

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**



**“LOCALIZACIÓN DE GENES Y MARCADORES MOLECULARES  
DE ALPACA (*Vicugna pacos*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)”**

**Presentada por:**

**MAYRA NOHELIA MENDOZA CERNA**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Lima – Perú**

**2019**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**“LOCALIZACIÓN DE GENES Y MARCADORES MOLECULARES  
DE ALPACA (*Vicugna pacos*) MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH)”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO  
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**Presentada por:**

**MAYRA NOHELIA MENDOZA CERNA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Mg.Sc. Jorge Calderón Velásquez  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso  
**PATROCINADOR**

Ph.D. Federico Abel Ponce de León Bravo  
**CO-PATROCINADOR**

Mg.Sc. María Elisa García Salas  
**MIEMBRO**

Ph.D. Juan Chávez Cossio  
**MIEMBRO**

## DEDICATORIA

*A mis padres: Silverio y Margarita, por su ejemplo, apoyo y paciencia.*

*A mis hermanos: Mirza y Angel, por el gran lazo que nos une.*

*A mi esposo: Daniel, por su compañía y afecto.*

*A mis sobrinos: Leo y Eli, por transmitirme su alegría e inocencia.*

*A mi gran familia, los Mendoza, los Cerna y Villajuan*

*Y a cada amistad con la que he disfrutado en este camino.*

## AGRADECIMIENTOS

- Al CONCYTEC-FONDECYT, por el financiamiento de este trabajo de investigación.
- Al Dr. Gustavo Gutiérrez, mi asesor, por su constante guía, y por darme la oportunidad de aprender en base a su experiencia.
- Al Dr. Abel Ponce de León, mi co-asesor, por su gran apoyo, consejos y confianza para poder llevar a cabo esta investigación.
- Al Dr. Chávez, la Ing. María Elisa y el Ing. Calderón, miembros del jurado, por sus buenas sugerencias y apreciaciones de este trabajo.
- A cada docente del programa de Maestría, por sus valiosas enseñanzas.
- A la Dra. Terje Raudsepp, quien me enseñó y capacitó para llevar a cabo la fase experimental de esta investigación, en su laboratorio de Citogenética Molecular de la Universidad de Texas A&M, aitäh.
- A Josefina, Caitlin, Matt, Fahad y Rytis, por ayudarme durante mi pasantía en su laboratorio.
- A Ross, Mau y Ronald, por hacerme sentir como en casa cuando estaba lejos.
- A mis amigos del POCA y el PMA: Juju, Mabel, Camu, Chavely, Carito, Nila, Camilo, Manuel, Gonzalo, Marcos, Luis, Jonathan y Yorch, por ser parte de este camino y alegrarme los almuerzos y las tardes.
- A mi Familia y a Daniel por ser parte de todo el proceso, y sentirse siempre orgullosos de mi y de mi esfuerzo.

## ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1.	LA ALPACA .....	3
2.2.	INFORMACIÓN GENÓMICA EN ALPACAS .....	4
2.3.	HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).....	5
2.4.	GENES CANDIDATOS QUE REGULAN LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LA FIBRA.....	7
2.5.	GENES CANDIDATOS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DEL COLOR DE LA FIBRA .....	7
2.6.	POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE.....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO .....	10
3.2.	ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO DE LINFOCITOS DE ALPACA.....	10
3.2.1.	Colección de sangre .....	10
3.2.2.	Preparación del cultivo celular.....	11
3.3.	LOCALIZACIÓN FÍSICA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (PNS) .....	12
3.3.1.	Selección de polimorfismos de nucleótido simple.....	12
3.3.2.	Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y grupos ligados a cromosomas de alpaca .....	13
3.4.	LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERÍSTICAS DE DIÁMETRO Y COLOR DE FIBRA DE ALPACA.....	13
3.4.1.	Selección de genes candidatos .....	13
3.4.2.	Identificación de secuencias únicas de los genes a mapear .....	14
3.4.3.	Identificación de BACs mediante hibridación de sondas overgo a los Filtros de Biblioteca BAC de Alta Densidad .....	15
3.4.4.	Identificación de los BACs candidatos y marcaje de la sonda .....	20
3.4.5.	Hibridación Fluorescente in situ (FISH).....	26
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29

4.1.	ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO DE LINFOCITOS DE ALPACA.....	29
4.2.	LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GENES .....	32
4.2.1.	Gen <i>ALX3</i> .....	33
4.2.2.	Gen <i>CHD7</i> .....	34
4.2.3.	Gen <i>COL1A1</i> .....	36
4.2.4.	Gen <i>CTNNB1</i> .....	37
4.2.5.	Gen <i>DAB2IP</i> .....	39
4.2.6.	Gen <i>KRT15</i> .....	40
4.2.7.	Gen <i>KRTAP13-1</i> .....	41
4.2.8.	Gen <i>NCOA6</i> .....	42
4.2.9.	Gen <i>SOX9</i> .....	43
4.2.10.	Gen <i>TNFSF12</i> .....	44
4.2.11.	Gen <i>ZIC1</i> .....	45
4.2.12.	Gen <i>ZIC5</i> .....	47
4.3.	LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GRUPOS LIGADOS DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTIDO SIMPLE .....	48
V.	CONCLUSIONES .....	50
VI.	RECOMENDACIONES .....	51
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
VIII.	ANEXOS .....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Resumen de ubicación de genes a cromosomas de alpaca.....	32
Tabla 2:	Relación de polimorfismos de nucleotido simple a scaffolds y su ubicación cromosómica.....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Ubicación de los filtros en el casete de autoradiografía.....	19
Figura 2:	Plantilla codificada sobre filtros autoradiográficos.....	20
Figura 3:	Inoculación del BAC a la placa petri (a) y selección de la colonia (b). .....	22
Figura 4:	Distribución y ensamblaje de columnas para extracción de ADN del BAC..	23
Figura 5:	Esquema diferencial de los protocolos evaluados y características del protocolo estandarizado .....	29
Figura 6:	Metafase de Alpaca a 100x .....	30
Figura 7:	Metafase de Alpaca a 100 x, obtenida con software MetaSystems® .....	31
Figura 8:	Cariotipo de Alpaca, obtenida con Ikaros ® .....	31
Figura 9:	Hibridación de sonda para el gen <i>ALX3</i> (rojo) y marcador GG_1068 (verde) .....	33
Figura 10:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>ALX3</i> alineadas al ideograma del cromosoma 9. ....	34
Figura 11:	Hibridación de sonda para el gen <i>CHD7</i> (rojo) y marcador <i>RPI</i> (verde) .....	35
Figura 12:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>CHD7</i> alineadas al ideograma del cromosoma 29. ....	35
Figura 13:	Hibridación de sonda para el gen <i>CHD7</i> (rojo) y marcador <i>RPI</i> (verde) en células interfásicas.....	35
Figura 14:	Hibridación de sonda para el gen <i>COL1A1</i> (rojo) y marcador <i>DDX52</i> (verde) .....	36
Figura 15:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>COL1A1</i> alineadas al ideograma del cromosoma 16. ....	37
Figura 16:	Hibridación de sonda para el gen <i>CTNNB1</i> (rojo) y marcador 021E03 (verde) .....	37
Figura 17:	Hibridación de sonda para el gen <i>CTNNB1</i> (rojo) y marcador SLC 22A13 (verde) .....	38



Figura 18:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>CTNNB1</i> alineadas al ideograma del cromosoma 17. ....	38
Figura 19:	Hibridación de sonda para el gen <i>DAB2IP</i> (rojo) y marcador <i>GG_1338</i> (verde) .....	39
Figura 20:	Hibridación de sonda para el gen <i>DAB2IP</i> (rojo) y marcador <i>GG_478</i> (verde) .....	39
Figura 21:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>DAB2IP</i> alineadas al ideograma del cromosoma 4. ....	40
Figura 22:	Hibridación de sonda para el gen <i>KRT15</i> (rojo) y marcador <i>AP2B1</i> (verde). 40	
Figura 23:	Hibridación de sonda para el gen <i>KRTAP13-1</i> (rojo) y marcador <i>SOX2</i> (verde) .....	41
Figura 24:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>KRTAP13-1</i> alineadas al ideograma del cromosoma 1. ....	41
Figura 25:	Hibridación de sonda para el gen <i>NCOA6</i> (rojo) y marcador <i>BMP7</i> (verde) 42	
Figura 26:	Hibridación de sonda para el gen <i>NCOA6</i> (rojo) y marcador <i>ASIP</i> (verde) ..	42
Figura 27:	Hibridación de sonda para el gen <i>NCOA6</i> (rojo) y marcador <i>ASIP</i> (verde) en células interfásicas.....	43
Figura 28:	Hibridación de sonda para el gen <i>SOX9</i> (rojo) y los marcadores <i>AP2B1</i> (verde) y <i>KCNJ16</i> (verde). ....	43
Figura 29:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>SOX9</i> alineadas al ideograma del cromosoma 16. ....	44
Figura 30:	Hibridación de sonda para el gen <i>TNFSF12</i> (rojo) y los marcadores <i>AP2B1</i> (verde) y <i>KCNJ16</i> (verde). ....	44
Figura 31:	Hibridación de sonda para el gen <i>TNFSF12</i> (rojo) y marcador <i>VIM</i> (verde) 45	
Figura 32:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>TNFSF12</i> alineadas al ideograma del cromosoma 16. ....	45
Figura 33:	Hibridación de sonda para el gen <i>ZIC1</i> (rojo) y marcador <i>SOX2</i> (verde).....	46
Figura 34:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>ZIC1</i> alineadas al ideograma del cromosoma 1. ....	46
Figura 35:	Hibridación de sonda para el gen <i>ZIC5</i> (verde) y marcador <i>BRCA2</i> (rojo) ...	47

Figura 36:	Hibridaciones obtenidas para el gen <i>ZIC5</i> alineadas al ideograma del cromosoma 14. ....	47
Figura 37:	Adaptación del Mapa citogenético integrado de la Alpaca, con los 12 genes adicionales mapeados. A la derecha se indica la correspondencia entre zonas sinténicas con cromosomas de humano. ....	48

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Preparación de reactivos .....	60
Anexo 2: Listado de PNSs seleccionados.....	63
Anexo 3: Listado de PNSs seleccionados según base bibliográfica.....	63
Anexo 4: Detalle bioinformático de genes mapeados .....	64
Anexo 5: Secuencias de los cebadores PCR y overgo para cada gen mapeado .....	76
Anexo 6: Patron de identificación de BACs positivos en filtros de biblioteca BAC- CHORI 246 .....	77
Anexo 7: Listado de cromosomas artificiales de bacteria (BACs) positivos por cada filtro de la biblioteca BAC-CHORI 246 .....	78
Anexo 8: Distribución de clones de cromosomas artificiales de bacteria (BACs) sembrado por placa .....	80
Anexo 9: Listado de genes candidatos a mapear, y de los BACS candidatos para su localización. ....	82
Anexo 10: Combinaciones de las sondas de referencia usadas con cada gen durante su localización física por FISH.....	83

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como principal objetivo localizar genes y marcadores moleculares de alpaca (*Vicugna pacos*) mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH). Para lo cual se plantearon los siguientes objetivos específicos: a) Estandarización de un protocolo de cultivo de linfocitos de alpaca y; b) Localización de genes candidatos para características de diámetro y color de fibra, y marcadores moleculares de Polimorfismo de nucleótido simple (PNS), a regiones cromosómicas mediante la técnica FISH. Para la realización de la primera parte de este trabajo se evaluaron dos protocolos de cultivo celular. Por otro lado, a fin de localizar físicamente genes y PNSs a cromosomas de alpacas, se tuvo que tener acceso a una biblioteca BAC-CHORI 246 del genoma de alpaca. Marcaje radioactivo de sondas de genes y PNSs marcadas radioactivamente se usaron para hibridar filtros representativos de la biblioteca, con lo cual se identificaron 326 clones de BAC que putativamente corresponden con los genes a mapear. Como resultado se ha desarrollado un protocolo estandarizado para la obtención de células metafásicas a partir del cultivo de linfocitos de alpaca en un laboratorio especializado de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). A su vez, ha sido posible localizar los genes *ALX3*, *CHD7*, *CTNNB1*, *COL1A1*, *DAB2IP*, *KRT15*, *KRTAP13-1*, *NCOA6*, *SOX9*, *TNFSF12*, *ZIC1*, *ZIC5* a los cromosomas 9, 29, 16, 17, 4, 16, 1, 19, 16, 16, 1 y 14 respectivamente. También ha sido posible estimar las ubicaciones de los PNSs BovineHD0700019108, BovineHD0800012560 y BovineHD2000012425, y los grupos ligados a los cuales pertenecen, a los cromosomas 29, 9 y 17, respectivamente.

**Palabras claves:** Alpaca, marcadores moleculares, genes, cromosomas, FISH

## ABSTRACT

The main objective of this work was to locate genes and molecular markers of alpaca (*Vicugna pacos*) using the Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) technique. For which the following specific objectives were proposed: a) Standardization of a cell culture protocol for alpaca lymphocytes and; b) Location of candidate genes for fiber diameter and color characteristics, and molecular markers of single nucleotide polymorphism (SNP), to chromosomal regions using the FISH technique. To carry out the first part of this work, two cell culture protocols were evaluated from alpaca lymphocytes. To physically locate genes and PNSs to alpaca chromosomes, it was necessary to have access to a BAC-CHORI 246 library of the alpaca genome. Radioactive labeling of gene and SNP probes hybridized to representative filters identified 326 BAC clones that putatively corresponded to the genes to be mapped. As a result, a standardized protocol has been developed for obtaining metaphase cells from the culture of alpaca lymphocytes in a specialized laboratory of the Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM). In turn, it has been possible to localize the genes *ALX3*, *CHD7*, *CTNNB1*, *COL1A1*, *DAB2IP*, *KRT15*, *KRTAP13-1*, *NCOA6*, *SOX9*, *TNFSF12*, *ZIC1*, *ZIC5* to chromosomes 9, 29, 16, 17, 4, 16, 1, 19, 16, 16, 1 and 14 respectively. It has also been possible to estimate the locations of the SNPs BovineHD0700019108, BovineHD0800012560 and BovineHD2000012425, and the linkage groups to which they belong, to chromosomes 29, 9 and 17, respectively.

**Keywords:** Alpaca, molecular markers, genes, chromosomes, FISH

## I. INTRODUCCIÓN

La Alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido nativo de América del Sur perteneciente a la familia Camelidae, es una especie domesticada y adaptada a las condiciones de clima de los andes (4000 – 5000 msnm). Es un animal de importancia económica para el país ya que Perú está considerado como el primer exportador de fibra de alpaca a nivel mundial (Quispe *et al.*, 2009).

Aún no se han adoptado sistemas de manejo que promuevan una mejora en la productividad de los rebaños de alpacas (Quispe *et al.*, 2009). Las investigaciones deben direccionarse a obtener tecnologías que logren evitar el engrosamiento de fibra, aumentar el volumen del vellón y establecer rebaños clasificados por colores naturales (Morante, 2009). Dentro de las tecnologías que permitirían acelerar la mejora en la producción de fibra de esta especie, tenemos a la selección asistida por marcadores genéticos, como por ejemplo los polimorfismos de nucleótido simple (PNS), los cuales han servido de base para la fabricación de micromatrices de PNSs, clave para la implementación de la selección genómica (Goddard *et al.*, 2010).

Actualmente la información genómica y las herramientas moleculares disponibles permiten realizar genotipados de más de 50000 marcadores de ADN en un solo ensayo, tanto en vacunos, ovejas, cerdos, caballos y pollos (Hayes y Goddard, 2010). A diferencia de estas especies, en alpacas existe poca información genómica relacionada a la localización de genes, marcadores moleculares, y la asociación entre los mismos (Ávila *et al.*, 2014a).

La poca disponibilidad de información molecular en alpacas no permite aplicar programas de mejora basados en la selección asistida por marcadores, ya probadas exitosamente en otras especies de importancia ganadera, como la selección genómica (SG). Para aplicar la SG en alpacas es necesario identificar y mapear PNSs a lo largo de su genoma, y asociar estos marcadores moleculares a genes que controlen caracteres productivos de importancia económica. A su vez, mapear genes candidatos ya reportados en asociación a características

como el color y diámetro de fibra, y poder asociarlo con PNSs, también contribuirá a implementar la selección asistida por marcadores en alpacas.

El Laboratorio de Citogenética Molecular y Genómica (LCMG) de la Universidad de Texas A&M viene desarrollando de manera continua la aplicación de un protocolo de cultivo celular a partir de linfocitos de alpaca, centrado en la obtención de células metafásicas para la identificación de cromosomas con bandas G. También cuentan con la técnica estandarizada de FISH que les ha permitido localizar 230 marcadores en los cromosomas de alpaca, por lo que se sabe que estas herramientas son útiles y necesarias para la localización de genes y marcadores moleculares.

En tal sentido, esta investigación propuso como objetivo principal el localizar genes y marcadores moleculares de alpaca (*Vicugna pacos*) mediante la técnica de Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH). Los objetivos específicos fueron: a) Estandarización de un protocolo de cultivo de linfocitos de alpaca y; b) Localización de genes candidatos para características de diámetro y color de fibra, y marcadores moleculares de Polimorfismo de nucleótido simple (PNS), a regiones cromosómicas mediante la técnica FISH.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. LA ALPACA

La alpaca (*Vicugna pacos*) es una especie domesticada perteneciente a la familia *Camelidae*, suborden *Tylopoda* y Orden *Artiodactyla*, que a su vez se subdivide en 2 variedades fenotípicas marcadas: Huacaya y Suri (Quispe *et al.*, 2009).

Se estima que la aparición del suborden *Tylopoda* fue a mitad del eoceno, y que la división de los camélidos en dos tribus: a) Camelini: camélidos del viejo mundo (camellos y dromedarios), y b) Lamini, camélidos del nuevo mundo (alpaca, guanaco, llama y vicuña), habría ocurrido en el oeste de América del Norte durante el Plioceno, lo que sustentaría la actual separación geográfica de ambas tribus, mediante la migración de los Camelini a Asia (mediante el estrecho de Bering) y Lamini hacía América (Taylor *et al.*, 1968). Hasta 1924 todos los camélidos del nuevo mundo se encontraban erróneamente clasificados bajo el género *Lama*. No es sino hasta que análisis dentarios y moleculares determinaran que las llamas provienen del guanaco y las alpacas de las vicuñas (Marín *et al.*, 2007), estableciéndose y aceptando los géneros *Lama* y *Vicugna*.

La alpaca es muy valorada en el Perú, tanto por su importancia cultural, como por el aporte económico que genera la producción y exportación de su fibra. A su vez, las alpacas constituyen una de las principales fuentes de ingresos de los campesinos (Bornstein, 2010), por el uso y explotación de otros productos obtenidos de estos animales, tales como la carne, y subproductos como las pieles y cueros (FAO, 2010). Con una población de alpacas a nivel Nacional de 3'685,516 cabezas (CENAGRO, 2012), y una cantidad de productores de alpaca de 789,775, el Perú se sitúa como primer exportador de fibra de alpaca a nivel mundial (Quispe *et al.*, 2009).



## 2.2. INFORMACIÓN GENÓMICA EN ALPACAS

Los análisis citogenéticos han confirmado la igualdad entre el número cromosómico de la alpaca ( $2n=74$ ) y otros camélidos (Hsu y Benirschke, 1967). Mediante técnicas de bandeo cromosómico, se sabe también, que existen zonas cromosómicas muy conservadas entre los miembros de la familia Camelidae (Bianchi *et al.*, 1986). Se ha calculado la longitud relativa de los cromosomas, el índice centromérico y los patrones de Bando G en alpacas (Di Berardino *et al.*, 2006). Mediante la técnica del ZOO-FISH, se confirmó que la información citogenética de la alpaca era compartida con otros camélidos, tanto en regiones cromosómicas como en bandas específicas (Balmus *et al.*, 2007). También se han determinado patrones de diferenciación longitudinal entre cromosomas de alpacas y llamas (Ramos, 2014).

La disponibilidad de información de marcadores moleculares en alpacas se inicia con la identificación de: 15 marcadores microsatélites dinucleotidos (Lang *et al.*, 1996), 10 marcadores microsatélites dinucleotidos (Obreque *et al.*, 1998), 6 marcadores microsatélites (Penedo *et al.*, 1998), hasta la identificación *in silico* de más de 600 marcadores microsatélites (Reed y Chaves, 2008). Posteriormente se logró la construcción del primer mapa citogenético de alpaca de baja resolución, donde se pudo localizar 44 marcadores moleculares en cromosomas (Ávila *et al.*, 2014b); seguido de la construcción de un mapa citogenético integrado de alpaca, donde fue posible localizar 230 marcadores (Ávila *et al.*, 2014a). También se ha logrado establecer un patrón basado en 12 marcadores microsatélites para determinar la filiación y reconstrucción de genealogías en Alpaca huacaya (Yucra, 2017).

El desarrollo de biotecnologías y el acceso al secuenciamiento de última generación ha permitido relacionar algunas características fenotípicas de interés a genes y/o marcadores en el genoma de alpaca. Algunas relaciones que han sido encontradas gracias al uso de estas herramientas biotecnológicas pueden evidenciarse en: Estudio de hembras infértiles y la presencia del “cromosoma diminuto” relacionado al cromosoma 36 en alpacas (Ávila *et al.*, 2015); la asociación de marcadores microsatélites a genes que influyen en el diámetro de fibra (Paredes *et al.*, 2014); la relación entre el gen *KIT* y la característica de “ojo sarco” en alpacas (Jackling *et al.*, 2012); la caracterización de genes, como el *MC1R*, relacionado con la coloración de fibra (Chandramohan *et al.*, 2015), el análisis de *CHD7* como gen candidato a provocar la Atresia coanal (Reed *et al.*, 2013) y la identificación de genes relacionados a la síntesis de fibra y color en piel de alpaca (Fernández, 2015).

El primer ensamblaje del genoma de alpaca disponible (VicPac1.0) contó con una cobertura de 2.91X (N° accesión GCA\_000164845.1; 2008) el cual fue mejorado y presentado como el VicPac 2.0.2 con una cobertura de 22X (Vicugna\_pacos-2.0.1 y Vicugna\_pacos-2.0.2, N° accesión GCA\_000164845.2 y GCA\_000164845.3, respectivamente; 2012). Actualmente se cuenta con el secuenciamiento a nivel 72.5X, el Vi\_pacos\_V1.0 (N° accesión GCA\_000767525.1; 2015), que se realizó con la finalidad de hacer comparaciones evolutivas con especies cercanas, como los camellos (Wu *et al.*, 2014a).

### **2.3. HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)**

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH), se basa en el marcaje de zonas cromosómicas con una sonda fluorescente, útil en el mapeo físico de secuencias específicas (Ponce de León, 1996). Esta técnica fue desarrollada inicialmente en *Drosophila melanogaster* (Langer-Safer *et al.*, 1982) y ha sido usada en muchas otras especies para localizar, orientar y ordenar genes en el genoma (Raudsepp y Chowdhary, 2008).

El FISH se ha convertido en una técnica de rutina en la investigación básica y en los diagnósticos clínicos. Permite el análisis citogenético de células metafásicas y núcleos en interfase. El FISH es particularmente útil para el diagnóstico rápido de trastornos genéticos (citogenética clínica) que van desde cambios numéricos cromosómicos simples hasta deleciones y reordenamientos cromosómicos complejos, también tiene aplicaciones forenses. El FISH se puede aplicar a organismos tanto procariotas como eucariotas, desde fósiles hasta muestras frescas (Nath y Johnson, 2000). El FISH proporcionó un enlace directo entre el microscopio y las secuencias de ADN, esta técnica permite ver las ubicaciones cromosómicas y nucleares de secuencias específicas de ADN a través del microscopio (Trask, 2002).

Los elementos básicos de la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) son una sonda de ADN y una secuencia diana. Antes de la hibridación, la sonda de ADN se marca mediante diversos medios, como Nick translation. Se utilizan comúnmente dos estrategias de etiquetado: etiquetado indirecto y etiquetado directo. Para el etiquetado indirecto, las sondas se marcan con nucleótidos modificados, mientras que el etiquetado directo utiliza la incorporación de nucleótidos que se han modificado directamente para contener un fluoróforo. La sonda marcada y el ADN diana se desnaturalizan. Luego se combinan, lo que

permite el recocido de secuencias de ADN complementarias. Si la sonda se ha etiquetado indirectamente, se requiere un paso adicional para la visualización. Mientras que el FISH con las sondas etiquetadas directamente es más rápido, el etiquetado indirecto ofrece la ventaja de la amplificación de la señal mediante el uso de varias capas de anticuerpos y, por lo tanto, puede producir una señal más brillante. Finalmente, las señales se evalúan mediante microscopía de fluorescencia (Speicher y Carter, 2005).

Las aplicaciones del FISH abarcan las siguientes áreas, estudios evolutivos, arquitectura del núcleo de interfase, mapeo del genoma humano, toxicología genética, citogenética clínica y forense (Nath y Johnson, 2000). En los años 90's, cuando se introdujeron los métodos de fácil acceso para la preparación y detección de la sonda, las búsquedas de "hibridación fluorescente *in situ*" aumentaron, llegando a superar las 2000 citaciones para inicios del siglo XXI (Levsky y Singer, 2003).

El uso de FISH en especies de importancia ganadera ha permitido, por ejemplo, realizar el análisis de la frecuencia y distribución del entrecruzamiento de cromosomas durante la meiosis en cerdos (Mary *et al.*, 2014); el afinamiento de la información genómica obtenida del secuenciamiento de bovinos (Partipilo *et al.*, 2011); y la asociación de zonas cromosómicas de diferentes especies de importancia ganadera como oveja, cabra y vacunos (Pauciullo *et al.*, 2014).

Además, la aplicación de FISH ha permitido confirmar homologías cromosómicas entre alpacas y otros mamíferos (Balmus *et al.*, 2007), determinar los primeros mapas genómicos de alpacas (Ávila *et al.*, 2014a; Ávila *et al.*, 2014b), e identificar marcadores específicos al cromosoma diminuto 36 de alpacas (Ávila *et al.*, 2015). La utilidad del mapeo de genes y marcadores moleculares mediante FISH no solo se limita a la mejora ganadera de esta especie, sino también a identificar polimorfismos relacionados a diferentes mecanismos de adaptación en camélidos sudamericanos y camellos, como la resistencia a insulina o la tolerancia a la sal, que pueden contribuir a una mejor comprensión de importantes condiciones médicas que afectan a humanos (por ejemplo, los vínculos entre el metabolismo de sodio y la hipertensión, la hiperglicemia y la diabetes, el metabolismo de la grasa y la obesidad, el polvo y las enfermedades respiratorias (Wu *et al.*, 2014a). Algunas estimaciones indican que hay más de ochenta defectos congénitos identificados en camélidos, cuya tercera parte presenta condiciones hereditarias similares en seres humanos (Johnson y Perelman, 2007).

