

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
04 de enero de 2024 (04.01.2024)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2024/005656 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/686 (2018.01) C12Q 1/6888 (2018.01)
C12Q 1/6879 (2018.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/PE2022/050016

(22) Fecha de presentación internacional:
25 de agosto de 2022 (25.08.2022)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
001334-2022/DIN
27 de junio de 2022 (27.06.2022) PE

(71) Solicitante: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA [PE/PE]; Avenida Pacífico N° 508, Urbanización Buenos Aires, Distrito Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento de Ancash, Santa, 02710 (PE).

(72) Inventores: ZELADA MÁZMELA, Eliana Victoria; Urbanización San Rafael K4-19, Distrito Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE). FERNANDINO, Juan Ignacio; Avenida Anchoqueta, Manzana W2, Lote 32, Distrito de Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE). DELGADIN, Tomás Horacio; Jirón Nepeña N° 168, Urbanización Buenos Aires, Distrito Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE). LOPEZ LANDAVERY, Edgar Alfonso; Calle Los Cipreses S-13, Distrito Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE). MARIN GUERRERO, Alan; Avenida César Vallejo N° 528, Urbanización Palermo, Distrito Trujillo, Provincia Trujillo, Departamento La Libertad, Trujillo, 13600 (PE). YZASIGA BARRERA, Carmen Gabriela; Urbanización Garatea, Manzana 123, Lote

8, Distrito Nuevo Chimbote, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE). REYES FLORES, Lorenzo Eduardo; Manzana 35, Lote 7, Pueblo San Jacinto, Distrito Nepeña, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02721 (PE). SANTOS ROJAS, Luis Enrique; San Carlos Manzana 4, lote 08A, Provincia Santa, Departamento Ancash, Santa, 02710 (PE).

(74) Mandatario: MERTZ PERU S.A.C.; Calle Los Laureles, N° 670, San Isidro, Lima, 15073 (PE).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

(54) Title: NON-INVASIVE EARLY SEXING KIT FOR PAICHE (ARAPAIMA GIGAS) USING REAL-TIME PCR

(54) Título: KIT DE SEXADO TEMPRANO NO INVASIVO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL PARA PAICHE (ARAPAIMA GIGAS)

(57) Abstract: The present invention relates to a non-invasive early sexing kit using real-time PCR to determine the sex of paiche (Arapaima gigas) at any age, said kit comprising one of the primer pairs of forward MSR_107 (TGGAAATCAGGGTGAAGCTGT) and reverse MSR_107 (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) or forward MSR_129 (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) and reverse MSR_129 (CGCTGTAATACACCTATACCATCC). The invention also relates to a non-invasive method for determining the sex of paiche (Arapaima gigas) by using real-time PCR, said method comprising the steps of providing a mucus sample or a tail fin segment, extracting genomic DNA, preparing and carrying out qPCR with a premix of MSR_107 or MSR_129 primer pairs and HKG primers, and analysing the dissociation curve due to the presence of peaks corresponding to the dissociation temperatures (T_m) of the amplified products.

(57) Resumen: La presente invención se encuentra dirigida a un kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para determinar el sexo de paiche (Arapaima gigas) en cualquier edad que comprende uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAAATCAGGGTGAAGCTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC) y a un método no invasivo de determinación del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (Arapaima gigas), que comprende las etapas de proporcionar una muestra de mucus o un segmento de aleta caudal, extraer ADN genómico, preparar y realizar qPCR con una premezcla de pares de cebadores MSR107 o MSR 129 y cebadores del HKG y analizar la curva de disociación por la presencia de los picos correspondientes a las temperaturas de disociación (T_m) de los productos amplificado.



WO 2024/005656 A1

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

KIT DE SEXADO TEMPRANO NO INVASIVO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL PARA PAICHE (*ARAPAIMA GIGAS*)

CAMPO TÉCNICO

[001] La presente invención se encuentra enmarcada en el campo técnico de la biotecnología y la industria farmacéutica para acuicultura continental para la identificación del sexo en paiche (*Arapaima gigas*), principalmente en el campo de la reproducción y cultivo de esta especie.

ESTADO DE LA TÉCNICA

[002] En la actualidad, la determinación del sexo en *Arapaima gigas* se realiza mediante endoscopia laparoscópica y métodos bioquímicos o inmunoenzimáticos de vida útil muy corta. Estos métodos tienen la limitante que su utilidad es aplicable sólo en la fase adulta. En el primer caso, la endoscopia es un método de muestreo invasivo en animales adultos (Carreiro et al., 2011), el cual tiene la desventaja que requiere realizar muestreo invasivo y cirugía solo en individuos adultos. En el caso de los kits de métodos bioquímicos o inmunoenzimáticos (Chu Koo et al., 2009), empleados habitualmente en Perú y Brasil, se realizan mediante una prueba de ELISA o a través de un kit comercial que tiene una vida útil de 3 meses, de muy alto costo y que, además, debe ser importado desde Francia.

[003] En el ámbito de patentes, se conoce el documento CN104808005 el cual describe un método para identificar mero gigante macho (*Epinephelus lanceolatus*). El método comprende los pasos de selección del mero gigante en la temporada de reproducción; obtener suero del mismo: seleccionar sangre de la vena caudal del mero gigante y realizar una centrifugación para obtener el suero; medir el contenido de vitelogenina en el suero mediante ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas); medir el contenido de 11-KT (11-cetotestosterona) en el suero con ELISA; e identificación del mero gigante macho en combinación con el contenido de vitelogenina y el contenido de 11-KT en el

suero del mero gigante. El método es rápido, eficiente y de alta precisión y no causa daños al espécimen.

