



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE MIOSTATINA
ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN GAMITANA (*Colossoma
macropomum*, Cuvier 1818)

**Línea de investigación:
Genética, bioquímica y biotecnología**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor

Medina Gómez, Hugo Alberto

Asesor

Scotto Espinoza, Carlos Jesús
ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurado

Robles Román, Margarita Elena

Sáez Flores, Gloria Maria

Salas Asensios, Ramsés

Lima - Perú

2025



SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE MIOSTATINA ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN GAMITANA (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

17%

FUENTES DE INTERNET

5%

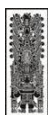
PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	revistas.urp.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	cibnor.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	2%
3	www.colibri.udelar.edu.uy Fuente de Internet	1%
4	vdocuments.es Fuente de Internet	1%
5	patents.google.com Fuente de Internet	1%
6	ri.uaq.mx Fuente de Internet	1%
7	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
8	Submitted to ipn Trabajo del estudiante	1%



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

SECUENCIAMIENTO Y ANÁLISIS DEL PROMOTOR DEL GEN DE
MIOSTATINA ASOCIADA AL CRECIMIENTO MUSCULAR EN GAMITANA
(*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)

Línea de Investigación:

Genética, bioquímica y biotecnología

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Autor

Medina Gómez, Hugo Alberto

Asesor

Scotto Espinoza, Carlos Jesús

ORCID: 0000-0003-1592-0419

Jurado

Robles Román, Margarita Elena

Sáez Flores, Gloria Maria

Salas Asensios, Ramsés

Lima-Perú

2025

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT.....	5
I. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Descripción y Formulación del Problema.....	6
1.2 Antecedentes.....	7
1.3 Objetivos.....	8
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	8
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	9
1.4 Justificación	9
1.5 Hipótesis	10
1.5.1 <i>Hipótesis nulas</i>	10
1.5.2 <i>Hipótesis alternativas</i>	10
II. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Bases teóricas sobre el tema de investigación.....	11
2.2 Gen de miostatina	11
2.3 Promotor del gen de miostatina	112
2.4 Edición molecular del gen de Miostatina.....	114
III. MÉTODO	15
3.1 Tipo de investigación.....	15
3.2 Ámbito temporal y espacial	15
3.2.1 <i>Ámbito temporal</i>	15
3.2.2 <i>Ámbito espacial</i>	15
3.3 Variables	16
3.3.1 <i>Variable independiente</i>	16
3.3.2 <i>Variable dependiente</i>	16
3.4 Población y muestra.....	16
3.4.1 <i>Población</i>	16
3.4.2 <i>Muestra</i>	16
3.5 Instrumentos.....	16
3.5.1 <i>Reactivos</i>	16
3.5.2 <i>Equipos</i>	17
3.5.3 <i>Software bioinformáticos y bases de datos</i>	17
3.6 Materiales	18
3.6.1 <i>Materiales de bioseguridad</i>	18
3.6.2 <i>Material biológico</i>	18
3.6.3 <i>Material de laboratorio</i>	18

3.7	Procedimientos.....	18
3.7.1	<i>Diseño de Primers</i>	18
3.7.2	<i>Técnica de recolección de datos</i>	19
3.7.3	<i>Toma de muestra de tejido</i>	19
3.7.4	<i>Extracción de ADN de tejido mediante gSYNC DNA Extraction Kit – GENEaid</i>	19
3.7.5	<i>Determinación de la calidad y concentración de ADN</i>	20
3.7.6	<i>Amplificación mediante PCR</i>	20
3.7.7	<i>Evaluación del amplicón</i>	21
3.7.8	<i>Servicio de Secuenciamiento</i>	21
3.7.9	<i>Análisis de datos</i>	21
3.8	Consideraciones éticas	22
IV.	RESULTADOS.....	24
4.1	Extracción de ADN y Calidad de ADN	24
4.2	PCR punto final.....	25
4.3	Análisis de Secuenciamiento Sanger	26
4.4	Análisis Filogenético	26
V.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	36
VI.	CONCLUSIONES.....	38
VII.	RECOMENDACIONES	40
VIII.	REFERENCIAS.....	41
IX.	ANEXOS	48

RESUMEN

La presente investigación realizada identifica por primera vez parte de la secuencia nucleotídica del promotor del gen de miostatina asociada al crecimiento muscular del pez gran importancia nutricional para la región de la selva peruana. Con la información reportada en el Genbank, se utilizó la secuencia del promotor del gen de Miostatina de la 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 el pez Gamitana obteniéndose una secuencia única de aproximadamente 351 pb. Un análisis bioinformático posterior de las secuencias promotoras amplificadas alineadas permitió establecer su alta homología conservada (99.11%) entre los promotores de ésta especie con las secuencias reportadas para la Tilapia. Asimismo, la secuencia nucleotídica consenso de 337 pb del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) con las secuencias de la Tilapia analizadas generó un árbol filogenético acorde a la historia evolutiva predicha. Donde la secuencia promotora esta muy conservada evolutivamente y cercana a esta Familia de Cíclidos. Se concluye que éstas secuencias obtenidas del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana podrían ser útiles para su edición génica por *Crispr Cas* a futuro. Y generar una línea “hipermuscularizada” de interés comercial.

Palabras clave: *Colossoma macropomum*, miostatina, acuicultura, promotor.

ABSTRACT

The present investigation carried out identifies for the first-time part of the nucleotide sequence of the promoter of the myostatin gene associated with the muscular growth of the Gamitana fish (*Colossoma macropomum*; Cuvier, 1818) from Peru, which is a fish resource of great nutritional importance for the region of the Peruvian jungle. With the information reported in the Genbank, the promoter sequence of the Tilapia Myostatin gene (*Oerochromis niloticus*; Genbank with access No. XM_003458832) was used to design a set of primers that amplified the Tilapia promoter sequence. And then these were used in the Gamitana fish, obtaining a unique sequence of approximately 351 bp. A subsequent bioinformatics analysis of the aligned amplified promoter sequences allowed establishing their high conserved homology (99.11%) between the promoters of this species with the sequences reported for Tilapia. Likewise, the consensus nucleotide sequence of 337 bp of the promoter of the Myostatin gene of the Gamitana fish (*Colossoma macropomum*) with the Tilapia sequences analyzed generated a phylogenetic tree according to the predicted evolutionary history. Where the promoter sequence is evolutionarily highly conserved and close to this Family of Cichlids. It is concluded that these sequences obtained from the promoter of the Myostatin gene of the Gamitana fish could be useful for gene editing by Crispr Cas in the future. And generate a "hypermuscularized" line of commercial interest.

Keywords: *Colossoma macropomum*, myostatin, aquaculture, promoter.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una actividad con gran potencial de desarrollo en la selva peruana debido a la abundancia de agua dulce y peces comestibles. Además, la acuicultura contribuye a la seguridad alimentaria ya que es una fuente de proteínas e ingresos económicos.

1.1. Descripción y Formulación del Problema

En el Perú actualmente la acuicultura está aún en sus inicios y se basa en la producción local de *scallops* “Concha de Abanico”, en el mar, *Oncorhynchus* spp “trucha”, principalmente en la sierra, *Litopenaeus* spp “Langostinos”, y *Oreochromis* spp, “Tilapia” y algunos peces amazónicos. Dentro de los peces amazónicos es la Gamitana (*Colossoma* sp.) y el Paco (*Piaractus* sp.) son los más prometedores para la producción (Ramírez et al., 2018).

La miostatina es producida por el gen MSTN, también llamado como la GDF8, es un regulador del crecimiento del músculo esquelético que funciona de forma negativa. Se ha reportado que, en casos de mutación natural o inducida, produce hipertrofia de los músculos y esto a un aumento de la masa muscular en mamíferos y otros vertebrados (Cabanillas et al., 2017).

Este gen de la miostatina se puede encontrar en peces de importancia comercial. Se ha secuenciado total o parcialmente las mRNA de la miostatina en Tilapias del Nilo (*Oreochromis niloticus*), pez cebra (*Danio rerio*) o trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), entre otros. En alguno de ellos, manipular el gen de la Miostatina (MSTN), conducirá directamente a mejores tasas de crecimiento (Elkatatny et al., 2016; Rescan et al., 2001).

La información que se conoce del gen miostatina es muy limitada en peces amazónicos. Por tal motivo no se tiene estudios en el gen MSTN de la especie Gamitana (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818).

El presente trabajo realizará un estudio genético molecular del gen de la Miostatina, mediante el uso del análisis de la secuencia 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.

En este estudio se pretende analizar las modificaciones que pueden descubrirse mediante la secuenciación de una porción de la región promotora del gen de la miostatina del pez gamitana (*Colossoma Macropomum*), para permitir la investigación sobre mejora genética y futura edición genética.

Formulación del Problema

¿Es posible usar primers previamente diseñados para el pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y el pez Trucha (*Oncorhynchus mykiss*) para obtener la secuencia nucleotídica del promotor del gen de la Miostatina del Gamitana (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) del Perú, y que la misma pueda presentar homología o diferencias con las secuencias promotoras de otras especies ictícolas previamente descritas?

1.2. Antecedentes

La miostatina (GDF8) pertenece a la superfamilia del factor de crecimiento transformante β , es fundamental para la regulación, el desarrollo y la función del músculo esquelético, y se expresa predominantemente mediante la inhibición del crecimiento y la

diferenciación celular (Hanset et al., 1982). La eliminación del gen de la miostatina provoca hipertrofia muscular debido a la unión y aumento de más fibras (McPherron et al., 1997).