## **2.4. GENES CANDIDATOS QUE REGULAN LAS CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO DE LA FIBRA**

Entre los muchos componentes moleculares conocidos del folículo piloso de los mamíferos (Rompolas y Greco, 2013), las queratinas y los colágenos son quizás los más estudiados (Toivola *et al.*, 2015) y se asocian con diversas características de textura del cabello en varias especies de mamíferos, incluidos los humanos (Shimomura *et al.*, 2010), perros (Cadieu *et al.*, 2009), caballos (Balmer *et al.*, 2017; Morgenthaler *et al.*, 2017) y alpacas (Fan *et al.*, 2011). Aquí consideramos como genes candidatos a mapear, relacionados al desarrollo de fibra de alpaca a las queratinas *KRT15* (Fernández, 2015) y *KRTAP13-1*, al colágeno *COL1A1* (Florez, 2016) y a los genes relacionados con la regulación de la apoptosis y la formación del folículo piloso, como *CTNNB1*, *TNFSF12* y *DAB2IP* (Fernández, 2015). *TNFSF12* y *DAB2IP* tienen funciones en el sistema de señalización WNT/ $\beta$ -catenina (Xie *et al.*, 2010), que controla la morfogénesis del folículo piloso y la diferenciación de las células madre en la piel (Huelsenken *et al.*, 2001). Inclusive se han encontrado variantes de polimorfismos de nucleótido simple (PNSs) en estos genes, que se han asociado con rasgos de interés en bovino (Farhadian *et al.*, 2018).

## **2.5. GENES CANDIDATOS QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DEL COLOR DE LA FIBRA**

Los melanocitos, las células responsables de la pigmentación de la piel, se derivan de células de la cresta neural de todos los niveles axiales (Betancur *et al.*, 2010). Por lo tanto, los genes involucrados en la generación de la cresta neural, como los genes *ZIC1* y *ZIC5* (Aruga, 2004), son candidatos potenciales para el desarrollo del color de la fibra. Del mismo modo, *SOX9* está involucrado en la diferenciación de células de la cresta neural en condrocitos (Simões-Costa y Bronner, 2013) y coopera con otros cofactores de condrocitos para regular la expresión de *COL2A1* en humanos (Hattori *et al.*, 2008). Además, *SOX9*, que es expresado por los melanocitos en piel humana neonatal y adulta, está regulada por la exposición a los rayos UV, mediante el cAMP y la proteína quinasa (Passeron *et al.*, 2007). A su vez, consideramos al gen *ALX3* que se encuentra involucrado en la diferenciación de color en roedores rayados (Cuthill *et al.*, 2017), y se propone como una fusión de genes de melanoma en humanos (Berger *et al.*, 2010).

Entre otros genes candidatos, se ha considerado al gen *NCOA6*, ya que existe el reporte de un evento de recombinación intracromosómica en este gen, relacionada a la expresión de la coloración blanca de la fibra de alpaca (Chandramohan *et al.*, 2013). A su vez, este gen se encuentra estrechamente vinculado al cluster de genes *RALY*, *EIF2S2*, *XPOTP1*, *ASIP*, *AHCY*, *ITCH*, *PIGU*, *NCOA6* y *GGT7*, de entre los cuales, el gen *ASIP*, ha demostrado ser clave en la regulación de la producción de pigmentos en mamíferos (Suzuki, 2013) y camélidos, ya que la proteína de señalización agutí participa en el desarrollo del color de la fibra en las alpacas (Bathrachalam *et al.*, 2011; Chandramohan *et al.*, 2013), llamas (Daverio *et al.*, 2016) y dromedarios (Almathen *et al.*, 2018).

## **2.6. POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE**

Un polimorfismo de nucleótido simple (PNS) es una variación de una base nucleotídica en la secuencia de ADN, tienen carácter bialélico, y están distribuidos a lo largo del genoma (Brookes, 1999). Debido a su cantidad y segregación genética estable, los PNSs son usados como marcadores moleculares (Thomas *et al.*, 2011). Los PNSs son catalogados como puntos de referencia en mapas genómicos (Johnson y Perelman, 2007) ya que son susceptibles de ser asociados a genes que codifican para caracteres de interés.

La selección genómica, que predice valores de mejora basados en la asociación de PNSs a caracteres de interés productivo, ha sido aplicada en ganado lechero, ganado de carne, ovejas y cerdos para una variedad de caracteres (Meuwissen *et al.*, 2013). Los PNSs son utilizados para la identificación de animales, filiaciones y mapeo de genes en *Bos taurus* (Heaton *et al.*, 2002); la determinación de estructura genética de poblaciones en *Ovis aries* (Kijas *et al.*, 2009); en el afinamiento del mapeo y relación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en *Sus scrofa* (Hidalgo *et al.*, 2013) y estudios filogenéticos y de diversidad genética en el género *Equus* (McCue *et al.*, 2012). A su vez, se han utilizado para programas de selección genómica en ovinos, caprinos (Rupp *et al.*, 2016) y bovinos (Wiggans *et al.*, 2017). La asociación de marcadores moleculares a caracteres de interés ganadero se ha visto reportada en el ganado Simmental, donde se han asociado PNSs a caracteres relacionados a la producción de carne (Wu *et al.*, 2014b).

Conocer la ubicación de los PNSs a lo largo del genoma de alpaca, permite detectar PNSs candidatos a ser usados para un futuro desarrollo de micromatrices de PNSs de alta densidad,

como la micromatriz de vacunos, con más de 770,000 PNSs (ILLUMINA, 2015). Mediante el uso del chip de vacunos “*Bovine HD Genotyping Beadchip*” ha sido posible genotipar muestras de alpaca, el primer reporte usando 8 muestras de alpaca ha permitido estimar alrededor de 70,000 marcadores PNSs positivos entre ambas especies (Bertolini *et al.*, 2016), mientras que el genotipado de los 92 clones de un panel celular híbrido irradiado Alpaca-hamster, y 4 muestras controles permitieron identificar 50,686 PNSs presentes en la alpaca y el panel híbrido (Mamani *et al.*, 2017).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE ESTUDIO**

El presente estudio se desarrolló en dos fases: la primera fue la estandarización del protocolo de cultivo de linfocitos de Alpaca, realizada en el Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (CIETE) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y la determinación de los genes a mapear mediante búsqueda bibliográfica.

La segunda fase experimental, que comprende la identificación de BACs, aislamiento y marcaje de sondas, y la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) han sido realizadas en el laboratorio de Citogenética Molecular y Genómica de la Universidad de Texas A&M (USA).

#### **3.2. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO DE LINFOCITOS DE ALPACA**

Para emplear las técnicas citogenéticas que permitieron ubicar físicamente secciones de ADN a lo largo del genoma, y asociarlos a bloques cromosómicos, ha sido necesario obtener cultivos celulares originados de muestras de sangre, los cuales, mediante un tratamiento de sincronización de división celular, han podido acumular células en el mismo estadio de división celular (metafase/interfase), susceptibles de ser hibridados por FISH.

La estandarización del protocolo de cultivo de linfocitos de Alpaca realizado en la UNALM se realizó usando muestras de sangre periférica de 02 alpacas macho (AN01 y AN02) y 02 alpacas hembra (AN03 y AN04), que se encuentran en el “RIGORANCH” - UNALM.

##### **3.2.1. Colección de sangre**

- Se utilizaron tubos de colección al vacío de 5ml.
- Se codificaron los tubos de colecta en relación al individuo.
- Se ensambló la aguja de colecta a un tubo al vacío suplementado con heparina sódica (tapa verde) y se procedió a sujetar al animal.

- Se ubicó la vena yugular y se limpió el área con algodón y alcohol.
- Se punzó hacia la vena, y se extrajo un aproximado de 4 ml de sangre, se retiró la aguja, limpiando el área con algodón y alcohol, y se procedió a hacer una lenta homogenización del tubo que contiene la sangre.
- Las muestras se almacenaron dentro de un cooler para tratar de mantener las muestras a 4°C y fueron llevadas al laboratorio.

### **3.2.2. Preparación del cultivo celular**

- Debido a que el protocolo demanda tiempos de cultivo fijos se debe planear el momento de inicio del proceso para poder realizarlo en periodos de trabajo manejables.
- El primer día (en horas de la tarde), en una cabina de flujo laminar, se procedió a realizar la mezcla en un tubo de 15 ml con 6 ml medio de cultivo 199 (SIGMA M5017), 2 ml de Suero Bovino Fetal, 50 µL de solución Antibiotic-Antimycotic (100X) (GIBCO 15240-02), 50 µL de Penn Strep (GIBCO 15140-122), 220 µL de Concavalina A (20 ug / mL) y 1 ml de la muestra sanguínea.
- Los tubos se prepararon y rotularon de acuerdo a información del animal (tubo y tapa). Los tubos se incuban a 37°C por 72 h.
- Luego de las 72 h, el cuarto día, se procede a adicionar al tubo incubado, 120 µL de timidina (concentración: 22.5 mg/ml), en una cabina de flujo laminar. Se procede a mantener los tubos incubados a 37°C por 16 horas.
- El quinto día, en horas de la mañana, se retiraron los tubos de la incubadora y se procedió a centrifugar (100 RCF) por 10 min.
- Se retiró el sobrenadante, con cuidado de no dispersar el pellet formado.
- Se procedió a agregar 3 ml del medio de cultivo 199 a cada tubo.
- Se centrifugaron los tubos por 10 min a 100 RCF. Se retira el sobrenadante.
- Se adicionaron 3 ml del medio de cultivo y 1 ml de Suero bovino fetal, y 500 µL de BrdU (concentración: 1 mg/ml) a cada tubo.
- Los tubos se mantuvieron en incubación a 37° durante 7 h, luego de la 6ta hora se procedió a adicionar 50 µL colchicina (concentración: 1 ug/ml) y se cosechó al finalizar las 7 horas.
- Se procedió con la centrifugación (10 min/100 RCF) y eliminación de sobrenadante



- Se dejó alrededor de 1 ml de muestra y se homogenizó suavemente con una pipeta pasteur plástica, de punta fina (paso crítico), realizando el proceso tubo por tubo.
- Se adicionaron aprox. 2 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) previamente incubada a 37°C y se volvió a homogenizar suavemente.
- Se adicionó solución hipotónica, entre 7 ml a 12 ml. Se homogenizó el tubo.
- Se procedió a incubar a 37°C por 1 hora
- Los tubos se lavaron con 1 ml de solución Carnoy y pasaron a centrifugación (10 min/100 RCF)
- Punto crítico (1ra fijación): Se retiró el sobrenadante y se empezó la homogenización del pellet con aprox. 1 ml de solución Carnoy, una vez homogenizado se adicionaron más fijador hasta llegar a los 7 ml.
- Centrifugación (10 min/100 RCF) y eliminación del sobrenadante
- 2da fijación: Se agregaron 5 ml de solución Carnoy (en partes)
- Centrifugación (10 min/100 RCF) y eliminación del sobrenadante
- Se repitieron las fijaciones por un mínimo de 6 veces, hasta que se lograron pellets claros sin sedimento volátil en el tubo.
- Se enrazaron los pellets con 0.5 ml de solución Carnoy.
- El goteó se realizó sobre una lámina limpia y húmeda, usando 0.7 µL con ayuda de una micropipeta.
- Se verificó la densidad de metafases en la lámina, usando un microscopio de contraste de fases.
- Las láminas obtenidas se mantuvieron en refrigeración (-20 C) hasta su posterior uso en el protocolo de FISH.

### **3.3. LOCALIZACIÓN FÍSICA DE POLIMORFISMOS DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (PNS)**

#### **3.3.1. Selección de polimorfismos de nucleótido simple**

- Los PNSs fueron seleccionados en base a la información de grupos ligados de PNSs reportados por Mamani (2018). Se consideraron aquellos que estuviesen localizados en *scaffolds* que ya fueron reportados por Ávila (2014) y los que fueron mapeados mediante el presente trabajo.
- Los 5 PNSs identificados se analizaron uno a uno, primero se realizó una comparación de secuencias (BLAST) de 19 a 25 pb del extremo 5'-3' colindante de cada PNS contra

el genoma de alpaca Vicugna\_pacos-2.0.2, para verificar la ubicación en el *scaffold* y obtener una aproximación de la ubicación en la que se encuentran (si están dentro de un gen o no).

- Una vez confirmada la información se procedió a tabular (Anexo 2) y a asociarlas a una ubicación cromosómica.

### **3.3.2. Asociación de polimorfismos de nucleótido simple y grupos ligados a cromosomas de alpaca**

- Usando la herramienta Genome data viewer del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/gdv/?org=vicugna-pacos&group=camelidae>), fue posible observar la proximidad entre los genes previamente mapeados y la ubicación que tendrían los PNSs seleccionados dentro del mismo *scaffold*.
- La asociación de la ubicación de los PNSs a los cromosomas es empírica, asumiendo que, si ciertos genes están localizados en cromosomas, y que estos genes están contenidos en el mismo *scaffold* de los PNS, entonces ambos deberían localizarse en el mismo cromosoma.
- Luego, si se infiere que un PNS corresponde a cierto cromosoma de alpaca, se asume que todo el grupo ligado al cual pertenece debería localizarse en ese mismo cromosoma.

## **3.4. LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GENES CANDIDATOS PARA CARACTERÍSTICAS DE DIÁMETRO Y COLOR DE FIBRA DE ALPACA**

Se seleccionaron genes de interés que han sido reportados como candidatos a influir en las características de diámetro y color de fibra, se ubicaron las secuencias en el NCBI, considerando el ensamblaje VicPac 2.0.2 (GCA\_000164845.3). A su vez se seleccionaron PNSs previamente reportados en alpaca, para ser luego localizados físicamente mediante FISH, siguiendo la metodología descrita por Raudsepp y Chowdhary (2008).

### **3.4.1. Selección de genes candidatos**

- Se realizó una búsqueda bibliográfica de artículos o tesis, en donde se reportaron genes asociados al diámetro y color de fibra. El listado de genes considerados con su respectiva fuente bibliográfica se reporta en el Anexo 3.

- Los genes candidatos fueron ubicados en la base de datos del NCBI, y se seleccionaron sólo aquellos que fueron reportados en alpaca.
- Se realizó un BLASTp de cada gen para poder identificar las regiones del gen que son compartidas con otros genes dentro de una superfamilia de genes, para restarlas de la secuencia del gen con la que se iba a trabajar.
- Con la ayuda de la herramienta Spleign del NCBI, se determinaron las bases nitrogenadas en donde empiezan y terminan los exones encontrados mediante BLASTp.
- Una vez eliminadas las secuencias genómicas que son compartidas con superfamilias, se almacenaron las secuencias en formato FASTA.
- Todas las secuencias de genes fueron sometidas al programa RepeatMasker (RepeatMasker: <http://www.repeatmasker.org>), con el fin de eliminar todas las áreas con información repetitiva que pudieran encontrarse dentro del genoma de alpaca VicPac 2.0.2.
- Las secuencias restantes luego del análisis son guardadas en formato FASTA en un block para su próximo análisis. El resumen de toda la información usada se encuentra en el Anexo 4.

### **3.4.2. Identificación de secuencias únicas de los genes a mapear**

#### **a. Diseño de cebadores**

- Usando la herramienta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) y Primer-BLAST ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BlastHome](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)) se diseñaron los cebadores para cada secuencia de los genes seleccionados.
- Los cebadores diseñados pasaron una revisión final, para verificar que no tengan secciones internas de apareamiento, o entre sí, usando la herramienta *in silico* PCR disponible en <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>

#### **b. Amplificación por PCR**

- Se realizó el protocolo de amplificación de productos de PCR usando los cebadores diseñados en Texas A&M, usando dos muestras de ADN, una de hembra y otra de macho a manera de control, ambas a una concentración aproximada de 25 ng/μL.

- Con los cebadores diseñados (Anexo 5) se procedió a realizar protocolos de PCR cualitativa, a modo de verificar la amplificación del gen de interés, para lo cual se preparó una mezcla base de PCR según el protocolo del kit usado (5x FIREPol®, Solis-BioDyne, Estonia).
- Todas la PCR fueron corridas a un T<sub>m</sub> inicial de 58°C, repitiendo con una mayor T° aquellas muestras cuya amplificación no fuera óptima.
- Para la visualización de los productos de PCR se procedió a preparar un gel de agarosa al 2%, calentado en el microondas por 45 seg., con una adición de 7 µL de bromuro de etidio. Las mezclas obtenidas pasaron a verterse sobre un molde con los peines pre-colocados.
- Los moldes ya con el gel solidificado son colocados en una cubeta electroforética horizontal que contiene una solución tampón TE 1x.
- Se cargaron las muestras de ADN, previamente amplificado en el termociclador, dentro del gel. Con la ayuda de una micropipeta se introdujeron 10 µL del ADN a cada pocillo del gel.
- El gel se corrió a un voltaje de 100 V por un lapso de 25 minutos.
- Transcurrido el tiempo, se retiró el gel de la cubeta, y se colocó cuidadosamente sobre un transiluminador de luz UV, se tomaron fotografías de los geles usando un fotodocumentador y se analizaron las bandas obtenidas.
- Estos procesos se repitieron las veces que fueron necesarios hasta obtener un producto de PCR optimizado (variando la T<sub>m</sub>). En algunos casos cuando la amplificación no era la esperada se tuvieron que rediseñar los cebadores y repetir el protocolo.
- Los cebadores optimizados fueron conservados a -20°C hasta su posterior uso.

### **3.4.3. Identificación de BACs mediante hibridación de sondas overgo a los Filtros de Biblioteca BAC de Alta Densidad**

#### **a. Diseño de sondas overgo**

- Se identificaron las regiones de interés (comprendida dentro del producto de PCR obtenido con los cebadores diseñados y amplificados previamente) para cada gen, de 40 pb aprox. de longitud, con un contenido de GC de 50-60% ( $\pm 5$ ) (Confirmado usando la herramienta GC calculator, disponible en: [http://www.genomicsplace.com/gc\\_calc.html](http://www.genomicsplace.com/gc_calc.html)).

- Se seleccionaron los primeros 24 pb desde la posición 5' como sonda directa (forward). Considerando un cálculo GC%, entre 50-60% ( $\pm 5$ ).
- Se tomaron los otros 24 pb desde la posición 3' y se invirtieron las secuencias complementarias [<http://www.bioinformatics.org/SMS/>], sonda reversa (reverse). Considerando un cálculo GC%, entre 50-60% ( $\pm 5$ ).
- Se calculó el GC% de la superposición de 8 pb dentro de 50-60% ( $\pm 5$ ).
- Puntos críticos considerados: No más de 5% de diferencia de GC% entre el cebador directo y el reverso, el valor Tm debió estar dentro de 60-70 °C. La longitud ideal del Overgo es de 40 pb, con variaciones máximas de 36 pb hasta 52 pb.
- Se realizó la comparación (BLAST) de las secuencias de cebador en NCBI y /o BLAT al genoma de las respectivas especies (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) para asegurar que la sonda overgo es específica para el gen de interés. Se realizó este procedimiento usando el total de 40 pb de secuencia que sería la sonda (en lugar de comparar los cebadores de 24 pb individualmente y por separado).
- Las sondas overgo fueron ordenadas a la casa comercial, desaladas, liofilizadas y a 3 OD.
- Se re-suspendieron los cebadores en ddH<sub>2</sub>O para preparar las soluciones stock de 100  $\mu$ M. El listado con las sondas overgos diseñados se detalla en el anexo 5.
- Posteriormente se hicieron soluciones de trabajo de 10  $\mu$ M para cada cebador y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

#### **b. Marcaje de sondas overgo**

- Se etiquetaron los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml con el nombre apropiado de cada una de las 24 sondas overgo que se usaron en este protocolo.
- Se agregaron 3  $\mu$ l de agua estéril a cada tubo.
- Se añadió 1  $\mu$ l de la sonda directa correspondiente (10  $\mu$ M)
- Se añadió 1  $\mu$ l de la sonda reversa correspondiente (10  $\mu$ M)
- Los tubos con un volumen total del tubo de 5  $\mu$ L fueron colocados en un baño de maría a 80°C durante 5 minutos.
- Se retiraron los tubos del baño de maría e inmediatamente fueron colocados en hielo.
- Se preparó la “mezcla base radioactiva” en hielo, bajo la adición de 24 $\mu$ L de dGTP (0.5 mM), 24 $\mu$ L de dTTP (0.5 mM), 12  $\mu$ L de d\*CTP (3000 Ci/mmol), 12  $\mu$ L de d\*ATP

(3000 Ci/mmol), 24  $\mu$ L de 10 X tampón y 24  $\mu$ L de Enzima Klenow (2U/ $\mu$ L), obteniendo una mezcla total de 120  $\mu$ L, disponible para 24 reacciones.

- Se retiraron los tubos del hielo y se añadieron 5  $\mu$ L de la mezcla base radioactiva a cada uno de ellos (volumen total 10  $\mu$ l), todos los procedimientos, desde este punto, se realizaron detrás del escudo de plástico transparente (plexiglass) en la respectiva campana de extracción dentro del laboratorio de radiación.
- Se colocaron los tubos en una caja de plexiglass, y se llevó a incubar a 37°C durante 30 minutos.
- Durante la incubación se pasó a preparar la “mezcla base no radioactiva”, utilizando 12 $\mu$ L de dATP (0.5 mM) y 12  $\mu$ L de dCTP (0.5 mM), obteniendo una mezcla total de 24  $\mu$ L, disponible para 24 reacciones.
- Se añadió 1  $\mu$ l de mezcla base no radioactiva a cada tubo (después de los primeros 30 minutos de incubación). Nuevo volumen total: 11  $\mu$ l
- Se volvieron a colocar los tubos en la caja de plexiglass y pasaron a incubarse a 37°C durante 15 minutos.
- Se retiraron los tubos de la incubadora (con las sondas ya marcadas).
- Se eliminaron los nucleótidos no incorporados haciendo pasar las sondas marcadas a través de columnas G-10 Sephadex Spin, siguiendo el protocolo del fabricante.
- Se hizo un pool de 4 cebadores juntos (4 x 11 = 44  $\mu$ L), añadiendo 56  $\mu$ L TE para llevarlo a 100  $\mu$ L.
- Se pasaron estos 100  $\mu$ L a través de columnas Sephadex (centrifugación a 3600 rpm/3 min) y se recogió el flujo en tubos nuevos etiquetados.
- Se etiquetaron los tubos nuevos para cada pool de cebadores como pool1, pool2, etc; alícuotando 2  $\mu$ L de sonda marcada (de cada grupo de 4 cebadores) en tubos nuevos, los cuales fueron colocados en el contador de centelleo.
- Los recuentos de las sondas fueron almacenados electrónicamente.
- Se juntaron todas las sondas marcadas y se colocaron en una caja plexiglass en el refrigerador hasta que estuvieran listos para la hibridación.

### **c. Hibridación de las sondas overgo a los filtros de biblioteca de BAC**

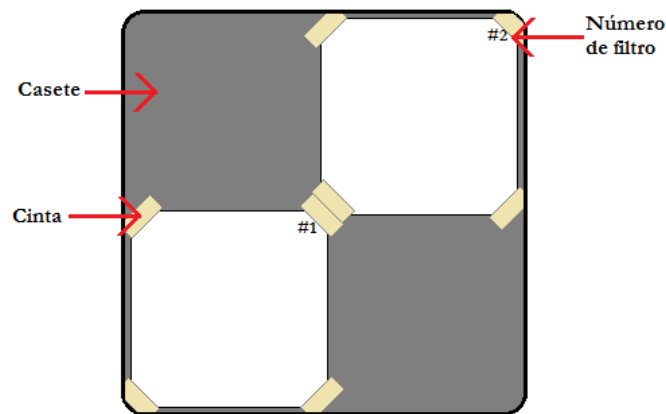
- Se colocaron los 11 filtros representativos de la biblioteca de BACs CHORI-246 dentro de 6 tubos de vidrio para hibridación, colocando 2 filtros en cada uno con una

- mallá entre ambos. Se agregaron 100 ml de “solución de prelavado” (Anexo 1) a cada tubo y se dejó incubando a 65°C por una hora.
- Luego, se retiraron los 100 ml de solución de pre-lavado de cada tubo de vidrio de hibridación, y se procedió a añadir 50 ml de “solución de pre-hibridación (1X)” (Anexo 1) en cada tubo de hibridación a 65°C.
  - Se preparó la “solución de hibridación” (Anexo 1) en tubos de plástico de 15 mL mezclando 4,5 mL de solución de pre-hibridación (2X) y 4,5 mL de formamida. El volumen total por tubo es de 9 ml. Siendo 6 tubos de 15 mL en total.
  - En la campana extractora de radiación, detrás de un protector plexiglass, se añadió a cada tubo de 15 ml, 100 µL de una mezcla de sondas marcadas anteriormente.
  - Se colocaron los tubos de 15 mL en un baño de agua hirviendo (ubicado en la campana extractora radiactiva) durante 10 minutos (para la desnaturalización de la sonda), para luego ser colocados inmediatamente sobre hielo.
  - Se retiraron los tubos de hibridación de su incubación a 65°C y se restableció la temperatura de la incubadora a 42 °C.
  - Se vierte la solución de pre-hibridación fuera del tubo de hibridación y se desecha.
  - En cada tubo de hibridación se vertió el contenido de un tubo de 15 ml (100 µl de sonda marcada desnaturalizada en 9 ml de la solución de hibridación).
  - Se cerraron firmemente las tapas (sin fugas) y se colocan los tubos de hibridación de nuevo en una incubadora giratoria. Se hibridó a 42°C durante la noche.

#### **d. Lavado post-hibridación y autorradiografía**

- A la mañana siguiente se vertió la solución de hibridación en una botella de residuos líquidos radiactivos.
- Se añadió 100 ml de 2x SSPE (Sodio salino fosfato EDTA) y se procedió a incubar en un incubador giratorio a 25°C durante 15 min.
- Se desechó la solución en la botella de residuos líquidos radiactivos.
- Se añadieron otros 100 ml 2x SSPE y repitió el proceso a 25°C durante 15 min.
- Se volvió a desechar la solución en la botella de residuos líquidos radiactivos.
- Se volvieron a añadir 100 ml de 2x SSPE y se incubó a 55°C durante 15 minutos.
- Se volvió a desechar la solución en la botella de residuos líquidos radiactivos.
- Se colocaron los filtros en papel secante para eliminar el exceso de agua, pero manteniéndolos húmedos para evitar su deterioro y funcionalidad.

- Los filtros fueron envueltos de manera individual en film plástico, asegurándose de que no queden burbujas de aire en la parte delantera del filtro, ya que evitarán la impresión de las sondas en la película de autorradiografía.
- Los filtros forrados fueron colocados en casetes de autorradiografía, colocando 2 filtros por casete; con el # de filtro cara arriba en la esquina superior derecha, con cintas en el casete para evitar movimientos (Figura 1). Luego se cierra el casete.



**Figura 1: Ubicación de los filtros en el casete de autorradiografía**

- Se llevó el casete a la habitación oscura y se colocó una película de autorradiografía dentro del casete (con un doblez en la esquina superior derecha de la película para marcarla, todo en total oscuridad).
- Luego se colocó el casete en un congelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 4 días aproximadamente.
- Luego de la exposición de los filtros radioactivamente marcados a la película autorradiográfica, se procedió a volver a la habitación oscura para desenvolver los mismos y revelarlos. Estos filtros mostraban marcas que fueron usadas para identificar los BACs según se detalla en el apartado 3.4.4.a.