[004] También se sabe del documento CN113528676 que divulga un método para usar el gen ARNr 5S para identificar el sexo fisiológico de los peces en la etapa inicial del desarrollo que incluye los pasos: uso de kits de extracción de ARN total o reactivos TRIzol y otros métodos convencionales para extraer ARN total de células animales, extraer ARN total de tejido gonadal de peces y usar un analizador de ácidos nucleicos (Nanodrop1000, etc.) para determinar la proporción de la densidad óptica 260/280. Se utiliza para valorar preliminarmente la pureza del ARN; separar el ARN total mediante electroforesis en gel de agarosa, observar el brillo y la distribución de las bandas pertenecientes a ARNr 5S, ARNr 5.8S, ARNr 18S y ARNr 28S. El tamaño del ARNr 5S está entre 130 y 150 nucleótidos. El valor máximo de la electroforesis microcapilar suele estar cerca de 140 nt, y el valor del ARN total se refiere al tamaño del área generada por todas las áreas cubiertas. Además, el tejido gonadal del pez, se puede muestrear de manera no letal por disección o con una herramienta de muestreo micro gonadal (u oviductor) y se toma una sección de tejido micro gonadal de 1 mg a 100 mg.

[005] De otra parte, el documento de patente EP3620536 proporciona un conjunto de biomarcadores epigenéticos útiles para predecir el sexo en peces, siendo dichos biomarcadores epigenéticos dinucleótidos citosina-guanina específicos (CpG) que están metilados diferencialmente en machos frente a hembras. Se encontró que los niveles de metilación de los promotores de los genes *dmrt1* y *cyp19a1a* son suficientes para agrupar los peces por sexo, donde el gen *cyp19a1a* está hipometilado en los ovarios con respecto a los testículos, mientras que el gen *dmrt1* está hipometilado en los testículos con respecto a los ovarios.

[006] La patente CN108998545 hace referencia a la aplicación de piR-mmu-31018127 de *Cynoglossus semilaevis*. La etiqueta sexual piR-mmu-31018127 se deriva de un exosoma del plasma seminal del pez. A través del análisis de secuenciación de ARN, se obtiene una etiqueta de piARN significativamente

diferente en expresión en dos tipos de peces mediante cribado, adoptándose como candidato, un biomarcador de piARN que tiene una función indicativa para los dos tipos de peces. Se determina finalmente a través de la verificación adoptando medidas cuantitativas en PCR tiempo real (qPCR). El piRNA de la etiqueta es piR-mmu-31018127 con una secuencia de GCATGTGGTTCAGTGGTAGAATTCTCGCCG, y se desarrolla un kit basado en la etiqueta. El método proporcionado es no invasivo y eficiente con un resultado de identificación confiable y se determina el sexo genético de *Cynoglossus semilaevis* mediante determinación cuantitativa.

[007] El documento de patente WO14129982 reporta sistemas de determinación del sexo en los peces mediante un método y kit de sexado conveniente y preciso que puede usarse en arañas rojas para establecer la proporción de sexos óptima de las poblaciones reproductoras que se emplearán durante la cría en cautiverio con fines de conservación y producción, en donde el método y el kit comprende un cebador que tiene una secuencia de oligonucleótidos de 5' TAACTCAAAGTAGAATAGACAATG 3' y un segundo cebador que tiene una secuencia de oligonucleótidos de 5' AATTCAAGGGAAGTACTGATGACTCTA 3' para identificar el sexo en una o más muestras de ADN genómico que pueden aislarse de una fuente de ADN, tal como músculo, branquias, aletas, mucus, heces o una combinación de uno o más de los mismos.

[008] Por su parte, el documento MX2013001464 reporta un método de obtención de una tira reactiva para el reconocimiento del sexo de lepisosteidos que comprende la purificación de vitelogenina a partir de plasma de especímenes de machos inducidos con estradiol, producción, purificación y marcaje de anticuerpos y elaboración de las tiras reactivas para el sexado de otras especies. Las tiras de nitrocelulosa o nylon con la vitelogenina inmovilizada en su superficie se emplean para el sexado de especies de peces que no presentan dimorfismo sexual, principalmente de lepisosteidos tanto a nivel de laboratorio como en campo.

[009] La patente ES2398811 reporta un método para la identificación del sexo en peces mediante el uso de una molécula asociada al ARN ribosómico 5s (ARNr 5s), o de una molécula involucrada en el transporte de proteínas que intervienen en la regulación de la transcripción del gen que codifica el ARN 5s como marcador para identificar el sexo en peces. La invención también se refiere a un método para clasificar por sexos una población de peces que comprende la determinación del nivel de expresión de una molécula asociada con 5s ARNr, o una molécula involucrada en el transporte de proteínas implicadas en la regulación de la transcripción del gen que codifica ARNr 5s. Los cebadores específicos son del gen ARNr 5S, número de acceso al Gen Bank AM706461 fw (SEQ ID NO: 1): 5'-CTTACGGCCATACCACCCTG 3' (SEQ ID NO: 2) y Rv 5'-GTATCCCAGGCGGTCTCC-3' (SEQ ID NO: 3) mediante reacciones de qPCR con ADN complementario (ADNc) a una concentración de 5 ng/μl.

[010] Por su parte, el documento US5480774 proporciona un método para determinar el sexo genómico de un salmónido mediante la detección de la presencia o ausencia del pseudogen de la hormona del crecimiento GH-PSI. El pseudogen se detecta mediante la amplificación de una subsecuencia seleccionada específica del pseudogen, o por formación dúplex de un ácido nucleico que se hibrida específicamente con el pseudogen y con ningún otro gen en el genoma de la especie de salmónidos. El método es útil en varios salmónidos, en particular en *Oncorhynchus tshawytscha* y *Oncorhynchus kisutch*.

[011] Desde el punto de vista de documentos científicos, se conoce el artículo "A duplicated copy of id2b is an unusual sex-determining candidate gene on the Y chromosome of arapaima (*Arapaima gigas*) de Mateus C. Adolfi et al. (2021) el cual indica que al incorporar un mapa de contacto cromosómico Hi-C se mejora el ensamblaje del genoma de *Arapaima* a nivel cromosómico, revelando un alto grado inesperado de reordenamientos cromosómicos durante la evolución de los Osteoglossiformes, y al combinar el nuevo reordenamiento con un pool de secuenciación de genomas masculinos y femeninos, se logra identificar el gen id2bbY que corresponde a una copia duplicada del inhibidor del

gen 2b (id2b) de unión al ADN en el cromosoma Y como gen candidato determinante del sexo masculino.