Se han desarrollado estrategias efectivas para bloquear la vía de señalización de la miostatina en esta superfamilia. Se ha demostrado que se puede esperar que los inhibidores de la miostatina aumenten significativamente el crecimiento muscular en modelos animales (Xu et al., 2013). La miostatina es un regulador del crecimiento del músculo esquelético. Ocurre en ganado con fenotipo de doble musculatura es debido a hipertrofia del músculo esquelético (aumento del diámetro de las fibras) y/o hiperplasia (aumento del número de fibras) (Kambadur et al., 1997).

Radaeri et al. (2003) caracterizaron la secuencia y el patrón de expresión de la miostatina en varias especies de peces de importancia comercial.

Se ha caracterizado molecularmente la secuencia del gen de la miostatina en distintos animales. Principalmente de mamíferos a partir de músculo esquelético de peces de importancia comercial y ornamental como: *Danio rerio* “pez cebra” (Xu et al., 2007), *Oryzias latipes* “Medakas”(Sawari et al., 2010), *Oreochromis mossambicus* “Tilapia” (Rodgers et al., 2001), (Gutiérrez de Paula et al., 2014), *Salmo salar* “Salmón del Atlántico” (Østbye et al. 2001), *Ictalurus punctatus* “bagre de canal “ (Khalil et al. 2017), *Onchorynchus mykiss* “trucha” (Rescan, Jutel y Rallièrre, 2001), entre otras especies.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General.

Identificar y analizar la secuencia nucleotídica del promotor de la miostatina involucrado en la generación de músculo de la especie ictícola Gamitana (*Colossoma macropomum*) con potencial comercial para la acuicultura peruana.

1.3.2. *Objetivos Específicos.*

- Probar primers específicos diseñados para el pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) para el promotor del gen de la Miostatina en la especie ictícola *Colossoma macropomum* (pez Gamitana).
- Identificar y secuenciar parte del promotor del gen de la Miostatina en la especie ictícola *Colossoma macropomum* (pez Gamitana).
- Analizar la variabilidad de las secuencias amplificadas del promotor del gen de Miostatina de la especie ictícola *Colossoma macropomum* (pez Gamitana) con la secuencia promotora de la Tilapia reportada en el banco de datos de genes.

1.4. **Justificación**

La acuicultura es una actividad con gran potencial de desarrollo en la selva peruana debido a la abundancia de agua dulce y peces comestibles. Además, la acuicultura contribuye a la seguridad alimentaria ya que es una fuente de proteínas e ingresos económicos. La acuicultura en el Perú ha crecido un 13% en la última década, concentrándose en tres especies (trucha, conchas de abanico y langostino), que representan el 95% de la producción total. En 2019 la producción acuícola peruana fue de 161.279,12 toneladas. Los principales productores de la acuicultura selvática en el Perú son las comunidades y pequeños agricultores que incursionan en esta actividad promovido por el estado. Debe evaluarse el alcance real de las oportunidades de desarrollo y sus impactos, especialmente para el tipo de acuicultura de recursos limitados. (Quesquén et al., 2022).

El gen de la miostatina es un regulador negativo de la masa del músculo esquelético en todas las especies animales. De manera similar, la inactivación del gen de la miostatina, ya sea por mutaciones naturales o inducidas, induce un fenotipo hipermuscular debido a la proliferación de células musculares en los vertebrados, incluidos los peces, duplicando así la masa muscular y el peso corporal. Esto tiene la ventaja de que los animales pueden ganar peso y tener una mayor ganancia a nivel comercialmente. Esto se puede lograr gracias a que se ve aumentado el peso de los individuos (McPherron et al., 1997).

En el presente estudio se realizará el secuenciamiento del promotor gen de la Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), pues en los peces, el músculo esquelético constituye entre el 40 y el 60 por ciento de la masa corporal y es la principal fuente de proteínas. Se ha examinado el papel del promotor del gen de la miostatina en los teleósteos, y los métodos de mejora biotecnológica de la acuicultura han encontrado atractiva su inactivación.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nulas

El secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en los individuos analizados del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) no presentaron variabilidad o mutaciones en su secuencia nucleotídica en comparación con la secuencia reportada del pez Tilapia.

Hipótesis alternativas

El secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en los individuos analizados del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) 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 proteína producida por el gen *mstn* llamado miostatina es crucial en la regulación y el crecimiento donde se expresa mediante la inhibición de la función del músculo esquelético.

El número de mioblastos disminuye principalmente por el crecimiento y la diferenciación. el grado de elongación de las fibras específicas de un gen, en las divisiones de diferenciación terminal, y en ambas. (Xu et al., 2003),

Pues la miostatina (MSTN), también conocida como factor de diferenciación del crecimiento 8 (GDF-8), es un inhibidor de la diferenciación y proliferación de células de miocitos en mamíferos. A través de la inactivación de Cdk2-Cdk4 (quinasas dependientes de ciclina) por p21 y p300, respectivamente, la miostatina inhibe la proliferación celular al detener el ciclo celular en la fase G1. Como resultado, la ciclina D1 se degrada, dejando al retinoblastoma (Rb) en su estado activo (hipofosforilado). Esto hace que el ciclo celular se detenga en la fase S, lo que plantea la posibilidad de que la miostatina funcione como un factor de supervivencia en los mioblastos. , deteniendo el ciclo celular, impidiendo la apoptosis y manteniendo un estado de senescencia, provocando su diferenciación. (Torres, 2018).

2.2. Gen de miostatina

El fenómeno biológico conocido como doble musculatura o hipertrofia muscular. Fue identificado en 1997 por McFerron como mutaciones en el gen de la miostatina bovina.

También se vio el efecto regulador negativo del crecimiento muscular en ratones con mutagénesis inducida (MSTN $-/-$), es decir si la posibilidad de producir miostatina. Con una masa do a tres veces el control no mutante, debido a la hiperplasia o hipertrofia muscular. Se

ha caracterizado el gen MSTN de distintos animales incluyendo al ser humano, que en el caso de los vertebrados consta de 3 exones y 2 intrones. (Morelos, 2015)

Promotor del gen de Miostatina

Los promotores son regiones reguladoras que actúan en cis que controlan la transcripción de otras áreas cercanas o adyacentes al ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que se traduce en proteínas. Un promotor es una secuencia de ADN que contiene las regiones de unión para los factores de transcripción y está situado "aguas arriba" (hacia el extremo 5' de la región codificante de un gen). Por lo general, se cree que las secuencias del promotor están conectadas a la enzima ARN polimerasa II, que está a cargo de producir ARN. Sin embargo, existen secuencias de ADN específicas en una región promotora que sirven como sitios de unión para los factores de transcripción que actúan en trans, que pueden activar o inhibir la transcripción de un gen. La caja TATA o caja "Hogness", una secuencia de ADN consenso rica en adenina y timina, y/o un elemento iniciador que se une a los elementos de "acción posterior" pueden estar presentes en el núcleo del promotor. En algunos promotores sin caja TATA, el elemento iniciador también puede mediar en el inicio de la transcripción. La edición de promotores genéticos, mediante técnicas como CRISPR-Cas9, permite modificar la expresión de genes para aplicaciones en investigación, medicina y agricultura, como la mejora de resistencia en plantas. Ejemplos incluyen la alteración de promotores para generar modelos de enfermedad, optimizar el desarrollo de semillas en plantas mediante promotores específicos, o crear promotores sintéticos para controlar la expresión génica con alta precisión. (De Guglielmo & Fernandez, 2016).

La capacidad de los promotores para regular y controlar la expresión de genes importantes tanto en organismos naturales como alterados genéticamente es lo que los hace

interesantes. Como resultado de su capacidad para aumentar la actividad transcripcional, así como para ofrecer niveles adicionales de control, como a nivel de expresión génica específica de tejido o etapa, actualmente están siendo ampliamente estudiados en procesos biotecnológicos. (De Guglielmo & Fernandez, 2016). La edición de promotores representa un enfoque innovador para introducir la variación cuantitativa de rasgos (QTV). Sin embargo, es necesario establecer un sistema de edición de promotores eficiente para QTV. Se ha podido realizar en modelos vegetales combinado un modelo de estimación de la región clave del promotor y un sistema de edición singular o multiplexado eficiente basado en CRISPR-Cas12a. (Jianping et al., 2023).

La activación génica celular está controlada también por potenciadores (enhancers), que pueden estar lejos del gen. Los investigadores descubrieron factores candidatos mediante estudios de sensores que dependen de la distancia al potenciador, y luego analizaron el impacto de eliminar estos factores en la clasificación de genes según su distancia al potenciador. (Tjalsma, & Cell Genomics. 2024)

Los enhancers son clave en la regulación génica celular, pero la distancia al gen y su interacción por medio de la organización 3D del ADN, mediada por la extrusión de bucles (loop extrusion) y dominios como las TADs, es compleja. Los bucles formados por la proteína cohesina en sitios CTCF son responsables de esta organización, aunque las investigaciones sobre cómo facilitan o interfieren estas interacciones potenciador-promotor (E-P) han dado resultados contradictorios. Un estudio reciente utiliza pantallas de reporteros para analizar la relación entre la distancia E-P y la organización cromatínica, buscando resolver este dilema, ya que la manipulación local de CTCF afecta la expresión de genes, pero la disrupción global de cohesina tiene efectos mínimos. La interacción entre enhancers y promotores (E-P) está regulada por la organización 3D del ADN, especialmente la formación de TADs y bucles. Sin embargo, la forma exacta en que la extrusión de bucles facilita o

interfiere con estas interacciones E-P es incierta, ya que diferentes estudios han arrojado resultados contradictorios sobre el papel de CTCF y cohesin en la expresión génica. (Nagano & Hansen 2025)

2.3. Edición molecular del gen de Miostatina

El sistema Crispr/Cas9 se desarrolló como una herramienta innovadora para la edición específica del genoma (edición de genes) o el control de la expresión génica (Haselkorn et al., 2018).

