



Biotempo (Lima)



<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

IDENTIFICATION OF THE SLC45A2 GENE THAT INDUCES ALBINISM IN FISHES OF COMMERCIAL INTEREST FOR PERUVIAN AQUACULTURE

IDENTIFICACIÓN DEL GEN SLC45A2 QUE INDUCE ALBINISMO EN PECES DE INTERÉS COMERCIAL PARA LA ACUICULTURA PERUANA

Carlos Scotto¹; Abel Walter Zambrano-Cabanillas²; Catalina Díaz-Cachay³; Betty Gamero-Collado⁴; Jessica Vargas-Ayala⁵; Henry Vega¹ & Diana Apaza⁶

¹ Laboratorio de Mejora Genética & Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Universidad Nacional Federico Villarreal. Jirón Río Chepén s/n. El Agustino. Lima, Perú. E-mail cscotto@unfv.edu.pe

² Laboratorio de Biotoxicología. Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Roma 350. Miraflores. Lima, Perú.

³ Laboratorio de Acuicultura. Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Roma 350. Miraflores. Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Genética Aplicada. Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Roma 340. Miraflores. Lima, Perú.

⁵ Laboratorio de Informática. Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura. Universidad Nacional Federico Villarreal. Calle Roma 350. Miraflores. Lima, Perú.

⁶ Módulo Dulceacuícola. Facultad de Ciencias Universidad Ricardo Palma. Av. Benavides 5440. Santiago de Surco. Lima, Perú.

Carlos Scotto: <https://orcid.org/0000-0003-1592-0419>

Walter Zambrano-Cabanillas: <https://orcid.org/0000-0001-6930-5601>

Catalina Díaz-Cachay: <https://orcid.org/0000-0003-1981-5616>

Betty Gamero-Collado: <https://orcid.org/0000-0002-6008-423X>

Jessica Vargas-Ayala: <https://orcid.org/0000-0002-0515-5875>

Henry Vega: <https://orcid.org/0000-0002-1237-2739>

Diana Apaza: <https://orcid.org/0000-0002-1237-2739>

ABSTRACT

Albino fish have greater economic value than fish that have coloration both at the ornamental level and at the consumption level for their meat. The *slc45a2* gene is associated with the induction of an albinism phenotype initially reported in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) and Medaka fish (*Oryzias latipes* Temminck & Schlegel, 1846). With the information registered in the Genbank of the *slc45a2* gene of the Tilapia fish (*Oerochromis niloticus* Linnaeus, 1758) and the Gamitana (*Colossoma macropomum* Bleeker, 1869), specific primers were designed in silico to identify this gene in these two freshwater species. Both sets of primers were used first on these two species (Tilapia and Gamitana). And then tested in the fish Paco (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818) and Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831) whose *slc45a2* gene sequences are currently unknown. With the set of primers designed for Tilapia, they gave a single band amplification for the Tilapia and the Oscar. With the other set of primers designed for Gamitana, he amplified a band for both the Gamitana and the Paco. Both were approximately 120 nucleotides in size. The sequences obtained confirmed



that they belonged to the *slc45a2* gene and not to another genome sequence. Likewise, for the albino versions of some species analyzed, the same results were obtained. They can be used in the future to identify and amplify this gene and initiate gene editing to obtain albino phenotypes of these and other species of economic interest for Peruvian aquaculture.

Keywords: albinis – aquaculture – fish – pigmentation – *slc45a2* gene

RESUMEN

Los peces albinos poseen mayor valor económico que los peces que presentan coloración tanto a nivel ornamental como a nivel de consumo por su carne. El gen *slc45a2* está asociado a la inducción de un fenotipo de albinismo reportado inicialmente en los peces Cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822) y Medaka (*Oryzias latipes* Temminck & Schlegel, 1846). Con la información registrada en el Genbank del gen *slc45a2* de los peces Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneo, 1758) y de la Gamitana (*Colossoma macropomum* Bleeker, 1869) se diseñaron *in silico* primers específicos para identificar este gen en estas dos especies dulceacuícolas. Ambos juegos de primers fueron utilizados primero en estas dos especies (Tilapia y Gamitana), y luego probados en los peces Paco (*Piaractus brachypomus* Cuvier, 1818) y Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831) cuyas secuencias del gen *slc45a2* se desconocen actualmente. Con el juego de primers diseñado para Tilapia dieron una amplificación de una sola banda para la Tilapia y el Oscar. Con el otro juego de primers diseñado para Gamitana amplificó una banda tanto para la Gamitana como para el Paco. Ambos fueron de un tamaño aproximado de 120 nucleótidos. Las secuencias obtenidas corroboraron que pertenecían al gen *slc45a2* y no a otra secuencia del genoma. Asimismo, para las versiones albinas de algunas especies analizadas se obtuvieron los mismos resultados. Pudiendo ser utilizados a futuro para identificar y amplificar este gen e iniciar la edición génica para la obtención de fenotipos albinos de éstas y de otras especies de interés económico para la acuicultura peruana.