#### **e. Separación de los filtros de la biblioteca después de la hibridación**

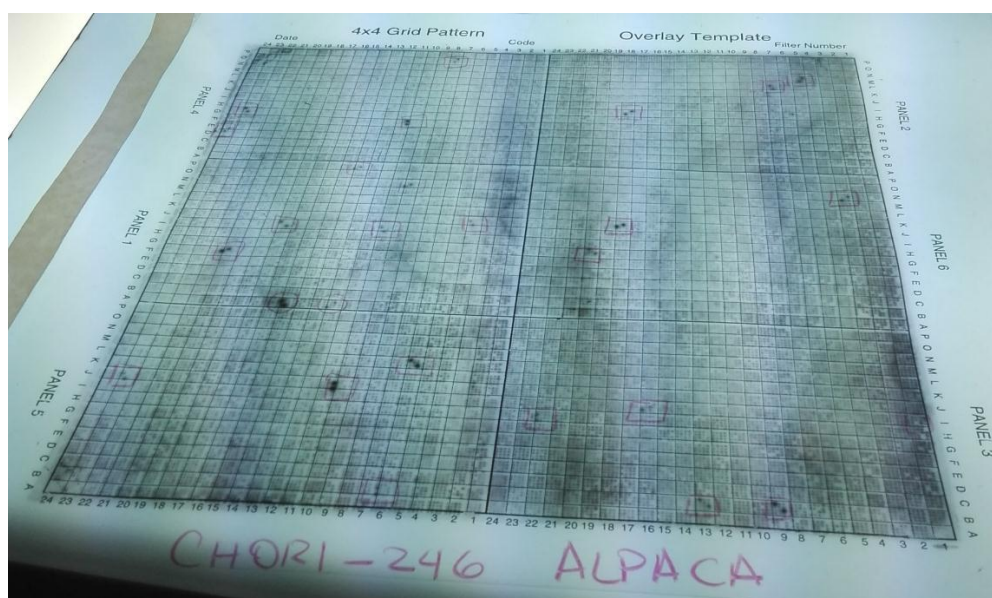
- Después de la radioautografía, se desmontaron los filtros de la biblioteca incubando los tubos cilíndricos de hibridación con 100 ml de solución de prelavado a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora.
- Se quitó el exceso de la solución de los filtros con un papel secante y fueron almacenados en bolsas de plástico selladas a  $+4^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso.



### 3.4.4. Identificación de los BACs candidatos y marcaje de la sonda

#### a. Detección, selección y siembra de los BAC candidatos.

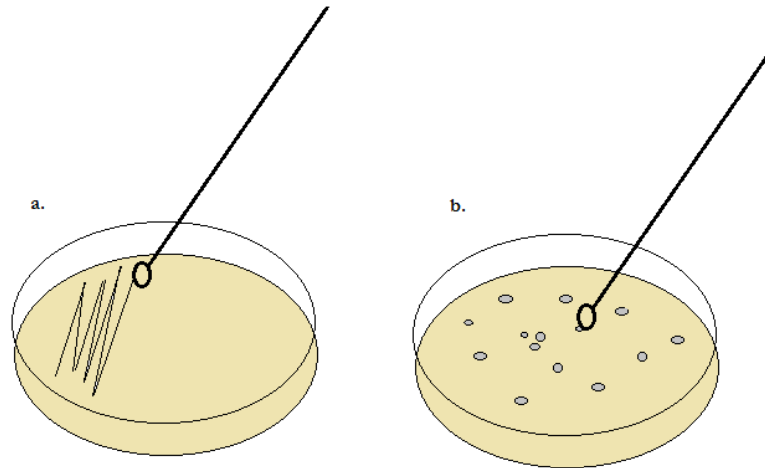
- Se identificaron marcas sobre los filtros autoradiográficos, que muestran un patrón de hibridación que ayuda a identificar el número del BAC al cual corresponden, Este procedimiento se llevó a cabo siguiendo el patrón de marcas mostrado en el Anexo 6.
- Con ayuda de una transiluminador de luz blanca, se marcaron las zonas hibridadas con un marcador, luego se coloca una plantilla transparente sobre la lámina, sobrelapando los 6 paneles visibles (Figura 2).
- El patrón de marcaje dio la información necesaria para identificar el número de BAC correspondiente a la hibridación, y permitió identificar y listar los BACS que se hibridaron a lo largo de los 11 filtros que constituye la biblioteca BAC CHORI 246 de alpaca.



**Figura 2: Plantilla codificada sobre filtros autoradiográficos.**

- Se apuntó la relación de los BACS positivos por cada filtro y se tabuló la información, obteniendo 326 clones candidatos (Anexo 7).
- Se prepararon placas de pozo profundo de 96 pocillos en la cabina de flujo laminar y se adicionó a cada pozo la cantidad de 1 ml de caldo 2YT con antibióticos.
- Se retiraron los racks (8 en total), uno a uno, que almacenan las 528 placas de 384 pocillos que contienen los clones, estos racks se mantienen almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

- Se abrieron los racks y se retiraron solo las placas que contuvieron los clones positivos y se abrieron dentro de la cabina de flujo laminar.
- Luego se procedió a usar palillos mondadientes previamente esterilizados, para hacer un ligero raspado en el pocillo donde figuran nuestros clones de interés (de la placa correspondiente en la biblioteca de ADN), para luego ser sumergido en el pocillo profundo de la placa de 96, repitiendo el procedimiento hasta obtener la placa completa sembrada. Se debe tener cuidado de no llegar a derretir el contenido de las placas de 384 pocillos que contienen los BACs de la biblioteca original.
- Se tabuló la información de los clones sembrados, considerando dos espacios para muestras genómicas positivas hembra y macho (Anexo 8). Se sembraron un total de 4 placas de 96, cubriendo el total de 326 BACS identificados por autoradiografía.
- Las placas sembradas se incubaron durante la noche a 37°C sobre un agitador.
- A la mañana siguiente, en la cabina de flujo laminar, se procedió a retirar 500 µL de cada pocillo, con ayuda de una pipeta multicanal, para ser colocadas sobre una placa nueva con pocillos de 1.5 ml. Las placas fueron centrifugadas por 10 minutos a 13000 RPM.
- Se descartaron los sobrenadantes y se agregó 100 µL de solución tampón TE, hasta re-suspender el pellet.
- De cada re-suspendido se usan 2 µL de muestra para correr una PCR usando todos los cebadores respectivos para cada gen. Se tabularon sólo los resultados positivos, obteniendo una tabla de resultados previos que estimaban que clones de la biblioteca BAC contenían las secuencias específicas para cada gen a mapear (Anexo 9).
- Se prepararon placas petri con agar LB (con antibióticos) donde se sembraron cada uno de los BACS seleccionados para cada gen, inoculando con un asa de siembra cada BAC de la placa de 96 pocillos profundos preparada inicialmente (Figura 3a.). Luego de sembrado cada clon, las placas Petri fueron incubadas a 37°C por 16 a 18 horas.
- Luego del periodo de incubación, se prepararon 2 tubos de 2 ml por cada BAC sembrado, a los cuales se le adicionó 1.5 ml de medio 2YT (con antibióticos). En la cabina de flujo se procedió a picar con un mondadientes aquellas colonias aisladas y pequeñas que se encontraron en cada placa (Figura 3b.), colocando una única colonia en cada microtubo.



**Figura 3: Inoculación del BAC a la placa petri (a) y selección de la colonia (b).**

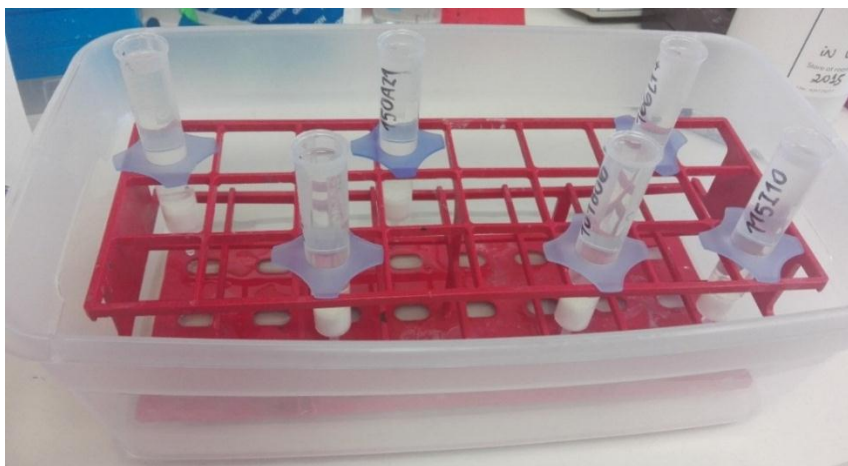
- Los microtubos se mantuvieron en agitación e incubación a 37°C por un plazo de 5 horas aprox., luego, de cada tubo se extrajeron 500  $\mu$ L que fueron colocados en tubos nuevos de 1.5 mL y debidamente rotulados.
- Los tubos fueron centrifugados por 10 min a 13000 RPM, luego de cada uno se extrajeron 2  $\mu$ L para ser usados en una PCR con sus respectivos genes, a modo de confirmar una amplificación positiva.
- Luego de la segunda verificación por PCR, 500  $\mu$ L de la solución restante fue usada en el siguiente protocolo (Extracción de ADN bacteriano). Los otros 500  $\mu$ L restantes fueron guardados a -80°C luego de ser mezclados con 500  $\mu$ L de medio 2YT (con antibióticos) + glicerol (1:1).

#### **b. Extracción del ADN del BAC seleccionado**

Luego de identificar los BACs que contengan la secuencia de interés, se procedió a usar un kit comercial para la extracción de ADN de cada uno de ellos, se detalla a continuación el protocolo de QIAGEN midiprep® que fue utilizado, considerando que se extrajeron 6 ADN de BACs como máximo, al mismo tiempo.

- Se incubaron 500  $\mu$ L de cada BAC seleccionado en un matraz plástico con 100 mL de medio 2YT con cloranfenicol. El frasco se mantuvo cerrado, pero con ventilación a nivel de la tapa, incubado a 37°C por el plazo de 12 a 16 horas en una incubadora agitadora.
- Luego del tiempo en incubación, el volumen de 100 mL fue redistribuido en 02 tubos conicos de 50 mL. Los mismos que fueron llevados a centrifugación por 30 min a 6000 RPM a 4°C.

- Se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos boca abajo sobre un papel toalla, con cuidado de no desprender el pellet, para eliminar los restos de medio. Luego se colocaron los tubos sobre una bandeja con hielo.
- Se agregaron 7.5 mL del tampón P1® (con una adición previa de 1 ml de RNAsa A -10 mg/ml- por cada 100 ml de tampón P1) provisto en el kit, y se procedió a re-suspender vigorosamente el pellet.
- Luego se adicionaron 7.5 ml de tampón P2® a cada tubo. Se incubaron los tubos por 4.5 min, invirtiendo ocasionalmente los tubos.
- Se pasó a agregar 7.5 ml de tampón P3® (previamente refrigerado), invirtiendo los tubos vigorosamente. Se dejaron los tubos incubando en hielo por el plazo de 15 min.
- Luego se centrifugaron a 7000 RPM, por 30 min a 4°C.
- Se etiquetaron tubos nuevos de 50 ml para cada BAC, y se colocaron papeles de filtro sobre cada uno de ellos, para así poder trasvasar los tubos previamente centrifugados y poder eliminar los cúmulos que se originaron hasta este punto del protocolo.
- Durante el proceso de filtración se procede a armar las columnas Quiagen - Tip 100 sobre una gradilla para tubos de 50 ml, ayudadas de un soporte azul provisto por el kit (Figura 4). La gradilla fue colocada sobre una cubeta plástica y las columnas debidamente rotuladas con el nombre del BAC.



**Figura 4: Distribución y ensamblaje de columnas para extracción de ADN del BAC**

- A las columnas Quiagen – Tip 100 se agregaron 4 ml de tampón QBT®, que, al pasar completamente por la columna, dejaron una marca en forma de “+” al fondo del tubo. Una vez detectada la marca se procedió a adicionar a cada columna las soluciones filtradas previamente y se dejaron escurrir.

- Luego del drenaje de las soluciones, se procedió a lavar las columnas con el tampón QC ®, adicionando 10 ml de solución a cada columna, 2 veces a cada una, asegurándose de escurrir el tampón en cada pasada (evidenciando la aparición de la marca “+” al fondo del tubo)
- Cada columna fue colocada dentro de un tubo rotulado de 50 ml (con ayuda del soporte azul). Sobre cada columna se adicionaron 6 alícuotas de 1 ml de tampón QF® (previamente calentado a 65°C), dejando que entre cada adición de 1 ml se escurra completamente el tampón. En este paso se efluye el ADN contenido en la columna, hacia el tubo de colección.
- A cada tubo se le agregaron 6 ml de isopropanol con la finalidad de precipitar el ADN. Luego de invertir un par de veces el tubo, el mismo procedió a marcarse con un plumón, haciendo una línea desde el fondo del tubo, verticalmente, hasta la tapa de este. Este procedimiento asegura la identificación del lado en el que se encontraría el ADN (las líneas coinciden con el sitio en el que el pellet se aloja), ya que los tubos se colocan orientados con las líneas como base, a 8000 RPM por un plazo de 30 min a 4°C.
- Luego del tiempo de centrifugación se retiraron los tubos, cuidadosamente, considerando que el pellet de ADN se ubica en el lugar donde se había dibujado la línea en el tubo. Se retiró suavemente el sobrenadante a cada tubo, con cuidado de no eliminar los pellets. Luego se colocaron los tubos boca abajo sobre papel toalla para escurrirlos por completo.
- Una vez escurridos, a cada tubo se le adicionaron 2 partes de 500 µL de etanol al 70%. En cada adición de etanol se pudo observar la presencia del pellet de ADN, luego de la verificación visual se procedió a trasvasar cada mezcla a tubos de microcentrifuga.
- Se centrifugaron los tubos por 15 min a 13000 RPM.
- Con cuidado se descartaron los sobrenadantes y se procedió a secar cada microtubo a T° ambiente por unos 15 min.
- Los pellets se suspendieron en 200 µL (aprox.) de agua destilada. La cantidad de agua depende del tamaño del pellet.
- Los microtubos se incubaron por lo menos a 37°C hasta que se observó que el ADN estuviera disuelto en cada uno de ellos.
- Para confirmar la calidad y estimar cantidad de cada ADN, se procedió a correr las muestras en un gel de agarosa al 1% usando un cuantificador de ADN DE 100 ng/µL.

- Se verificaron las concentraciones estimadas para cada ADN extraído, considerando que para los subsiguientes protocolos se requería una concentración aproximada de 100 ng/  $\mu$ L. Algunas de las preparaciones de ADN tuvieron que ser diluidas.
- Los ADN fueron almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  luego de su uso inmediato en los subsiguientes protocolos.

**c. Marcaje del ADN bacteriano usado como sonda y preparación de solución de hibridación de la sonda.**

Las sondas fueron marcadas indirectamente con biotina y digoxigenina usando la técnica de Translación de la muesca (Nick translation, en inglés) siguiendo con el subsiguiente protocolo:

- Por cada ADN bacteriano extraído en el punto anterior, se armaron 2 juegos de microtubos, que fueron debidamente rotulados con el número del BAC, considerando que uno sería marcado con Biotin (Bio) nick translation kit y el otro con Digoxigenin (Dig) nick translation kit.
- Se agregaron 16  $\mu$ L de cada ADN con 4  $\mu$ L del sistema de marcaje de translación de la muesca (biotina o digoxigenina) según el tubo rotulado, luego, los tubos fueron colocados a  $-15^{\circ}\text{C}$  en un baño maría por un plazo de 90 minutos.
- Se retiraron los tubos y se le agregaron 25  $\mu$ L de agua destilada a cada uno.
- Se procedió a preparar tubos minicolumnas spin-50, centrifugándolos por 3 min. A 1200 RCF, luego las columnas se colocaron en microtubos nuevos debidamente rotulados.
- Se agregaron las mezclas de los ADN marcados al microtubo correspondiente, y se centrifugaron por 3 min. A 12000 RCF.
- Luego de la centrifugación, se mezclaron 5  $\mu$ L de cada mezcla con 2  $\mu$ L de tampon de carga Orange G y se corrieron en un gel de agarosa al 1% usando un marcador de peso molecular de 100 bp.
- Se verificó que cada ADN marcado luce en el gel como una mancha degradada entre los 300 a 700 pb, pudiendo proceder así con la preparación de la mezcla para la hibridación.
- Para la preparación de la solución de hibridación de la sonda se procedió a agregar a cada microtubo con los 40  $\mu$ L restantes de la mezcla, 15  $\mu$ L de un *pool* de ADN de

alpaca de diferentes animales (mínimo 5) que dieran una concentración final aproximada de 1 ug/  $\mu$ L, el cual finge de ADN competidor.

- Se colocaron todos los tubos en una centrifuga al vacío a una T° de 65°C por un plazo aproximado de 30 min, hasta secar los contenidos.
- Luego cada tubo se re-suspendió en 6  $\mu$ L de agua y 14  $\mu$ L de la mezcla base de hibridación (14  $\mu$ L formamida deionizada, 2.8  $\mu$ L dextran sulfato sodico y 3.2  $\mu$ L 3X SSC).
- Las sondas quedaron listas para ser usadas en el protocolo de FISH, pudiendo almacenarse a -20°C hasta por el plazo de 2 años.

### **3.4.5. Hibridación Fluorescente in situ (FISH)**

#### **a. Preparación de láminas para hibridación**

- Se observaron las láminas con metafases (previamente preparadas en el punto 3.3.1) bajo un microscopio de contraste de fases, y se marcaron (con un plumón indeleble, por la parte posterior de la lámina) las zonas con buena cantidad y calidad de metafases (en cuadrados de 4mm<sup>2</sup> aproximadamente). Estos marcajes permitieron hacer varias hibridaciones en simultáneo para efectivizar el experimento.
- Se realizó un tratamiento con RNAsas, adicionando 500  $\mu$ L del mismo sobre toda la lámina y cubriéndolo con una laminilla. Se mantuvieron las láminas dentro de una cámara humedecida, a 37°C durante 1 hora.
- Luego de la incubación se retiraron las laminillas y las láminas fueron sumergidas en una solución de 2X SSC (Sodio Salino Citrato, Anexo 1) por un plazo de 2 minutos.
- Mientras tanto se fue verificando la Temperatura de la solución de 70% Formamida y 2X SSC, para luego colocar las láminas por 2 minutos a 70°C.
- Luego se sumergieron inmediatamente las láminas durante 2 min en etanol al 70% (enfriado con hielo) para luego deshidratarlas en una serie ascendente de etanol (80%, 90% y 100% a 2 min c/u), dejando secar las láminas al aire.
- Tras la denaturación del ADN de las láminas, se procedió a hibridar con la sonda previamente preparada.

#### **b. Hibridación y lavado**

- Se colocaron 1.5  $\mu$ L de cada solución de hibridación de la sonda marcada en un microtubo de centrífuga, contemplando la sonda incógnita y una sonda marcador. Se denaturó cada mezcla por 10 min a 70°C aprox.

- Cada mezcla se colocó a una temperatura de 37°C por 20 min., facilitando el anillamiento de las sondas.
- Cada mezcla de sondas se colocó sobre la lámina pre-tratada, en su cuadrado respectivo, los mismos que fueron sellados con laminillas y adhesivo (*rubber cement*), y luego se mantuvieron en incubación a 37°C en un ambiente húmedo hasta el día siguiente.
- Luego de la incubación, se removió el adhesivo y las laminillas en una solución de 2X SSC.
- Se sumergieron las láminas en 50% de formamida 2X SSC por 5 minutos a 40 °C. Repitiendo 3 veces el procedimiento.
- Se lavaron las láminas en 4X SSC - 0.05% Tween-20 por dos minutos a temperatura ambiente, repitiendo 3 veces el procedimiento y agitando constantemente.
- Luego se sumergieron las láminas en 4X SSC por dos minutos a temperatura ambiente, sobre un agitador.
  - Entre tanto se prepararon las capas que adhieren las señales fluorescentes a los anticuerpos mediados por biotina y digoxigenina, considerando 3 capas de 300 µL para cada lámina. Cada capa de 300 µL se compone de 2 partes de solución de bloqueo (1X) (diluido a partir del producto *5X in-situ hybridization blocking solution*, Vector Laboratories) y 5 partes de tampón (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Ph8). a) 1ra capa: Para Biotina, por cada 100 µL de solución se agregaron 0.5 µL de avidin-FITC (avidina-isotiocianato de fluoresceína). c) 2da capa: Para Biotina, por cada 100 µL de solución se agregó 1 µL de antiavidin D. c) 3ra capa: Para biotina y digoxigenina, por cada 100 µL de solución se agregaron 0.5 µL de avidin-FITC y 0.5 µL de Anti Dig-Rho (anti-DIG –Rhodamin).
- Se retiraron las láminas del 4X SSC y sobre cada una se echan los 300 µL de la 1ra capa, luego se cubren las láminas con laminillas y se colocaron en una cámara humedecida, para mantenerlas incubadas a 37°C por ½ hora.
- Se procedió a lavar las láminas en 4X SSC - 0.05% Tween-20 por dos minutos a temperatura ambiente, repitiendo 3 veces el procedimiento. Luego se sumergieron las láminas en 4X SSC por dos minutos, agitando constantemente.
- Se retiraron las láminas del 4X SSC y sobre cada una se echan los 300 µL de la 2da capa, luego se cubren las láminas con laminillas y se colocaron en una cámara humedecida, para mantenerlas incubadas a 37°C por ½ hora.



- Luego de la incubación se lavaron las láminas en 4X SSC - 0.05% Tween-20 por dos minutos a temperatura ambiente, repitiendo 3 veces el procedimiento. Luego se sumergieron las láminas en 4X SSC por dos minutos, agitando constantemente.
- Se retiraron las láminas del 4X SSC y sobre cada una se echan los 300  $\mu$ L de la 3ra capa, luego se cubren las láminas con laminillas y se colocaron en una cámara humedecida, para mantenerlas incubadas a 37°C por 1 hora.
- Luego de la incubación se lavaron las láminas en 4X SSC - 0.05% Tween-20 por dos minutos a temperatura ambiente, repitiendo 3 veces el procedimiento. Luego se sumergieron las láminas en 4X SSC por dos minutos, siempre agitando constantemente.
- Se retiraron las láminas del 4X SSC y se secaron suavemente los bordes, luego se adicionaron 15  $\mu$ L de DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride), que contiene anti desvanecedor, y se procedió a sellar con una laminilla, teniendo reparos de no formar burbujas. Las láminas se mantienen a -20°C a largo plazo, luego de 10 minutos en refrigeración ya pudieron ser usadas en el microscopio de fluorescencia.

**c. Detección de la señal y análisis**

- La fluorescencia emitida fue captada con una cámara montada en un microscopio de fluorescencia que cuenta con filtros especiales que detectan las diferentes longitudes de onda que emiten los compuestos fluorescentes usados en el marcaje, dando como resultado un color diferente para cada uno.
- Este proceso dio un reporte visual de la ubicación de los genes y secuencias específicas de PNSs, en un determinado cromosoma de alpaca. El cual se obtuvo usando distintas combinaciones de sondas con ubicaciones previamente confirmadas (Ávila *et al.*, 2014a), y en base a estimaciones de ubicación de los genes siguiendo los grupos sinténicos reportados entre camélidos y humanos (Balmus *et al.*, 2007), según se detalla en el anexo 10.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

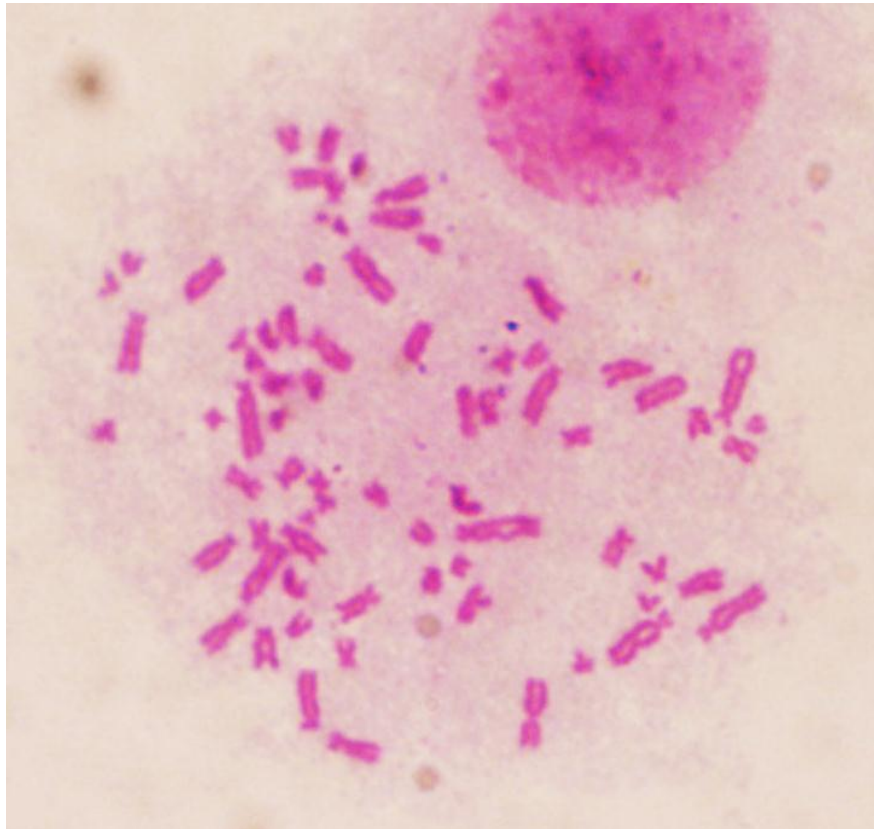
### 4.1. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CULTIVO DE LINFOCITOS DE ALPACA

La estandarización del presente protocolo ha consistido en evaluar dos protocolos de cultivo que se han realizado tanto en Perú como en el Extranjero. Se tuvo acceso en primera instancia al protocolo que desarrolla el laboratorio de Citogenética humana de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) (Protocolo SM), y se comparó al que se aplica en el Laboratorio de Citogenética Molecular y Genómica (LCMG) de la Universidad de Texas A&M (Protocolo TAMU). Ambas Instituciones vienen desarrollando de manera continua la aplicación del protocolo de cultivo celular a partir de linfocitos de alpaca, centrado en la obtención de células metafásicas. Tras la evaluación de ambos se ha considerado mantener los reactivos más accesibles, versátiles y posibles de obtener a nivel local, y a su vez se ha considerado los factores más ventajosos entre ambos, tales como tiempo de duración del protocolo y tipos de resultados (Figura 5).



**Figura 5: Esquema diferencial de los protocolos evaluados y características del protocolo estandarizado**

La estandarización del protocolo de cultivo de linfocitos de alpaca en el laboratorio especializado de la UNALM ha permitido observar metafases completas de alpaca, en las que es factible contabilizar el número cromosómico ( $2n=74$ ) y observar la morfología de algunos cromosomas (Figura 6), verificando que el protocolo empleado nos brinda la información biológica que requerimos para futuros análisis de cariotipos y aplicación de FISH.