[012] El artículo titulado “The genome of the *Arapaima (Arapaima gigas)* provides insights into gigantism, fast growth and chromosomal sex determination system” de Kang Du et al. (2019) indica que se generó un draft de la secuencia del genoma con buena contigüidad que proporciona una referencia útil para análisis filogenómico y evolutivo genómico comparativo. Con este fin, se identifica genes candidatos que pueden estar relacionados con rasgos específicos de *Arapaima*, por ejemplo: rápido crecimiento, gran tamaño corporal, adaptaciones a un estilo de vida carnívoro y función del órgano secretor similar a una glándula que se encuentra en la superficie de la cabeza de machos y hembras. En este contexto, se encontró una expresión génica específica masculina en el órgano secretor, que asigna tanto una función de nutrición de alevines y también una función de señalización de tipo feromona para las hembras locales. Por primera vez, se infiere de los datos genómicos, un posible sistema genético que determina el sexo de la heterogeneidad masculina en esta especie que presenta cromosomas homomórficos para ambos sexos.

[013] Otro artículo relacionado es el titulado “De novo transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in *Arapaima gigas* (Schinz, 1822), an ancient amazonian Freshwater fish” de Luciana Watanabe et al. (2018) el cual hace referencia al establecimiento de cuatro bibliotecas de *A. gigas*: hígado masculino, hígado femenino, piel masculina y piel femenina. Las bibliotecas de ADN complementario (ADNc) se restringieron en dos pasos, en primer lugar, la fragmentación del ARN total y luego la síntesis del ADNc bicatenario. La cantidad inicial del ARN utilizado en la fragmentación fue de 600 ng/μl, con cloruro de zinc (ZnCl₂) y Tris. Se agrega HCl para iniciar el proceso de fragmentación. Las muestras de ARN se analizaron luego en un bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.), utilizando el kit RNA 6000 Pico (Agilent Technologies). A continuación, se obtuvo ADNc bicatenario, utilizando el kit ADNc Synthesis System (Roche), con los siguientes cuatro pasos: desnaturalización del ARN, síntesis de la segunda

cadena de ADNc y purificación de las hebras de ADNc dobles. Los extremos irregulares de los fragmentos de ADNc generados por este proceso, se repararon y se incorporaron adaptadores en ambos extremos de las cadenas de ADNc. Finalmente, los fragmentos de ADNc se cuantificaron utilizando un fluorómetro TBS 380 QuantiFluor (Promega, EE. UU.). Se verificó el tamaño de los fragmentos de cADN en el bioanalizador (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) utilizando un chip de alta sensibilidad de ADN.

[014] El artículo “Bulked segregant analysis of the pirarucu (*Arapaima gigas*) genoma for identification of sex-specific molecular markers” de I.G. Almeida et al. (2013) en donde se indica que se analizaron pooles de DNA de machos y hembras de *A. gigas* con cebadores 566 RAPD (Análisis Segregante Masivo con ADN polimórfico al azar) generando 2609 fragmentos con un estimado de 1341 marcadores polimórficos segregantes y un promedio estimado de espacios de 714 kb que corresponde a menos del 0.1% del genoma de la especie. Se identificaron dos fragmentos sexo-específicos putativos en todas las muestras y se sugiere que *Arapaima gigas* ha desarrollado un sistema no cromosomal de determinación de sexo o de manera alternativa, la especie ha experimentado una pérdida reciente del cromosoma que lleva el sitio de determinación del sexo.

[015] Finalmente, el artículo “Non-invasive sex genotyping of paiche *Arapaima gigas* by qPCR: An applied bioinformatic approach to identify sex differences” de López-Landavery et al. (2021) muestra el desarrollo de una herramienta molecular para sexado genotípico de paiche a lo largo de su ciclo de vida. Se recolectaron muestras de gónadas, aletas y mucus de branquias de especímenes juveniles de instalaciones locales para análisis histológico y molecular. Basado en la reciente secuencia del genoma de paiche disponible, y utilizando el método actual NGS, se implementó un enfoque novedoso, llamado “Diferencias del genoma por lecturas no asignadas”, para identificar marcadores sexuales de ADN. Se encontró una Región Específica del macho (MSR), identificado como MSR_3728, por estar presente solo en machos. A continuación, se diseñó dos conjuntos específicos de cebadores en esta región para identificar el sexo genotípico mediante ensayos de qPCR. Ambos conjuntos

de cebadores, MSR_107 y MSR_129, detectaron machos con 100% de exactitud.

[016] En este sentido, es claro que existe la necesidad aún no satisfecha de proporcionar un kit y un método de determinación temprana del sexo del paiche (*Arapaima gigas*) que pueda ser aplicado en cualquier etapa del ciclo de vida de esta especie en donde el kit y el método sea un método molecular rápido, económico, sensible y eficiente mediante un muestreo no invasivo; en donde el kit y el método proporcione una notable mejoría respecto de los métodos actuales para la identificación del sexo en *A. gigas* y que ofrezca ventajas principalmente frente a métodos conocidos en relación con la rapidez y determinación del sexo del animal en cualquier etapa de su ciclo de vida.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[017] La presente invención se encuentra dirigida a un kit y un método no invasivo de terminación temprana del sexo en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) que se basa en la la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la identificación no invasiva del sexo genético de ejemplares de cualquier edad de *Arapaima gigas*, a partir del ADN genómico extraído de muestras de mucus presente en sus branquias o de un pequeño segmento de su aleta caudal, mediante su interacción con dos pares de cebadores (oligonucleótidos) desarrollados en esta invención para tal fin y diseñados sobre una región del genoma específica de machos (MSR) y un juego de cebadores diseñados para amplificar el gen TATA-Box Binding Protein Like 1 (TBPL1_205) que actúa como control o *housekeeping gene* (HKG) de la técnica.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[018] La Figura 1 muestra las curvas de disociación obtenidas a partir de los amplicones generados por método molecular de acuerdo con la presente invención a través del ensayo de PCR en tiempo real para los picos generados con el marcador de la región específica del macho MSR_107 y el gen de referencia TBPL1 en paiche *Arapaima gigas* en donde se pone en contacto una

muestra con los cebadores sexo-específico MSR_107 y el control endógeno TBPL1_205.