El sistema CRISPR/Cas9, CRISPR (repeticiones palindrómicas cortas interespaciadas agrupadas regularmente) y Cas (proteínas asociadas a CRISPR) se utiliza para introducir DSBs en el genoma objetivo, induciendo así la recombinación homóloga. Este sistema está basado un mecanismo de defensa que forma parte del sistema inmunitario adaptativo de los procariotas (bacterias y arqueas) que utilizan para protegerse de la infección de elementos genéticos externos. Las bacterias son capaces de detectar secuencias genéticas afectadas por la infección por fagos o plásmidos, escindirlos y reemplazarlos con secuencias funcionales, integrando fragmentos de ADN extraño en sus genomas, proporcionando así protección frente a futuras invasiones. (Lebrero, 2014)

III. MÉTODO

3.1. Tipo de investigación

Este estudio es exploratorio ya que requiere examinar información específica sobre las especies bajo investigación. Además, se trata de un estudio de tipo cualitativo, ya que principalmente se busca información sobre el gen de la miostatina. Por tanto, también es un estudio experimental mediante manipulación de variables, ya que es necesario analizar la secuencia de nucleótidos del promotor del gen de la miostatina de la especie acuícola Gamitana (*Colossoma macropomum*). Además, según su conclusión, el estudio es hipotético a priori, ya que las hipótesis pueden confirmarse mediante observaciones y experimentos realizados sobre la base de los resultados obtenidos.

3.2. Ámbito temporal y espacial

3.2.1. *Ámbito temporal*

Se evaluó el secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en el pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) en el periodo desde el mes de mayo hasta el mes de julio del 2023.

3.2.2. *Ámbito espacial*

Se evaluó el secuenciamiento del promotor del gen de Miostatina en el pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) obtenido en el Laboratorio de Mejora Genética y Reproducción Animal de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la UNFV.

3.3. Variables

3.3.1. Variable independiente

Variabilidad genética de la secuencia nucleotídica del promotor del gen de Miostatina en la población de peces Gamitana (*Colossoma macropomum*) procedentes de la comunidad Santo Tomás del 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 nucleotídicas del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) procedentes de la zona de Alto Amazonas- Loreto.

3.4. Población y muestra

3.4.1. Población

Se trabajó con dos muestras de tejido de las aletas caudales de especímenes en estadio adulto del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) procedentes de la provincia Alto Amazonas del departamento de Loreto

3.4.2. Muestra

Dos especímenes en estadio adulto del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*).

3.5. Instrumentos

3.5.1. Reactivos

- ✓ Agua grado molecular BioRad de 500ml.
- ✓ Kid gSYNC DNA – extraction KIT- GENEaid.
- ✓ Etanol absoluto alisado Merck.
- ✓ Agarosa -Clever Scientific CSL- AG 500.

- ✓ Buffer carga – Blue Juice Gel Loading (10x).
- ✓ 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)
- ✓ 2Xpcr (i-STARMAX GH) – Master Mix – Intron

3.5.2. Equipos

- ✓ Vortex Mixer - WIZARD. Velp Scientific
- ✓ Centrifuga - Eppendorf
- ✓ Incubadora
- ✓ Cámara Electroforética horizontal
- ✓ Termociclador punto final (Marca SimpliAmp. Life technologies)
- ✓ Cabina de Flujo Laminar

3.5.3. Software bioinformáticos y bases de datos

- ✓ QIAGEN CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5) (*programa de análisis de secuencias*)
- ✓ Clustal X (Versión 2.1) (*programa de alineamiento*)
- ✓ FastQC (*aplicación de control de calidad*)
- ✓ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool (*herramienta de comparacion de secuencias*))
- ✓ Base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) y Genbank

3.6. Materiales

3.6.1. *Materiales de seguridad*

- Guardapolvo.
- Guantes quirúrgicos talla L - R&G.
- Mascarilla quirúrgica 3 pliegues - R&G.
- Cofia - R&G.

3.6.2. *Material Biológico*

- ✓ Especímenes adultos del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*).

3.6.3. *Materiales de laboratorio*

- ✓ Bisturí estéril N° 23 Surgical Blades.
- ✓ Tubo de fondo cónico de 50 ml.
- ✓ Tubo eppendorf de 2.0, 1.5, 0.2 ml

3.7. Procedimientos

3.7.1. *Diseño de Primers*

Los primers diseñados se basan en la secuencia promotora del gen de la miostatina del pez tilapia (*Oerochromis niloticus*) obtenida de la plataforma del banco de genes virtual (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Número descargado. XM_003458832, en el software virtual Primer3 Plus (Untergasser et al., 2012).

En la Tabla 1 se muestran primers únicos obtenidos en las condiciones y tamaños deseados. Por lo tanto, ningún primer tiene temperaturas de annealing significativamente diferentes entre pares de cebadores.

Tabla 1

Primers utilizados para cada PCR en muestras de Colossoma macropomum.

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

Nota. Primers diseñados por el autor.

3.7.2. Técnica de recolección de datos

Se obtuvieron los especímenes del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) de forma aleatoria de piscigranjas del departamento de Loreto, provincia Alto Amazonas.

3.7.3. Toma de muestra de tejido.

Se separó muestra de tejido del pescado con una hoja de bisturí estéril y fue colocada en un tubo de 2 ml que contenía agua libre de nucleasas.

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

1. Se agregaron 100 µl de muestra prehomogeneizada a un tubo de 1,5 ml que contenía 200 µl de tampón GT y 20 µl de proteinasa K. Se continuó con el vórtex y luego el tubo se incubó a 60 °C durante 40 minutos con agitación continua a 80 rpm.
2. Una vez completada la incubación, se añadieron 200 µl de tampón GTB y se incubaron a 60 °C durante 20 minutos con agitación continua a 80 rpm. Una vez completada la incubación, se añadieron 5 µl de solución de RNasa A (10 mg/ml), se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Al final de la incubación, añadir 200 µl de etanol absoluto alisado y agitar durante 10 segundos. Luego se cargó esta mezcla en una columna GS evitando la adición de

precipitado. Luego se centrifugó a 14.000 rpm durante 1 minuto y se descartó el tubo de recogida.

4. Se instaló un nuevo tubo de recolección, se agregaron 400 μ l de tampón W1 y se centrifugó a 14000 rpm durante 30 segundos. Luego agregue 600 μ l de tampón de lavado y centrifugue nuevamente en las mismas condiciones para reemplazar el tubo de recolección por uno nuevo. Además, se volvió a colocar el tubo de recogida y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 minutos para secar la columna GS.
5. Finalmente, se colocó la columna en el último tubo de 1,5 ml y se diluyó el ADN con 60 μ l de tampón de elución precalentado a 60 °C y centrifugue a 14.000 rpm durante 30 segundos.

3.7.5. Determinación de la calidad y concentración de ADN

Una vez que se obtuvo el ADN, la calidad se evaluó cualitativamente mediante gel de agarosa Cleaver Scientific CSL-AG500 (1%). Para ello se añadió 1 μ l de ADN y 2 μ l de tampón de carga (Blue Juice Gel Loading 3X). Se utilizaron como colorante 10 μ l de tinción con ácido nucleico RedSafe™. Los marcadores ThermoScientific™ Lambda DNA/HindIII Marker sirvieron como referencia. Las muestras se sometieron a electroforesis durante 60 minutos a 90 voltios y se determinó la integridad del ADN ejecutando el gel usando marcadores de peso molecular.

3.7.6. Amplificación mediante PCR

Se utilizaron cebadores diseñados por el software Primer 3 para la amplificación del promotor del gen de la miostatina mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (ver Tabla 1). Además, se describieron los reactivos

utilizados en el Marter Mix para la amplificación y las condiciones de ciclado para las muestras evaluadas (ver Tabla 2).

Tabla 2

Preparación del máster mix para la Amplificación del promotor del gen de Miostatina en Colossoma macropomum.

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

3.7.7. Evaluación del amplicón

Una vez obtenido el producto de la PCR, el proceso de evaluación del amplicón se ejecuta en un gel de agarosa Cleaver Scientific CSL-AG 500 (2%) usando 2 µl de producto amplificado y 2 µl de tampón de carga (Blue Juice Gel Loading 3X) usando 10 µl del Agente intercalante Eco-Listo para usar (20000x). Se utilizó como referencia un marcador Generuler DNA Ladder de 100 pb.

3.7.8. Servicio de Secuenciamiento

Las muestras lavadas, junto con una solución de los cebadores, fueron enviadas al exterior a través de la empresa nacional Macrogen que presta este servicio. Posteriormente Macrogen envió por correo electrónico los resultados de la secuenciación para su posterior análisis de los resultados mediante software especializados.

3.7.9. Análisis de datos

Para el análisis de datos, alineación, edición y determinación de la diversidad de nucleótidos de la secuencia promotora de miostatina en las especies estudiadas. Se requirió el

uso del software QIAGEN CLC Genomics Workbench (versión 3.6.5) y Clustal X (Versión 2.1).

