de interés, principalmente por la presencia de redundancia en los bancos de datos y/o genes duplicados. Hoy en día, una aproximación más detallada de las secuencias de genes, ARNm y proteínas implicadas en funciones de transporte de solutos a través de las membranas de las células de los peces teleósteos es necesaria para dilucidar el

papel de los transportadores en la fisiología de los peces teleósteos, con la perspectiva de confirmar viejos conceptos y establecer nuevos, y aplicar la información más relevante para la salud, nutrición y bienestar de las especies cultivadas (Verri et al., 2012).

Actualmente se dispone del genoma completo secuenciado de Tilapia (*O. niloticusi*) (Genbank, 2020^a). También se tiene parte del genoma de Paco (*P. brachypomus*) donde está la secuencia nucleotídica del gen del *slc45a4* que sirvió para diseñar los primers para amplificar el mencionado gen en este estudio (Genbank, 2020^b).

En cuanto al proceso de extracción de ADN éste fue óptimo evidenciándose sólo una banda muy detallada para el proceso de amplificación por PCR. Todas las muestras dieron positivo para el gen *slc45a2* con una secuencia de una longitud aproximada entre 100 a 200pb que fue lo esperado del análisis bioinformático (Figuras 4 y 5).

En la Figura 6, se visualiza el gel del amplificado con los *primers* para el gen *slc45a4* de Tilapia, donde solamente amplificó para Tilapia, Oscar y su versión albina. Tanto la especie *O. niloticus* como *A. ocellatus* son cíclidos muy importantes por ser peces empleados para consumo humano y en caso del Oscar por ser muy popular como especie ornamental (Kullander, 1998; Sparks & Smith, 2004). En la figura 8, se muestra la estrecha relación filogenética entre estas dos especies.

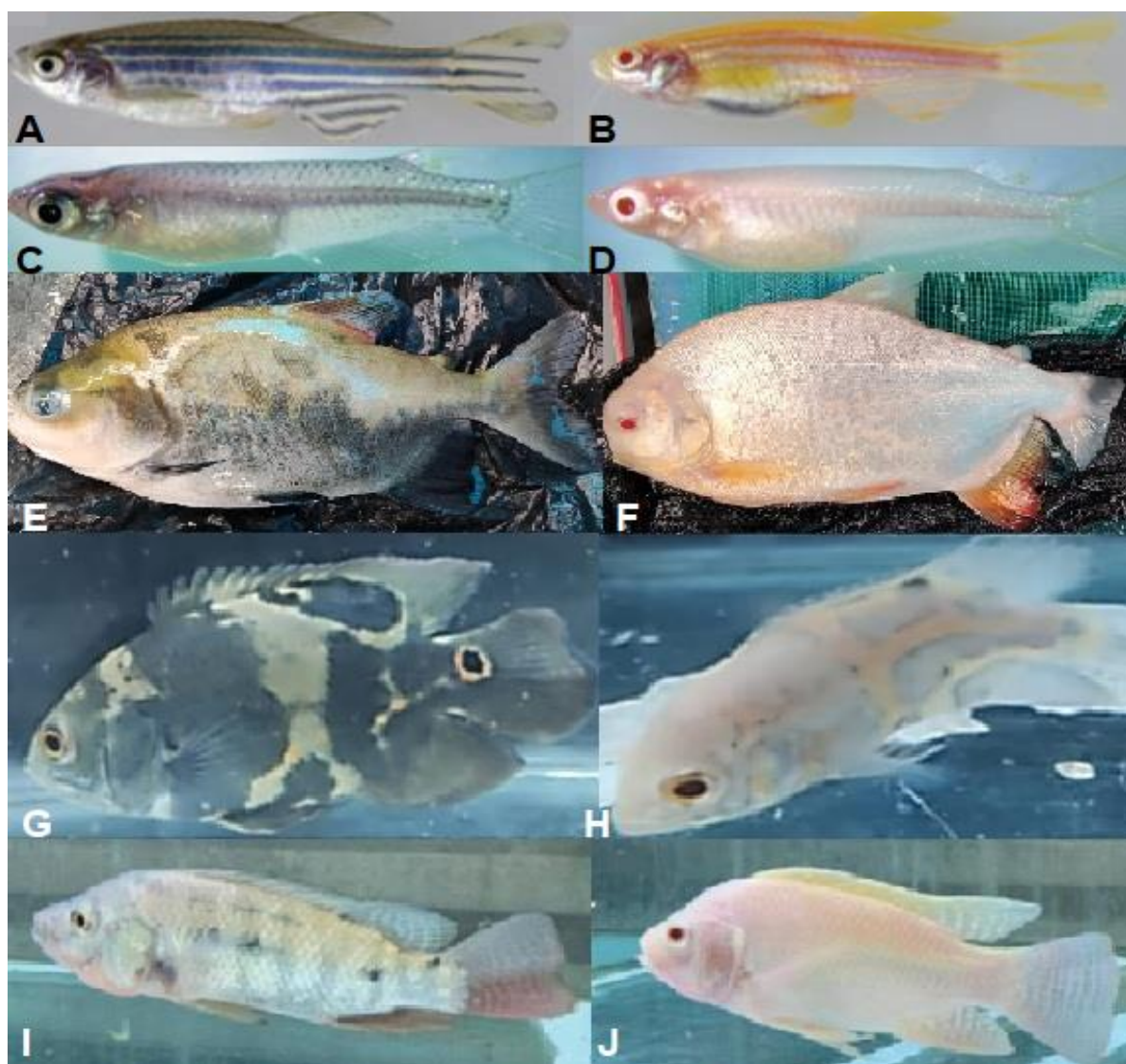
En la Figura 7, se visualiza el gel del amplificado con los *primers* para el gen *slc45a4* del Paco, donde solamente amplificó para Paco y su versión albina junto con Gamitana. Tanto la especie *P. brachypomus* como *C. macropomum* son de la familia Serrasalmidae y muy importantes por ser peces comestibles (FishBase, 2022). En la Figura 8, se muestra la estrecha relación filogenética entre estas dos especies.