Palabras claves: acuicultura – albinismo – gen *slc45a2* – peces – pigmentación

INTRODUCCIÓN

La comercialización de peces ornamentales exóticos en el Perú es una actividad en crecimiento. Muchas investigaciones, incluyendo algunas recientes, están ayudando a conocer toda la diversidad que existe de especies de peces amazónicos considerados como ornamentales (Ministerio del Ambiente, 2021).

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* Agassiz, 1831) (García *et al.*, 2009). Tanto los peces Paco (*Piaractus brachypomus* Georges Cuvier, 1818) como la Gamitana (*Colossoma macropomum* Bleeker, 1869), ambas pertenecen a la familia Serrasalminidae y son especies nativas de la Amazonía que han sido priorizadas para la acuicultura (Fernandes *et al.*, 2004). Por otro lado, la Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linneo, 1758) (Cichlidae) es una especie que fue introducida al Perú y es la cuarta de mayor producción en el país (Baltazar & Palacios, 2020).

El gen *slc45a2* codifica para la producción de una proteína que se encuentra en los melanocitos que son

células especializadas para la coloración (Protas & Patel, 2008; Wang *et al.*, 2021). 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 es muy conservada evolutivamente desde los peces hasta los humanos (Dooley *et al.*, 2013). 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 alélicas o 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; Zhang *et al.*, 2023). Los mutantes albinos homocigóticos en el 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) (Basolo, 2006; Han *et al.*, 2008; Esposito *et al.*, 2012; Tsetskhladze *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2021).

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 en los 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 teleosteos, que tienen una sola copia, y planteándose la hipótesis de que la pérdida de función por las mutaciones en el exon 1 del gen *slc45a2* darían como resultado albinismo (Tsutsumi *et al.*, 2006; Braasch, 2007; Wang *et al.*, 2022).

Según Segev-Hadar *et al.* (2021) se ha identificado 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 Cebrá (*Danio rerio* Hamilton, 1822) previamente identificada (NM_001110377) (Genbank, 2023c).

A la fecha, muchas investigaciones sobre Crispr en acuicultura reflejan una mejora genética en crecimiento, resistencia a enfermedades, reproducción, esterilidad, y patrones de coloración en peces. Como es el caso de los genes miembros de la familia de portadores de solutos 45 miembro 2 (*slc45a2*) involucrado en las vías de síntesis de melanina (Hallerman, 2021). La coloración y los patrones de color en los peces son importantes en algunas especies acuícolas, especialmente en el comercio ornamental (Roy *et al.*, 2022). Es así, que con el sistema Crispr/Cas9 se desactivó el gen *slc45a2*, involucrado en la pigmentación de diversos peces y se observó una gama graduada de fenotipos, que van desde una completa falta de pigmentación (albina) a la pérdida parcial y pigmentación

normal (Edvardsen *et al.*, 2014), que podría aumentar el valor agregado de varias de nuestras especies ictícolas con alto potencial permitiendo su rápido mejoramiento genético para la obtención de diversos fenotipos o líneas comerciales asociados a la pigmentación.

El presente trabajo tuvo como objetivo general la amplificación e identificación molecular del polimorfismo genético del gen del color *Slc45a2* en cuatro peces de interés comercial para la acuicultura peruana (Paco, Gamitana, Tilapia y Oscar).

MATERIALES Y MÉTODOS

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 Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV) en la ciudad de Lima, Perú.

Muestreo

Los especímenes fueron adquiridos de dos centros de crianza acuícola: las Tilapias fueron obtenidas de la Empresa Las Palmas Aqua Inversiones y Proyectos, Jr. San Martín N°484, La Banda de Shilcayo, San Martín, Perú. Los peces Paco y Gamitana de la Dirección Regional IIAP Huánuco, Jr. Tingo María Mz. C Lt. 20, Castillo Grande Huánuco, Leoncio Prado, Huánuco, Perú. Finalmente, los peces Oscar fueron conseguidos de acuarios locales de Lima Metropolitana, Perú.

Los especímenes fueron fotografiados antes de la toma de muestra de las aletas para la extracción del ADN (Figura 1).