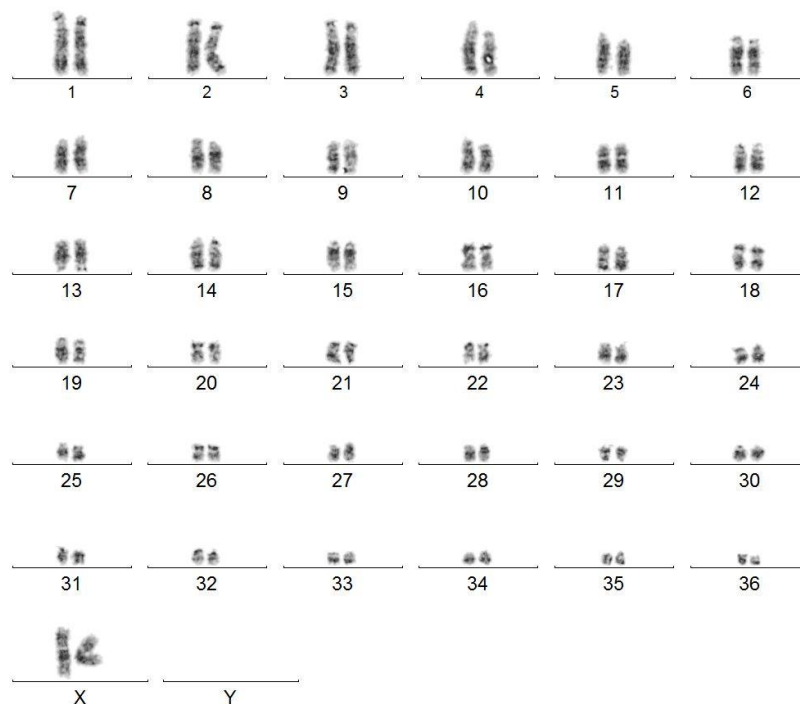


**Figura 6: Metafase de Alpaca a 100x**

Para optimizar nuestros resultados es necesario equipar el microscopio de contraste con el que contamos, con una lente adicional que amplifique la imagen recibida desde el microscopio a la imagen digital que obtenemos, esto garantiza ampliar el tamaño cromosómico observado y permitiría observar un mejor patrón de bandas, así como identificar mejor la morfología de cada cromosoma (Figura 7). A su vez, es necesario contar con un software que permita organizar cariotipos para así poder discriminar los pares cromosómicos mediante bandas y/o morfología de los cromosomas (Figura 8) y que favorezca mejorar la imagen, eliminando áreas de fondo, y permitiendo inclusive separar, de manera digital, cromosomas que se encuentren entrecruzados.



**Figura 7: Metafase de Alpaca a 100 x, obtenida con software MetaSystems®**  
 FUENTE: Laboratorio de Citogenética molecular y genómica, TAMU.



**Figura 8: Cariotipo de Alpaca, obtenida con Ikaros®**  
 FUENTE: Laboratorio de Citogenética molecular y genómica, TAMU.

En tanto, la mejor resolución de nuestros resultados dependerá de la mejora tecnológica en el equipamiento con el que contamos. Nuestro protocolo estandarizado sigue en constante validación, hasta la obtención de láminas metafásicas con un alto nivel de densidad (un mínimo de 8 metafases por campo de 10x) y en las cuales los cromosomas tengan un buen nivel de elongación, separación entre ellos mismos y pocos cruces.

#### 4.2. LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GENES

Se lograron mapear 12 genes mediante la técnica FISH (Tabla 1), permitiendo ubicarlos en 8 diferentes cromosomas de alpaca. A su vez, fue posible identificar los *scaffolds* a los que cada gen pertenecía, a modo de cotejar esta información con la existente reportada por Ávila (2014) y así afinar los análisis de ubicación para cada gen.

**Tabla 1: Resumen de ubicación de genes a cromosomas de alpaca.**

<b>GEN</b>	<b>Ubicación estimada (Balmus <i>et al.</i>, 2007)</b>	<i>Scaffold</i>	<b>Localización final</b>
<i>ALX3</i>	9, 13, 21	4	9q24-q25
<i>CHD7</i>	14, 25, 29, 31	45	29q16
<i>COL1A1</i>	16	377	16q13
<i>CTNNB1</i>	17	23	17q12-q13
<i>DAB2IP</i>	4, 28	52	4q34
<i>KRT15</i>	16	450	16q
<i>KRTAPI3-1</i>	1	101	1q33
<i>NCOA6</i>	19	34	19q12
<i>SOX9</i>	16	15	16q17
<i>TNFSF12</i>	16	387	16p13-p12
<i>ZIC1</i>	1, 17	35	1q13-q14
<i>ZIC5</i>	14	84	14q15-q16

La localización de cada gen fue confirmada por un marcador molecular con ubicación cromosómica previamente conocida, el análisis y pasos seguidos para la ubicación de cada

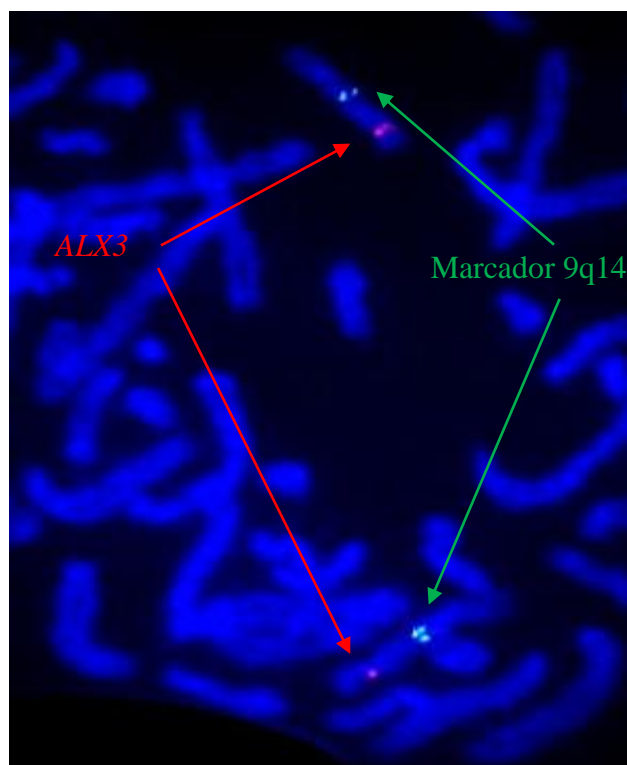
uno de los genes se detallan específicamente en los apartados siguientes y las diferentes combinaciones de sondas y resultados intermedios se encuentran descritas en el Anexo 10.

Seis de los 12 genes mapeados han sido localizados específicamente en una banda cromosómica, 5 han sido identificados a lo largo de 2 bandas cromosómicas, mientras que uno de los genes (*KRT15*) ha podido ser ubicado sólo a nivel de brazo cromosómico.

Los presentes resultados muestran concordancia con los grupos sinténicos descritos por Balmus y colaboradores (2007), confirmando que, en estos genes, la relación de ubicación entre humanos, bovinos y camélidos es conservada.

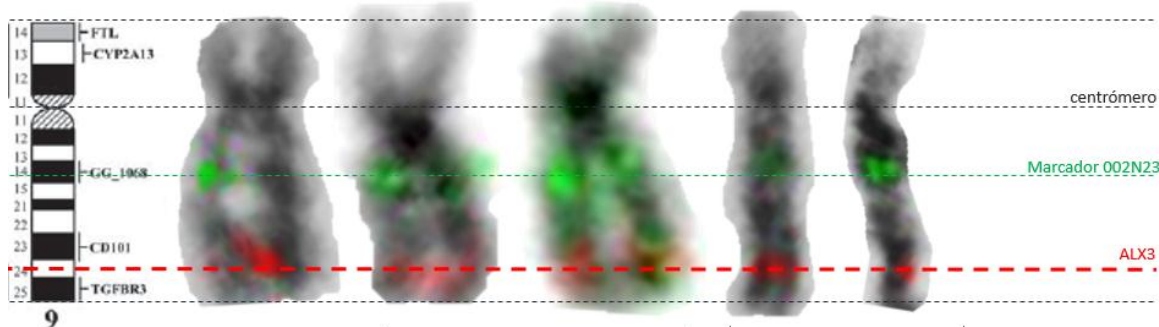
#### 4.2.1. Gen *ALX3*

Considerando que la ubicación estimada para este gen fuera en alguno de los cromosomas 9, 13 y 21, se hicieron hibridaciones considerando marcadores conocidos de estos 3 cromosomas. La secuencia representativa del gen *ALX3*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador GG\_1068 (9q14), concluyendo que el gen *ALX3* se encuentra en el cromosoma 9 (Figura 9).



**Figura 9: Hibridación de sonda para el gen *ALX3* (rojo) y marcador GG\_1068 (verde)**

Al realizar un análisis del ideograma y la posición de las señales fluorescentes, es posible estimar que el gen *ALX3* se encuentra al nivel de las últimas 3 bandas del brazo q del cromosoma 9 (Figura 10). A su vez, considerando la información disponible de la ubicación de los otros marcadores cercanos (*CD101* y *TGFBR3*), podemos notar que la secuencia del gen *ALX3* y la secuencia que contiene al marcador del gen *TGFBR3*, se encuentran alojadas en el *scaffold* 4 (NW\_005882706.1), por lo que ambos genes, al ser cercanos, tendrían que ubicarse en la misma o cercanas bandas. Gracias a esta información podemos concluir que el gen *ALX3* se encuentra alojado entre las bandas q24 y q25 del cromosoma 9 de alpaca (9q24-q25).



**Figura 10: Hibridaciones obtenidas para el gen *ALX3* alineadas al ideograma del cromosoma 9.**

#### 4.2.2. Gen *CHD7*

Considerando que la ubicación estimada para este gen fuera en alguno de los cromosomas 14, 25, 29 y 31 se hicieron hibridaciones considerando marcadores conocidos de estos 4 cromosomas. La secuencia representativa del gen *CHD7*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador *RPI* (29q16), concluyendo que el gen *CHD7* se encuentra en el cromosoma 29 (Figura 11).

Según la cercanía de las señales fluorescentes obtenidas, es posible estimar que el gen *CHD7* se encuentra en la misma o en una banda muy cercana al marcador usado, según se puede observar en el análisis de 4 pares de cromosomas metafásicos alineados al ideograma del cromosoma 29 (Figura 12). Es necesario considerar que, tanto el gen *CHD7*, como los genes *RPI* y *RBICC1*, se encuentran alojados en el mismo *scaffold*, el 45 (NW\_005882747.1). Para confirmar la proximidad de estos genes se procedió a analizar células interfásicas (Figura 13), encontrándose que las señales para ambos genes son muy próximas, inclusive

en este estadio celular, por lo que es posible concluir que el gen *CHD7* se encuentra alojado en la banda q16 del cromosoma 29 de alpaca (29q16).

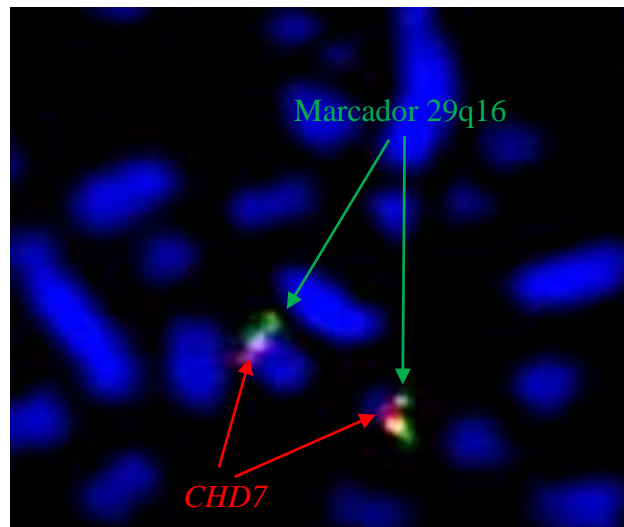


Figura 11: Hibridación de sonda para el gen *CHD7* (rojo) y marcador *RPI* (verde)

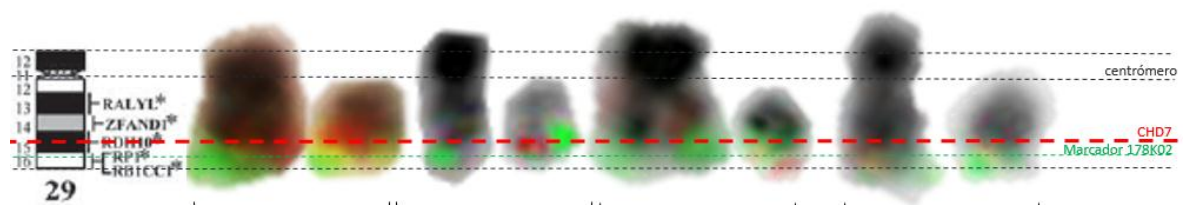


Figura 12: Hibridaciones obtenidas para el gen *CHD7* alineadas al ideograma del cromosoma 29.

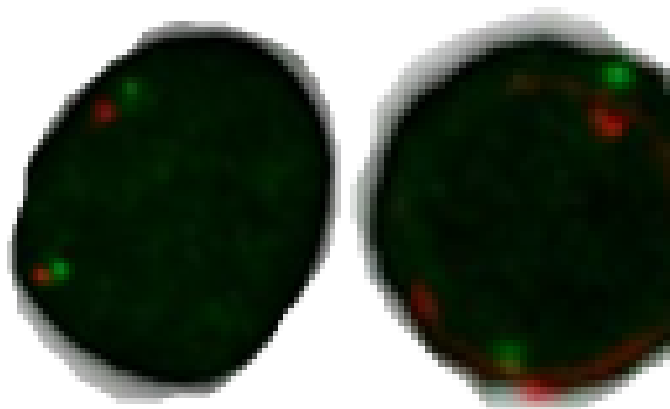
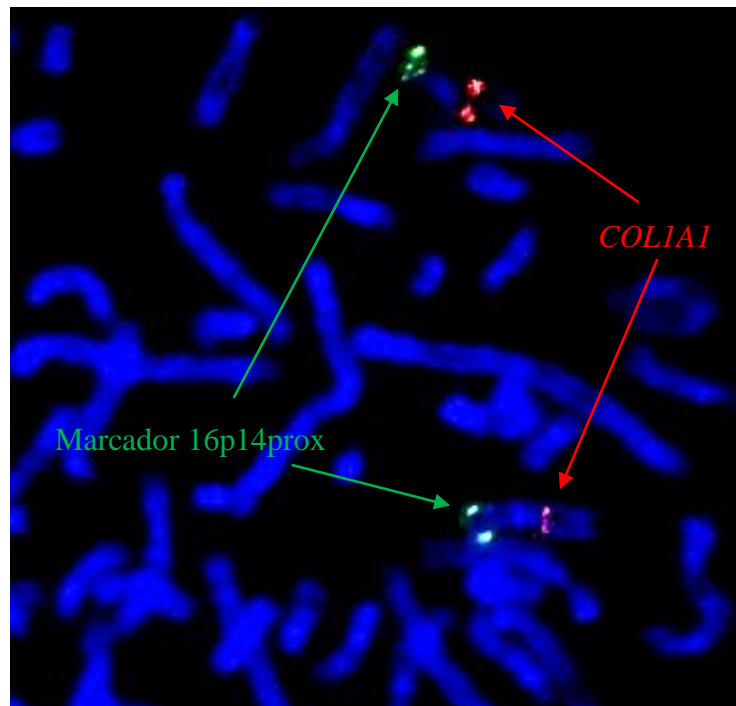


Figura 13: Hibridación de sonda para el gen *CHD7* (rojo) y marcador *RPI* (verde) en células interfásicas



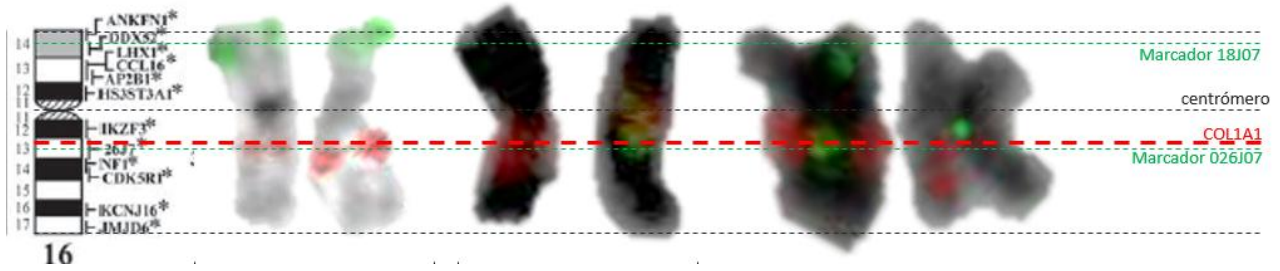
### 4.2.3. Gen *COLIA1*

Considerando que la ubicación estimada para este gen fuera el cromosoma 16, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *COLIA1*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador *DDX52* (16p14), concluyendo que el gen *COLIA1* se encuentra en el cromosoma 16 (Figura 14), adicionalmente se puede observar que el marcador y el gen se encuentran separados por el centrómero, por lo que se estima que *COLIA1* se encuentra en el brazo q de este cromosoma.



**Figura 14: Hibridación de sonda para el gen *COLIA1* (rojo) y marcador *DDX52* (verde)**

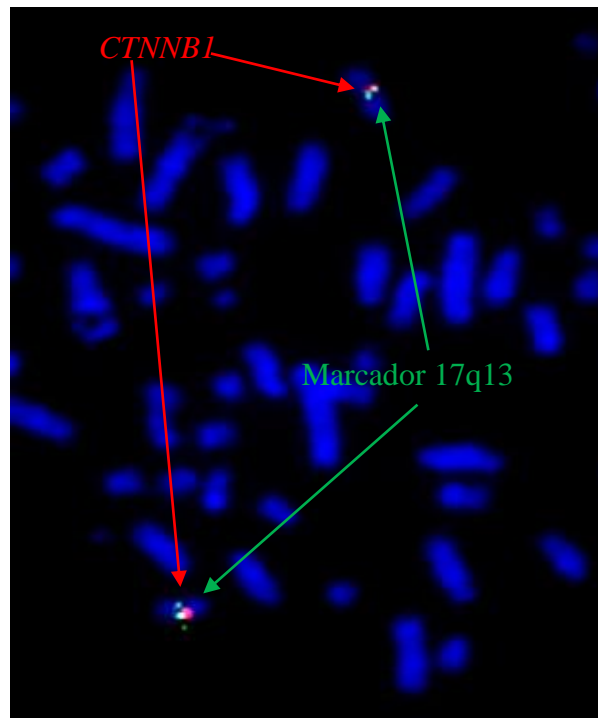
Adicionalmente se realizó una siguiente hibridación, considerando un marcador más próximo al gen, usándose uno ubicado en 16q13 (26J7), aunque las señales fluorescentes obtenidas fueran débiles, el análisis del ideograma usando estas metafases (Figura 15) demuestra que ambos, tanto el marcador usado como nuestro gen se encuentran muy próximos. Por lo que es posible estimar que la ubicación del gen *COLIA1* es en la banda q13 del cromosoma 16 de alpaca (16q13).



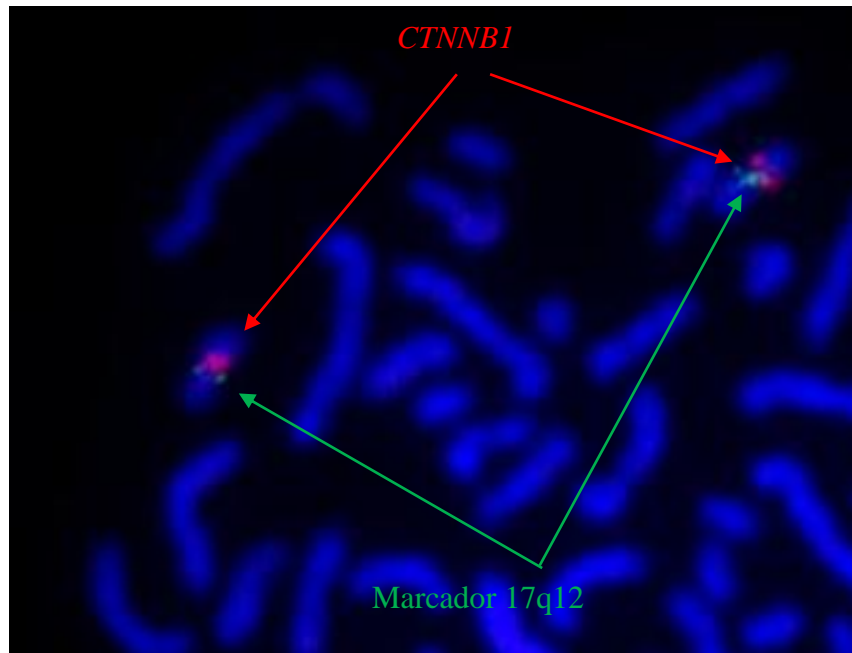
**Figura 15: Hibridaciones obtenidas para el gen *COL1A1* alineadas al ideograma del cromosoma 16.**

#### 4.2.4. Gen *CTNNB1*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 17, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *CTNNB1*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubican los marcadores 021E03 (17q13) y *SLC* (17q12), concluyendo que el gen *CTNNB1* se encuentra en el cromosoma 17 (Figuras 16 y 17).

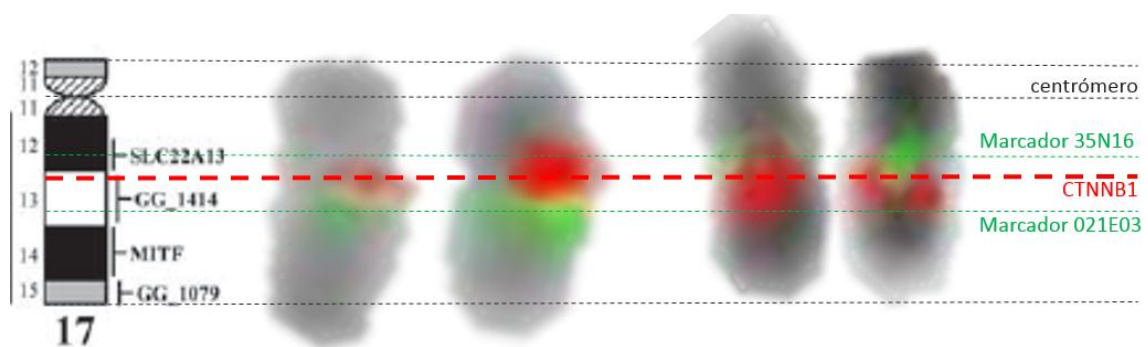


**Figura 16: Hibridación de sonda para el gen *CTNNB1* (rojo) y marcador 021E03 (verde)**



**Figura 17: Hibridación de sonda para el gen *CTNNB1* (rojo) y marcador *SLC 22A13* (verde)**

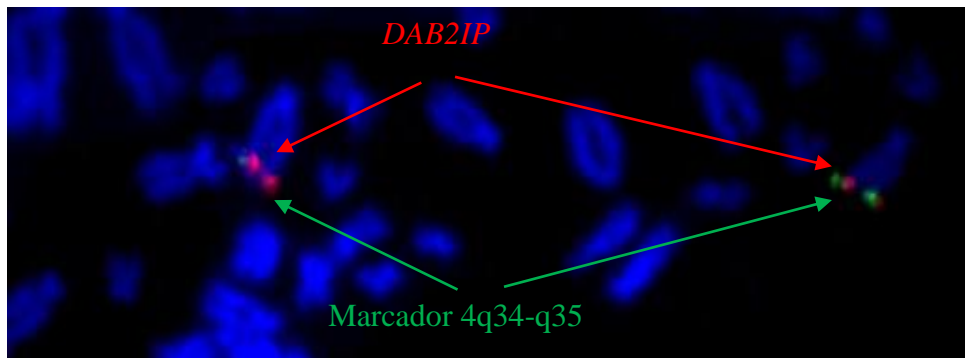
Al realizar el análisis del ideograma y la posición de las señales fluorescente, es posible estimar que el gen *CTNNB1* se encuentra entre las señales de los marcadores SLC 22A3 (17q12) y 021E03 (17q13) por lo que se lo puede situar entre ambas bandas (Figura 18). Adicionalmente, la secuencia del gen *CTNNB1* y la secuencia que contiene al marcador SLC 22A13, se encuentran alojadas en el *scaffold* 23 (NW\_005882725.1). Gracias a esta información podemos concluir que el gen *CTNNB1* se encuentra alojado entre las bandas q12 y q13 del cromosoma 17 de alpaca (17q12-q13).



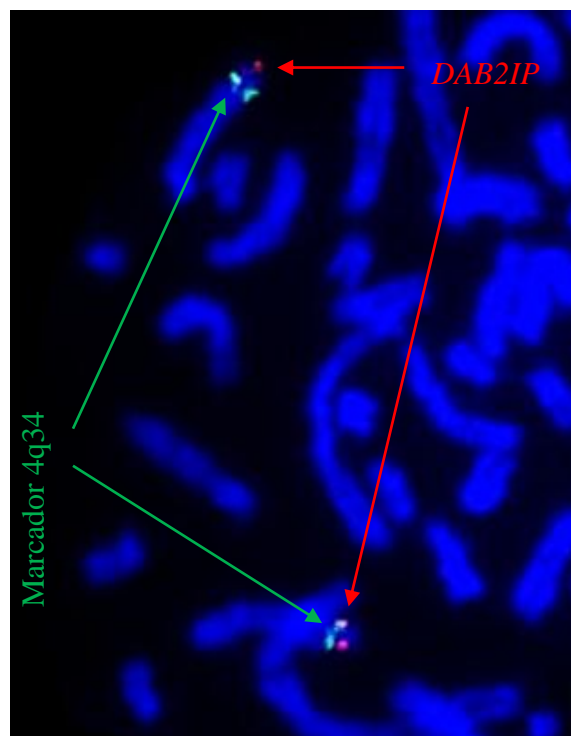
**Figura 18: Hibridaciones obtenidas para el gen *CTNNB1* alineadas al ideograma del cromosoma 17.**

#### 4.2.5. Gen *DAB2IP*

Considerando que la ubicación estimada para este gen fuera en alguno de los cromosomas 4 y 18, se hicieron hibridaciones considerando marcadores conocidos de estos 2 cromosomas. La secuencia representativa del gen *DAB2IP*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubican los marcadores GG\_1338 (4q34-q35) y GG\_478 (4q34), concluyendo que el gen *DAB2IP* se encuentra en el cromosoma 4 (Figuras 19 y 20).