3.8. Consideraciones éticas

La bioética es importante porque concierne a todos los procesos y etapas de la investigación. Sin embargo, se concibe desde una perspectiva de investigación cuyo propósito principal es proporcionar información que mejore el bienestar animal, la calidad de la investigación científica y el avance del conocimiento (Hoyos, 2000; Salazar, Icaza y Alejo, 2018). Respetar los principios básicos: evitar sufrimiento innecesario a los animales, evitar riesgos para los propietarios y promover la aplicación de las 3R (Reducir, Refinar y Reemplazar). (OIE, 2019).

En caso se deba sacrificar a los especímenes en condiciones controladas. El dolor debe ser mínimo durante los experimentos con peces, ya que estas consideraciones también se han observado en estudios con animales (Manrique et al., 2018).

El término animal de laboratorio incluye todos los animales de laboratorio utilizados tradicionalmente (roedores, conejos, aves y primates no humanos), así como los animales domésticos y de granja, los animales salvajes y los animales acuáticos (peces). Incluye los "vertebrados" de Utilizado en investigación científica, educación o pruebas clínicas.

En el presente estudio se utilizó pescado comercial comestible procedente de criaderos (no se trata de peces silvestres). Generalmente sacrificado diariamente para consumo local o venta, esto esta conforme a la Ley 30407 (2016).

Además, todos los experimentos con estos peces fueron recomendados en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (2017)” (2017) y aprobados por ASOPEBAID (2017) "Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú".

IV. RESULTADOS

4.1. Extracción de ADN y Calidad de ADN

La extracción de ADN se realizó en dos especímenes de pez Gamitana (*Colossoma Macropomum*) en el Instituto de Mejora Genética y Reproducción Animal. Las condiciones de amplificación por PCR se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

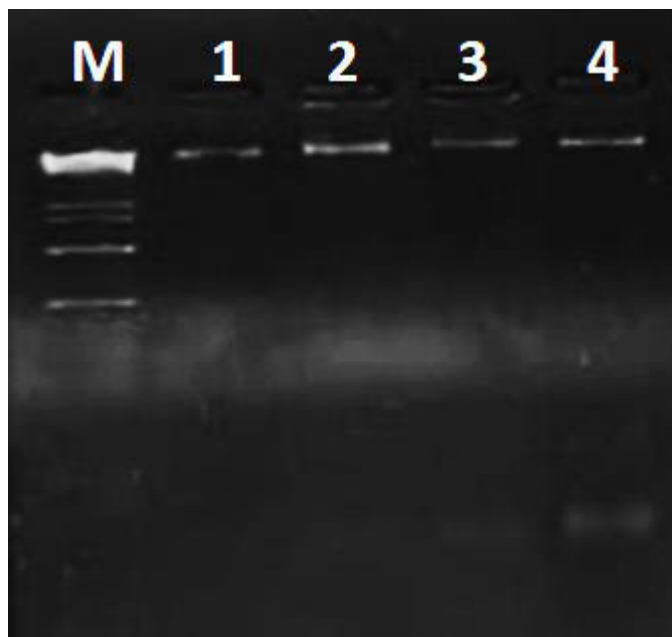
PCR convencional - Condiciones del ciclado.

Paso	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Denaturación Inicial	2.5 min.	95°C	1
Denaturación	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 determinar de la calidad del ADN se realizó el análisis cualitativo mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando un marcador de peso molecular del fago ADN lambda/HindIII que reconoce fragmentos de 564 a 23.130 pb para detectar la presencia de ADN genómico, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1

Gel de electroforesis al 1% con el marcador de peso molecular de fago lambda digerido con Hind III.



Nota. Se visualiza una banda cerca de la banda de 23 130 bp que corresponde al ADN genómico purificado (M = Marcador Molecular). 1, 2, 3 y 4 = Muestras de ADN genómico del pez.

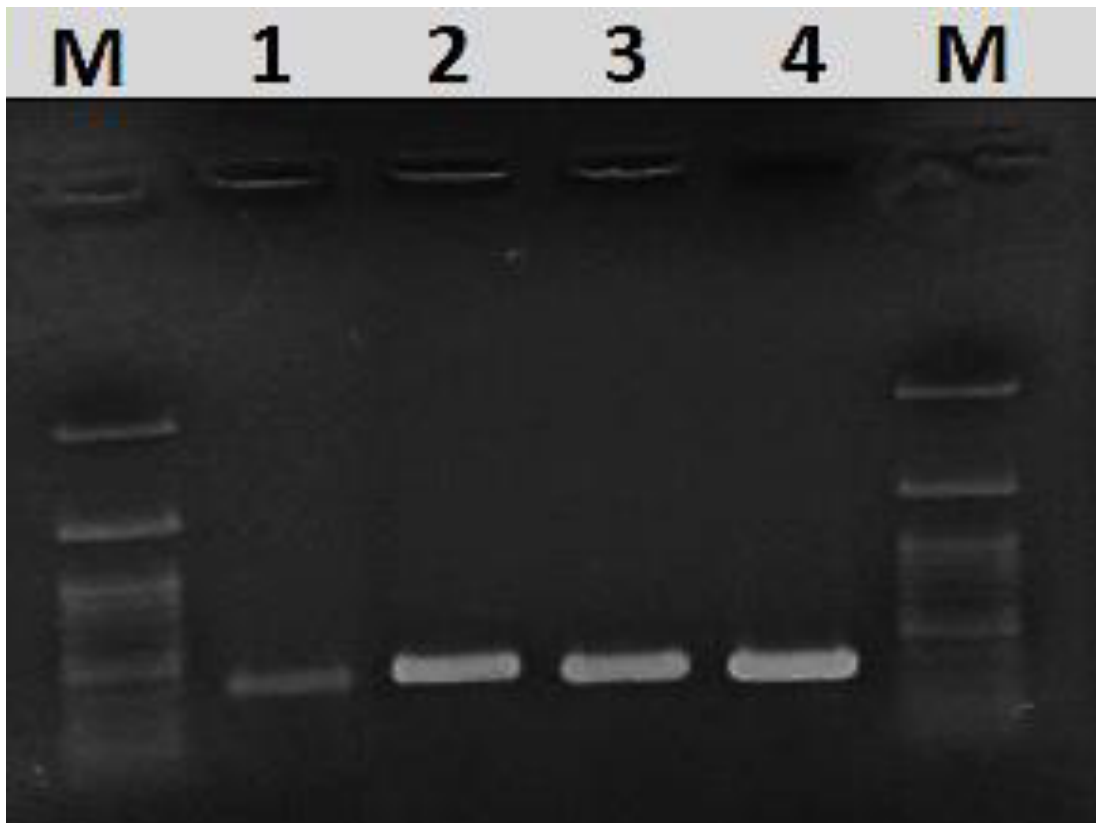
4.2. PCR punto final

A continuación, utilizando el conjunto de cebadores que se muestra en la Tabla 1 y las condiciones que se muestran en la Tabla 2, se amplificó el promotor del gen de miostatina mediante PCR convencional.

Posteriormente, En la Figura 2, se observa la amplificación de un fragmento de aproximadamente 350 pb en el promotor del gen de la miostatina en Gamitana y Tilapia (control positivo).

Figura 2

Gel de electroforesis al 2% para amplicones.



Nota. Se visualiza un amplicón de aproximadamente 350 bp para cada muestra que corresponde al promotor de la Miostatina. Carril 1 = Pez Gamitana, Carriles 2, 3 y 4 = Tilapias (Control Positivo) y M = Marcador Molecular de 100 bp.

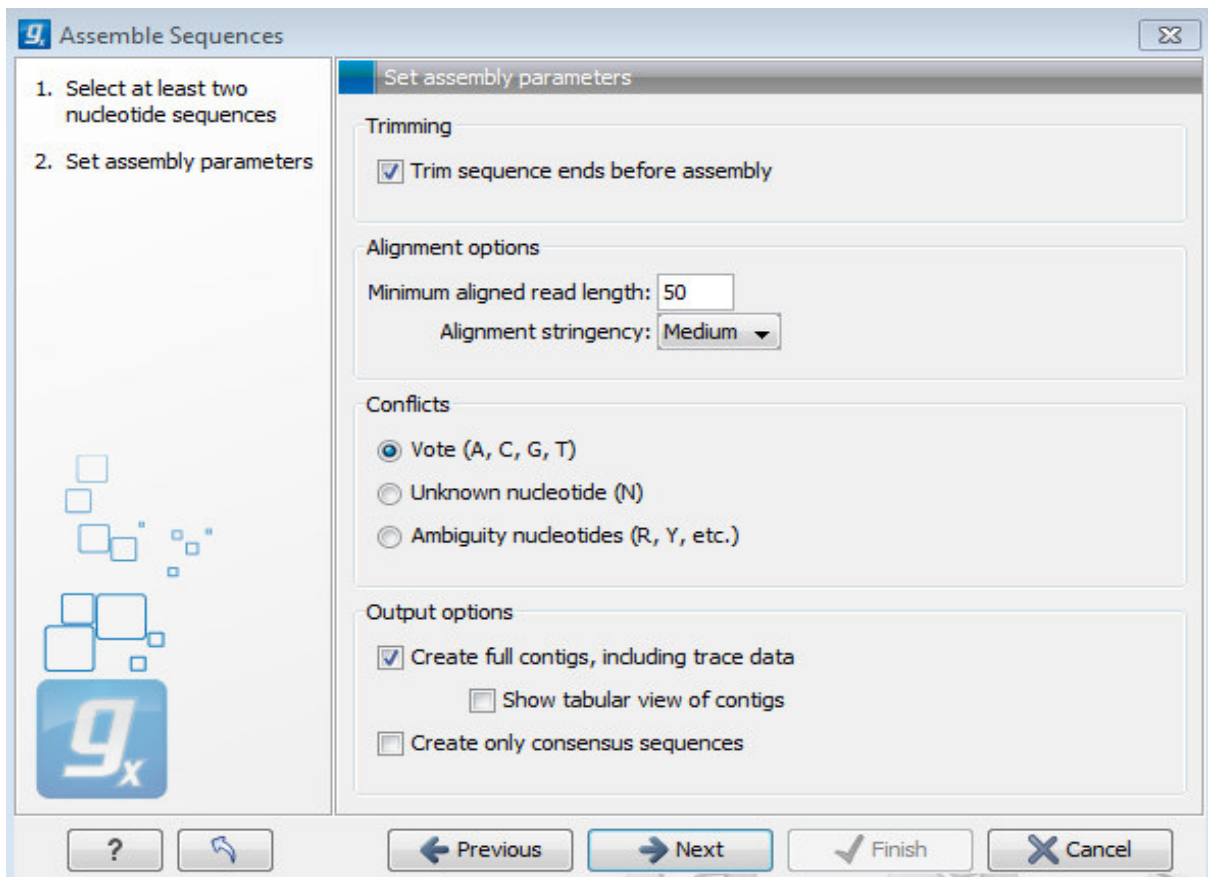
4.3. *Análisis del Secuenciamiento Sanger*