Actualmente con la edición génica por Crispr Cas se podría obtener nuevas líneas de peces comerciales como es el caso de la tilapia o en los ejemplos con el pez Cebra (Dooley et al, 2012; Zebrafish Information Network, 2022) y el pez Medaka (Fukamachi et al., 2008)

que son modelos de la versión mutada de albinismo. Con color de pieles más atractivas, uniformes y rosadas que aumentaría su valor comercial. Se tiene la variedad albina en el pez Oscar, y se ha obtenido por edición génica o selección artificial la versión albina de la Tilapia. Asimismo, en forma natural se tiene la versión albina de Paco (figura 9). La versión albina de la Gamitana no se ha reportado a la fecha, pero por su similitud con las secuencias del gen *slc45a4* en ambas especies, puede hacer posible la obtención de esta nueva variedad.

Figura 9

Modelos de versión mutada de albinismo en peces de consumo y ornamentales.



Nota. Lado izquierdo versión con pigmentación. Lado derecho versión albina. Á, B = Pez Cebra (*Danio rerio*), C, D = Pez Medaka (*Oryzias latipes*), E, F = Paco (*Piaractus brachypomus*), G, H = Oscar (*Astronotus ocellatus*), I, J = Tilapia (*Oerochromis niloticus*).

CONCLUSIONES

1. Todas las muestras de las diez especies amplificaron en una sola banda para uno u otro juego de *primers* diseñados para el gen de *slc45a4* con una secuencia de una longitud entre 100 a 200pb aproximadamente.
2. Las secuencias obtenidas de ambos juegos de *primers* del gen de *slc45a4* de todas las especies de peces analizados se correspondieron con la secuencia del gen *slc45a4a* que está asociado a la falta de pigmentación corporal reportada por la bibliografía científica.
3. Del análisis filogenético del gen de la *slc45a4* se evidenció una similitud de la secuencia de nucleótidos entre la especie de *Oerochromis niloticus* y la especie *Astronotus ocellatus* ambos de la familia Cichlidae, y entre las especies de la familia Serrasalmidae *Piaractus brachypomus* y *Colossoma macropomum*.

REFERENCIAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3), 403-10. 2836(05)80360-2. PMID: 2231712. <https://doi.org/10.1016/S0022>
- Baltazar, P. y Palacios, J. (2020). Malformaciones congénitas en larvas de *Oreochromis niloticus* durante la incubación en criadero. *Rev Inv Vet Perú* 2020, 31(4): e17342 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.17342>
- Basolo, A. (2006). Genetic Linkage and Color Polymorphism in the Southern Platyfish (*Xiphophorus maculatus*): A Model System for Studies of Color Pattern Evolution. *Zebrafish*, 3 (1), 65-83. <https://doi.org/10.1089/zeb.2006.3.65>
- Braasch, I.; Schartl, M. & Volff, J. (2007). Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 7(74), 14-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-74>
- Dey, V. (2016). Global Trade in Ornamental Fish. INFOFISH International 4: 52-55. Recuperado de: <https://www.bassleer.com/ornamentalfishexporters/wp-content/uploads/sites/3/2016/12/GLOBAL-TRADE-IN-ORNAMENTAL-FISH.pdf>
- Dooley, CM, Schwarz, H., Mueller, K.P., Mongera, A., Konantz, M.; Neuhauss, S., Nusslein-Volhard, C., & Geisler, R. (2012). Slc45a2 y V-ATPase son reguladores de la homeostasis del pH melanosómico en el pez cebra, lo que proporciona un mecanismo para la evolución y la enfermedad del pigmento humano. *Pigment Cell Melanoma Res*, 26, 205–217. <https://doi:10.1111/pcmr.12053>
- Fernandes, J. B. K.; Lochmann, R.; Alcántara, F. B. (2004). Apparent digestible energy and nutrient digestibility coefficients of diet ingredients for pacu *Piaractus brachypomus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 35, 237–244

FishBase (2022). Froese, R. and D. Pauly. Editors. 2022. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org

Fukamachi, Shoji; Kinoshita, Masato; Tsujimura, Taro; Shimada, Atsuko; Oda, Shoji; Shima, Akihiro; Meyer, Axel; Kawamura, Shoji & Mitani, Hiroshi. (2008). Rescue From Oculocutaneous Albinism Type 4 Using Medaka slc45a2 cDNA Driven by Its Own Promoter. *Genetics*, 178, 761-9. 10.1534/genetics.107.073387.

García, A.; Tello, S.; Vargas, G.; Duponchelle, F. (2009). Patterns of commercial fish landings in the Loreto region (Peruvian Amazon) between 1984 and 2006. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35, 53- 67.

Genbank^a (2022). ARNm del Miembro 2 de la familia 45 de portadores de soluto de *Oreochromis niloticus* (slc45a2), XM_003451484.3. Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_003451484

Genbank^b (2022). ARNm del Miembro 2 de la familia 45 de portadores de soluto de (*Piaractus brachypomus*) (slc45a2), XM_0036589010.1 Recuperado de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/XM_036589010

Geneaid Biotech (2017): Instruction Manual gSYNC™ DNA Extraction Kit. Solid Tissue Protocol Procedure. Recuperado de: <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15.pdf>

Han, J.; Kraft, P.; Nan, H.; Guo, H.; Chen, C.; Qureshi, A.; Hankinson, E.; Hu, F.; Duffy, D.; Zhao, Z.; Martin, N.; Montgomery, G.; Hayward, N. & Hunter, A. (2008). Genome-Wide Association Study Identifies Novel Alleles Associated with Hair Color and Skin Pigmentation. *PLoS Genet*, 4(5):1-11. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000074>