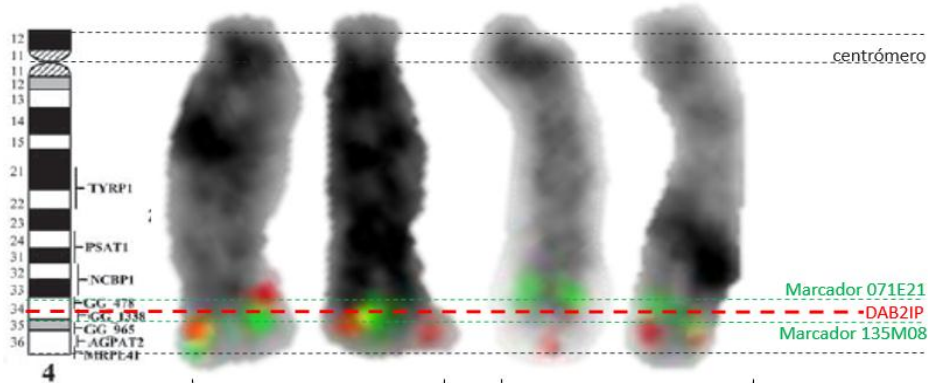
**Figura 19:** Hibridación de sonda para el gen *DAB2IP* (rojo) y marcador GG\_1338 (verde)



**Figura 20:** Hibridación de sonda para el gen *DAB2IP* (rojo) y marcador GG\_478 (verde)

Según la cercanía de las señales fluorescentes obtenidas, es posible estimar que el gen *DAB2IP* se encuentra en la misma o en una banda muy cercana al de los marcadores GG\_1338 (4q34-q35) y GG\_478 (4q34), según se puede observar en el análisis de 2 pares

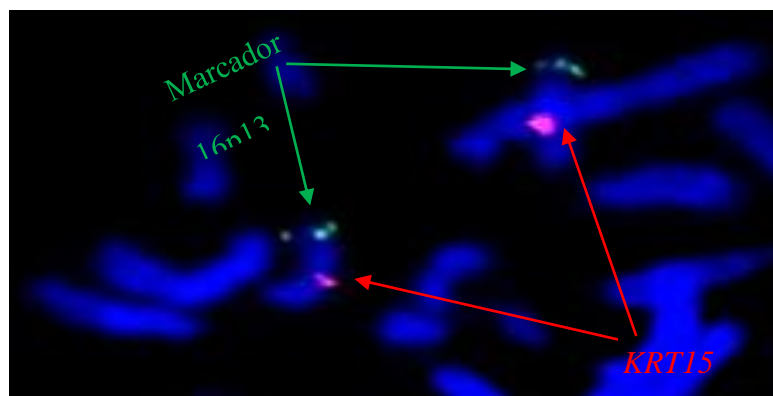
de cromosomas metafásicos alineados al ideograma del cromosoma 4 (Figura 21). Por lo que es posible concluir que el gen *DAB2IP* se encuentra alojado en la banda q34 del cromosoma 4 de alpaca (4q34).



**Figura 21: Hibridaciones obtenidas para el gen *DAB2IP* alineadas al ideograma del cromosoma 4.**

#### 4.2.6. Gen *KRT15*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 16, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *KRT15*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador AP2B1 (16p13), concluyendo que el gen *KRT15* se encuentra en el cromosoma 16 (Figura 22).

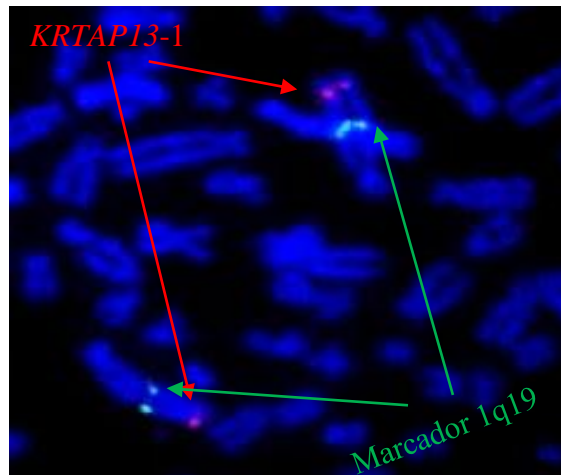


**Figura 22: Hibridación de sonda para el gen *KRT15* (rojo) y marcador *AP2B1* (verde)**

Al estar el gen separado del marcador por el centrómero, se confirma que ambos se sitúan en brazos distintos del cromosoma, por lo que concluimos que el gen *KRT15* se encuentra en el brazo q del cromosoma 16 (16q).

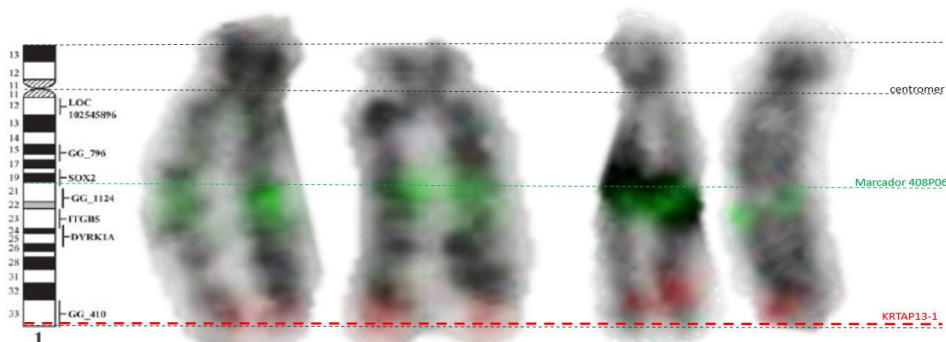
#### 4.2.7. Gen *KRTAP13-1*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 1, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *KRTAP13-1*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador *SOX2* (1q19), concluyendo que el gen *KRTAP13-1* se encuentra en el cromosoma 1 (Figura 23).



**Figura 23:** Hibridación de sonda para el gen *KRTAP13-1* (rojo) y marcador *SOX2* (verde)

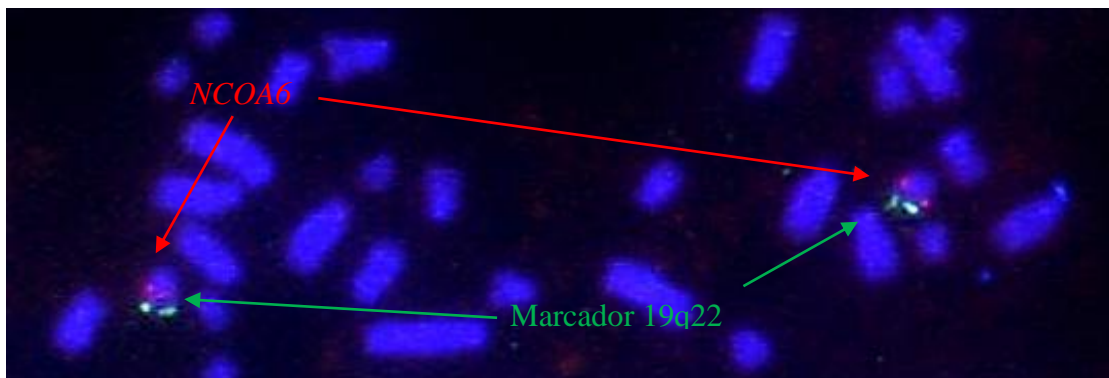
Tanto el gen *KRTAP13-1* como el marcador se encuentran en el mismo brazo del cromosoma 1, según las señales fluorescentes observadas, el gen *KRTAP13-1* se encuentra en la zona terminal del brazo q (Figura 24). No hay muchos marcadores conocidos para la región en la que se encuentra el gen, exceptuando el GG\_410 (1q33), que al usarse en una futura hibridación podría ubicar mejor a *KRTAP13-1*. La información presentada para este gen es concluyente, por lo que es posible afirmar que el gen *KRTAP13-1* se encuentra alojado en la banda q33 del cromosoma 1 de alpaca (1q33).



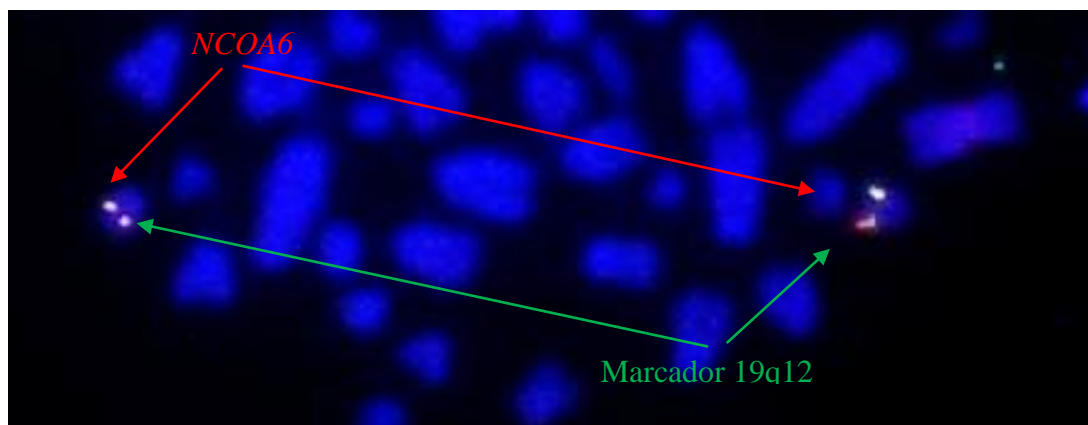
**Figura 24:** Hibridaciones obtenidas para el gen *KRTAP13-1* alineadas al ideograma del cromosoma 1.

#### 4.2.8. Gen *NCOA6*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 19, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *NCOA6*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubican los marcadores *BMP7* (19q22) y *ASIP* (19q12), concluyendo que el gen *NCOA6* se encuentra en el cromosoma 19 (Figuras 25 y 26). En la figura 26 se observan ambas señales fluorescentes casi sobrelapadas, por lo que se estima que tanto el gen *NCOA6*, como el marcador *ASIP*, se ubican en la misma banda.

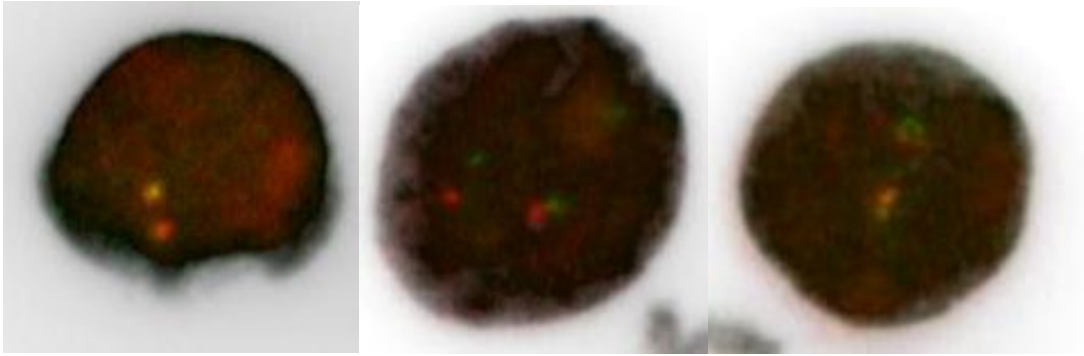


**Figura 25: Hibridación de sonda para el gen *NCOA6* (rojo) y marcador *BMP7* (verde)**



**Figura 26: Hibridación de sonda para el gen *NCOA6* (rojo) y marcador *ASIP* (verde)**

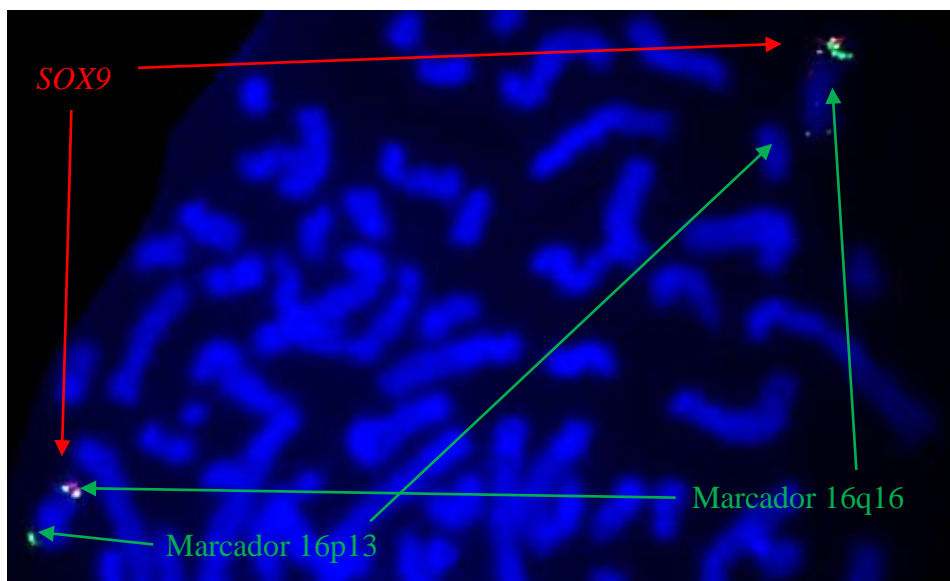
Se realizó el análisis de células interfásicas (Figura 27), en las cuales se observó que inclusive a ese nivel de des condensación, tanto el marcador como el gen se ubicarían al nivel de la misma banda, ya que no muestran separación. Adicionalmente, tanto el gen *NCOA6* y el marcador *ASIP* (19q12), se encuentran alojados en el *scaffold* 34 (NW\_005882736.1). Gracias a esta información podemos concluir que el gen *NCOA6* se encuentra ubicado en la banda q12 del cromosoma 19 de alpaca (19q12).



**Figura 27: Hibridación de sonda para el gen *NCOA6* (rojo) y marcador *ASIP* (verde) en células interfásicas**

#### 4.2.9. Gen *SOX9*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 16, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *SOX9*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubican los marcadores *AP2B1* (16p13) y *KCNJ16* (16q16), concluyendo que el gen *SOX9* se encuentra en el cromosoma 16 (Figura 28).

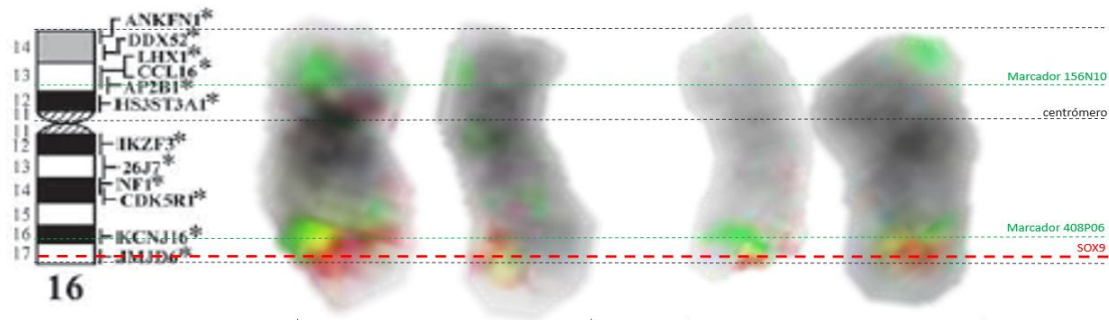


**Figura 28: Hibridación de sonda para el gen *SOX9* (rojo) y los marcadores *AP2B1* (verde) y *KCNJ16* (verde).**

Según la cercanía de las señales fluorescentes obtenidas del gen *SOX9* y el marcador *KCNJ16* (16q16), es posible estimar que ambos se encuentran en la misma o en una banda muy cercana, lo cual se confirma en el análisis de 2 pares de cromosomas metafásicos alineados al ideograma del cromosoma 16 (Figura 29). Además, la secuencia del gen *SOX9*



y la secuencia que contiene al marcador del gen *KCNJ16*, se encuentran alojadas en el *scaffold* 15 (NW\_005882717.1), por lo que ambos genes, al ser cercanos, tendrían que ubicarse en la misma banda. Por lo que es posible concluir que el gen *SOX9* se encuentra alojado en la banda q16 del cromosoma 16 de alpaca (16q17).

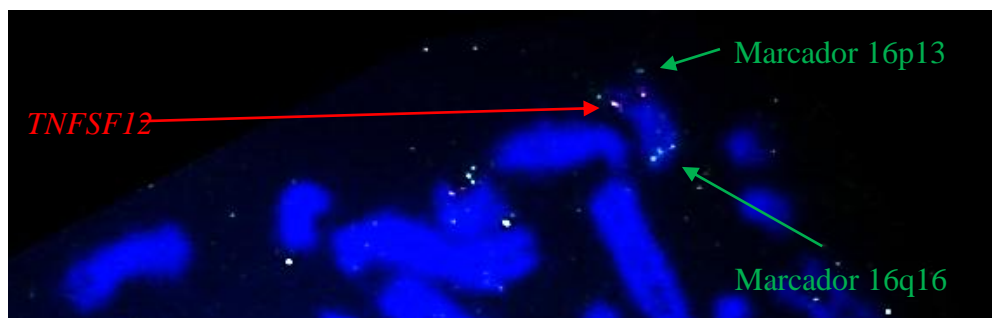


**Figura 29:** Hibridaciones obtenidas para el gen *SOX9* alineadas al ideograma del cromosoma 16.

#### 4.2.10. Gen *TNFSF12*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 16, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *TNFSF12*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubican los marcadores *AP2B1* (16p13), *KCNJ16* (16q16) y *VIM* (16q13), concluyendo que el gen *TNFSF12* se encuentra en el cromosoma 16 (Figuras 30 y 31).

Según las señales fluorescentes observadas, el gen *TNFSF12* se encuentra en la zona media del brazo p (Figura 32), por lo que es posible estimar que la ubicación del gen *TNFSF12* se encuentra entre las bandas p13 y p12 del cromosoma 16 de alpaca (16p13-p12).



**Figura 30:** Hibridación de sonda para el gen *TNFSF12* (rojo) y los marcadores *AP2B1* (verde) y *KCNJ16* (verde).

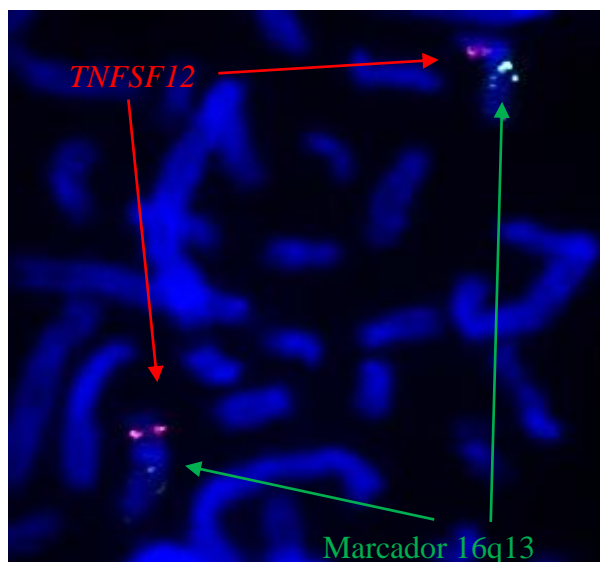


Figura 31: Hibridación de sonda para el gen *TNFSF12* (rojo) y marcador *VIM* (verde)

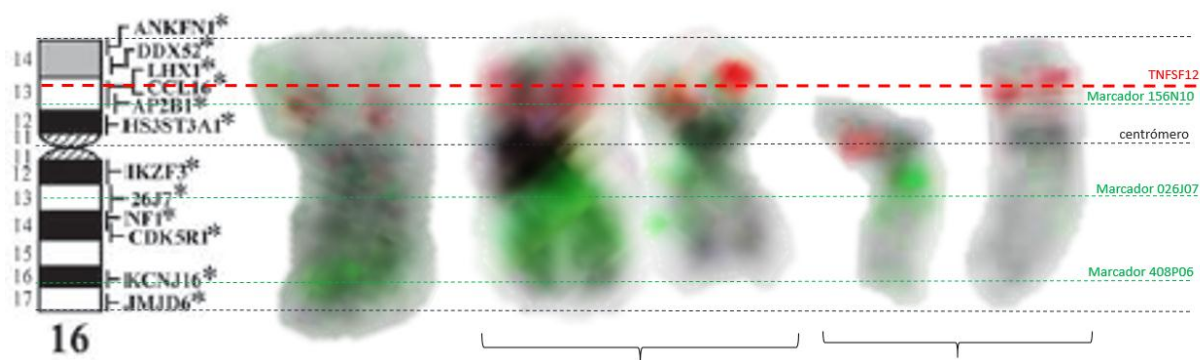
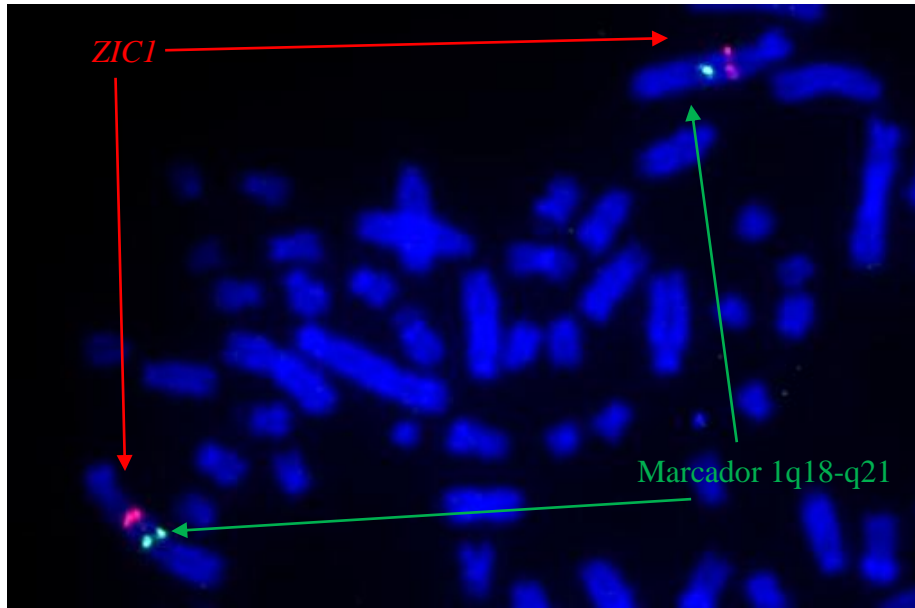


Figura 32: Hibridaciones obtenidas para el gen *TNFSF12* alineadas al ideograma del cromosoma 16.

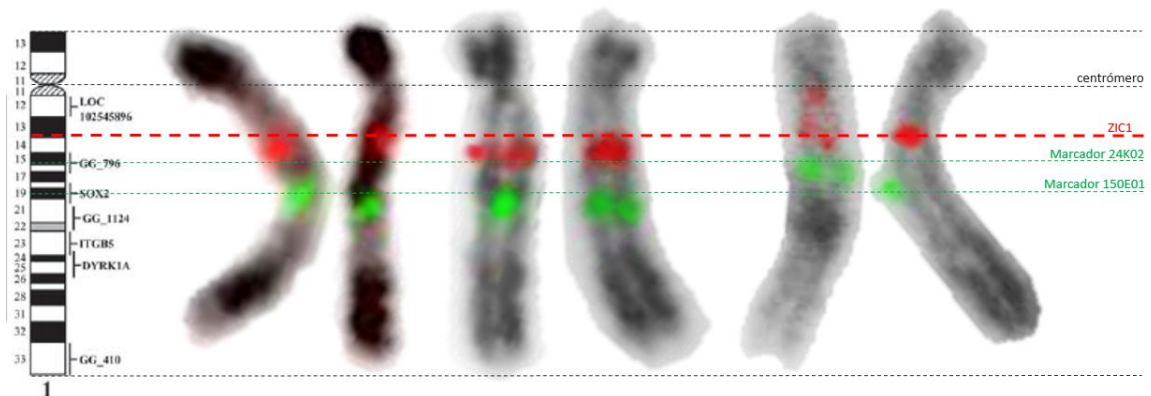
#### 4.2.11. Gen *ZIC1*

Considerando que la ubicación estimada para este gen fuera en alguno de los cromosomas 1 o 17, se hicieron hibridaciones considerando marcadores conocidos de estos 2 cromosomas. La secuencia representativa del gen *ZIC1*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador *SOX2* (1q18-q21), concluyendo que el gen *ZIC1* se encuentra en el cromosoma 1 (Figura 33).



**Figura 33: Hibridación de sonda para el gen *ZIC1* (rojo) y marcador *SOX2* (verde)**

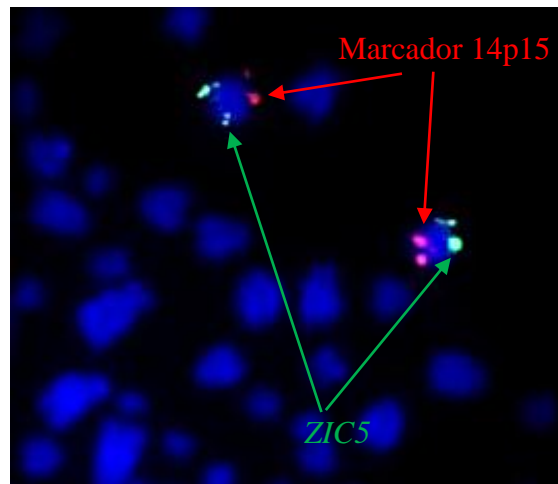
Tras el análisis del ideograma del cromosoma 1 a la par de 3 pares de cromosomas metafásicos, es posible estimar que el gen *ZIC1* se encuentra entre el centrómero y los marcadores *SOX2* (1q18-q21) y *GG\_796* (1q15-q16) usados (Figura 34). Cabe considerar que no hay otros marcadores conocidos para aproximar la ubicación de genes o marcadores en este cromosoma, y los que están disponibles cubren de 2 a 3 bandas. Por lo que la única estimación posible para el gen *ZIC1* corresponde a situarse entre las bandas q13 y q14 del cromosoma 1 de alpaca (1q13-14).



**Figura 34: Hibridaciones obtenidas para el gen *ZIC1* alineadas al ideograma del cromosoma 1.**

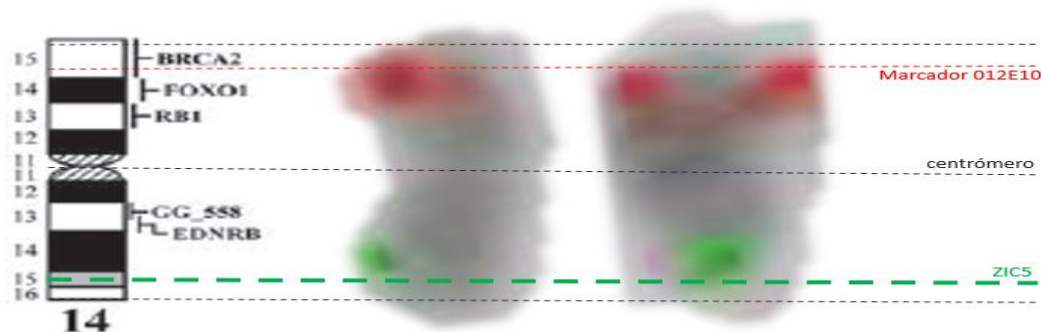
#### 4.2.12. Gen *ZIC5*

Considerando que la ubicación estimada para este gen es en el cromosoma 14, se hizo una hibridación considerando un marcador conocido para este cromosoma. La secuencia representativa del gen *ZIC5*, finalmente co-hibridó en el mismo cromosoma donde se ubica el marcador *BRCA2* (14p15), concluyendo que el gen *ZIC5* se encuentra en el cromosoma 14 (Figura 35).



**Figura 35:** Hibridación de sonda para el gen *ZIC5* (verde) y marcador *BRCA2* (rojo)

La única metafase disponible que mostro tanto la hibridación del gen como del marcador se encuentra muy condensada, más, es determinante en mostrar que el gen *ZIC5* y el marcador *BRCA2* (14p15) se encuentran en brazos distintos del cromosoma 14. Adicionalmente, tal como se puede apreciar en el análisis del ideograma y la información disponible del brazo q del cromosoma 14 (Figura 36), no hay marcadores conocidos que se sitúen al nivel en el que se estima que se encuentra el gen *ZIC5*, por lo que la única estimación posible para el gen *ZIC5* corresponde a situarse entre las bandas q15 y q16 del cromosoma 14 de alpaca (14q15-16).