Se procedió al ensamblaje de las secuencias, con el uso de programas CLC Genomics Workbench v3.6.5 (<https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-clc-genomics-workbench/>) (Figura 3).

Nota: Sólo una de las muestras del pez Gamitana se pudo lograr secuenciar.

Figura 3

Configuración de los parámetros para el ensamblaje.



Nota. Control de calidad de la secuenciación con FastQC obtenido con 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 solapamiento mínimo de 50 nucleótidos de longitud entre los segmentos Forward y Reverse de cada muestra.

Durante el ensamblado se presentaron bases nitrogenadas marcadas como *Conflict* (conflictos). Esto indica diferencias entre en las bases nitrogenadas de las secuencias medidas y de referencia.

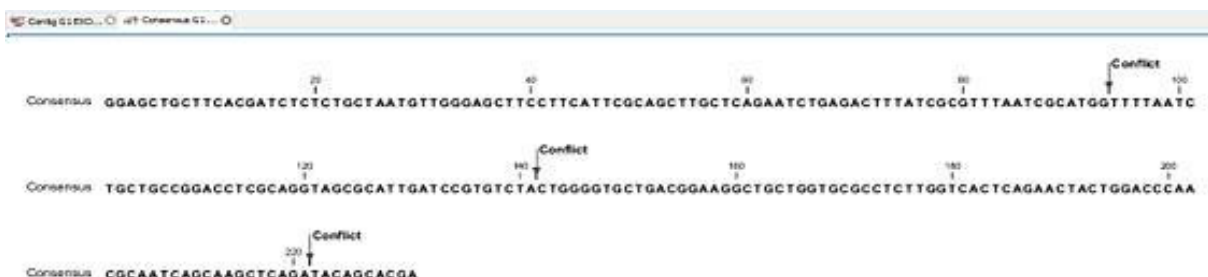
Identificación y corrección de conflictos de las bases en las lecturas pareadas.



Para identificar la base exacta de la secuencia *Consensus* (de consenso), se procedió a corregir estas conflictos para poder mejorar el análisis. 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 solapamiento de las lecturas. Estos conflictos se corrigen mediante la verificación de los picos y la calidad de estos en las lecturas de Forward y Reverse, a fin de obtener la base nucleotídica correcta (Figura 5).

Figura 5

Obtención de la secuencia consenso.



Finalmente al solucionar los conflictos se obtuvo la siguiente secuencia consenso para la región promotora de la Miostatina de [Gamitana \(337 pb\)](#):

**5'-CAGCAAGCTCAGATACAGCACGATTTGAGACAGATGCATTGTCTTTTAGG
TGTGAAGTGTGGTTTAAAAATACGTTTTGTTTAAAAAAAATCCTTTGCACT
GTGTCGGAGCTGATGCGCGACTGAACTGGGGTTGGATTAATGTCCCACACT
GATAGGCATCATAGTTTATTAGCGCGCACCTTTTTATACTCCAACCTTAGCC
TCTTTTGTGTCGTCAAATCTATGATTGGCTGGACAGGCAACAATGAATTTT
AACCGACTGACATGAAAACTTTTTTTTTCGCTGTCAACCCATAAGGAACGGAG
GCTGTGGGCATGTGTTTGACGGGATAAA-3'**

Con la secuencia consenso ya determinada, se comparó la similitud con secuencias ya existentes en la base de datos del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Para ello se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al., 1997). Para así poder hallar más información de la secuencia ensamblada. (Figura 6).

Figura 6

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

blastn blastp blastx tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

```
CAGCTTGCTCAGAATCTGAGACTTTATCGCGTTTAATCGCATGTTTAAAT
CTGCTGCCGGACCTCGCAGGTAGCGCATTGATCCGTGCTACTGTTGGT
GCTGACGGGAAAGGCTGCTGGTGGCCCTTTGGTCACTCAGAACTACTGG
ACCCAACGCAATCAGCAAGCTCAGATACAGCACGA
```

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

[?](#)

Organism Optional exclude [?](#)
Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown [?](#)

Exclude Optional Models (XM/XP) Uncultured/environmental sample sequences

Limit to Optional Sequences from type material

Entrez Query Optional [YouTube](#) [Create custom database](#)
Enter an Entrez query to limit search [?](#)

Program Selection

Optimize for Highly similar sequences (megablast)
 More dissimilar sequences (discontiguous megablast)
 Somewhat similar sequences (blastn)
Choose a BLAST algorithm [?](#)

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

Finalmente, se realizó un alineamiento de 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 Gamitana (Colossoma macropomum).

The screenshot displays the BLASTn search interface. At the top, there are navigation links: '< Edit Search', 'Save Search', 'Search Summary', 'How to read this report?', 'BLAST Help Videos', and 'Back to Traditional Results Page'. The search parameters are listed on the left: Job Title (Nucleotide Sequence), RID (X8PDTB0601N), Program (BLASTN), Database (nt), Query ID (Ic|Query_81663), Description (None), Molecule type (dna), and Query Length (337). A 'Filter Results' panel on the right allows filtering by Organism, Percent Identity, E value, and Query Coverage. Below the filters, there are tabs for 'Descriptions', 'Graphic Summary', 'Alignments', and 'Taxonomy'. The main section is titled 'Sequences producing significant alignments' and shows a table of results with columns for Description, Scientific Name, Max Score, Total Score, Query Cover, E value, Per. Ident, Acc. Len, and Accession. Four sequences are listed, all with 99% identity and 99% query coverage.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ PREDICTED: Oreochromis niloticus myostatin (mstn) mRNA	Oreochromis n...	604	604	99%	2e-168	99.11%	3560	XM_003458832.5
✓ Oreochromis aureus x Oreochromis niloticus myostatin gene complete cds	Oreochromis a...	604	604	99%	2e-168	99.11%	3939	KC583258.1
✓ Oreochromis niloticus MSTN gene promoter region and partial cds	Oreochromis n...	599	599	99%	1e-166	98.81%	2413	F3972683.1
✓ Oreochromis niloticus myostatin (MSTN) gene complete cds	Oreochromis n...	588	588	99%	2e-163	98.22%	3215	KT987208.1

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 ichtícola reportada en el Genbank (2023). Es decir, en la actualidad no hay reportadas secuencias del promotor de la Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*).

Sin embargo, la secuencia consenso obtenida coincidió con la secuencia nucleotídica del promotor del gen de Miostatina de la Tilapia (No. acceso: XM_003458832.5).

Cuyos resultados obtenidos fueron para la Gamitana de una identidad del 99.11% (Per. Ident) y una cobertura del 99% (Query cover) con la secuencia nucleotídica del

promotor de la Miostatina de la Tilapia reportada. Por lo tanto, la secuencia ensamblada tiene una alta homología a la especie de referencia.