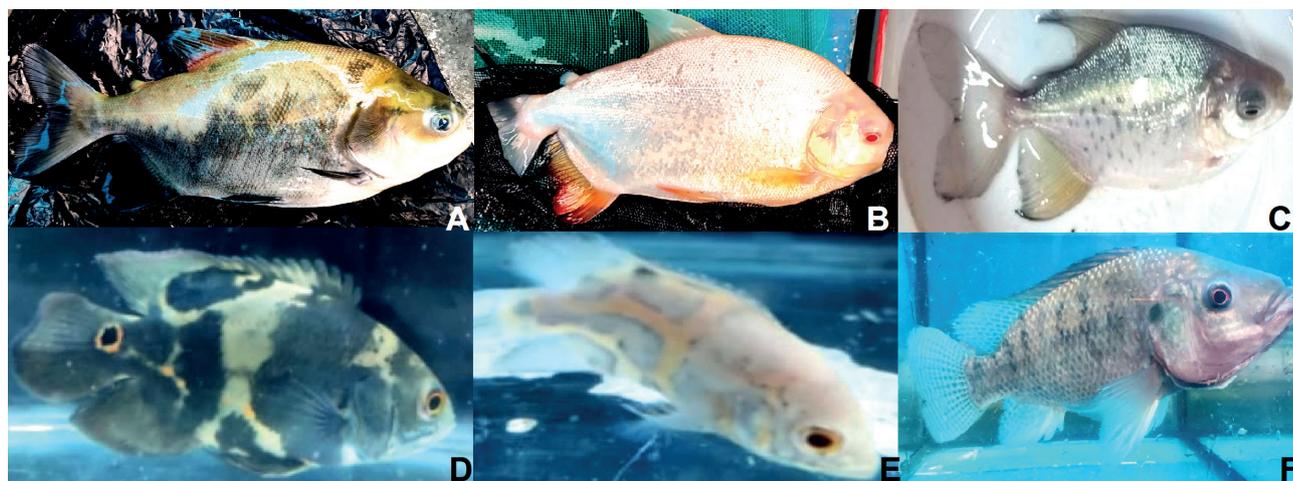


Figura 1. Especímenes ictícolas empleados en la investigación. A. Paco silvestre (*Piaractus brachypterus*), B. Paco albino (*Piaractus brachypterus*), C. Gamitana (*Colossoma macropomum*), D. Oscar silvestre (*Astronotus ocellatus*). E. Oscar albino (*Astronotus ocellatus*). F. Tilapia (*Oerochromis niloticus*).

Material biológico

Se trabajó con las especies adultas de Paco (*P. brachypomus*), Gamitana (*C. macropomum*), Oscar (*A. ocellatus*) y Tilapia (*O. niloticus*).

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 fotográfico. Para fotografiar cada pez se utilizó una cámara digital marca Lumix de 16 Megapíxeles empleándose luz natural y fondos de color negro o blanco para lograr un contraste estándar adecuado.

Extracción de ADN de tejido muscular del pez

Para la estandarización del protocolo de extracción de ADN (Geneaid Biotech, 2017), se obtuvo aproximadamente un cm del músculo de cada pez (Lopera-Barrero *et al.*, 2008). Se transfirió la porción del músculo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y seguidamente se agregó 200 µL de tampón GST y 20 µL de la proteinasa K. Luego se incubó a 60 °C durante 30 min 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 µL de GSB Buffer y agitando durante 10 seg. Se añadió 200 µL de etanol absoluto al lisado de la muestra y se mezcló nuevamente durante 10 seg, 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 min en una centrifuga 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 µL de tampón W1 a la columna GS y se centrifugó posteriormente a 15 000g durante 30 seg. El flujo sobrante se desechó y la columna GS se colocó nuevamente en el tubo de recogida de 2 mL. Se añadió 600 µL de tampón de lavado a la columna GS, centrifugando nuevamente a 15 000 g durante 30 seg 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 min para el secado de la columna. La columna GS seca fue transferida a un tubo limpio de microcentrífuga y se añadió 100 µL Buffer de dilución precalentado dejando reposar durante al menos 3 min. Finalmente se centrifugó a 15 000g durante 30 seg para diluir el ADN purificado.

Diseño de *primers* para el gen *slc45a4* para especies ictícolas de interés

Para determinar la presencia del gen *slc45a2* se sintetizaron cebadores o *primers* específicos comerciales reportados por la literatura científica diseñando las secuencias *in silico* utilizándose el programa online Primer3Plus. Las secuencias para el gen *slc45a2* de Tilapia fueron: Forward: 5'-TGTACAGCTTGGTGTGGTTGAT-3' y Reverse: 5'-GTGCCAGGATGTAAGGCCTCC-3'. Las secuencias del gen *slc45a2* para Gamitana fueron: Forward: 5'-TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT-3' y Reverse: 5'-GTGACAGTATGTAGGGTCTCC-3'.

Los primeros seleccionados fueron probados en el programa Primer-BLAST (Ye *et al.*, 2012) y comparados con la base de datos y se seleccionó a la Tilapia (*O. niloticus*), cuya secuencia tiene un tamaño de 120 nucleótidos (Genbank, 2023a). Con estos resultados se procedió a la búsqueda por homología del gen *slc45a4* en el GenBank en otras especies dulceacuícolas de interés. La única especie cercana fue el pez Gamitana (*C. macropomum*) (Genbank, 2020b). Se comparó la secuencia nucleotídica del gen *slc45a4* del pez Gamitana con la de la Tilapia usándose el programa bioinformático BLASTn (Altschul *et al.*, 1990). Se descargó la secuencia homóloga y se identificaron las regiones de los *primers* mediante el alineamiento de las secuencias empleando el programa CLC genomics Workbench 3.6 (2024). Se utilizó la misma región para el diseño de *primers* específicos para pez Gamitana (*C. macropomum*). Dichas secuencias se analizaron en el programa BLAST-Primers (Ye *et al.*, 2012). Basados en el análisis anterior se pudieron seleccionar dos juegos de *primers* específicos para la amplificación de una secuencia de aproximadamente 120 nucleótidos (Tabla 1).