**Figura 36:** Hibridaciones obtenidas para el gen *ZIC5* alineadas al ideograma del cromosoma 14.

Estas 12 localizaciones de genes confirman que la técnica FISH nos brinda la información necesaria para determinar la ubicación de zonas génicas específicas a cromosomas, en este caso, de alpacas.

El presente trabajo aporta en tanto a mejorar el mapa actual citogenético de alpaca (Ávila *et al.*, 2014a), adicionando 12 nuevas ubicaciones relacionadas a los genes mapeados en este estudio (Imagen 37).

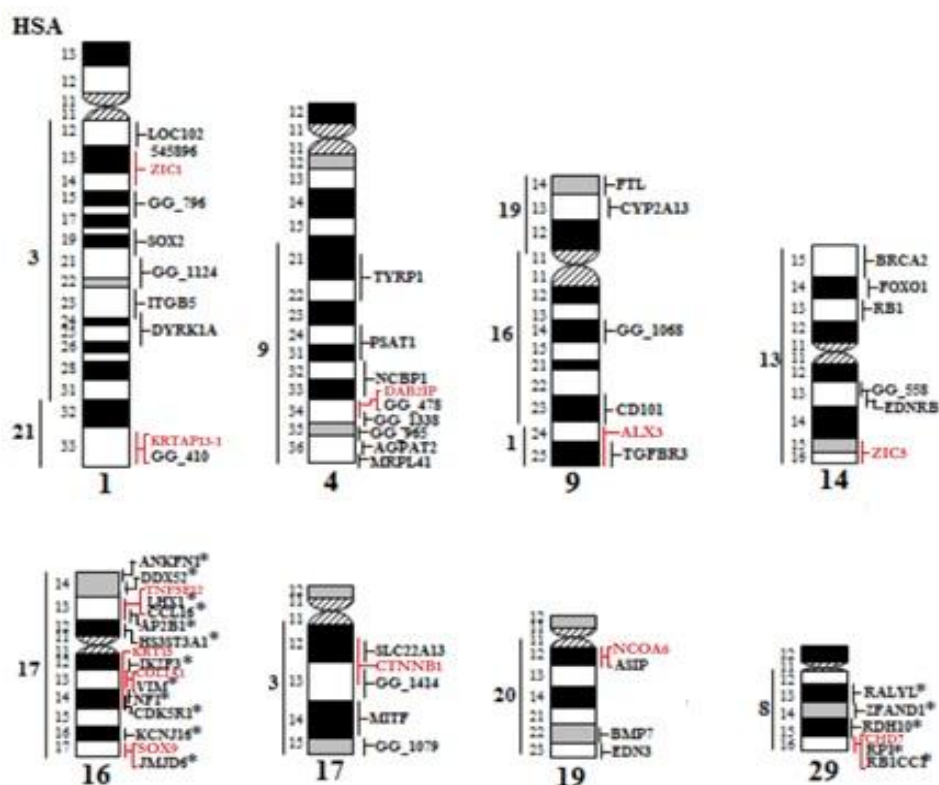


Figura 37: Adaptación del Mapa citogenético integrado de la Alpaca, con los 12 genes adicionales mapeados (en rojo). A la derecha se indica la correspondencia entre zonas sinténicas con cromosomas de humano.

FUENTE: Ávila *et al.*, 2014a

#### 4.3. LOCALIZACIÓN FÍSICA DE GRUPOS LIGADOS DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTIDO SIMPLE

Según lo reportado por Mamani (2018), existen 5 PNSs de una micromatriz para bovinos (BovineHD BeadChip – Illumina) que se encuentran en el ensamblaje del genoma de alpaca usado en este estudio (VicPac 2.0.2.), los mismos que se han ubicado en distintos *scaffolds* que han sido mapeados a ciertos cromosomas de alpaca (Tabla 2), por lo que se estima que

estos PNSs, y los grupos ligados a los que pertenecen, deberían pertenecer a estos mismos cromosomas. Más, dos de los PNSs (BovineHD0500004820 y BovineHD2000007676) no han sido reportados exclusivamente a sólo un *scaffold*, por lo que el análisis de ellos no sería concluyente.

**Tabla 2: Relación de polimorfismos de nucleótido simple a scaffolds y su ubicación cromosómica.**

Nombre del PNS	Grupo de ligamiento (Mamani, 2018)	Ubicado en <i>Scaffold</i>	Gen(es)/marcador ubicado(s) en el mismo <i>scaffold</i>	Cromosoma de alpaca donde se ubicada el <i>scaffold</i>
BovineHD0500004820	7	235	<i>GG410</i> (Ávila <i>et al.</i> , 2014a)	1
		255 y 452	-	-
BovineHD0700019108	9	33	<i>RALYL, ZFAND1, RDH1</i> (Ávila <i>et al.</i> , 2014a)	29
BovineHD0800012560	10	8	<i>FTL</i> (Ávila <i>et al.</i> , 2014a)	9
BovineHD2000007676	22	15	<i>KCNJ16, JMJD6</i> (Ávila <i>et al.</i> , 2014a) <i>SOX9</i> (Presente trabajo)	16
		30 y 119	-	-
BovineHD2000012425	22	23	<i>SLC22A13</i> (Ávila <i>et al.</i> , 2014a) <i>CTNNB1</i> (Presente trabajo)	17

Finalmente se estimó que el PNS BovineHD0700019108 debería estar ubicado en el cromosoma 29 de alpaca, a su vez, el grupo de ligamiento al cual pertenece (9), también debería estar situado en el mismo cromosoma. El PNS BovineHD0800012560 debería estar ubicado en el cromosoma 9 de alpaca, a su vez, el grupo de ligamiento al cual pertenece (10), también debería estar situado en el mismo cromosoma. El PNS BovineHD2000012425 debería estar ubicado en el cromosoma 17 de alpaca, a su vez, el grupo de ligamiento al cual pertenece (22), también debería estar situado en el mismo cromosoma. Cabe resaltar que la localización de estos PNSs y grupos ligados es estimada, y para demostrar las mismas es necesario realizar pruebas posteriores que confirmen estas asunciones.

## V. CONCLUSIONES

- 1** Se estandarizó un protocolo de cultivo de células a partir de linfocitos de alpaca que permite la obtención de cromosomas metafásicos con bandeo G.
- 2** Se han localizado los genes *ALX3*, *CHD7*, *CTNNB1*, *COL1A1*, *DAB2IP*, *KRT15*, *KRTAP13-1*, *NCOA6*, *SOX9*, *TNFSF12*, *ZIC1*, *ZIC5* en los cromosomas 9, 29, 16, 17, 4, 16, 1, 19, 16, 16, 1 y 14, respectivamente.
- 3** Se estimaron las ubicaciones de los PNSs BovineHD0700019108, BovineHD0800012560 y BovineHD2000012425, y sus respectivos grupos ligados, en los cromosomas 29, 9 y 17, respectivamente.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- El cultivo de linfocitos puede mejorar, tanto como el análisis de los cromosomas metafásicos, gracias a la implementación de un software en el microscopio que permita el análisis de metafases y armado de cariotipos. También es requerida la habilitación de un lente que amplíe las imágenes obtenidas por el microscopio de manera digital.
- El protocolo de cultivo de linfocitos debe ser mejorado, hasta lograr metafases en la elongación correcta y en lo posible sin cruzamiento de cromosomas.
- Los reportes de localización de los PNSs, y grupos ligados de los mismos, deben verificarse con análisis de laboratorio.
- Los laboratorios de FISH deben contemplar el diseño y marcaje de sondas moleculares, lo cual permitirá una constante aplicación de la técnica en pos del mapeo de otros genes y/o marcadores moleculares.
- Mantener la constante capacitación de los investigadores involucrados en esta investigación y diseminar el conocimiento a colaboradores que puedan seguir aportando al conocimiento genómico de la alpaca.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almathen, F; Elbir, H; Bahbahani, H; Mwacharo, J; Hanotte, J. 2018. Polymorphisms in MC1R and ASIP genes are associated with coat color variation in the arabian camel. *Journal of Heredity*, Volume 109, Issue 6, 24 August 2018, Pages 700–706.

Aruga, J. The role of Zic genes in neural development. *Mol Cell Neurosci.* 2004; 26:205–221.

Ávila, F; Baily, M; Perelman, P; Das, P; Pontius, J; Chowdhary, R; Owens, E; Johnson, W; Merriwether, D; Raudsepp, T. 2014a. A Comprehensive Whole-Genome Integrated Cytogenetic Map for the Alpaca (*Lama pacos*). *Cytogenet Genome Res* 2014; 144:193–204.

Ávila, F; Das, P; Kutzler, M; Owens, E; Perelman, P; Rubes, J; Hornak, M; Johnson, W; Raudsepp, T. 2014b. Development and Application of Camelid Molecular Cytogenetic Tools. *Journal of Heredity* 2014:105(6):858–869.

Ávila, F; Baily, MP; Merriwether, DA; Trifonov, VA; Rubes, J; Kutzler, MA; Chowdhary, R; Janečka, J; Raudsepp, T. 2015. A cytogenetic and comparative map of camelid chromosome 36 and the minute in alpacas. *Chromosome Research*, 23(2), 237-251.

Balmer, P; Bauer, A; Pujar, S; McGarvey, KM; Welle, M; Galichet, A; Müller, EJ; Pruitt, KD; Leeb, T; Jagannathan, V. 2017. A curated catalog of canine and equine keratin genes. *PloS one*, 12(8), e0180359. doi:10.1371/journal.pone.0180359.

Balmus, G; Trifonov, VA; Biltueva, LS; O'brien, PC; Alkalaeva, ES; Fu, B; Skidmore, JA; Allen, T; Graphodatsky, AS; Yang, F; Ferguson-Smith, MA. 2007. Cross-species chromosome painting among camel, cattle, pig and human: further insights into the putative Cetartiodactyla ancestral karyotype. *Chromosome Res.* 15:499–515.

Bathrachalam, C; La Manna, V; Renieri, C; La Terza, A. 2011. Asip and *MC1R* cDNA polymorphism in alpaca. *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*, Springer Book. Wageningen Academic Publishers, pp. 93–96 (ISBN: 978-90-8686-727-1).

Berger, MF; Levin, JZ; Vijayendran, K; Sivachenko, A; Adiconis, X; Maguire, J; Johnson, LA; Robinson, J; Verhaak, RG; Sougnez, C; Onofrio, RC; Ziaugra, L; Cibulskis, K; Laine,

- E; Barretina, J; Winckler, W; Fisher, DE; Getz, G; Meyerson, M; Jaffe, DB; Gabriel, SB; Lander, ES; Dummer, R; Gnirke, A; Nusbaum, C; Garraway, LA. 2010. Integrative analysis of the melanoma transcriptome. *Genome research*, 20(4), 413-27.
- Bertolini, F; Elbeltagy, A; Ponce de León, FA; Gutiérrez, GA; Rothschild, MF. 2016. Applicability of using bovine, ovine and caprine SNP chips for alpaca and dromedary genomic studies. ISAG P4013.
- Betancur, P; Bronner-Fraser, M; Sauka-Spengler, T. 2010. Assembling neural crest regulatory circuits into a gene regulatory network. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2010;26:581–603.
- Bianchi, NO; Larramendy, ML; Bianchi, MS; Cortes, L. 1986. Karyological conservation in South American camelids. *Experientia*. 42: 622- 624.
- Bornstein, S. 2010. Important ectoparasites of Alpaca (*Vicugna pacos*). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52 (Suppl 1), S17.
- Brookes, AJ. 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234(2): 177-186.
- Cadiou, E; Neff, MW; Quignon, P; Walsh, K; Chase, K; Parker, HG; Vonholdt, B. M; Rhue, A; Boyko, A; Byers, A; Wong, A; Mosher, DS; Elkahlon, AG; Spady, TC; André, C; Lark, KG; Cargill, M; Bustamante, CD; Wayne, RK; Ostrander, EA. 2009. Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5949), 150-3.
- CENAGRO (Censo Nacional Agropecuario, Perú). 2012. Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Población de Ganado Alpaquero.
- Chandramohan, B; Renieri, C; La Manna, V; La Terza, A. 2013. The alpaca agouti gene: Genomic locus, transcripts and causative mutations of eumelanic and pheomelanic coat color. *Gene* 521 303–310.
- Chandramohan, B; Renieri, C; La Manna, V; La Terza, A. 2015. The Alpaca Melanocortin 1 Receptor: Gene Mutations, Transcripts, and Relative Levels of Expression in Ventral Skin Biopsies. Hindawi Publishing Corporation. *Scientific World Journal*. Volume 2015, Article ID 265751, 9 pages.
- Cuthill, IC; Allen, WL; Arbuckle, K; Caspers, B; Chaplin, G; Hauber, ME; Hill, GE; Jablonski, NG; Jiggins, CD; Kelber, A; Mappes, J; Marshall, J; Merrill, R; Osorio, D; Prum, P; Roberts, NW; Roulin, A; Rowland, HM; Sherratt, TN; Skelhorn, J; Speed, MP; Stevens,

- M; Stoddard, MC; Stuart-Fox, D; Talas, L; Tibbetts, E; Caro, T. 2017. The biology of color. *Science* 357, 470.
- Daverio, MS; Rigalt, F; Romeroc, S; Vidal-Riojaa, L; Di Rocco, F. 2016. Polymorphisms in MC1R and ASIP genes and their association with coat color phenotypes in llamas (*Lama glama*). *Small Ruminant Research* 144 83–89.
- Di Berardino, D; Nicodemo, D; Coppola, G; King, AW; Ramunno, L; Cosenza, GF; Iannuzzi, L; Di Meo, GP; Balmus, G; Rubes, J. 2006. Cytogenetic characterization of alpaca (*Lama pacos*, fam. Camelidae) prometaphase chromosomes. *Cytogenet Genome Res.* 115:138–144.
- Fan, R; Dong, Y; Cao, J; Bai, R; Zhu, Z; Li, P; Zhang, J; He, X; Lü, L; Yao, J; Mondal, M; Smith, GW; Dong, C. 2011. Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *Animal*. 2011;5(8):1157–1161.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Italia). 2010. La situación de los recursos Zoogenéticos mundiales para la Alimentación y la Agricultura.
- Farhadian, M; Rafat, SA; Hasanpur, K; Ebrahimi, M; Ebrahimie, E. 2018. Cross-Species Meta-Analysis of Transcriptomic Data in Combination With Supervised Machine Learning Models Identifies the Common Gene Signature of Lactation Process. *Frontiers in genetics*, 9, 235.
- Fernández, D. 2015. Búsqueda de genes relacionados a la síntesis de la fibra y marcadores SSR en los ESTs de piel de alpaca *Vicugna pacos*. Tesis de Titulación. Lima, Perú, UNMSM. 57p.
- Florez, F. (2016). Caracterización de marcadores genéticos en genes que codifican a proteínas asociadas a queratina y evaluación de la asociación del gen KRTAP11-1 al diámetro de fibra en alpaca (*Vicugna pacos*) siguiendo una aproximación de gen candidato. Tesis de Maestría. Lima, Perú, UPCH. 172p.
- Goddard, ME; Hayes, BJ; Meuwissen, THE. 2010. Genomic selection in livestock populations. *Genetics Research*, 92(5-6), pp. 413–421.
- Hattori, T; Coustry, F; Stephens, S; Eberspaecher, H; Takigawa, M; Yasuda, H; de Crombrughe, B. 2008. Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60

via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Res.* 2008 May;36(9):3011-24.

Hayes, B; Goddard, M. 2010. Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. *Genome* 53(11):876-883.

Heaton, M; Harhay, G; Bennett, G; Stone, R; Grosse, W; Casas, E; Keele, J; Smith, T; Chitko-Mckown, C; Laegreid, W. 2002. Selection and use of SNPET markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mamm.Genome.* 13:272-281.

Hidalgo, AM; Lopes, PS; Paixão, DM. Silva, FF; Bastiaansen, JWM; Paiva, sr; Faria, DA; Guimarães, SEF. 2013. Fine mapping and single nucleotide polymorphism effects estimation on pig chromosomes 1, 4, 7, 8, 17 and X. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 511–519.

Hsu, TC; Benirschke, K. 1967. *An Atlas of Mammalian Chromosomes.* 1: 40. New York: Springer.

Huelsken, J; Vogel, R; Erdmann, B; Cotsarelis, G; Birchmeier, W. 2001. Beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell.* 2001 May 18;105(4):533-45.

Illumina. 2015. BovineHD Genotyping BeadChip. Pub. No.370-2010-018

Jackling, F; Johnson, W; Appleton, B. 2012. The Genetic Inheritance of the Blue-eyed White Phenotype in Alpacas (*Vicugna pacos*). *Journal of Heredity.*

Johnson, W; Perelman, P. 2007. Development of a Radiation-Hybrid Map. *Alpacas Magazine* 2007: 234-239.

Kijas, JW; Townley, D; Dalrymple, BP; Heaton, MP. 2009. A Genome Wide Survey of SNP Variation Reveals the Genetic Structure of Sheep Breeds. *PLoS ONE*, 4(3), e4668.

Lang, K; Yang, Y; Plante, Y. 1996. Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Animal Genetics* 27: 285-294.

Langer-Safer, PR; Levine, M; Ward, DC. 1982. Immunological method for mapping genes on *Drosophila* polytene chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), 4381–4385.

Levsky, JM; Singer, RH. 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *J. Cell Sci.* 116,2833–2838.

- Mamani, C; Gutierrez, G; Ponce de León, FA. 2017. Identificación de polimorfismo de nucleótido simple en alpaca (*Vicugna pacos*) usando un panel de células híbridas irradiadas alpaca/hámster. *Revista RICBA* 1(2): 92-95, 2017 – ISSN: 2521-5485.
- Mamani, C. 2018. Mapa físico de polimorfismos de nucleótido simple en alpaca (*Vicugna pacos*) usando un panel de células híbridas irradiadas alpaca/hámster. Tesis Mg. Sc. Producción Animal. Lima, Perú, UNALM. 58p.
- Marín, J; Zapata, B; González, B; Bonacic, C; Wheeler, J; Casey, C; Bruford, M; Palma, E; Poulin, E; Alliende, A; Spotorno, A. 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural* 80:121 – 140.
- Mary, N; Barasc, H; Ferchaud, S; Billon, Y; Meslier, F; Robelin, D; Calgaro, Anne; Loustau-Dudez, A; Bonnet, N; Yerle, M; Acloque, H; Ducos, A; Pinton, A. 2014. Meiotic Recombination Analyses of Individual Chromosomes in Male Domestic Pigs (*Sus scrofa domestica*). Shi Q, ed. *PLoS ONE*. 9(6):e99123.
- Mccue, ME; Bannasch, DL; Petersen, JL. 2012. A High Density SNP Array for the Domestic Horse and Extant *Perissodactyla*: Utility for Association Mapping, Genetic Diversity, and Phylogeny Studies. *PLoS Genetics*, 8(1), e1002451.
- Meuwissen, T; Hayes, B; Goddard, M. 2013. Accelerating Improvement of Livestock with Genomic Selection. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2013. 1:221–237.
- Morante, R; Goyache, F; Burgos, A; Cervantes, I; Pérez-Cabal, MA; Gutiérrez, JP. 2009. Genetic improvement for alpaca fibre production in the Peruvian Altiplano: the Pacamarca experience. *Animal Genetic Resources Information*, 2009, 45, 37–43.
- Morgenthaler, C; Diribarne, M; Capitan, A; Legendre, R; Saintilan, R; Gilles, M; Esquerré, D; Juras, R; Khanshour, A; Schibler, L; Cothran, G. 2017. A missense variant in the coil1A domain of the keratin 25 gene is associated with the dominant curly hair coat trait (CRD) in horse. *Genet Sel Evol.* 2017 Nov 15;49(1):85.
- Nath, J; Johnson, K L. 2000. A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects. *Biotech. Histochem.* 75,54–78.
- Obreque, V; Coogle, L; Henney, P; Bailey, E; Mancilla, R; Garcia-Huidobro, J; Hinrichsenl, P; Cothran, EG. 1998. Characterization of 10 polymorphic alpaca dinucleotide microsatellites. *Animal Genetics*. 29(6): 461-462.

- Paredes, MM; Membrillo, A; Gutiérrez, JP; Cervantes, I; Azor, PJ; Morante, R; Alonso, A; Molina, A; Muñoz-Serrano, A. 2014. Association of microsatellite markers with fiber diameter trait in Peruvian alpacas (*Vicugna pacos*). *Livestock Science*, 161: 6-16
- Partipilo, G; D'addabbo, P; Lacalandra, GM; Liu, GE; Rocchi, M. 2011. Refinement of *Bos taurus* sequence assembly based on BAC-FISH experiments. *BMC Genomics*, 12, 639.
- Passeron, T; Valencia, JC; Bertolotto, C; Hoashi, T; Le Pape, E; Takahashi, K; Ballotti, R; Hearing, VJ. 2007. SOX9 is a key player in ultraviolet B-induced melanocyte differentiation and pigmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 28; 104(35):13984-9.
- Pauciullo, A; Perucatti, A; Cosenza, G; Iannuzzi, A; Incarnato, D; Genuardo, V; Di Bernardino, D; Iannuzzi, L. 2014. Sequential Cross-Species Chromosome Painting among River Buffalo, Cattle, Sheep and Goat: A Useful Tool for Chromosome Abnormalities Diagnosis within the Family Bovidae. Shi Q, ed. *PLoS ONE*.9 (10):e110297.
- Penedo, C; Caetano, R; Cordova, I. 1998. Microsatellite markers for South American camelids. *Animal Genetics* 29: 398-413.
- Ponce de León, FA. 1996. Microdissected Chromosome Libraries for Livestock species. *Arch. Zootec*. 45: 165-174.
- Quispe, EC; Rodríguez, TC; Iñiguez, LR; Mueller, JP. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resource Information*. 45, 1–14.
- Ramos, M. 2014. Descripción del patrón de diferenciación longitudinal de los cromosomas de alpacas y llamas. Tesis Magíster en Genética. Lima, Perú. UNMSM. 110 p.
- Raudsepp, T; Chowdhary BP. 2008. FISH for Mapping Single Copy Genes. *Methods Mol Biol*. 422:31-49.
- Reed, KM; Chaves, LD. 2008. Simple Sequence Repeats for Genetic Studies of Alpaca. *Animal Biotechnology* 19(4):243-309.
- Reed, KM; Mendoza, KM; Fleege, EC; Damerow, JA; Armien, AG. 2013. Evaluation of *CHD7* as a candidate gene for choanal atresia in alpacas (*Vicugna pacos*). *The Veterinary Journal* 198 (2013) 295–298.
- Rompolas, P. Greco, V. 2013. Stem cell dynamics in the hair follicle niche. *Seminars in cell & developmental biology*, 25-26, 34-42.

Rupp, R; Mucha, S; Larroque, H; McEwan, J; Conington, J. 2016. Genomic application in sheep and goat breeding. *Anim Frontiers*. 2016;6:39–44.

Shimomura, Y; Wajid, M; Petukhova, L; Kurban, M; Christiano, AM. 2010. Autosomal-dominant woolly hair resulting from disruption of keratin 74 (KRT74), a potential determinant of human hair texture. *Am J Hum Genet*. 2010 Apr 9;86(4):632-8.

Simões-Costa, M; Bronner, ME. 2013. Insights into neural crest development and evolution from genomic analysis. *Genome Res*. 2013 23: 1069-1080.

Speicher, MR; Carter, NP. 2005. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nat. Rev. Genet*.6,782–792.

Suzuki, H. 2013. Evolutionary and phylogeographic views on Mc1r and Asip variation in mammals. *Genes Genet Syst*. 2013;88(3):155-64.

Taylor, KM; Hungerford, DA; Synder, RL; Ulmer, FA. 1968. Uniformity of karyotypes in the Camelidae. *Cytogenetics* 7: 8-15.

Thomas, PE; Klinger, R; Furlong, LI; Hofmann-Apitius, M; Friedrich, CM. 2011. Challenges in the association of human single-nucleotide polymorphism mentions with unique database identifiers. *BMC Bioinformatics*. 12: S4.

Toivola, DM; Boor, P; Alam, C; Strnad, P. 2015. Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2015 Feb;32:73-81.

Trask, BJ. 2002. Human cytogenetics: 46 chromosomes, 46 years and counting. *Nat. Rev. Genet*.3,769–778.

Wiggans, GR; Cole, JB; Hubbard, SM; Sonstegard, TS. 2017. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. *Annu Rev Anim Biosci*. 2017 Feb 8;5:309-327.

Wu, H; Guang, X; Al-Fageeh, MB; Cao, J; Pan, S; Zhou, H; Zhang, L. 2014a. Camelid Genomes Reveal Evolution and Adaptation to Desert Environments. *Nat Commun*.5.

Wu, Y; Fan, H; Wang, Y; Zhang, L; Gao, X; Chen, Y; Li, J. 2014b. Genome-Wide Association Studies Using Haplotypes and Individual SNPs in Simmental Cattle. *PLoS ONE*, 9(10), e109330.

Xie, D; Gore, C; Liu, J; Pong, RC; Mason, R; Hao, G; Long, M; Kabbani, W; Yu, L; Zhang, H; Chen, H; Sun, X; Boothman, DA; Min, W; Hsieh, JT. 2010. Role of DAB2IP in modulating epithelial-to-mesenchymal transition and prostate cancer metastasis.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2010, vol. 107, n° 6, p. 2485-90.

Yucra, A. 2017. Determinación de filiación mediante marcadores microsatélite en alpacas Huacaya del Anexo Quimsachata INIA – Puno. Tesis de Titulación. Puno, Perú, UNA. 71p.



## VIII. ANEXOS

### Anexo 1: Preparación de reactivos

#### ***Concanavalina A. Marca SIGMA. Código C-2010.***

Solución stock (SS): Diluir 50mg de Concanavalina A en 50 mL de Solución Puck. Luego filtrar con filtros 0.2 micrones, alicuotar y congelar.

Solución de trabajo: Utilizar 200  $\mu$ L de SS para 10 mL de medio, es decir 20ug/mL.

#### ***Giemsa' stain. Marca Gurr BDH. Chemicals Ltd Poole England.***

Solución stock 200 mL: 1,52 g de Giemsa en polvo + 100 mL de Glicerol a 60° C. Mezclar y disolver el Giemsa manteniendo la temperatura de 60° C.

Una vez disuelto agregar 100 mL de metanol y homogenizar. Filtrar la solución con papel filtro y almacenarlo en frasco oscuro por 5 días antes de su uso.

Solución de trabajo: 3 mL de SS en 97 mL de tampón fosfato pH 6,8

#### ***Solución Carnoy:***

Fijador compuesto por Etanol absoluto:Ácido acético (3:1)

#### ***Tampón fosfato pH 6.8***

10,5 de Solución A + 9 mL de Solución B.

Solución A:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,06 M 8,1654 g / L

Solución B:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,06 M 16,0848 g / L

Agua destilada: 1,000 L

Ajustar el pH 6.8 con HCl 0,1 N o NaOH 0,1 N y mantener refrigerado.

***Solución salina citratada 2X SSC g / L***

NaCl: 17,500 mg / L

Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O: 8,824 mg / L

Agua destilada: 1,000 L

La solución deberá tener el pH 7,0.