[019] La Figura 2 muestra las curvas de disociación obtenidas a partir de los amplicones generados por método molecular de acuerdo con la presente invención a través del ensayo de PCR en tiempo real para los picos generados con el marcador de la región específica del macho MSR_129 y el gen de referencia TBPL1 en paiche *arapaima gigas*, en donde se pone en contacto una muestra con los cebadores sexo-específico MSR_129 y control endógeno TBPL_205. La presencia de la curva de disociación para los cebadores MSR_107 y MSR_129 determina el sexo masculino del individuo analizado (primer pico de izquierda a derecha en la figura 2) y a su vez la ausencia de esta curva de disociación indica el sexo femenino de la muestra analizada.

[020] La Figura 3 muestra el gel de agarosa para los productos PCR de regiones específicas de macho. Se muestra que los machos (M) presentan dos bandas: una perteneciente a la región específica de macho MSR_107 y la otra banda perteneciente al TBPL1_205, mientras que la hembra (FM) sólo presenta la banda perteneciente al TBPL1_205.

[021] La Figura 4 muestra el gel de agarosa para los productos PCR de regiones específicas de macho. Se muestra que los machos (M) presentan dos bandas: una perteneciente a la región específica de macho MSR_129 y la otra banda perteneciente al TBPL1_205, mientras que la hembra sólo presenta la banda perteneciente al TBPL1_205.

[022] La Figura 5 muestra las regiones en *A. gigas* desde donde se colectó tejido para la extracción de ADN. A. extracción de AND genómico de gónadas, aleta caudal y moco para análisis de qPCR; B. fijación gonadal para análisis histológico.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[023] En un primer aspecto, la presente invención hace referencia a un kit de sexado no invasivo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*)

como solución a los problemas antes mencionados, el cual se desarrolló en la presente invención, mediante la implementación de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) para la identificación no invasiva del sexo genético de ejemplares de cualquier edad de *Arapaima gigas*, a partir de ADN genómico extraído de muestras de mucus presente en sus branquias o de un segmento de su aleta caudal, mediante el empleo de dos pares de cebadores desarrollados en esta invención para tal fin y diseñados sobre una Región del Genoma Específica de Machos (MSR) y un juego de cebadores diseñados para amplificar el gen TATA-Box Binding Protein Like 1 (TBPL1) que actúan como control de la técnica (*reference gene* o *housekeeping gene*, HKG).

[024] El kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de la presente invención permite identificar machos de *A. gigas* mediante la detección de la MSR usando uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC), observado como un pico a 76,6°C o 77,5°C respectivamente en la curva de disociación junto a un pico a 84,7°C correspondiente al HKG que comprende los cebadores del gen presente en machos y hembras TATA-Box Binding Protein like 1 (HKG): TBPL1 directo (CTCTGGCTTGTAGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTGCGTGTCTCTGTGG). Las hembras se identifican por la ausencia de los picos a 76,6°C/77,5°C en la curva de disociación y la presencia del pico a 84,7°C del HKG.

[025] El kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real del paiche (*Arapaima gigas*) comprende además hisopos estériles, solución amortiguadora de lisis, solución acuosa de NaOH para la extracción del ADN genómico y una mezcla maestra (Master Mix) que comprende los reactivos necesarios para el ensayo qPCR los cuales son solución amortiguadora (buffer), enzima, nucleótidos, los cebadores sexo específicos, un control positivo y un control negativo. El kit comprende uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso

(GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo
(GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso
(CGCTGTAATACACCTATAACCATCC).

[026] El kit puede incluir además otros materiales/componentes deseables entre los que incluyen lancetas, soluciones amortiguadoras, por ejemplo, Solución amortiguadora de muestra, diluyentes, filtros, capilares, agujas y/o jeringas, entre otros.

[027] En un segundo aspecto, la presente invención hace referencia a un método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*), el cual comprende las siguientes etapas:

- a) Proporcionar una muestra de mucus de branquias de *Arapaima gigas* o un segmento de la aleta caudal;
- b) Extraer ADN genómico e incubar en bloque térmico;
- c) Preparar y realizar qPCR agregando el ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A y agregar una premezcla de uno de los pares de cebadores MSR107 o MSR 129 y cebadores del HKG y hacer la reacción; y
- d) Analizar las curvas de disociación.

[028] En la etapa a) la muestra se realiza mediante la colección de una muestra de mucus mediante un hisopo de las branquias de un ejemplar de *A. gigas*, luego, el cual se sumerge en 1ml de solución amortiguadora de lisis. En estadios de alevinos, juveniles o cuando no fuera posible coleccionar mucus, se corta un segmento de entre 2 mm a 4 mm de sección máxima de la aleta caudal y se lo sumerge en 1ml de etanol 96 %.

[029] En la etapa b) la extracción del ADN genómico se realiza mediante la adición a la muestra en solución amortiguadora de lisis de 180µl de NaOH 50 mM, y 0.2 mM EDTA, se incuba en bloque térmico por 5 minutos a 95°C, al que luego se le agrega 180µl de Tris-HCl 300 mM pH 8.0.