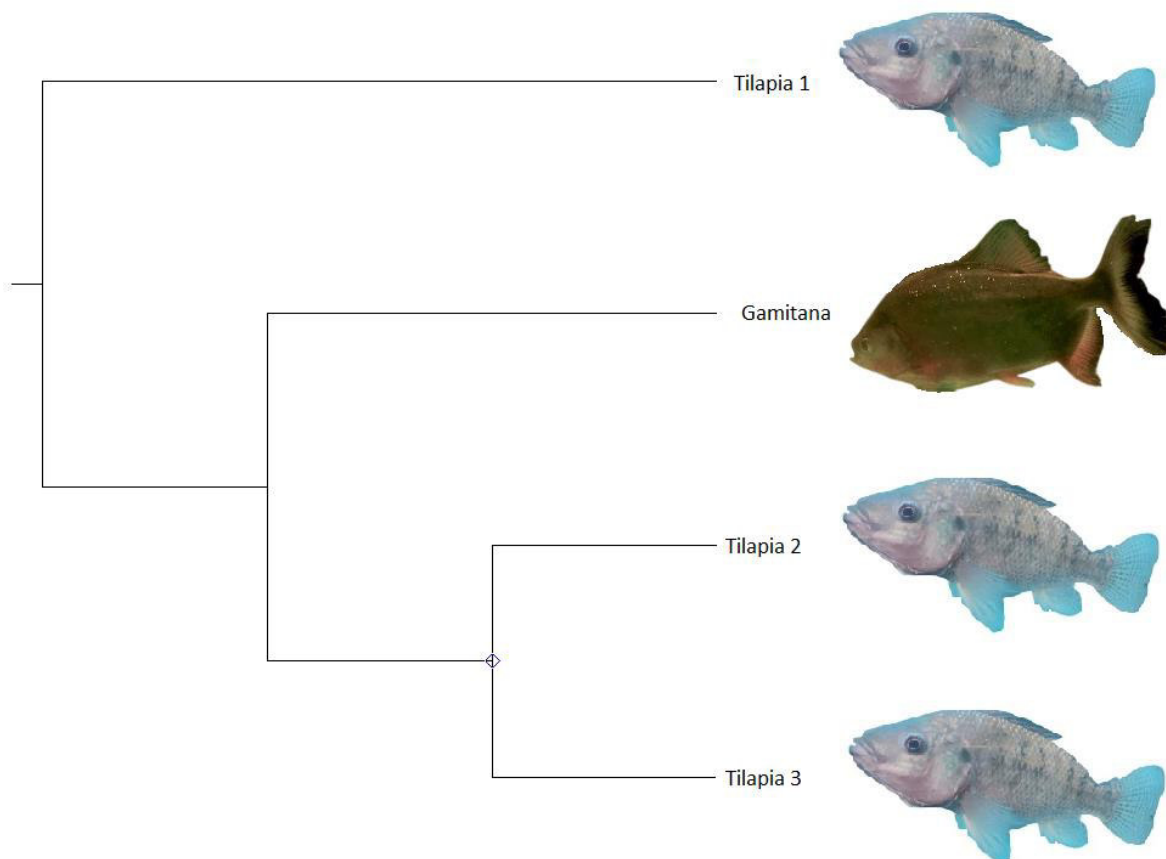
4.4. Análisis Filogenético

Con la información molecular de la secuencia consenso del pez Gamitana y de cuatro secuencias nucleotídicas obtenidas. Estas se alinearon con el programa Clustal X (Versión 2.1) (Larkin et al., 2007). Luego se eliminaron los “Gaps” quedando una secuencia de 312 nucleótidos. Y se construyó el árbol filogenético con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Se compararon las secuencias nucleotídicas alineadas de la secuencia del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) con tres secuencias nucleotídicas reportadas de la Tilapia publicados en el Genbank (No. de accesos: XM_003458832.5, FJ972683.1, KT987208.1 y KT987208.1).

En la Figura 8, se observa el árbol filogenético obtenido de la comparación de las secuencias del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana y de tres peces de Tilapias reportados en el Genbank.

Figura 8

Árbol filogenético obtenido de las secuencias del promotor del gen de *Miostatina* del pez *Gamitana* (*Colossoma macropomum*) y del pez *Tilapia* (*Oerochromis niloticus*).



Nota. el árbol filogenético se obtuvo utilizando el método UPGMA. La distancia evolutiva se calculó utilizando el método combinado de máxima verosimilitud (Tamura et al., 2004). Se eliminaron todas las posiciones ambiguas por pares en secuencias (opción de eliminación por pares). Hubo un total de 312 posiciones en el conjunto de datos final. El análisis evolutivo se realizó en MEGA X (Kumar et al., 2018).

En la Figura 9, se compara las tres secuencias alineadas sin Gaps de las tres secuencias reportadas de Tilapia con la secuencia del pez Gamitana. Entre la Gamitana y la Tilapia 1 con No. de acceso XM_003458832.5 se visualiza hay 160 nucleótidos diferentes de 312 en total (51.28%). Entre la Gamitana y la Tilapia 2 y Tilapia 3 con No. de acceso FJ972683.1 y KT987208.1 se visualizan en ambos cuatro nucleótidos diferentes de 312 en total (1.28%).

Figura 9

Comparación de las secuencias nucleotídicas conservadas del promotor del gen de la Miostatina del pez del pez Gamitana (Colossoma macropomum) y de los peces Tilapia (Oerochromis niloticus) reportados en el Genbank (2023). Longitud total = 312 nucleótidos.

```

T2      CAGCAAGCTCAGATACAGCACGATCTGAGACAGATGCATTGTCTCTTAGGTGTGAAGTGT
T3      CAGCAAGCTCAGATACAGCACGATCTGAGACAGATGCATTGTCTCTTAGGTGTGAAGTGT
Gamitana CAGCAAGCTCAGATACAGCACGATTTGAGACAGATGCATTGTCTTTTAGGTGTGAAGTGT
T1      -CACAGCCTCCG-TTCCTTATGGGTTGACAGCGAAAAAAGTTTTCA--TGCA---GT
      ** ***** ** ***** ** * ***** **

T2      GGTTTAAAAATACGTTTTGTTTAAAAAATCCTTTG--CACTGTGTCGGAGCTGATGC
T3      GGTTTAAAAATACGTTTTGTTTAAAAAATCCTTTGCCAC-GTGTGCGGAGCTGATGC
Gamitana GGTTTAAAAATACGTTTTGTTTAAAAAATCCTTTG--CACTGTGTCGGAGCTGATGC
T1      CGGTTAAAATTCATTGTTGCCTGTCCAGCCAATCATAG---ATTTTGACGACACAAAAGA
      * ***** * **** * * * * * * ***** * *

T2      GCGACTGAACTGGGGTTGGATTAATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTTATTAGCGC
T3      GCGACTGAACTGGGGTTGGATTAATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTTATTAGCGC
Gamitana GCGACTGAACTGGGGTTGGATTAATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTTATTAGCGC
T1      G--GCTAAAGTTGGAGTATAAAAAAGGTGC-GCGCTAATAAACTATGATGCCTATCAGTGT
      * ***** * * ***** ***** * * *****

T2      GC-GCCTTTTATACTCCAACCTTAGCCTCTTTT--GTGTCGTCAAAT-CTATGATTGG
T3      GC-ACCTTTTATACTCCAACCTTAGCCTCTTTT--GTGTCGTCAAAT-CTATGATTGG
Gamitana GC-ACCTTTTATACTCCAACCTTAGCCTCTTTT--GTGTCGTCAAAT-CTATGATTGG
T1      GGGACATTAATCCAACCCAGTTCAGTCGCGCATCAGCTCCGACACAGTGCAAAGGATTT
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

T2      CTGGACAGGCAACAATGAATTTTAACCGACTGACATGAAAACCTTTTTTTCGCTGTCAAC
T3      CTGGACAGGCAACAATGAATTTTAACCGACTGACATGAAAACCTTTTTTTCGCTGTCAAC
Gamitana CTGGACAGGCAACAATGAATTTTAACCGACTGACATGAAAACCTTTTTTTCGCTGTCAAC
T1      TTTTTAAACAAAACGTATTTTAAACCAC-----ACTTCACACCTAAGAGACAAT
      * * **** * ***** ** * * * ****

T2      CCATAAGGAACGGAGGCTG-TGGGCATGTGCTTGACGGGATAA-
T3      CCATAAGGAACGGAGGCTG-TGGGCATGTGCTTGACGGGATAA-
Gamitana CCATAAGGAACGGAGGCTG-TGGGCATGTGTTTGACGGGATAAA
T1      GCATCTGTCTCAGATCGTGTATCTGAGCTTGCTGATT----
      *** * * * * * * * * * *

```

Nota. () Nucleótidos conservados de la secuencia promotora del gen de Miostatina del pez Gamitana con las secuencias promotoras de peces Tilapias (Oerochromis niloticus) reportados en el Genbank (2023).*

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La extracción de ADN fue analizado cualitativamente por electroforesis en gel de agarosa. El análisis indica la presencia de ADN de alto peso molecular debido a la presencia de bandas superiores a 20.000 pb. Este análisis también ayudó a detectar la ausencia de bandas difusas o "smear" que representan degradación del ADN y complican el proceso de PCR (Figura 1).

El diseño del cebador (Tabla 1) establece que se debe utilizar una temperatura de hibridación o hibridación de 5 °C por debajo de la temperatura de fusión más baja del par de cebadores utilizado. Estos se obtuvieron del programa virtual de ThermoFisher Scientific, Tm Calculator (<https://www.thermofisher.com>). Para ello, se hicieron consideraciones dependiendo del kit de amplificación y de los cebadores μM agregados en condiciones de PCR (Innis y Geldand, 1990). Se utilizó como referencia la secuencia genética de la miostatina de tilapia informada previamente en Genbank (Conte et al., 2017).

La amplificación por PCR del fragmento promotor del gen de la miostatina fue de aproximadamente 351 pb (Figura 2). Sin embargo, para confirmar que efectivamente son las secuencias de interés, se realizó la secuenciación de Sanger para obtener la secuencia completa de cada amplicón obtenido utilizando los conjuntos de cebadores probados en este estudio.