***100X Denhardt's***

500 ml

10 g de Ficoll

10 g de polivinilpirrolidona (PVP)

10 g de albúmina de suero bovino (BSA)

Añadir agua MilliQ a 500 ml de volumen final

El filtro esteriliza y alícuota de 20 ml en tubos cónicos de 50 ml. Almacenar a -20°C

***5% Leche (leche en polvo sin grasa de un supermercado)***

1000 ml

50 g de leche sin grasa alimentada

Añadir agua MilliQ a 1000 ml de volumen final

Alícuota de 40 ml en tubos cónicos de 50 ml. Almacenar a -20 °C

***10% Sodium Duodecil Sulfate***

1000 ml

100 g de SDS en polvo

Añadir 500 mL de agua MilliQ en un matraz de 1 L

Verter en 25 g de SDS a la vez, hasta que se disuelva

Llevar el volumen final a 1000 mL. Almacenar en botellas de 200 mL a temperatura ambiente.

### **20X SSPE**

2000 ml

Añadir lo siguiente a 1000 mL de agua:

55,2 g Fosfato de sodio Monobásico, Monohidrato

14,8 g de EDTA (di - sodio)

348,0 g Cloruro sódico

Calentar sobre la placa de agitación y ajustar el pH a 8,0 con NaOH para facilitar la disolución de EDTA.

Ajustar el pH a 7,4 con HCl

Aumente el volumen hasta 2000 ml con agua MilliQ. Autoclavar (líquidos: 121°C, 30 min) y almacenar en botellas.

### ***Solución de prelavado (SSPE 0,1X, SDS al 1,0%), 1000 ml***

5 ml de SSPE 20X

100 ml de SDS al 10%

Llevar el volumen a 1000 mL (agua)

### ***Solución de Pre-hibridación (2X), 200 ml***

100 ml de SSPE 20X

40 ml de SDS al 10%

40 ml de Leche al 5%

20 mL de 100X de Denhardt

Almacenar a 4°C

### ***Solución de lavado (2X SSPE)***

1000 ml

100 ml de SSPE 20X

Llevar hasta 1000 mL con agua MilliQ

**Anexo 2: Listado de polimorfismos de nucleótido simple (PNSs) seleccionados**

Nombre del PNS	Secuencia nucleotídica	Numero de Scaffold	Numero de Acceso
BovineHD0500004820	TCACAAAGGAAGACAGTAA	235	NW_005882937.1
BovineHD0700019108	TGTTAATATCCTATAGAAA	33	NW_005882735.1
BovineHD0800012560	TTGAAGAATTTTAGAAAGTA	8	NW_005882710.1
BovineHD2000007676	GATTGTTTCCAGTTTTTCAT	15	NW_005882717.1
BovineHD2000012425	AGTGTGAGAAAAGCATGAAGCGA	23	NW_005882725.1

**Anexo 3: Listado de genes seleccionados según base bibliográfica**

Genes	Función	Fuente bibliográfica
<i>ALX3</i>	Color de fibra o pelo en mamíferos	Cuthill <i>et al.</i> , 2017
<i>CHD7</i>	Atresia coanal	Reed <i>et al.</i> , 2013
<i>COL1A1</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>DAB2IP</i> , <i>KRT15</i> , <i>KRTAP13-1</i> , <i>TNFSF12</i>	Síntesis de fibra	Fernández, 2015
<i>NCOA6</i>	Color de fibra agutí en camélidos	Chandramohan <i>et al.</i> , 2013
<i>SOX9</i> , <i>ZIC1</i> , <i>ZIC5</i>	Color de pelo en mamíferos	Simões-Costa y Bronner, 2013

## Anexo 4: Detalle bioinformático de genes mapeados

### 1. Gen: *ALX3*

Descripción: *ALX* homeobox 3

Nombre/Gen ID: *ALX3*

Numero de exones: 4

Locación: NW\_005882706.1

RNAm: XM\_015243118.1

CDS: XP\_015098604.1

Scaffold: 4

Sec. Fasta utilizada: >*ALX3*

```
GCGGAACCCCTTCACGTCTGCCTATGACATCTCTGTGCTGCCTCGAACCGACAG
CCATCCCCAGCTGCAGAACTCCCTGTGGCCCAGTCCAGGGTCTGGGAGCCCTG
GGGGCCCCTGCCTCGTGTCTCCAGAGGGCATCCCCCTCCCCATGTATGTCTCCGT
ACTCCCACTCTCATGGGAATGTGGCTGGCTTCATGGGGGTGCCAGCCTCTCCTG
GAGCCCACCCTGGTATCTACTCCATCCACAGCTTTTCCCCCGCTCTAGGGGGCC
ACAGCTTTGAGCCCTCCCCAGATGACGACTATAAGTCTCCAAGCCTCATCTCAC
TCAGGGTGAAGCCCAAGGAGCCGCCAGCCTGCTGAACTGGACCACGTGATCT
GTTGCGTGGACACGCAGACTGAGCTGCCCAACCCCATTTCTGTTCCCAGCTGCT
CCCACCCACCCCGGCCTGGATGCCAGAGAGGACACACCTCTGCCTCCAAGCC
CCAGATGGTTCCTGGAGGCCCGGCAGAGCAGCTGGGACCCTCAGGCTTCCGC
AGGGAAAAGCTACAGAGTCTTTTCTCTTAGAATAAGGTGGGGCTGTCCAGGAA
AGAGCAGGCTTCAAACGGGTAGGATTCTTCCTACCATACAGTGGGTCCCCTCA
CCCAA ACTCTGGGCTGGAGGAGGAAGATACTGCCCTGCTTCCTTCAGACTTCG
CCTGTCATCCCTCCAGCTGAAACAGCTTAACTGACTCCTCATTTCAGGGAATGCA
GGA
```

### 2. Gen: *CHD7*

Descripción: Chromodomain helicase DNA binding protein 7

Nombre/Gen ID: *CHD7*

Numero de exones: 40

Locación: NW\_005882747.1

RNAm: XM\_015239552.1

CDS: XP\_015095038.1

Scaffold: 45

Sec. Fasta utilizada: >CHD7

```
AGTGCAGTGAAGGAGGACGAGCTGATGGAGTTTTTCGGACCTGGAGAGCGATTC
CGAAGAGAAGCCGTGCGCGAAGCCGCGGCGGCCCCAGGACAGGTCCCAGGGC
TACGCCAGGAGCGAGTGCTTCCGAGTCGAGAAGAACCTGCTTGTCTACGGCTG
GGGACGGTGGACGGACATCCTTTCCCACGGGCGCTACAAACGTCCGCTCACTG
AGCAAGACGTGGAACCATCTGCAGAACCATCCTTGTGTACTGCCTCAACCAC
TACAAGGGCGACGAGAACATCAAAAGCTTCATCTGGGATCTGATCACGCCAC
AGCTGACGGCCAGACGCGGGCCTTGGTCAACCATTCCGGTTTGTGAGCCCCGG
TGCCCAGGGGGCGGAAGGGTAAGAAGGTGAGAGCCCAGAGCACGCATCCCGT
GGTGCAGGACGCAGACTGGCTGGCTGGCTGCAACCCCGACGCCCTGTTCCAGG
AGGACAGCTACAAGAAGCACCTGAAACACCACTGCAACAAGGTCCTGCTGCG
TGTCCGCATGCTGTACTACCTAAGACAAGAAGTGATCGGAGACCAGGCCGAGA
AGATCCTGGAGGGTGCCGACTCAAGCGAAGCTGATGTGTGGATCCCGGAGCCT
TTCCACGCGGAGGTGCCCGCAGATTGGTGGGATAAGGAAGCAGATAAGTCCCT
CCTGATTGGAGTGTTCAAACACGGGTATGAGAAGTACAATTCCATGCGAGCTG
ACCCCGCGCTGTGCTTCCTGGAACGAGTTGGGATGCCTGATGCCAAGGCCATC
GCTGCCGAGCAGAGGGGAACAGACATGCTAGCAGATGGCGGTGACGGGGGAG
AATTTGATAGAGAAGATGAAGACCCAGAATATAAACCAACCAGAACGCCATT
CAAGGATGAAATAGATGAATTTGCAAATTCTCCTCCAGAAGATAAGGAAGAAC
CCCTGGAAGTACGTGCCCCAGGCAAGCACAGCGACAGCGGTGCTGATTTAGGC
CAGCTGTACTGGCCCAACACCTCAACGCTGACCACCCGTCTGCGCAGGCTCAT
AACTGCCTATCAGCGCAGCTATAAAAGGCAGCAGATGAGGCAGGAGGCCTTG
ATGAAGACTGACCGGCGGAGGCGGCGGCCTCGGGAGGAAGTGCGGGCCCTGG
AAGCCGAGAGGGAAGCTATCATATCCGAGAAACGGCAGAAGTGGACCAGAAG
GGAAGAGGCGGACTTCTACCGCGTGGTGTCCACTTTTGGGGTCATTTTGGACCC
CGTGAAACAGCAGTTCGACTGGAACCAGTTTCGAGCCTTCGCCAGACTGGACA
AAAAGTCCGACGAGAGTTTGGAGAAATACTTCAGCTGCTTCGTAGCCATGTGT
```

CGGCGGGTGTGTTCGGATGCCACGAAGCCGGATGACGAGCCGCCCGACCTCTC  
CTCGGCGATCGAGCCATCACCGAGGAGCGCGCCTCCAGGACCCTGTACCGCA  
TCGAGCTGCTGCGGAAGATCCGCGAGCAGGTCCTGCACCACCCGCAGCTGGGC  
GAGCGGCTGAAGCTCTGCCAGCCCAGCCTGGACTTGCCCCGAGTGGTGGGAGTG  
CGGGCGGCACGACCGGGACCTGCTGGTCGGAGCTGCCAAGCACGGCGTCAGC  
CGGACGGACTACCACATCCTCAACGACCCGGAGCTGTCCTTCCTGGACGCGCA  
CAAGAACTTCGCCAGAACCGAGGGGCGGAGGCCGAGCGCGGCGAGAAGGAC  
GGGAGGCAGGACCGCGAGGCCGAGGCCGGCTCGGCGAAAAACGAGCCAAA  
GGGGTGGAGGTCGCCGCGGACACGGGGCCCAAGTCTATTTTCAGAGAAAGGTTT  
TGAAGAGGACGACGAGGAAAAGCTGGAGGATGACGACAAGTCGGAGGAATCC  
TCCCAGCCTGAAGCAGGAGCTGTCTCGAGGGGGAAGAATTTTGATGAAGAAA  
GCAATGCTTCCATGAGCACTGCCAGGGACGAAACCCGAGATGGCTTCTACATG  
GAGGACGGGGACCCGTCGGTCGCTCAGCTCCTGCACGAAAGAACGTTTGCCTT  
CTCATTTTGGCCGAAGGACCGAGTAATGATAAACCGATTAGACAACATCTGTG  
AAGCAGTGTTGAAAGGCAAATGGCCGGTAAATAGGCGCCAGATGTTTGATTTC  
CAGGGCCTCATCCCTGGTTACACGCCCCCGCCGCGACAGTCCCCTACAGAA  
GCGGAGCCTGGCAGAGCTCTCTGTGGTCGGCCAGGCCAGCATCAGCGGCAGTG  
AGGACCTCACCACTTCCCCTCAGTTGTCCAAGGATGATGCCCTCAACCTCTCCG  
TCCCTCGCCAGCGGAGGAGGAGGAGGAGAAAAATCGAAATCGAGGCCGAAAG  
AGCTGCCAAGCGGCGAAACCTCATGGAGATGGTTGCCAGCTGCGCGAGTCTC  
AGGTGGTCTCGGAGAACGGACAAGAGAAAGTCGTGGATTTATCAAAGGCCTC  
GAGAGAGGCGACAAGCTCTACCTCAAATTTTTTCATCTCTTACTTCAAAGTTTAT  
CTTGCCTAACGTCTCGACACCGGTGTCTGATGCCTTTAAGACTCAAATGGAGCT  
GCTCCAGGCAGGTCTGTCCCGCACACCCACGAGGCATCTGCTCAACGGCTCCC  
TCGTGGACGGAGAGCCTCCCATGAAGAGGAGGCCGGGGACGGAGGAAAAACGT  
GGAGGGCCTCGATCTGCTGTTTCATGAGCCACAAACGGACGTCATTGAGTGCAG

### **3. Gen: *COL1A1***

Descripción: Collagen type I alpha 1 chain

Nombre/Gen ID: *COL1A1*

Numero de exones: 51

Locación: NW\_005883079.1

RNAm: XM\_006218653.2

CDS: XP\_006218715.1

Scaffold: 377

Sec. Fasta utilizada: >>COL1A1

```
GGTGAAACTGGTCCTAGCGGCCCTGCTGGTCCCCTGGAGCTCGTGGTGCCCC
CGGAGACCGTGGTGAGCCTGGTCCCCCGGCCCTGCTGGCTTCGCTGGCCCCC
CTGGTGCTGACGGCCAACCTGGTGCTAAAGGCGAACCTGGTGATGCTGGTGCT
AAAGGTGACGCTGGTCCCCCTGGCCCTGCTGGACCCACTGGACCCCCTGGCCC
CATTGGTAGTGTGGTGCTCCCGGACCCAAAGGCGCTCGTGGCAGCGCTGGTC
CCCCTGGTGCTACTGGTTTCCCTGGTGCTGCTGGCCGAGTCGGTCCCCCGGCC
CCTCTGGAAATGCTGGACCCCCTGGCCCTCCCGGCCCTGTTGGCAAAGAAGGC
AGCAAAGGTCCTCGTGGTGAGACTGGCCCCGCTGGGCGTCCCGGTGAGGTCGG
TCCTCCTGGTCCCCCTGGCCCCGCTGGCGAGAAAGGAGCCCCTGGTGCTGATG
GACCTGCTGGCGCTCCTGGCACTCCTGGCCCTCAGGGCATTGCTGGACAACGT
GGTGTGGTTCGGCCTGCCCGGTCAGCGAGGAGAAAGAGGCTTCCCTGGTCTTCC
CGGCCCTCT
```

#### 4. Gen: *CTNNB1*

Descripción: Catenin beta 1

Nombre/Gen ID: *CTNNB1*

Numero de exones: 14

Locación: NW\_005882725.1

RNAm: XM\_015236324.1

CDS: XP\_015091810.1

Scaffold: 23

Sec. Fasta utilizada: >CTNNB1A

```
GATCCCAGCTATCGTTCCTTTTCACTCCGGTGGATACGGACAGGATGCCTTGGGT
ATGGACCCCATGATGGAGCACGAGATGGGAGGCCACCACCCTGGTGCTGACTA
TCCAGTTGATGGGCTGCCGGATCTGGGGCATGCCAGGACCTCATGGACGGGC
```



TGCCTCCGGGTGACAGCAATCAGCTGGCCTGGTTTGATACTGACCTGTAACCTCA  
TCCTTTAGGTAAGAAGTTTAAAAAGCCAGTTTGGGTAAAATACTTTTACTCTGC  
CTACAGAACTTCAGAAAGACTTGGGTTGGTAGGGTGGGAGTGCTTTAGGCCTA  
CTTGTAATCTGCCACAAAACAGATACATACTTTGAAAGGAGATGTCTTAGA  
ACATTTGAATGTTCTCGGATTTCTGGTTGTTACGTGGTCATGTGTGGAAGTTAT  
TAACTTTAATGTTTTTTTGGCCACAGCTTTTGCAACTTAATACTCAAATGAGTAAC  
ATTTGCTGTTTTAAACATTAATAGCAGCCTTTCTCTCTTTATACAGCTGTATTGT  
CTGAACTTGCATTGTGATTGGCCTGTAGAGTTGCTGAGAGGGCTCGAGGGGTG  
GGCTGGTATCTCAGAAAGTGCCTGACACACTAACCAAGCTGAGTTTCCTATGG  
GAACAATTGAAGTAAACTTTTTGTTCTGGTCCTTTTTGGTCGAGGAGTAACAAT  
ACAAATGGATTTTGGGAGTGACTCAAGAAGTGAAGAATGCACAAGAATGGAT  
CACAGGATGGAATTTATCAAACCTTAGCCTTGCTTGTTAAAATTTTTTTTTTAAT  
ATCTGTAATGGTACTGACTTTGCTTGCTTTAAAGTAGCTCTTTCATTTTTTTTTT  
TTTGCAGTAACTGTTAGTTTTTTAAGTCTCTTGTAGTGTTAAGTTATAGTGAATA  
CTGCTACAGCAATTTCTAATTTTTAAGAATTGAGTAATGGTGTAGAACACTAAT  
TCATAATCACTCTAATTGTAATCTGAATAAAGTGTAACATTGTGTAGCCTTTTT  
GTATAAAATAGACAAATAGAAATGGTCCAATTAGTTTCCTTTTTAATATGCTTA  
AAATAAGCAGGTGGATCTATTTTCATGTTTTTGATCAAAAACCTCTATTTGGGATA  
TGTATGGGTAGGGTAAATCAGTATAAGAGGTGTTATTTGGAACCTTGTTTTGGA  
CAGTTTACCAGTTGCCTTTTATCCCAAAGTTGTTGTAACCTGCTGTGATACAAT  
GCTTCAAGAGAAAATGCGGTTATAAAAATGGTTCAGAATTAACCTTTTAATTC  
ATTC

## 5. Gen: *DAB2IP*

Descripción: Disabled homolog 2-interacting protein

Nombre/Gen ID: LOC102538349

Numero de exones: 15

Locación: NW\_005882754.1

RNAm: XM\_015240239.1

CDS: XP\_015095725.1

Scaffold: 52

Sec. Fasta utilizada: >DAB2IP

```
CCACCAACCCACCAAATTGCAGATTACTGAGAACGGCGAGTTCAGAAACAGC
AGCAATTCAAGTGTCCCAGGCACGGTGGCCCTGCAGGGAGTGGCCAGCTGGTG
CTCCCCCGAGAGAGAGGCTGAGCTTTTCTGA
```

## 6. Gen: *KRT15*

Descripción: keratin 15

Nombre/Gen ID: *KRT15*

Numero de exones: 8

Locación: NW\_005883152.1

RNAm: XM\_006219253.2

CDS: XP\_006219315.1

Scaffold: 450

Sec. Fasta utilizada: >KRT15

```
GATGGCTGGTATTGGCACCAGAGAAGCCTCCCTGGGTGGTGGCAGCGGCGGCA
AAGTCCGCATCAATGTTGAAGAGTCAGTGGATGGAAAGGTGGTTTCTTCTCGA
AAGAGAGAAATCTAAATACCCAGTGCGAGAGAGACGCCCCCGCCACCCCAAC
CCTCCCCACGCTGAGTGGACAGCTGGCCAGAGGGGCCAGAAGGGCAAACCTCT
AGACCCAGAGGGGTCCAGCTCCAGGGGTCCCTTGTCTCCTAGTTGGCTGCTTG
GCATGCTCTCCCTGCGCCCCTCCCCAGCCTTCCCACCTCCTTTAGAGCAGGAAG
GTGCAGGAAACCACAGTATTGTGTAACAAGGTCGTTTGTACCATGTCTAGCCA
TGCAATAAAGAATTGCTTTTCCTTTTGCAAATA
```

## 7. Gen: *KRTAP 13-1*

Descripción: Keratin Associated Protein 13-1 Like

Nombre/Gen ID: LOC 102533350

Numero de exones: 1

Locación: NW\_005882803.1

RNAm: XM\_015244064.1

CDS: XP\_015099550.1

Scaffold: 101

Sec. Fasta utilizada: >KRTAP13-1  
CTGGGTCTCTGGGCTCTGGGTCCGGCAAAGGCTACTTCCTGGTCTATGGATCCA  
GAAGCTGTGGGTCCAGTGGATCTCTGGGTTCTGGATTCTTTGGCTTCCCCTCCC  
TGAGCTGTGGATCCTGCCATCCAATTTATGTGGTTTCTTGA

## 8. Gen: *NCOA6*

Descripción: Nuclear receptor coactivator 6

Nombre/Gen ID: *NCOA6*

Numero de exones: 13

Locación: NW\_005882736.1

RNAm: XM\_015237872.1

CDS: XP\_015093358.1

Scaffold: 34

Sec. Fasta utilizada: >NCOA6

CAACTTTGAAGGCCATTGGGCAAGCGCCTTCAAATCTTACCATGAATAATCCTT  
CCAATTTTGCTGCCCCACAACTCACAAATTAGATTCTGTGGTGGTGAATTCTG  
GAAAGCAGTCTAATTCTGGAGCAACAAAACGGGCAAGTCCAAGCAACAGTCG  
CAGGTCTAGTCCTGGGTCAAGTAGGAAAACCACCCCAAGTCCTGGGAGACAAA  
ATTCAAAGCCCCTAACTTACTCTGGCCTCTCAAACAAACGCAGCCCTGTTG  
CAAAATGTGGAGTTGCCAAGAAATGTACTGGTCAATCCCCTCCTTTGGCCAA  
TCCCCCTGTACCTGGGAACTTCCCTAACAACAGTGGGCTGAATCCTCAGAATTC  
TACCATGCCTGTGGCTGCAGTGGGAGGTGTTCTCGAGGATAACAAGGAGAGCT  
TGAACGTGCCTCAGGACAGCGATTGCCAGAATTCCCAGGGTAGGAAGGAGCA  
GGTAAATGTTGAGCTAAAAGCGGTCCCTGCCCAAGAAGTTAAAATAGTTGTCC  
CTGAAGATCAATCCAAAAACGATGGGCAACCTTCGGATCCTAACAAGCTTCCC  
AGTGTCGAAGAGAACAAAACTTGGTGTCTCCTGCTATGAGGGAAGCACCAAC  
ATCGTTAAGTCAACTTCTTGACAACTCTGGAGCTCCTAATGTGACCATTAAACC

CCCTGGGCTTACAGATCTGGAAGTGACACCTCCAGTAGTTTCTGGAGAGGACC  
TGAAAAAAGCATCTGTCATTCCCACACTGCAGGATCCGTCTTCTTCTAAAGAAC  
CCTCTAATTCCCTAAATTTACCTCACAGTAACGAGCCGTGTTCAACCCTTGTGC  
ATCCAGAAATGAGTGAGGTCAGTTCAGTGTTGCACCAAGCATCCCTCAAGTA  
ATGTCAAGACCTGTCAGCTCTTCCTCCATTTCCACCCCTTTGCCCCAAATCAG  
ATAACTGTTTTTGTAACTTCCAACCCCATCACA ACTTCAGCTAACACATCAGCA  
GCTCTGCCAACTCACTTGCAGTCTGCGTTAATGTCAACAGTCGTCACAATGCCC  
AATGTGGGTAGCAAGGTTATGGTTTCTGAGGGACAGTCAGCTGCTCAGTCAAA  
TGCCCGGCCTCAGTTCATTACACCTGTCTTTATCAATTCATCCTCAATAATTCA  
GGTTATGAAAGGATCACAGCCAAGCACAATTCCTGCAGCCCCACTGACAACCA  
ACTCTGGCTTGATGCCTCCCTCTGTTGCAGTTGTTGGCCCTTTACACATACCTCA  
GAGTATAAAATTTTCTTCTGCTCCTGTACTGCCTAACGCCCCCTCTAGCAGTCC  
CGCTCCAAACATACAGACAGGTCGACCTTTGGTCCTTAACTCACGAGCCACCC  
CTGTT CAGCTTCCTTCCCCTCCTTGTACA ACTTCTCCAGTTGTCCCTCCTCATCC  
CCCTGTCCAGCAAGTGAAAGAATTGAATTCAGATGAGACTAGTCCTCAGGTGA  
GCACCTCAGCAGATCAGAGCACTCTGCCCTCTTACAGTCAACCACGGTGGTT  
TCTCCCCTTTTGACCAATAGTCCAGGCTCTTCTATCAACCGGCGAAGCCCAGTC  
TCATCTAGTAAGGGCAAAGGAAAAGTGGACAAAATCGGCCAGATTTTGCTGAC  
CAAGGCATGTAAGAAAGTTACAGGCGCCCTTGAGAAAGGGGAAGAGCAATAT  
GGTGCAGATGGAGAGACTGAAGGCCAGGGCTAGAGACCGCAGCTCCAGGGC  
TTGTGGGAACAGAGCAGTTATCCACAGAGCTGGACAGTAAAACCCCAACACCC  
CCAGCACCCACTCTGCTAAAAATGACCTCTAGCCCTGTGGGCCAGGCTCCGC  
TTCAGCAGGACCCAGCTTACCTGGCAGTACTCTCCCCACCAATGTACGCTCGGT  
AGTAACCACTCTGGTACCCTCTGAGCTCATCTCCACGGCGCCGACCACAAAAA  
ACAATCATGTTGGCATAGCATCTGAGCCACTTGCGGGTGGCCTAGTGGAGGAG  
AAGGTGGGATCTCATCCAGAGCTTCTACCCAGCATAGCCCCTTACAGAGTTT  
AGTCCCAAAGGAAGCTCCAACCACAGCACTGCAGGGATCTGTTGCCAGACCAG  
AACTCGAGGCAAATGCTGCCATAGTCTCTGGACAAAGTGAGCCCAAAGAGGTA  
ATTGAAAAGTCCAAA ACTCCAAGCCGAAGAACTCCCGAACTGAAGAGCCAA  
CTGTGGCTTCTGAAAATGTGGAAAATGGGCATCGTAAGCGATCCTCTCGGCCT  
GCTTCAGCCTCCAGCTCTACTAAAGACATAACCAGTGTGGTGCAATCCAAGCG  
AAGAAAATCCAAGTAAACAAGCTGGACGGCGACTTGATATTTGTAAATGTGTG  
TGAATTTTACAAAAGCAATTTT GAGCTGTGACTTTTTTAAAATTCATTTCTGTA  
CAGTTAGTCATTTTAAATAATGTGGTCCTTTTCTAGTCCCTGCAACCTGTTTTA

TAAAGTGCAATGGGGAAAGCAGAGTTGTTGAACCCTTTTGGTGTGCAAGATG  
AAGATCAAGGTTTCTAAAATGTTGCCATGTATTGAGAGGAGCTAATGCGATTA  
TGTTATTAGTTTTTCACATTTCTAAGCAGCCTAGAGTACAGGGTGAGCATTTTT  
AGATCTTCTAATAATGTACTGTGCTGTGGAAGTACTGTGTGTGAATAGCAGTA  
GTGGGGCAAAGGAATCTTCTCATTGGAATGTTGTAAATAATTTTATTATAT  
AGTGTTTTGGATGTATTTGTTGTAGAAATGGACCAGTGAATAAAGAGAATCTA  
AGGATTTGTACAATGTGAAATACTGAATGTGTTAAATAAATGTCATTGTCCTAG  
AACATAAATGTATGTTATTGGTAAAGGATTATTGGGAAAGCAAGCTCTTTCTCT  
GGACCATAAATGAACAGAAACAGCCTTCTTTGTGAATTAGAATCCCATCTTGT  
CCTTACTGCACCTGAGATGACTACCTGGCAAGTTGAGGAAAATGCACATACTT  
GTTCACTCAACTCATTCTGGGCTTGGAAGACACTAGCCCTTTTCAGCACTGTAC  
CAGCACTTTGATATACATTGGTCAAATTTCTTTTGGTTGCAAATAACAGAATTA  
ACTTAGGATCAAAGGCCACCCAAGATTTTCTAAAGACAGGAAGCCATCAGCAA  
CCCAGATGGCACTTTTTCTCTACTTCATTTCGTCGCTTCTCCATACATATGATGGA  
TTGCTCCATAACAGCTGTGTTTACAACCTCCAGCCAAGAGATAAGCCCATAC  
TGACCAGCAAGATTCTCTGTAACAGCATCAAGAATCTAGCCCAGTTTAGGTCA  
TGTCTCCACCTTCAGTCCATTTCCATGGTTAGATGGAGTAGTTCCCAAATAA