[030] En la etapa c) la preparación y realización de PCR en tiempo real (qPCR) se realiza mediante la adición de 2µl de ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A (10µl), la cual comprende la enzima *Taq*-polimerasa, el fluoróforo intercalante SYBR Green de fórmula química $C_{32}H_{37}N_4S$, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifostato), solución amortiguadora y Mg^{2+} . Inmediatamente, se agregan 1.5µl (0.1 uM) de una premezcla de uno de los pares de cebadores MSR107 o MSR 129 y 1.5µl (0.05 uM) de los cebadores del HKG. Los tubos de reacción son puestos en el equipo termociclador, el cual debe contar con los filtros específicos para detectar la emisión del fluoróforo utilizado. Se procede a comenzar la reacción con 5 minutos a 95°C. Seguidamente, se realizan 35 ciclos de amplificación, cada ciclo consiste en 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C. Posteriormente, se realiza la curva de disociación incrementando la temperatura de reacción de 60°C a 95° con pasos crecientes de 2.2°C/s.

[031] En la etapa d), el análisis se realiza mediante la evaluación de la presencia de los picos correspondientes a las temperaturas de disociación (*melting*) (T_m) de los productos de amplificación generados por los pares de cebadores MSR107/MSR129 según corresponda, y al par de cebadores control HKG. La presencia de dos picos a las T_m correspondientes indica que el ejemplar es macho (Figura 1). La presencia de un solo pico, correspondiente al HKG, indica un ejemplar hembra (Figura 2). En caso de no haber un pico correspondiente al HKG, la identificación es indeterminada y la reacción debe repetirse.

[032] En este sentido, el método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de cualquier edad es implementado por la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real sobre ADN genómico extraído de muestras de mucus presente en las branquias del animal o de un segmento de su aleta caudal o de cualquier otro tejido del animal, mediante la etapa de poner en contacto dicha muestra con un par de cebadores sexo específicos que hibrida y amplifica una región genómica específica de machos (MSR) y un par de cebadores que hibrida y amplifica una región presente en machos y hembras (HKG) y de esta forma con ambos pares

de cebadores presentes en el tubo de reacción y luego de concluida la reacción se identifica como macho si se detectan el producto de amplificación de la MSR y el HKG o hembras si solo se verifica la presencia del HKG.

[033] Por lo anterior, el método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la presente invención comprende en la etapa c) las secuencias de los pares de cebadores sexo específicos MSR_107 directo: (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso: (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) y MSR129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC), en donde el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_107 tiene una temperatura de disociación de 76.6°C y el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_129 es de 77.5°C.

[034] El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la presente invención comprende en la etapa c) la secuencia de pares de cebadores para amplificar el gen presente en machos y hembras TATA-Box Binding Protein like 1 (HKG): TBPL1 directo (CTCTGGCTTGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTGCGTGTCTCTGTGG), el cual tiene una temperatura de disociación (Tm) de 84.7°C.

[035] Adicionalmente, mediante el método de acuerdo con la presente invención los productos de amplificación de los cebadores anteriormente indicados, pueden ser además diferenciados mediante electroforesis en gel de agarosa, gel de poliacrilamida o una mezcla de ambos.

[036] El método de acuerdo con la presente invención en la etapa c) tiene un perfil de temperaturas de la qPCR característico el cual comprende 5 minutos iniciales a 95°C, seguidos de 35 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C, seguidos del perfil de la curva de disociación que comprende el aumento escalonado de temperaturas de 2.2°C desde 60°C a 95°C.

[037] En un tercer aspecto, la presente invención hace referencia al uso del kit de sexado no invasivo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) a través de la identificación de machos de *A. gigas* mediante la detección de la MSR usando uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC).

EJEMPLOS DE LA MEJOR MANERA DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo 1

[038] Según lo mencionado anteriormente, la presente invención comprende un método molecular no invasivo para la determinación del sexo del paiche *Arapaima gigas* y un kit con los reactivos necesarios para el ensayo PCR (Buffers, nucleótidos, enzima, cebadores sexo específico).

[039] Se utilizaron hisopos estériles para la obtención de mucus de las branquias de 35 individuos juveniles de *A. gigas* de una piscigranja local. Los hisopos que contuvieron el mucus fueron preservados en microtubos de 2ml conteniendo 1ml de solución amortiguadora de lisis hasta su análisis molecular, transportados al laboratorio en un enfriador (cooler) a 4°C. El ADN genómico fue extraído agregando al microtubo 180µl de NaOH 50 mM, agitados en un vórtex y colocados en una placa térmica para microtubos por 5 minutos a 95°C. Luego se procedió a retirar el hisopo y se realizó una breve centrifugación. La integridad del ADN genómico extraído fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% (migración 100V por una hora). La pureza y concentración fueron obtenidas usando un espectrofotómetro Epoch Microplate y un fluorómetro Qubit.

[040] Los cebadores sexo-específico que participan en el kit y en el método de acuerdo con la presente invención fueron sintetizados por encargo a la compañía Integrated DNA Technologies (IDT, USA). Para la preparación de la mezcla de

qPCR se utilizó el kit LightCycler 480 SYBR-Green I Master (Roche). El volumen final de las reacciones fue de 20µl y cada reacción consta de: 10µl de la mezcla maestra (master mix) LightCycler 480 SYBR-Green I Master (2X), 0.1 µM de los cebadores sexo específico MSR107, 0.05 µM de los cebadores control endógenos TBPL1 y 30ng de ADN genómico total, la diferencia en volumen se completó utilizando agua para PCR. Para la amplificación por qPCR se utilizó un termociclador en tiempo real LightCycler 480 II (Roche) con un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de amplificación que consisten de una denaturación a 95°C por 15 segundos seguido de hibridación/extensión a 62°C por 60 segundos. Una vez terminada la amplificación por qPCR, se realizó la creación de las curvas de disociación en el mismo equipo LightCycler 480 II, que consiste en elevar la temperatura gradualmente desde 60°C hasta 95°C con una rampa de temperatura de 2.2°C/s.

[041] Se observó que usando los oligonucleótidos sintéticos MSR_107 (cebadores sexo específico) y TBPL1 (cebador control endógeno) todos los individuos machos (22 individuos) produjeron un amplicón sexo-específico de 107 pb (curva de disociación con un valor de 76.6°C) y un segundo amplicón con un tamaño de 205 pb (curva de disociación con un valor de 84.7°C). Por otro lado, todos los individuos hembras (13 individuos) solamente amplificaron el amplicón producido por el cebador para el control endógeno (HKG) de 205 pb (TBPL1_205).