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.

Tabla 1: Secuencias de los *primers* diseñados para el gen *slc45a4* para Tilapia (*Oerochromis niloticus*) y Gamitana (*Colossoma macropomum*).

Primers ID	Cadena	Long. (pb)	Tm	GC	Long. amplificado (pb)	Especie
TGTACAGCTTGGTGTGGTTGAT	F	22	60,16	45,45	120	<i>O. niloticus</i>
GTGCCAGGATGTAAGGCCTCC	R	21	62,80	61,90		
TGTATAGTCTGGTGTGGCTCAT	F	22	58,63	45,45	120	<i>C. macropomum</i>
GTGACAGTATGTAGGGTCTCC	R	21	56,92	52,38		

F=Forward, R=Reverse

Las condiciones de ciclaje para el PCR fueron las siguientes: Activación inicial de un ciclo por 2 min a 95°C, 35 ciclos de 15 min a 95°C para desnaturalización, 1 ciclo de 30 seg a 62°C para alineamiento, un ciclo de 10 min a 72°C de extensión. Seguido por una extensión final de un ciclo a 4°C para conservación. Se corrieron los geles de agarosa al 1,5% durante 40 min a 70 V. Se utilizó como marcador de peso molecular el GeneRuler 100 bp DNA Ladder by Thermo Fisher Scientific y los geles de agarosa fueron visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador de la marca Cleaver Scientific.

Los amplificados de *Slc45a2* fueron purificados y enviados a secuenciar a la empresa Macrogen en Corea del Sur.

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. Luego se alineó las secuencias nucleotídicas obtenidas del gen *slc45a2* con el programa Mega X para obtener el árbol filogenético comparativo entre las secuencias nucleotídicas consenso de estas especies ictícolas (Kumar *et al.*, 2018).

Aspectos éticos

En el presente estudio se utilizó peces comerciales comestibles procedentes de criaderos (no se trata de peces silvestres). Los cuales son sacrificados diariamente para consumo local o venta, y esto está 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), y aprobados por la ASOPEBAID (2017) o la Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 2, 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.

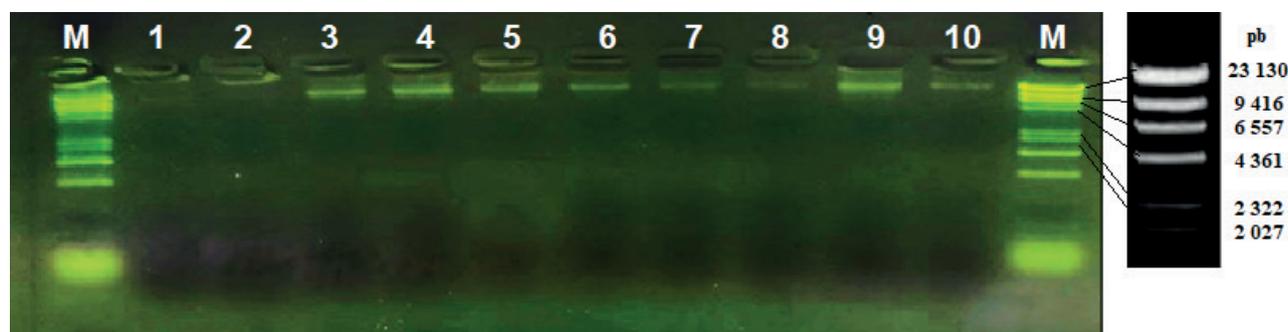


Figura 2. Corrida electroforética de las muestras de ADN extraídas (Banda amplificada de 21 000 pb aproximadamente). Especímenes de peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco silvestre; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar silvestre; 10 = Oscar albino (M = Marcador de peso molecular fago lambda digerido con Hind III).

En la figura 3, 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.