- Iida, A.; Inagaki, H.; Suzuki, M., Wakamatsu, Y. & Hori, H. (2004). The tyrosinase gene of the i(b) albino mutant of the medaka Fish carries a transposable element insertion in the promoter. *Pigment Cell Res*, 17, 158–164.
- Jeanmougin, F.; Thompson, J.; Gouy, M.; Higgins, D.; Gibson, T. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Science*, 23, 403-405.
- Kelsh, R. N. Genetics and evolution of pigment patterns in fish. (2004). *Pigment Cell Res*, 17, 326–336. DOI: [10.1111/j.1600-0749.2004.00174.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2004.00174.x)
- Kullander, SO (1998). Una filogenia y clasificación de los cíclidos sudamericanos (Teleostei: Perciformes). En LR Malabarba; RE Reis; RP Vari; ZM Lucena; CAS Lucena (eds.). *Filogenia y clasificación de peces neotropicales*. Porto Alegre: EDIPUCRS. págs. 461–498. ISBN 978-85-7430-035-1.
- 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: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lopera-Barrero, N.; Povh, J.; Ribeiro, R.; Gomes, P.; Jacometo, C. & Da Silva Lopes, T. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.* 35, (1), 77-86.
- Matsumoto, Y., Oota, H., Asaoka, Y. (2009). Medaka: a promising model animal for comparative population genomics. *BMC Res Notes* 2, 88 <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-88>
- Parichy, D. M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* (Edinb). 97, 200–210. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800867>
- QIAGEN CLC Genomics Workbench 20.0 <https://digitalinsights.qiagen.com/>

- Sparks, J. & Smith, W. (2004). Filogenia y biogeografía de peces cíclidos (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladística*, 20 (6): 501–517. CiteSeerX 10.1.1.595.2118. doi:10.1111/j.1096-0031.2004.00038.x.
- Segev-Hadar, A., Slosman, t., Rozen, a., Sherman, A., Cnaani, A., and Biran, J. (2021). Genome Editing Using the CRISPR-Cas9 System to Generate a Solid- Red Germline of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *The CRISPR Journal*, 4 (4): 583-594.
- Software CLC Genomics Workbench (Versión 3.6.5). Recuperado de: <https://digitalinsights.qiagen.com/>
- Verri, T.; Terova, G.; Romano, A.; Barca, A.; Pisani, P.; Storelli, C. & Saroglia, M. (2012). The SoLute Carrier (SLC) Family Series in Teleost Fish. (Ed.) Saroglia, M. & Liu, Zhanjiang (2012). *Functional Genomics in Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc. 219-320.
- Ye, J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 2012 Jun 18;13:134. PMID: 22708584; PMCID: PMC3412702. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zebrafish Information Network (ZFIN). 2022. <https://zfin.org/ZDB-FISH-150901-7721>

Anexo 1: Secuencias nucleotídicas consenso alineadas de los 10 especímenes analizados:
Tilapia, Paco y paco albino, Gamitana. Oscar y Oscar albino.

1. Tilapia_1	CAGCTTGGTGTGGTTGAT-CAGCCCCATCCTGGGCTTCC TGC TCCA GCCCATCA TCGGTTCA GCCA GCGACTA TTGCCGCTCGCCGTGGGGCCGGCGGAGGCC
2. Tilapia_2	CAGCTTGGTGTGGTTGAT-CAGCCCCATCCTGGGCTTCC TGC TCCA GCCCATCA TCGGTTCA GCCA GCGACTA TTGCCGCTCGCCGTGGGGCCGGCGGAGGCC
3. Paco_1	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
4. Paco_2	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
5. Paco_albino_1	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
6. Paco_albino_2	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
7. Gamitana_1	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
8. Gamitana_2	CAGTATGTA GGGTCTCC TGC GGCCCA TCGCGAGCTCGCTGGCTGA GCCGATGA CTGGCTGCAGGATGAATCCCA GCACGGGGCTGATGAGCCACCCAGACT
9. Oscar	CAGCTTGGTGTGGTTGAT-CAGCCCCATCCTGGGCTTCC TGC TCCA GCCCATCA TCGGTTCA GCCA GCGACTA TTGCCGCTCGCCGTGGGGCCGGCGGAGGCC
10. Oscar_albino	CAGCTTGGTGTGGTTGAT-CAGCCCCATCCTGGGCTTCC TGC TCCA GCCCATCA TCGGTTCA GCCA GCGACTA TTGCCGCTCGCCGTGGGGCCGGCGGAGGCC