[042] De este modo, la utilización simultánea de ambos juegos de cebadores (sexo específico y control endógeno) en una sola reacción asegura una identificación precisa del sexo en el paiche *A. gigas* con una tasa de identificación del 100%.

[043] La realización de esta técnica supone una notable mejoría respecto de los métodos actuales para la identificación del sexo en *A. gigas* dado que el kit y el método de la presente invención es no invasivo, es un método rápido y finalmente, porque puede ser utilizado para identificar el sexo genético en ejemplares de *A. gigas* de cualquier edad.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para determinar el sexo de paiche (*Arapaima gigas*) en cualquier edad, caracterizado porque el kit comprende uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATAACCATCC).

2. El kit de sexado temprano no invasivo mediante PCR en tiempo real para determinar el sexo de paiche (*Arapaima gigas*) en cualquier edad de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además hisopos estériles, solución amortiguadora de lisis, solución acuosa de NaOH, controles endógenos TBPL1 directo (CTCTGGCTTGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTTGCGTGTCTCTGTGG) y SYBR-Green I Master Mix 2x.

3. Un método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*), el cual comprende las siguientes etapas:
 - a) Proporcionar una muestra de mucus de branquias de *Arapaima gigas* o un segmento de la aleta caudal;
 - b) Extraer ADN genómico e incubar en bloque térmico;
 - c) Preparar y realizar qPCR agregando el ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A y agregar una premezcla de uno de los pares de cebadores MSR107 o MSR 129 y cebadores del HKG y hacer la reacción; y
 - d) Analizar las curvas de disociación.

4. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa b) la extracción del ADN genómico se realiza mediante la adición a la muestra en solución amortiguadora de lisis de 180µl

de NaOH 50 mM, y 0.2 mM EDTA y se incuba en bloque térmico por 5 minutos a 95°C, al que luego se le agrega 180µl de Tris-HCl 300 mM pH 8.0.

5. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa c) la preparación y realización de PCR en tiempo real (qPCR) se realiza mediante la adición del ADN genómico extraído en la etapa b) a una solución A que comprende enzima *Taq*-polimerasa, fluoróforo intercalante SYBR Green, dNTPs, solución amortiguadora y Mg²⁺ e inmediatamente se agregan una premezcla de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAATCAGGGTGAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) y MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC) y de los cebadores del gen presente en machos y hembras *TATA-Box Binding Protein Like 1* (HKG) TBPL1 directo (CTCTGGCTTGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTTGCGTGTCTCTGTGG).
6. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque en la etapa c) en donde los tubos de reacción son puestos en un equipo termociclador y la reacción se realiza con 5 minutos a 95°C y seguidamente, se realizan 35 ciclos de amplificación, en donde cada ciclo consiste en 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 62°C, posteriormente se realiza la curva de disociación incrementando la temperatura de reacción de 60°C a 95° con pasos crecientes de 2.2°C/s.
7. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5, caracterizado porque el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_107 tiene una temperatura de disociación de 76.6°C y el producto de amplificación para el par de cebadores MSR_129 es de 77.5°C.
8. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5,

caracterizado porque el producto de amplificación amplificar del gen TATA-Box Binding Protein like 1 (HKG): TBPL1 directo (CTCTGGCTTG TAGATGACATTGG) y TBPL1 reverso (TTTGTTGCGTGTCTCTGTGG), tiene una temperatura de disociación (T_m) de 84.7°C.

9. El método no invasivo de determinación temprana del sexo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) de acuerdo con la reivindicación 5 caracterizado porque los productos de amplificación se diferencian además mediante electroforesis en gel de agarosa, del de poliacrilamida o una mezcla de agarosa y poliacrilamida.
10. Uso de un kit de sexado temprana no invasivo mediante PCR en tiempo real para paiche (*Arapaima gigas*) mediante la identificación de machos de *A. gigas* mediante la detección de la MSR usando uno de los pares de cebadores MSR_107 directo (TGGAAATCAGGGTGAAACTGT) y MSR_107 reverso (GTCGTCCCTAAGCTGGTTATTATC) o MSR_129 directo (GATAATAACCAGCTTAGGGACGAC) y MSR_129 reverso (CGCTGTAATACACCTATACCATCC).