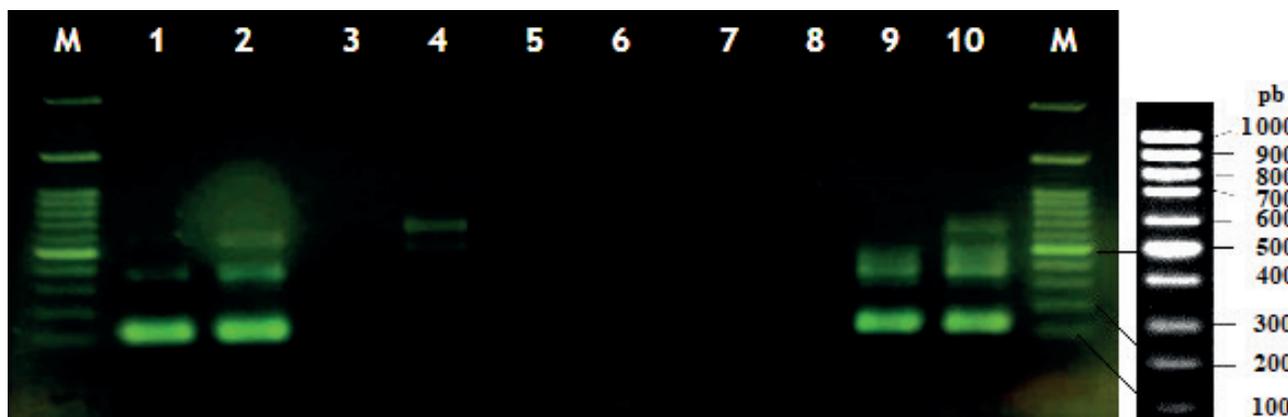


Figura 3. Gel de amplificación de los primers para el gen *slc45a4* de tilapia. Gel de amplificado con los primers para el gen *slc45a4* del pez Tilapia y probado para los peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco Silvestre; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar Silvestre; 10 = Oscar albino (M = Marcador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

En la figura 4, se observa que las bandas del ADN amplificadas del gen *slc45a4* con los primers para

Gamitana (*C. macropomum*) tuvieron un tamaño aproximado entre 100 a 200 pb.

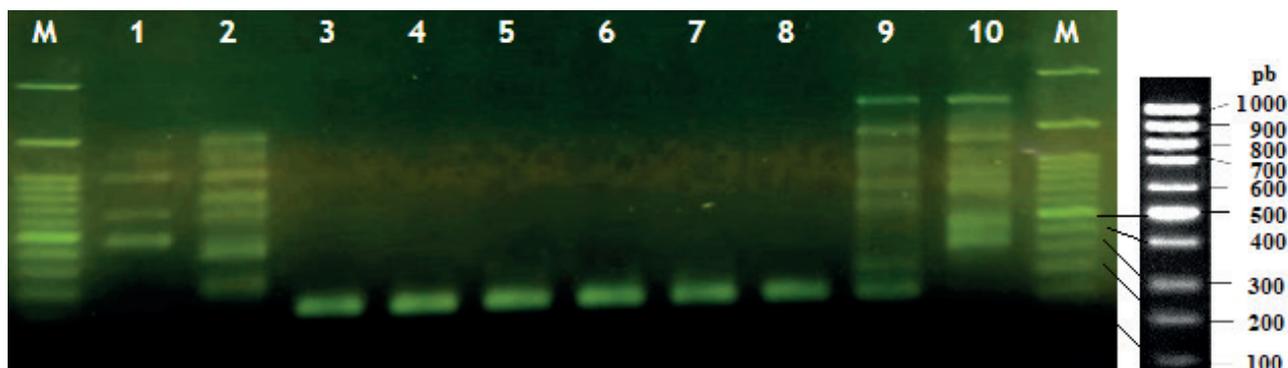


Figura 4. Gel de amplificación para los primers del gen *slc45a4* de Paco. Gel de amplificado con los primers para el gen *slc45a4* del pez Paco y probado para los peces: 1, 2 = Tilapia; 3, 4 = Paco Silvestre; 5, 6 = Paco albino; 7, 8 = Gamitana; 9 = Oscar Silvestre; 10 = Oscar albino (M = Marcador de peso molecular 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 MEGA para alinear y eliminar los “Gaps” quedando una secuencia consenso de 103 nucleótidos, y se realizó el análisis filogenético. En la Figura 5, se observa el árbol filogenético obtenido de la comparación de las secuencias nucleotídicas del gen de *slc45a4*.

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 (Fujii, 1993; Wang *et al.*, 2021). 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 (Fujii, 2000). Los peces teleosteos, que reflejan iridóforos, poseen los seis tipos de células pigmentarias (Kelsh, 2004).

La coloración está determinada principalmente por diversos pigmentos sintetizados por cromatóforos o células