Una vez obtenidas las secuencias consenso del promotor del gen de Miostatina para el pez Gamitana (Página 25). Se procedió a utilizar diferentes programas ya descritos en los resultados para el análisis de la 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. Para concluir, se ejecutó el alineamiento de las secuencias consenso en el BLASTn a fin de obtener la

secuencia precisa. Coincidiendo con la secuencia reportada (*Código Genbank*: XM_003458832, Anexo 2) de miostatina del pez Tilapia (*Oreochromis niloticus*) y guardando una alta homología del 99.11% de la secuencia obtenida con la especie indicada (Figura 7).

Del mismo modo, del análisis filogenético se encontró una similitud entre las secuencias nucleotídicas del promotor del gen de Miostatina del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*) con respecto a la secuencia de la Tilapia que fue alrededor del 51.28% de similitud con la Tilapia 1 (No. de acceso XM_003458832.5). Y de 98.72% con la Tilapia 2 y Tilapia 3 (No. de accesos FJ972683.1 y KT987208.1) (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 cerca del promotor del gen cuya expresión se desea regular. Para generar este tipo de efectos es recomendable que el ARN guía se diseñe para sitios blancos ubicados lo más cerca posible del extremo N-terminal de la proteína que se verá afectada (Lo más cerca al promotor). De esta forma se asegura la pérdida de función total del gen blanco (Bortesi & Fischer, 2015; Cong *et al.*, 2013). Este hecho tiene especial aplicación para generar el “knock-out” de un gen disruptiendo 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 Gamitana en el Perú.

VI. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se logró identificar y secuenciar con ayuda de los primers diseñados de la especie ictícola Tilapia reportada en el Genbank (No. de acceso XM_003458832), parte de la región promotora del gen del pez Gamitana (*Colossoma macropomum*; Cuvier, 1818).
- Se determinó que los primers diseñados para parte de la región promotora son específicos para las dos variedades de Gamitana. Puesto que, al momento de visualizarse el producto de amplificación en un gel de agarosa, se observan una sola banda nítida sin “smearing o chorreo”. Tampoco se observa dímeros u otros productos que puedan dar a entender que no son específicos para la región promotora diseñada.
- Se obtuvo un amplificación de 337 pb del pez Gamitana. Y cuya secuencia fue:


```

5'CAGCAAGCTCAGATACAGCACGATTTGAGACAGATGCATTGTCCTTT
TAGGTGTGAAGTGTGGTTTAAAAATACGTTTTGTTTAAAAAAAAATCC
TTTGCACGTGTGTCGGAGCTGATGCGCGACTGAACTGGGGTTGGATTA
ATGTCCCACACTGATAGGCATCATAGTTTATTAGCGCGCACCTTTTTA
TACTCCAACCTTAGCCTCTTTTGTGTCGTCAAAATCTATGATTGGCTG
GACAGGCAACAATGAATTTTAACCGACTGACATGAAAACCTTTTTTTTC
GCTGTCAACCCATAAGGAACGGAGGCTGTGGGCATGTGTTTGACGGG
ATAAA-3'

```
- El análisis del secuenciamiento de los amplicones nos indican que el gen de miostatina es altamente conservado dado que el porcentaje de similitud dado por el NCBI está alrededor del 98.22 al 99.11% en todos los secuenciamientos obtenidos para parte de la región promotora. Puesto que no se encontraron 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 cual también indica que son especies relacionadas filogenéticamente.

- Asimismo, la secuencia consenso de 312 nucleótidos fueron divergentes en: 51.28% (Tilapia 1) y de 1.28% (Tilapia 2 y 3) con respecto al pez Gamitana. Y sobre la cual se construyó el árbol filogenético.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar estudios similares en otros peces comerciales de interés cárnico para el Perú, para así poder tener una base de datos del gen de Miostatina de estos recursos ictícolas con la finalidad de poder desarrollar programas de mejoramiento genético de líneas superiores en ganancia de peso para generar una mayor rentabilidad económica.

VIII. REFERENCIAS

- 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>
- ASOPEBAID, Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú (2017). <https://asopebaid.org.pe/>
- 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
- 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*. *Rev. Fac. Med. Hum.* ;17(2):75-80. DOI 10.25176/RFMH.v17.n2.846. <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMHCaiL>
- 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
- Clustal X. <http://www.clustal.org>

- De Guglielmo, Z. & Fernandez, R. (2016) Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529 <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v18n2/v18n2a16.pdf>
- 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. Ménessier (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>
- 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
- 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>
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T., & Bass, J. (1997). Mutations in Myostatin (GDF8) in Double-Muscled Belgian Blue and Piedmontese Cattle. *Genome Research*, 7(9),16 - 910. <https://doi:10.1101/gr.7.9.910>
- Kumar, S., Stecher, G., Li. M., Knyaz, C. & 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., McGettigan, 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.
- 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>
- 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>
- Morelos C. Rosa M.(2015). Caracterización del gen de la miostatina como un regulador

negativo de crecimiento en la almeja mano de leo *Nodipecten subnodosus* y análisis de la expresión genética en el musculo aductor en respuesta al estrés nutricional. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste*

Nagano, M., & Hansen, A. S. (2025). Distance matters: *How protein regulators facilitate enhancer-promoter interactions and transcription. Cell Genomics,*

OIE, (2019). Utilización de animals 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>

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/>

Quesquén, R., Gutiérrez, G., Haeun, J., Cabrera, A. & Samaniego L.(2022). Estado actual de la acuicultura de la Selva Peruana: caso Ucayali, *Journal Selva Andina Anim. Sci.* 2022; 8(2):49-63. ID del artículo: 117/JSAAS/2022

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>
- Ramirez, J., Sandoval, N., Vicente, K. (2018). Sistema nacional de innovación en pesca y acuicultura. *Fundamentos y propuesta 2017-2022. Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura, Ministerio de la Producción, PNIPA.* <https://www.pnipa.gob.pe/wp-content/uploads/2019/02/PESCA-Y-ACUICULTURA-3-1.pdf>
- Rescan, P. Y., 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>
- 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>
- Reyes, M. A., & Rojas, N. J. (2014). Secuenciación y análisis del gen de la miostatina GDF 8 en búfalos de la raza murreh 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
- 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>

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 A

Imagen de la especie del pez Gamitana (Colossoma macropomum).



Nota. Autoría propia (2022).

Anexo B

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  cctttgacct  ctgacatcag  caggcatttt
121  gaccagaga  agtggtgctc  gctggatatt  tttttcccc  tgggccattc  tctaattggc
181  aagtatattt  atctgaagca  ctgccacaca  gaacaactac  acagaacaac  tttagatggt
241  acagaatttt  aaagtacata  cagtgcataa  aaattaaaga  catacatttt  caaatagcct
301  tgacaccagc  aatttatctt  tctgatgtta  gtgttactaa  ctggccacac  gatggcgctc
361  tgctctcatg  tcgttcaacc  aactgactat  tttgaaaagt  cctgggcca  gtattttcta
421  cattttagtt  attctctttt  gccctgacgt  cgttgcccaa  tgctcttttg  agaaatatta
481  tatttcocaga  ttttcatgta  agattattta  ttcgcttttg  acagaaagcc  tgacctcaac
541  aaagcagatg  atttaattgc  cacttcgtaa  cattacaact  gtcatttttc  ttcaggtggg
601  aaattcattt  agaaattaac  atttgaatgc  agaatgcaaa  tccaaaacgc  tgccctttct
661  caaggacgca  gaaagacatg  cgagcaaaaga  tatgactgac  tattggatat  tctttagaga
721  agatacgcac  tgtaaagtgt  aagaaaatga  agaatgcaac  ttctatcttt  attcaagact
781  tgcattaaat  tatttgtttt  tgggtgatat  aaaacattgt  gtgagtgaga  ttatcccgtc
841  aagcacatgc  ccacagcctc  cgttccttat  gggttgacag  cgaaaaaaaa  gttttcatgt
901  cagtcgggta  aaattcattg  ttgcctgtcc  agccaatcat  agattttgac  gacacaaaag
961  aggctaaagt  tggagtataa  aaaggtgctc  gctaataaac  tatgatgcct  atcagtggtg
1021  gacattaatc  caaccccagt  tcagtcgctc  atcagctccg  acacagtgca  aaggattttt
1081  ttttaacaaa  aacgtatttt  taaaccacac  ttcacaccta  agagacaatg  catctgtctc
1141  agatcgtgct  gtatctgagc  ttgctgattg  cgttgggtcc  agtagttctg  agtgaccaag
1201  aggcgcacca  gcagccttcc  gtcagcacc  cagtagacac  ggatcaatgc  gctacctgcg
1261  aggtccggca  gcagattaaa  accatgcgat  taaacgcgat  aaagtctcag  attctgagca
1321  agctgcgaat  gaaggaagct  cccaacatta  gcagagagat  cgtgaagcag  ctctgccc  ca
1381  aagcgcggcc  gctgcagcag  cttctggatc  agtacgacgt  gctgggagat  gacaacaggg
1441  aagaagtctc  ggaggacgac  gacgagcagc  caaccacgga  gacaattgta  atgatggcaa
1501  ctgaacctga  ttccgctgtc  caggtggacg  ggcaaccaa  gtgctgcttt  ttctcaatta
1561  cgcagaagt  tcaagccagt  cgcgtagttc  gagcgcagct  ttgggtgcat  ctgctccat
1621  cggagaagt  gaccaccgtg  ttctcgcaaa  tctcccggt  tataccggtc  acagacggga
1681  acagacacat  acgaatccgc  tccttgaaga  tcgacgtgaa  tgccggggcc  agctcttggc
1741  aaagtataga  cgtcaagcaa  gtgttgactg  tgtggctgcg  gcagccggag  accaactggg
1801  gcatcgagat  caacgctttc  gattcgaggg  gaaatgactt  agctgtgacc  ttgcgagagc
1861  cgggagagga  gggctctgca  ccgttcatgg  aggtgaagat  ttcagagggc  cccagggctg
1921  cccggagaga  ctccggcctg  gactgcgatg  agaactctcc  agagtcccgg  tgctgtcgtc
1981  accactcac  tgtggacttc  gaggactttg  gctgggactg  gattattgca  ccaaacgct
2041  acaaggccaa  ctattgctct  ggggagtgtg  agtacatgca  cttacagaag  taccacaca
2101  cccacctggt  gaacaaagcc  aaccccagag  ggactgcagg  tcctgctgtg  acccaacaa
2161  agatgtcgcc  aatcaacatg  ctctacttta  accgcaaaaga  gcaaatcatc  tatggcaaga
2221  tcccctccat  ggtggtggac  cgttgtggat  gctcctgagt  tgggatggag  agagaaaggg
2281  ggtgggggcg  aaggggcccga  ggcgccatcc  agcaccctac  ttaagactg  tttcacacca
2341  ccaatccacc  agttccagtg  ctttctctgca  gaacacgggtg  caatagaatc  agagtagagg
2401  ccacaaacag  cccgaccttc  ctgcagggca  atgctttcat  agttctcact  tttctttcct
2461  ccagtgaat  cttagccata  gaggcttgaa  gccaggtgga  tgcaagaatt  caaacacaca
2521  cacacacaca  caccgacaca  tataacacat  gctggacctt  gaagtgaatg  tagccagaaa
2581  tgatcacagt  tttccaaaac  agtgttatta  ttctttgttt  tttaaatgat  ctgtctctg
2641  tccatttata  ccaacatgcc  gtccgtttat  acaccactcc  acttgtagct  gatatacaag
2701  ctatcacact  tgatgctctg  tgtttgtgat  aatcattttt  ttagttttgt  tttcagagtg
2761  aaaccaggaa  tcctcaagga  ctttttgaaa  gggctcggaa  aaacacagct  ggagactctt
2821  tagggtgata  tttcacactg  gtagaacatg  ttttagtacc  cctaagtgtc  ccaagagtc
2881  aatgaaaagt  taaactgcac  aaaagactaa  ctaatctgga  gattaatctc  tcttgattg
2941  ctcaaagttt  cagtttcaat  gttttctccc  cccaaaatga  tgtggtggtt  aatctctctt
3001  cagagcctat  ggatacaaac  atgttccacc  agtctgaagt  accactttag  gtctgtcag
3061  gtcctcattt  attctgtcat  acatacatgc  aacaatata  ccaaccgaga  gatcgttctc
3121  cctcagtcgc  aattgtcagt  atccaaccaa  acagcccagc  ctgcccagata  cacttgaatt
3181  attctgattg  taaattcaca  tgactggaca  gaaggacttg  aactgaaggc  acgatgaatg

```