FIGURAS

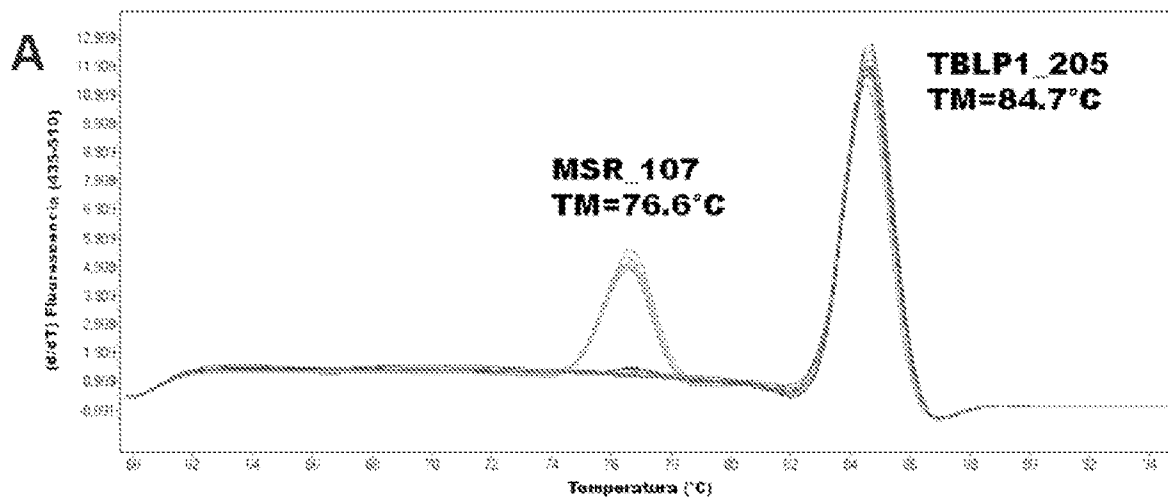


FIGURA 1

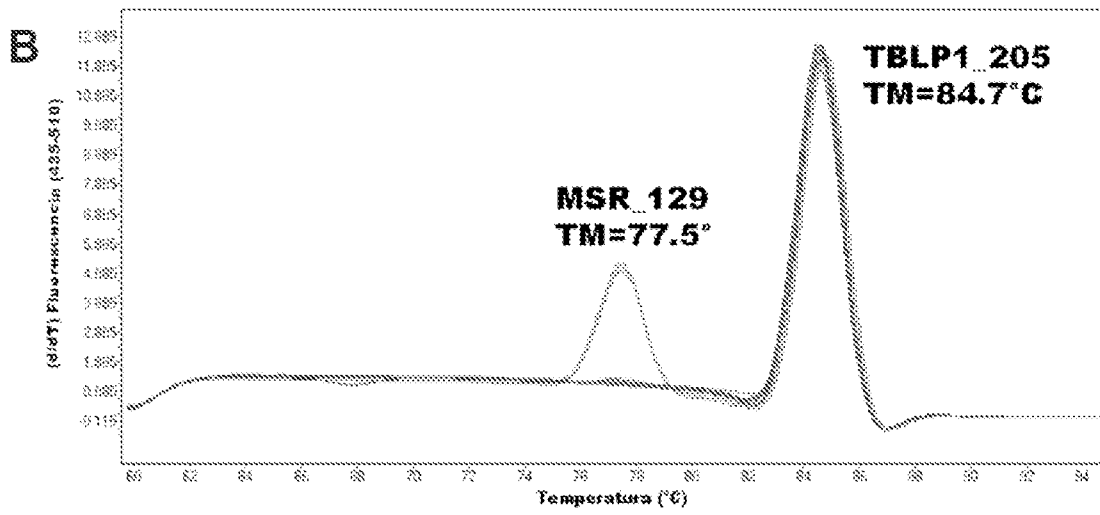


FIGURA 2

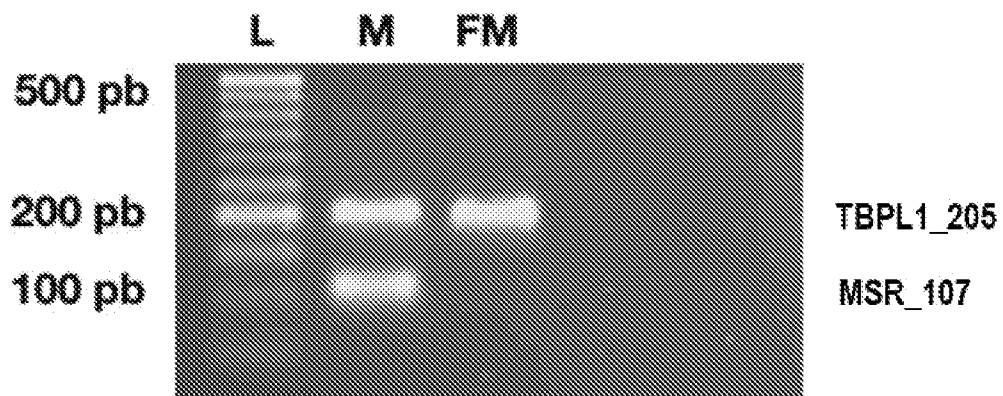


FIGURA 3

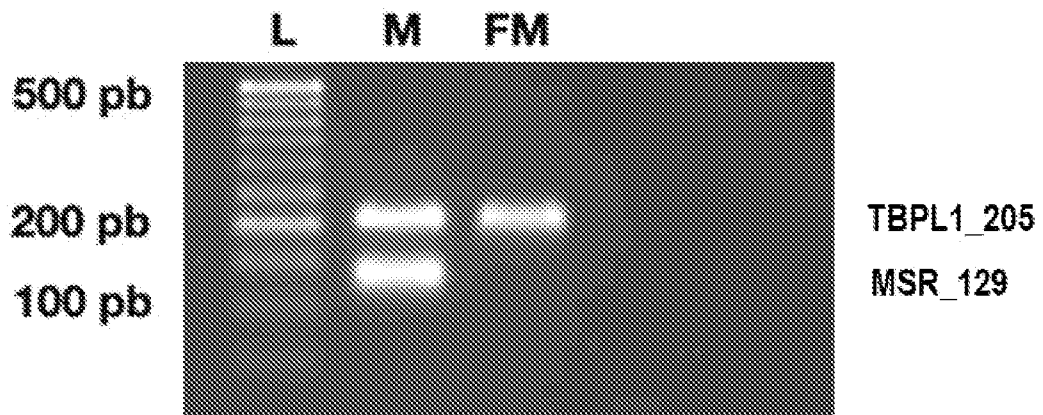


FIGURA 4

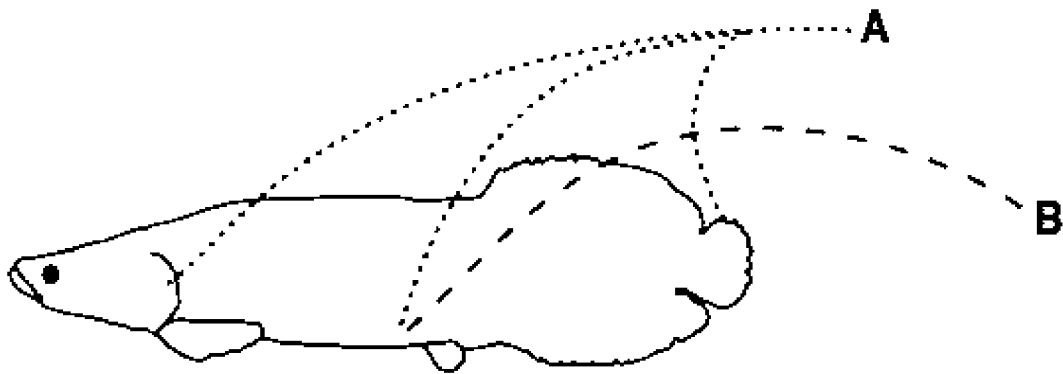


FIGURA 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/PE2022/050016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER CIP: C12Q1/686; C12Q1/6879; C12Q1/6888 (2023.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) CIP: C12Q1/686; C12Q1/6879; C12Q1/6888 CPC: Y02A40/81; C12Q2565/125 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN; PUBMED; ESPACENET; RESEARCHGATE; GOOGLE SCHOLAR; INAPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LÓPEZ-LANDAVERY, E. A. et al. Non-invasive sex genotyping of paiche <i>Arapaima gigas</i> by qPCR: An applied bioinformatic approach for identifying sex differences. <i>Aquaculture</i> , 2022, vol. 546, p. 737388. Available online 27 August 2021. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737388 The whole document "cited in the application "	1-10
A	DU, K. et al. The genome of the arapaima (<i>Arapaima gigas</i>) provides insights into gigantism, fast growth and chromosomal sex determination system. <i>Scientific reports</i> , 2019, vol. 9, no 1, p. 5293. DOI: 10.1038/s41598-019-41457-x The whole document "cited in the application "	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 March 2023		Date of mailing of the international search report 21 March 2023
Name and mailing address of the ISA/ INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17 Santiago, Chile		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/PE2022/050016

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ADOLFI, M. C. et al. A duplicated copy of id2b is an unusual sex-determining candidate gene on the Y chromosome of arapaima (<i>Arapaima gigas</i>). Scientific Reports, 2021, vol. 11, no 1, p. 21544. DOI: 10.1038/s41598-021-01066-z The whole document "cited in the application "</p>	
A	<p>WATANABE, L. et al. De novo transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in <i>Arapaima gigas</i> (Schinz. 1822), an ancient Amazonian freshwater fish. Plos one, 2018, vol. 13, no 10, p. e0206379. DOI: 10.1371/journal.pone.0206379 The whole document "cited in the application "</p>	
A	<p>SANTOS, C. H. A. et al. Insight to new genes with sex-biased to bony-tongued fishes: Differentially expressed genes in adult individuals of <i>Arapaima gigas</i> revealed by RNA-Seq. Aquaculture Research, 2021, vol. 52, no 11, p. 5617-5629. DOI: 10.1111/are.15437 The whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/PE2022/050016

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

The application does not contain a sequence listing. The sequences searched correspond to those disclosed in the description.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/PE2022/050016

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
 CIP: C12Q1/686; C12Q1/6879; C12Q1/6888 (2023.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP: C12Q1/686; C12Q1/6879; C12Q1/6888 CPC: Y02A40/81; C12Q2565/125

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