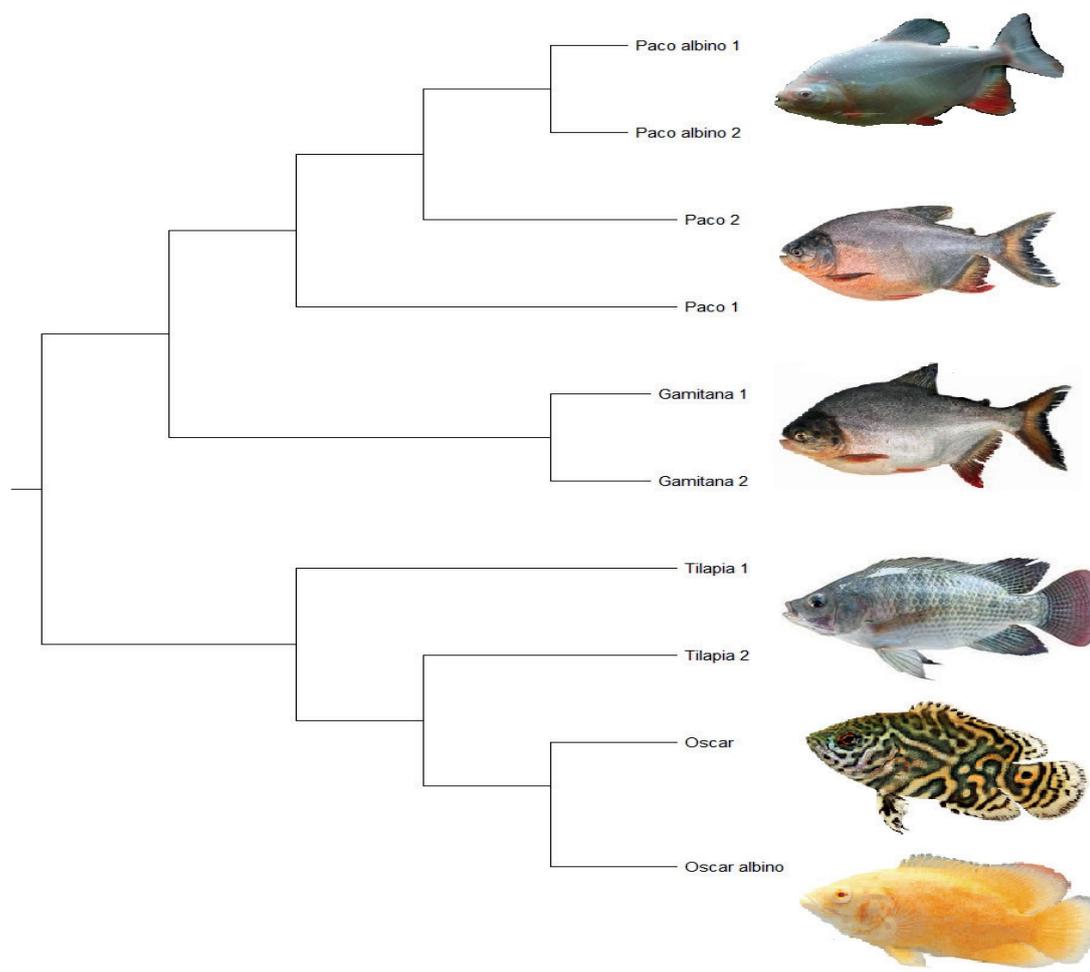


Figura 5. Árbol filogenético obtenido de las secuencias del gen *slc45a4* de las cuatro especies de ictícola. De arriba hacia abajo Paco albino, Paco, Gamitana, Tilapia, Oscar y Oscar albino.

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 (Parichy, 2006; Braasch *et al.*, 2007). No hay evidencia empírica de este gen con relación al fenotipo. Hay un mutante OCA4 único en el pez Medaka (*O. 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).

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).

Hoy se dispone del genoma completo secuenciado de Tilapia (*O. niloticus*) (Genbank, 2020a). También se tiene parte del genoma de la Gamitana (*C. macropomum*) donde está la secuencia nucleotídica del gen del *slc45a4* que sirvió para diseñar los primers para amplificar el mencionado gen en este estudio (Genbank, 2020b).

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 (Figura 3 y 4).

En la Figura 3, 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 5, se muestra la estrecha relación filogenética entre estas dos especies.

En la Figura 4, se visualiza el gel del amplificado con los primers para el gen *slc45a4* de la Gamitana, donde solamente amplificó para Paco y su versión albina junto con la 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 5, 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 por selección, 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 del Paco (Figura 6). 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 dentro de un programa de reproducción asistida con la información genómica.