```
3241 cagcctccaa atgaaagtgt gtttaagaca gaaaacgatg tgaatgctga aatcatgcct
3301 agactctgtc ttacaaacac agtttgact atggcacacc aatagaaaga attggttgct
3361 aaaaaaaaaa gttgtaaaaa ctgattttga tatgtttgct aatttgtatt gtattcatat
3421 gccatttggt tccagtagga gttgcctttc tgaaccattg ttggtaaata tataaaactg
3481 caacctagca agataaatgt tgtaatgcag caactctata tacttgtttt aacaaataaa
3541 gtttctagct tgtttgaaga
```

Nota. Dirección: 5' → 3'

Anexo D

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'-GCGTTGGGTCCAGTAGTTC-3'

Secuencia del Promotor

Secuencia Codificadora

ATG = Codon de inicio
TGA = Último codon

```

TTGAATCTTTGCCACCCTCATGCTAAGAAAATTTCTCTAGATCCGCCCTGGTTACTGTTCTATCAGCT
TTAGGTTGTCCAGCCATTCTCCTTTGACCTCTGACATCAGCAGGCATTTTGACCAGAGAAAGTGTGTCTC
GCTGGATATTTTTTCCCCCTGGGCCATTCTCTAATGGCTAAGTATATTTATCTGAAGCACTGCCACACA
GAACAACTACACAGAACAACCTTAGATGTTACAGAATTTTAAAGTACATACAGTGCATAAAAAATAAAGA
CATACATTTTCAATAGCCTTGACACCAGCAATTTATTTTCTGATGTTAGTGTACTAACTGGCCACAC
GATGGCGCTCTGCTCTCATGTCGTTCAACCAACTGACTATTTGAAAAGTCCCTGGGCCAAGTATTTCTA
CATTTTAGTTATTCTCTTTTGCCCTGACGTCGTTGCCCAATGCTCTTTGAGAAATATTATATTTCCAGA
TTTTCATGTAAGATTATTTATTCGCTTTTGACAGAAAGCCTGACCTCAACAAAGCAGATGATTTAATTGC
CACTTCGTAACATTACAACTGTCAATTTTTCTTCAGGTGGTAAATTCATTTAGAAAATTAACATTTGAATGC
AGAATGCAAAATCCAAAACGCTGCCCTTTCTCAAGGACGCGAAGACATGCGAGCAAAAGATATGACTGAC
TATTGGATATCTTTAGAGAAGATACGCATTGTAAGTTTAAAGAAAATGAAGAATGCAACTTCTATCTTT
ATTCAGACTTGCATTAATTTATTTGTTTTGGGTGATATAAACATTTGTGTAGTGAGATATATCCCTTC
AAGCACATGCCACAGCCTCCGTTCCCTTATGGGTTGACAGCGAAAAAAAGTTTTCAATGTCAGTCGGTTA
AAATTCATTGTTGCCTGTCCAGCCAATCATAGATTTTGACGACACAAAAGAGGCTAAAAGTTGGAGTATAA
AAAGGTGCGCGCTAATAAACTATGATGCCTATCAGTGTGGGACATTAATCCAACCCAGTTCAGTCGCGC
ATCAGCTCCGACACAGTGCAAGGATTTTTTTTTAAACAAAACGATTTTTTAAACCACTTCACACCTA
AGAGACAATGATCTGTCTCAGATCGTGTATCTGAGCTTGTGATTTCGTTGGGTCCAGTAGTTCAGTTCG
AGTGACCAAGAGGGCGCACCCAGCAGCCTTCCGTCAGCACCCAGTAGACACGGATCAATGCCTACCTCGC
AGGTCGGCAGCAGATTAACCATGCGATTAACCGGATAAAGTCTCAGATTTGAGCAAGCTCCGAAT
GAAGGAAGCTCCCAACATTAGCAGAGAGATCGTGAAGCAGCTCCTGCCAAAGCGCCGCTGACAGCAG
CTTCTGGATCAGTACGACGTGCTGGGAGATGACAACAGGGGAAGAGTCTTGGAGGACGACGACGAGCAG
CAACCCGGAGACAATGTAATGATGGCAACTGAACCTGATCCGCTGTCCAGGTGGACGGGCAACCAAA
GTGCTGCTTTTTCTCAATTACGCAAGATTTCAAGCCAGTCCGCTAGTTCGAGCGCAGCTTTGGGTGCAT
CTGCGTCCATCGGAAGAGTGAACCCGTTCTCCTGCAAAATCTCCCGCTTATACCGGTACAGACGGGA
ACAGACACATACGAATCCGCTCCTTGAAGATCGACGTGAATGCCGGGGCCAGCTCTTGGCAAAGTATAGA
CGTCAAGCAAGTGTGACTGTGTGGCTGCGGCAGCCGGAGACCAACTGGGGCATCGAGATCAACGCTTTC
GATTCGAGGGGAAATGACTTAGCTGTGACCTTCGCAAGCCGGGAGAGGAGGCTCTGCAACCGTTCATGG
AGGTGAAGATTTAGAGGGCCCCAGGCGTGCCTGGAGAGACTCGGGCCTGGACTGCGATGAGAATCTCC
AGAGTCCCGGTGCTGTCGCTACCCACTCACTGTGGACTTCGAGGACTTTGGCTGGGACTGGATTATTGCA
CCAAAACGCTACAAGGCCAACTATTGCTCTGGGAGTGTGAGTACATGCCTTACAGAAGTACCCACACA
CCCACCTGGTGAACAAAGCCAAACCCAGAGGGACTGCAGGTCCCTGCTGTACCCCAACAAAGATGTCCGC
AATCAACATGCTCTACTTTAACCAGAAAGAGCAAAATCATCTATGGCAAGATCCCTCCATGGTGGTGGAC
CGTTGTGGATGCTCCGAGTTGGGATGGAGAGAAAGGGGGTGGGGGCAAGGGGCCAGGGCCCATCC
AGCACCCTACTTTAAGACTGTTTACACCACCAATCCACCAGTTCAGTGTCTTCTGCGAGAACACGGTG
CAATAGAATCAGAGTAGAGGCCAACAACAGCCCGACCTTCTGCAAGGCAATGCTTTCATAGTTCTCACT
TTTCTTCCCTCAGTGAATCTTAGCCATAGAGGCTTGAAGCCAGGTGGATGCAAGAATTCAAACACACA

```

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