STN; PUBMED; ESPACENET; RESEARCHGATE; GOOGLE SCHOLAR; INAPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	LÓPEZ-LANDAVERY, E. A. et al. Non-invasive sex genotyping of paiche Arapaima gigas by qPCR: An applied bioinformatic approach for identifying sex differences. Aquaculture, 2022, vol. 546, p. 737388. Available online 27 August 2021. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737388 Todo el documento "Citado en la solicitud"	1-10
A	DU, K. et al. The genome of the arapaima (Arapaima gigas) provides insights into gigantism, fast growth and chromosomal sex determination system. Scientific reports, 2019, vol. 9, no 1, p. 5293. DOI: 10.1038/s41598-019-41457-x Todo el documento "Citado en la solicitud"	

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante. "D" documento citado por el solicitante en la solicitud internacional "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior. "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada). "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"I" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención. "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado. "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia. "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
--	---

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 13/03/2023 13/marzo/2023	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 21/03/2023 21/marzo/2023
--	--

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17 Santiago, Chile N° de fax	Funcionario autorizado AGUILERA, Mauricio N° de teléfono 56-2-28870551
--	--

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/PE2022/050016

C (continuación)		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	<p>ADOLFI, M. C. et al. A duplicated copy of id2b is an unusual sex-determining candidate gene on the Y chromosome of arapaima (<i>Arapaima gigas</i>). <i>Scientific Reports</i>, 2021, vol. 11, no 1, p. 21544. DOI: 10.1038/s41598-021-01066-z Todo el documento "Citado en la solicitud"</p>	
A	<p>WATANABE, L. et al. De novo transcriptome based on next-generation sequencing reveals candidate genes with sex-specific expression in <i>Arapaima gigas</i> (Schinz, 1822), an ancient Amazonian freshwater fish. <i>Plos one</i>, 2018, vol. 13, no 10, p. e0206379. DOI: 10.1371/journal.pone.0206379 Todo el documento "Citado en la solicitud"</p>	
A	<p>SANTOS, C. H. A. et al. Insight to new genes with sex-biased to bony-tongued fishes: Differentially expressed genes in adult individuals of <i>Arapaima gigas</i> revealed by RNA-Seq. <i>Aquaculture Research</i>, 2021, vol. 52, no 11, p. 5617-5629. DOI: 10.1111/are.15437 Todo el documento</p>	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/PE2022/050016

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias:
 - a. que forma parte de la solicitud internacional tal y como se presentó.
 - b. presentada con posterioridad a la fecha de presentación internacional a los fines de la búsqueda internacional (Regla 13ter.1.a):
 - junto con una declaración según la cual la lista de secuencias no excede la divulgación contenida en la solicitud internacional tal como se presentó.
2. Con respecto a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional, este informe se ha establecido en la medida en que fue posible llevar a cabo una búsqueda significativa en ausencia de una lista de secuencias conforme con la Norma ST.26 de la OMPI.
3. Comentarios adicionales:

La Solicitud no incluye un Listado de Secuencias. Las secuencias buscadas corresponden a las divulgadas en la Descripción.