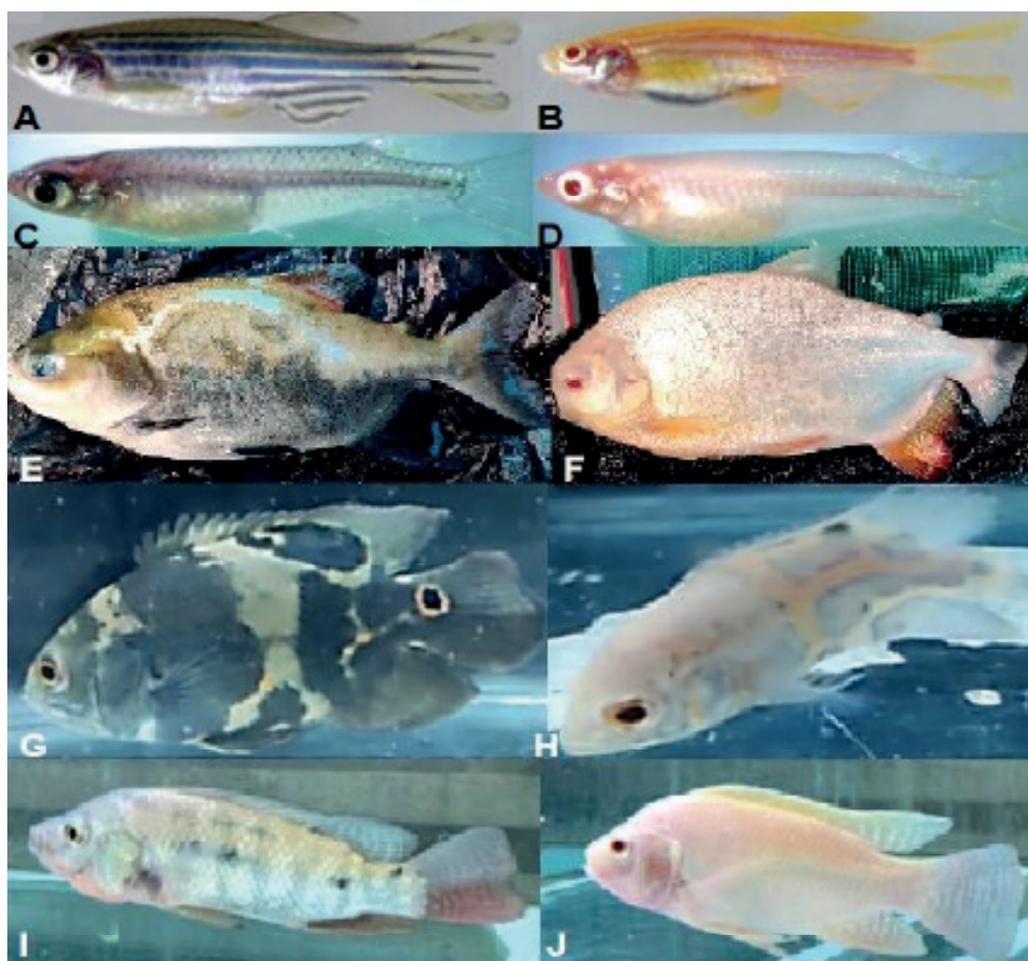


Figura 6. Modelos de versión mutada de albinismo en peces de consumo y ornamentales. Lado izquierdo versión con pigmentación. Lado derecho versión albina. A, B = Pez Cebra (*Danio rerio*), C, D = Pez Medaka (*Oryzias latipes*), E, F = Paco (*Piaractus brachypomus*), G, H = Oscar (*Astronotus ocellatus*), I, J = Tilapia (*Oerochromis niloticus*).

Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)

CSE = Carlos Scotto Espinoza
 WZC = Walter Zambrano-Cabanillas
 CDC = Catalina Díaz-Cachay
 BGC = Betty Gamero-Collado
 JVA = Jessica Vargas-Ayala
 HVM = Henry Vega Machuca
 DAR = Diana Apaza Rengifo

Conceptualization: CSE, CDC
Data curation: CDC, WZC
Formal Analysis: CSE, WZC, DAR
Funding acquisition: CSE, WZC
Investigation: CSE, CDC
Methodology: CSE, WZC
Project administration: CSE, HVM
Resources: CSE, BGC
Software: CSE, JVA
Supervision: CSE, CDC
Validation: CSE, CDC
Visualization: CSE, BGC
Writing – original draft: CSE, CDC
Writing – review & editing: CSE, CDC

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.
- ASOPEBAID. Asociación para el empleo y bienestar animal en la investigación y docencia del Perú (2017). <https://asopebaid.org.pe/>
- Baltazar, P., & Palacios, J. (2020). Malformaciones congénitas en larvas de *Oreochromis niloticus* durante la incubación en criadero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31, e17342.
- 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, 65-83.
- Braasch, I., Schartl, M., & Volff, J. (2007). Evolution of pigment synthesis pathways by gene and genome duplication in fish. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 14-18.
- Dooley, C.M., Schwarz, H., Mueller, K.P., Mongera, A., Konantz, M., Neuhaus, S., Nusslein-Volhard, C., & Geisler, R. (2012). Slc45a2 and V-ATPase are regulators of melanosomal pH homeostasis in zebrafish, providing a mechanism for human pigment evolution and disease. *Pigment Cell Melanoma Research*, 26, 205–217.
- Edvardsen, R. B., Leininger, S., Kleppe, L., Skaftnesmo, K. O., & Wargelius, A. (2014). Targeted Mutagenesis in Atlantic Salmon (*Salmo Salar L.*) Using the CRISPR/Cas9 System Induces Complete Knockout Individuals in the F0 Generation. *PLoS One*, 9, e108622.
- Esposito R., D’Aniello S., Squarzone P., Pezzotti M.R., Ristatore F., & Spagnuolo A. (2012). New insights into the evolution of metazoan tyrosinase gene family. *PLoS ONE*, 7, e35731.
- 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). *FishBase*. Froese, R., & Pauly, D. (Eds). www.fishbase.org
- Fujii, R. (1993). *Coloration and chromatophores*. En: Evans, D.H. *The physiology of fish*. CRC Press. pp. 535–562.
- Fujii, R. (2000). The regulation of motile activity in fish chromatophores. *Pigment cell research*, 13, 300-319.
- Fukamachi, S., Kinoshita, M., Tsujimura, T., Shimada, A., Oda, S., Shima, A., Meyer, A., Kawamura, S., & Mitani, H. (2008). rescue from oculocutaneous albinism Type 4 Using Medaka slc45a2 cDNA driven by its own promoter. *Genetics*, 178, 761-769.
- 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 (2020). *Bioproyecto: Secuenciación del genoma completo de Colossoma macropomum (Characiformes: Characidae): un pez amazónico importante para la*

- acuicultura en América del Sur*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/664082>
- Genbank (2023a). *ARNm del Miembro 2 de la familia 45 de portadores de soluto de Oreochromis niloticus (slc45a2)*, XM_003451484.3. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_003451484
- Genbank (2023b). *ARNm del Miembro 2 de la familia 45 de portadores de soluto de (Colossoma macropomum) (slc45a2)*, XM_0036589010.1 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_036589010
- Genbank (2023c). *ARNm del Miembro 2 de la familia 45 de portadores de soluto de (Danio rerio) (slc45a2)*, NM_001110377.1. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001110377
- Geneaid Biotech (2017). *Instruction Manual gSYNC™ DNA Extraction Kit*. Solid Tissue Protocol Procedure. <http://www.geneaid.com/sites/default/files/GS15.pdf>
- Hallerman, E. (2021). Genome editing in cultured fishes. *CABI Agricultura y Biociencia*, 2.
- 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, 1-11.
- 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 Research*, 17, 158–164.
- Kelsh, R. N. (2004). Genetics and evolution of pigment patterns in fish. *Pigment cell research*, 17, 326–336.
- Kullander, SO (1998). *Una filogenia y clasificación de los ciclidos sudamericanos (Teleostei: Perciformes)*. En LR Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena, & C.A.S. Lucena (eds.). *Filogenia y clasificación de peces neotropicales*. EDIPUCRS. pp. 461–498.
- 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.
- Ley30407. *Ley de protección y bienestar animal* (2016). Congreso de la República. Diario Oficial del Bicentenario: El Peruano N° 574725. <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>
- 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. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35, 77-86.
- Ministerio del Ambiente. (2021). *Línea de base de los peces ornamentales con fines de bioseguridad en el Perú*. https://bioseguridad.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2021/12/ldb_pecesornam_2021.pdf
- Parichy, D. M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* (Edinb). 97, 200–210.
- Programa CLC Genomics Workbench (2024). Versión 3.6.5. <https://digitalinsights.qiagen.com/ProgramaPrimer3Plus>. Versión 2.3.7. <https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>
- Protas, M.E. & Patel, N.H. (2008). Evolution of coloration patterns. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 425-446.
- Roy, S., Kumar, V., Behera, B.K., Parhi, J., Mohapatra, S., Chakraborty, T., & Das, B.K. (2022). CRISPR/Cas Genome Editing-Can It Become a Game Changer in Future Fisheries Sector? *Frontiers in Marine Science*, 9, 924475.
- Sparks, J., & Smith, W. (2004). Filogenia y biogeografía de peces cíclidos (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Cladística*, 20, 501–517.
- Segev-Hadar, A., Slosman, T., Rozen, A., Sherman, A., Cnaani, A., & 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, 583-594.
- Tsatskheladze, Z., Canfield, V., Ang, K., Wentzel, S., Reid, K., Berg, A.S., Johnson, S.L., Kawakami, K., & Cheng, K.C. (2012). Functional Assessment of Human Coding Mutations Affecting Skin Pigmentation Using Zebrafish. *PLOS ONE*, 7, e47398.

- Tsutsumi, M., Imai, S., Kyono-Hamaguchi, Y., Hamaguchi, S., Koga, A., & Hori, H. (2006). Color reversion of the albino medaka fish associated with spontaneous somatic excision of the Tol-1 transposable element from the tyrosinase gene. *Pigment Cell Research*, *19*, 243-247.
- Verri, T., Terova, G., Romano, A., Barca, A., Pisani, P., Storelli, C. & Saroglia, M. (2012). *The SoLute Carrier (SLC) Family Series in Teleost Fish*. Saroglia, M., & Liu, Zhanjiang (Eds.). *Functional Genomics in Aquaculture*. John Wiley & Sons, Inc. pp. 219-320.
- Wang, C., Lu, B., Li, T., Liang, G., Xu, M., Liu, X., Tao, W., Zhou, L., Kocher, T.D., & Wang, D. (2021). Nile Tilapia: A model for studying teleost color patterns. *Journal of Heredity*, *112*, 469-484.
- Wang, C., Xu, J., Kocher, T.D., Li, M., & Wang, D. (2022). CRISPR Knockouts of pmela and pmelb engineered a golden tilapia by regulating relative pigment cell abundance. *Journal of Heredity*, *113*, 398-413.
- 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*, *13*, 134.
- Zhang, C., Ren, Z. & Gong, Z. (2023). Generation of albino phenotype in ornamental fish by CRISPR/Cas9-mediated genome editing of slc45a2 Gene. *Marine Biotechnology*, *25*, 281-290.
- Zebrafish Information Network (ZFIN) (2022). <https://zfin.org/ZDB-FISH-150901-7721>

Received January 31, 2024.

Accepted February 13, 2024.