## 9. Gen: *SOX9*

Descripción: SRY-box 9

Nombre/Gen ID: *SOX9*

Numero de exones: 5

Locación: NW\_005882717.1

RNAm: XM\_015235077.1

CDS: XP\_015090563.1

Scaffold: 15

Sec. Fasta utilizada: >*SOX9*

ATCGCCTACACGCCCTTCCACGCCCTCCCGCCACCTACCACGCCCTCCCTAC  
CCGCCCATCACCCGCTCGCAGTACGACTACACAGACCACCAGAACTCCGGCTC  
CTACTACAGCCACGCGGGCCAGGGCTCCGGCCTTACTCCACCTTCACCT

ACATGAACCCGGCGCAGCGGCCCATGTACACGCCCATCGCCGACACCTCCGGG  
GTCCCTTCCATCCCGCAAACCCACAGCCCCCAGCACTGGGAACAGCCCGTCTA  
TACGCAGCTCACCAGACCTTGAGGAGACCGTAGAGGGTGATAATGGCCGTGAT  
GATCATAAAAATTAACCGAAGAAACACGTAACCAACCAGAATTTCTTTGAAC  
ATTTTTTTTCTTATTTTTTGAAAGACATTGACTCTAAAGGCAACTCGAACCCAA  
ATTCCAAGACAGAAACATTGGCTATTCAAACGCATTACCACCTTGTTGGGAAT  
CAGTGGCCAGGCCACTTTTGGCTAGACGGACCAGCGCAATCGACAGGAACTG  
GACTTGAAACCTTCAGAGCAAGTGTGGAGGATGATGGAGTTTCGTTGTGACCA  
ATTTGCTCACTCTCTGCCTGTTTGGACTTTGTAATTATTTTTTAGCCGTAATTAA  
AGAAAAAGTCCTCTGTGAGGAATATTCTCTATTTTAAATATTTTTAGTATGTA  
CTGTGTATGATTCATTACCATTTTTGAGGGGATTTATACATATTTTTAGATAAAA  
AAAATTAAATGCTCTTATTTTTCCAACAGCTAAACTACTTAGTTGAACAGTGTG  
CCCTAGCTTTTCTTGCAACCAGAGTATTTTTGTACAGATTTGCTTTCTCTTACAA  
ACAAACAAACAAACAAAAAAGTGTGTGTGTTGTATTAACCTAAAAACCCCA  
CAAATTTGTGTTATGGGATCAGTTTGGGGGGTTAGCTTTGCTTAATTCCTCAGG  
CTTTGTGATTCAAGGAGGAGTTGCCTTAGAAAGAAAAATAAAGGCCTTATTTT  
GTGAATATGGAAGTAAACAATAGTCTAGAGATGCACTTGGTAAGCTTTATCAT  
ATATATTTTTTTTCAACAAGAGAAAAACACCTTGAGCCTTAAAACCATGCTGCT  
GAAAAATGCTTTCGCCACTTTTAGTGCATTTCCCTCCAGTGTTTGTGTTTACC  
GCAATCTTATAAAAAGGAGCAAAAGGCAAGCAAAGGAGAAGAAATCTGTTTG  
GGGGGTGCTCCAGCAGCCGGTATGTGCGTGCCCCAGCACACTGCCCCCTGGTT  
GCCTGCCCCGGCCCCATGTGGAACACAGATGCTAGAGTCCCTCACTTAACTGT  
CACCTGTGCCTCTCTGAACACCAGCAGTTAATCTTCAAGACATTCCACGTGCTA  
AAATTATTTATTTTGTAAAGGAGAGGTTTAAATTA AAAACAAAAACAACTTCCT  
CTTTTTATTTTTTAAATTTGCCTTCTTTAAAATAGGTTGTCAGAGCCGTCCTCAA  
AGGGTAGGGTCATCTGTTGTTAAATTATGTTCTTAACTGTAACCAG

**10. Gen: *TNFSF12***

Descripción: TNF superfamily member 12

Nombre/Gen ID: *TNFSF12*

Numero de exones: 6

Locación: NW\_005883089.1

RNAm: XM\_006218825.2

CDS: XP\_006218887.1

Scaffold: 387

Sec. Fasta utilizada: >TNFSF12A

```
AGGACCTGAATCCCCAGACAGAGGAAAGCCAGGACACCGTGTCTTTCCTGAAA
CTGGTTCGGCCTCGCAGAAGTGCACCTAAAGGCCGGAAACCACGGGCTCGCAG
AGCGATT
```

## 11. Gen: *ZIC1*

Descripción: zinc finger protein ZIC 1

Nombre/Gen ID: LOC102530519

Numero de exones: 3

Locación: NW\_005882737.1

RNAm: XM\_006202783.2

CDS: XP\_006202845.2

Scaffold: 35

Sec. Fasta utilizada: >ZIC1

```
CGCGACGTGGGCCTGGGCATCAATCCGTTCCGCCGACGGCATGGGCGCCTTCAA
GCTCAACCCAGCTCGCACGAGCTGGCCTCCGCGGGCCAGACGGCCTTCACAT
CGCAGGCTCCGGGCTACGCGGCTGCGGCGGCCCTGGGACATCACCACCACCCG
GGCCACGTAGGCTCCTATTCCAGCGCAGCCTTCAACTCCACGCGGGACTTTCTG
TTCCGCAACCGGGGCTTTGGCGACGCGGCGGCTGCAGCCAGCGCGCAACACAG
TCTGTTCGCGGCTTCGGCCGGGGGCTTCGGGGGCCACACGGCCACACGGACG
CCGCGGGCCACCTCCTTTTCCCCGGCCTTCACGAGCAGGCGGCGGGCCATGCG
TCGCCCAACGTGGTCAACGGGCAGATGAGGCTTGGCTTCTCCGGGGACATGTA
CCCGCGGCCTGAGCAGTACGGCCAGGTGACCAGTCCGCGTTCAGAGCACTATG
CCGCGCCGCAGCTGCACGGCTACGGGCCATGAACGTGAACATGGCCGCGCAT
CACGGCGCCGGCGCTTTCTTCCGCTACATGCGCCAGCCATCAAACAGGAGCT
CATCTGCAAGTGGATCGAGCCCAGCAGCTGGCCAACCCCAAAAAGTCGTGCA
```

ACAAAACCTTTCAGCACCATGCACGAGCTGGTCACGCACGTCACCGTGGAGCAC  
GTCGGCGGGCCAGAGCAGAGCAACCACATCTGCTTCTG

## 12. Gen: *ZIC5*

Descripción: Zic family member 5

Nombre/Gen ID: *ZIC5*

Numero de exones: 5

Locación: NW\_005882786.1

RNAm: XM\_006208373.2

CDS: XP\_006208435.1

Scaffold: 84

Sec. Fasta utilizada: >*ZIC5*

```
ATGGAGGGCACTGGGGAGCCGCAGTCCCCTCTCTTGGCGCAGTGGGAAGCCGT  
AAGCGCCAGCCAGGGCATCCCTGGAGACCGGGCTCTGTGCGCTAGTCTAGGCA  
GCGGAGTGCCGCGAGGCCGCCCGCCTTTTGCCCCCGGGGGTCCCCAGCCCA  
GAGCTGCCCGGCGCCCTTCGGCCGCGTGCCGGCGCACGCTCTCCGCCAGGCGT  
GTCATGGGAACGCGGGGCGCTGCGCGCGCAGGCCCAACGCAAACCTTTCTGCAA  
GTGCAAACCTGGGCATCCCCCGGGGAGGCGGGGACGCAAGGCTCCACGGGAGG  
AGGGGGCACGAAGCGAAAGCGAAGGCGTCATTCTGATGGAGCCCCCTTTGAG  
CAAGAGGAACCCGCCAGCGCTGAGATTAGCGGATTTGGCAACGGCTCAGACC  
AGGCCGTTTCAGAATATGACAGGCTTCCCGGCGCTGGCCAGCCCGCCCGCCA  
CTCCCAACACCGCGCCACAGCAGC
```

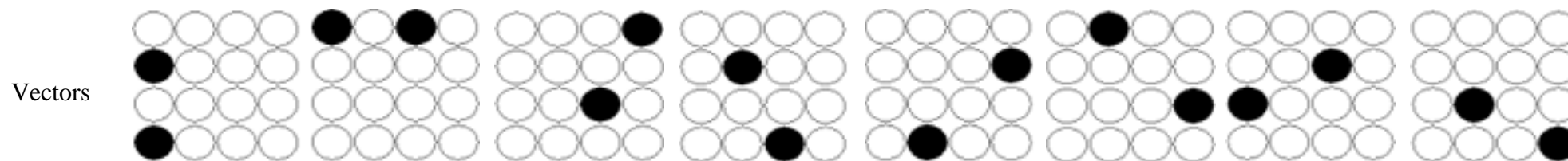


### Anexo 5: Secuencias de los cebadores PCR y overgo para cada gen mapeado

GEN	Cebador PCR (5'-3')	Tm	Annealing T°	GC%	Producto esperado de PCR (bp)	sondas overgo (5'-3')
<i>ALX3</i>	F: GTATGTCTCCGTACTCCCACTCTC	60.43	65	54.17	161	F: GCTCTAGGGGGCCACAGCTTTGAG R: CGTCATCTGGGGAGGGCTCAAAGC
	R: TGGAGACTTATAGTCGTCATCTGG	59.67		45.83		
<i>CHD7</i>	F: AGAAAGTCGTGGATTTATCAAAGG	59.91	65	37.5	128	F: TATCAAAGGCCTCGAGAGAGGCGA R: TTTGAGGTAGAGCTTGTGCGCTCT
	R: TTGAGTCTTAAAGGCATCAGACAC	59.83		41.67		
<i>COL1A1</i>	F: CCATTGGTAGTGTGGTGCT	58.09	65	50	365	F: GCCCTGTTGGCAAAGAAGGCAGCA R: TCACCACGAGGACCTTTGTGCTCT
	R: AGGGAAGCCTCTTTCTCCTC	58.42		55		
<i>CTNNB1</i>	F: ATCCCAGCTATCGTTCTTTTCA	60.1	65	40.91	300	F: CACTCCGGTGGATACGGACAGGAT R: GGTCCATACCCAAGGCATCCTGTC
	R: CCTACCAACCAAGTCTTTCTG	60.03		50		
<i>DAB2IP</i>	F: TACTGAGAACGGCGAGTTCA	59.59	65	50	107	F: GAACGGCGAGTTTCAGAAACAGCAGCAA R: CGTGCCTGGGACACTTGAATTGCTGCT
	R: AAAGCTCAGCCTCTCTCTCG	59.07		55		
<i>KRT15</i>	F: GGCAAAGTCCGCATCAATGTT	60.07	59	47.62	218	F: TGGCCAGAGGGGCCAGAAGGGCAAA R: CCCCTCTGGGTCTAGAGTTTGCCT
	R: ATGCCAAGCAGCCAAGTAGG	60.68		55		
<i>KRTAP13-1</i>	F: GCAAAGGCTACTTCCTGGTCTA	46	59	59.76	109	F: TCCAGAAGCTGTGGGTCCAGTGG R: TCCAGAACCCAGAGATCCACTGGA
	R: ATTGGATGGCAGGATCCACAG	113		60.13		
<i>NCOA6</i>	F: CCCAAGATTTTCTAAAGACAGGAA	60	59	37.5	151	F: CAGCTGTGTTTACAACCTCCTCCAGCCAAG R: CTGGTCAGTATGGGCTTATCTCTTGGCTG
	R: CTGGTCAGTATGGGCTTATCTCTT	60.04		45.83		
<i>SOX9</i>	F: AAATGCTCTTATTTTCCAACAGC	60.3	59	33.33	220	F: GTGTTATGGGATCAGTTTGGGGGGTTA R: CTGAGGAATTAAGCAAAGCTAACCCCC
	R: AATCACAAAGCCTGAGGAATTAAG	60.3		37.5		
<i>TNFSF12</i>	F: GACCTGAATCCCCAGACAGA	60.05	62	55	94	F: AGCCAGGACACCGTGTCTTTCTCTG R: GAGGCCGAACCAGTTTCAGGAAAG
	R: GTGGTTTCCGGCCTTTAGGT	62.44		55		
<i>ZIC1</i>	F: AGTCCGCGTTCAGAGCACTAT	61.35	58	52.38	192	F: GCGCCGGCGCTTTCTTCCGCTACATG R: CTGTTTGATGGGCTGGCGCATGTAGC
	R: GAAAGTTTTGTTGCACGACTTTTT	60.88		33.33		
<i>ZIC5</i>	F: GCAAACCTTCTGCAAGTGCAAC	62.21	60	45.45	199	F: AGGGGGCACGAAGCGAAAGCGAAG R: CTGTGCTCACTGACGCCTTCGCTT
	R: GGAAGCCTGTCATATTCTGAAAC	59.15		43.48		

### Anexo 6: Patrón de identificación de cromosomas artificiales de bacteria (BACs) positivos en filtros de biblioteca BAC-CHORI 246

Filter Information



Filter #	Plates	Plates	Plates	Plates	Plates	Plates	Plates	Plates
Segment 1	1	1-6	7-12	13-18	19-24	25-30	31-36	37-42
	2	49-54	55-60	61-66	67-72	73-78	79-84	85-90
	3	97-102	103-108	109-114	115-120	121-126	127-132	133-138
	4	145-150	151-156	157-162	163-168	169-174	175-180	181-186
	5	193-198	199-204	205-210	211-216	217-222	223-228	229-234
	6	241-246	247-252	253-258	259-264	265-270	271-276	277-282
	7	289-294	295-300	301-306	307-312	313-318	319-324	325-330
	8	337-342	343-348	349-354	355-360	361-366	367-372	373-378
Segment 2	9	385-390	391-396	397-402	403-408	409-414	415-420	421-426
	10	433-438	439-444	445-450	451-456	457-462	463-468	469-474
	11	481-486	487-492	493-498	499-504	505-510	511-516	517-522

**Anexo 7: Listado de cromosomas artificiales de bacteria (BACs) positivos por cada filtro de la biblioteca BAC-CHORI 246**

FILTRO 1	FILTRO 2	FILTRO 3	FILTRO 4	FILTRO 5	FILTRO 6	FILTRO 7	FILTRO 8	FILTRO 9	FILTRO 10	FILTRO 11
001N10	051H11	099H22	145B19	193D13	242E 20	290F06	379E 24	386K20	436N13	482D22
002M22	052K14	100F10	146P14	197C22	242E 22	290L17	292P04	388I09	439N18	484E 02
006O08	056E 13	101B06	149A14	198E 13	247H12	295I07	337E 02	392D05	440L16	485F07
013L16	058P04	101J10	150A21	199D11	248K06	295O17	338I06	395L16	443M08	492J3
013O23	059N23	110M05	154M08	200F03	249C14	297J24	348P04	398C07	444M03	493A04
015L19	061O21	111I01	164C02	200N10	251O09	300I19	351M21	401F14	446B20	493G22
017I20	063K17	112D24	166L17	202F10	252O18	300J07	354A15	403D04	446L08	498C03
019I04	063L14	112O08	169N06	203K14	253H16	300O21	355C05	405H04	447L17	498E 01
020M07	064J15	113J23	169O05	204B18	253I18	306O05	355D09	406I08	449M10	500M11
021P09	067N21	115A15	172F10	204N12	255K16	306P10	366H05	408A22	451M18	501N13
024C21	068B16	115I10	172H17	207I24	256P01	308H12	368J02	408J12	452K08	502E 01
027O05	068P18	115J04	173I03	207O12	257O19	309L18	368K13	413D06	452O13	503K02
029H01	071F14	116C07	178F22	208D23	257P06	311A12	368P09	413H10	453A15	505C24
029J22	071O11	118G23	178N24	209B10	262N01	311J19	370F09	414D22	453P18	505P05
030B06	072P16	120N03	179J18	209C18	263C01	313J11	370L23	415O04	455D17	508F14
032I21	074O16	121A12	181P23	209K23	263E 22	317L03	372J23	417J03	457K18	508K15
033E 10	075H17	122H18	184I15	211H22	264F19	317P05	373J15	417O03	458J17	509A24
034F13	079B03	127I17	186L14	212G01	264O11	319A01	375I01	421F12	462B19	509C05
034F15	081O17	129B09	190B12	214A24	267F18	319E 14	376L22	422P16	463I02	509I03
037C11	082E 21	129B13	190L06	215N23	268A09	319J09	378M06	426L19	465B08	510F07
037D11	086O24	131L06	191J06	216G05	271L20	320B24	380C09	429E 11	466A13	511P17
037M09	087I19	132G20		216I06	272N18	320C22	383N21	430B10	469L21	513I10
040P13	089G12	133F20		217L22	273L12	321E 05		431P13	473L7	513J13
043N09	093H23	133N09		220I05	274A22	321O18		431P24	474C18	515A01
044H08		133P13		221M24	274L17	322G09			478A05	516E 04
046J23		135I16		223O21	275I20	324N22			479H14	516P21
047O06		138J18		224A03	276E 06	325H17				517B19
048H22				224L24	277O03	326A16				517H19
				225E 10	279H10	327F14				517O09
				225P04	282F17	328K14				517O24
				227B16	285B16	328M10				518N05
				228J24	286A03	329G17				519C08
				230D03	287I14	329K02				519C23
				230H16	288K12	332B15				520E 09
				231H17		332P05				520J12

				231N03		332P11				521H20
				236I16		334G07				521I21
				238M12						524I21
				239F18						525F24
				240H01						525L18
										528G14
										528L18
										528M22

**Anexo 8: Distribución de clones de cromosomas artificiales de bacteria (BACs)  
sembrado por placa**

#1	H	G	F	E	D	C	B	A	#1
	001N10	002M22	006O08	013O23	015L19	017I20	019I04	020M07	1
	021P09	027O05	029H01	029J22	030B06	032I21	033E 10	034F13	2
	034F15	037C11	037D11	037M09	040P13	043N09	044H08	046J23	3
	047O06	048H22	051H11	052K14	056E 13	058P04	059N23	061O21	4
	063K17	063L14	064J15	067N21	068B16	068P18	071F14	071O11	5
	072P16	074O16	075H17	079B03	081O17	082E 21	086O24	087I19	6
	089G12	093H23	099H22	100F10	101B06	101J10	110M05	111I01	7
	112D24	112O08	113J23	115A15	115I10	115J04	116C07	120N03	8
	121A12	122H18	127I17	129B09	129B13	131L06	132G20	133F20	9
	133N09	133P13	135I16	138J18	145B19	146P14	149A14	150A21	10
	154M08	164C02	166L17	169N06	169O05	172F10	172H17	173I03	11
	178F22	178N24	179J18	181P23	184I15	186L14	Hembra control	Macho control	12

#2	H	G	F	E	D	C	B	A	#2
	190B12	190L06	191J06	193D13	197C22	198E 13	199D11	200F03	1
	200N10	202F10	203K14	204B18	204N12	207I24	207O12	208D23	2
	209B10	209C18	209K23	211H22	212G01	214A24	215N23	216G05	3
	216I06	217L22	220I05	221M24	223O21	224A03	224L24	225E 10	4
	225P04	227B16	228J24	230D03	230H16	231H17	231N03	236I16	5
	238M12	239F18	240H01	242E 20	242E 22	247H12	248K06	249C14	6
	251O09	252O18	253H16	253I18	255K16	256P01	257O19	257P06	7
	262N01	263C01	263E 22	264F19	264O11	267F18	268A09	271L20	8
	272N18	273L12	274A22	274L17	275I20	276E 06	277O03	279H10	9
	282F17	285B16	286A03	287I14	288K12	290F06	290L17	295I07	10
	295O17	297J24	300I19	300J07	300O21	306O05	306P10	Hembra control	11
	308H12	309L18	311J19	311A12	313J11	317L03	317P05	Macho control	12

#3	H	G	F	E	D	C	B	A	#2
	319A01	320E 14	319J09	320B24	320C22	321E 05	321O18	322G09	1
	324N22	325H17	326A16	327F14	328K14	328M10	329G17	329K02	2
	332B15	332P05	332P11	334G07	379E 24	319E 14	337E 02	338I06	3
	348P04	351M21	354A15	355D09	355C05	366H05	368J02	368K13	4
	368P09	370F09	370L23	372J23	373J15	375I01	376L22	378M06	5
	380C09	383N21	386K20	388I09	392D05	395L16	398C07	401F14	6
	403D04	405H04	406I08	408A22	408J12	413D06	413H10	414D22	7
	415O04	417J03	417O03	421F12	422P16	426L19	429E 11	430B10	8
	431P13	431P24	436N13	439N18	440L16	443M08	444M03	446B20	9
	446L08	447L17	449M10	451M18	452K08	452O13	453A15	453P18	10
	455D17	457K18	458J17	462B19	463I02	465B08	466A13	Hembra control	11
	469L21	473L7	474C18	478A05	479H14	482D22	484E 02	Macho control	12

#4	H	G	F	E	D	C	B	A	#2
	Hembra control		455D17	485F07	492J3	493A04	493G22	498C03	1
	Macho control	498E 01	500M11	501N13	502E 01	503K02	505C24	505P05	2
	508F14	508K15	509A24	509C05	509I03	510F07	511P17	513I10	3
	513J13	515A01	516E 04	516P21	517B19	517H19	517O09	517O24	4
	518N05	519C08	519C23	520E 09	520J12	521H20	521I21	524I21	5
	525F24	525L18	528G14	528L18	528M22				6
									7
									8
									9
									10
									11
									12

**Anexo 9: Listado de genes candidatos a mapear, y de los BACS candidatos para su localización.**

*ALX*: 115I10

*CHD7*: 431P24

*COL1A1*: 204B18, 198E 13, 264O11, 271L20, 295O17

*CTNNB1*: 129B09, 150A21

*DAB2IP*: 101B06

*KRT15*: 263E22, 268A09, 274A22

*KRTAP13-1*: 336H05, 368J02, 408J12, 413H10

*NCOA6*: 086O24, 059N23, 046J23, 034F15

*SOX9*: 169O05, 172F10, 186L14, 122H18, 115A15, 068P18, 058P04, 013O23, 030B06, 032I21, 202F10, 231H17, 249C14, 297J24, 306O05, 279H10

*TNFS12*: 169O05, 172F10, 133N09

*ZIC1*: 127I17, 135I16

*ZIC5*: 211H22, 224A03

**Listado de BACs seleccionados para cada gen.**

*ALX*: 115I10

*CHD7*: 431P24

*COL1A1*: 204B18

*CTNNB1*: 150A21

*DAB2IP*: 101B06

*KRT15*: 268A09

*KRTAP13-1*: 368J02

*NCOA6*: 059N23

*SOX9*: 231H17

*TNFS12*: 172F10

*ZIC1*: 135I16

*ZIC5*: 224A03

## **Anexo 10: Combinaciones de las sondas usadas con cada gen durante su localización física por FISH.**

### **1. Mapeo de gen *ALX3***

Ubicación estimada: cromosoma 13, 9 o 21

1° Hibridación:

Sonda conocida: 056L05 – USF – 21q14 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 115I10 – *ALX3* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: La sonda verde mostró una fluorescencia muy débil, la sonda roja *ALX3* es fuerte, y ambos muestran hibridación en diferentes cromosomas. *ALX3* se encuentra en un cromosoma con una morfología submetacéntrica, por lo que la próxima hibridación se centró en el cromosoma 9

2° Hibridación:

Sonda conocida: 002N23 – GG1068 – 9q14 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 115I10 – *ALX3* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *ALX3* se localiza en el cromosoma 9.

### **2. Mapeo de gen *CHD7***

Ubicación estimada: cromosoma 25, 29, 31 o 14

1° Hibridación:

Sonda conocida: 032H16 – *UBE2K* – 31q14ter – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 431P24 – *CHD7* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Las sondas hibridaron en diferentes cromosomas.

2° Hibridación:

Sonda conocida: 178K02 – *RP1* – 29q16 – Fluorescencia verde



Sonda incógnita: 431P24 – *CHD7* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *CHD7* se localiza en el cromosoma 29.

### **3. Mapeo de gen *COL1A1***

Ubicación estimada: cromosoma 16

1° Hibridación:

Sonda conocida: 18J07 – *DDX52* – 16p14prox – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 198E13 – *COL1A1* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *COL1A1* se localiza en el cromosoma 16

### **4. Mapeo de gen *CTNNA1***

Ubicación estimada: cromosoma 17

1° Hibridación:

Sonda conocida: 35N16 – *SLC* – 17q12 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 150A21 – *CTNNA1* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *CTNNA1* se localiza en el cromosoma 17

2° Hibridación:

Sonda conocida: 021E03 – N/A – 17q13 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 150A21 – *CTNNA1* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el cromosoma 17, pero la cercanía entre la sonda conocida y el gen es mayor.

## 5. Mapeo de gen *DAB2IP*

Ubicación estimada: cromosoma 4 o 28

1° Hibridación:

Sonda conocida: 014J18 – *MAL* – 28q14 – Fluorescencia roja

Sonda incógnita: 101B06 – *DAB2IP* – Fluorescencia verde

Resultados intermedios: Las sondas hibridaron en diferentes cromosomas.

2° Hibridación:

Sonda conocida: 071E21 – *GG\_478* – 4q34 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 101B06 – *DAB2IP* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *DAB2IP* se localiza en el cromosoma 4

3° Hibridación:

Sonda conocida: 135M08 – *GG\_1338* – 4q34-q35 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 101B06 – *DAB2IP* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el cromosoma 4, y se observa que el gen se encuentra entre la sonda y el centrómero

## 6. Mapeo de gen *KRT15*

Ubicación estimada: cromosoma 16

1° Hibridación:

Sondas conocidas: 156N10 – *AP2BI* – 16p13 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 268A09 – *KRT15* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *KRT15* se localiza en el cromosoma 16

## **7. Mapeo de gen *KRTAP13-1***

Ubicación estimada: cromosoma 1

1° Hibridación:

Sonda conocida: 024K02 – *SOX2* – 1q19 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 368J02 – *KRTAP13-1* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *KRTAP13-1* se localiza en el cromosoma 1

## **8. Mapeo de gen *NCOA6***

Ubicación estimada: cromosoma 19

1° Hibridación:

Sonda conocida: 093P06 – *BMP7* – 19q22 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 059N23 – *NCOA6* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *NCOA6* se localiza en el cromosoma 19

2° Hibridación:

Sonda conocida: 18C13 – *ASIP* – 19q12 – Fluorescencia roja

Sonda incógnita: 059N23 – *NCOA6* – Fluorescencia verde

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el cromosoma 19, pero la cercanía entre la sonda conocida y el gen es mayor.

## **9. Mapeo de gen *SOX9***

Ubicación estimada: cromosoma 16

1° Hibridación:

Sonda conocida: 156N10 – *AP2B1* – 16p13 – Fluorescencia verde + 408P06 – *KCNJ16* – 16q16 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 231H17 – *SOX9* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *SOX9* se localiza en el cromosoma 16

### **10. Mapeo de gen *TNFSF12***

Ubicación estimada: cromosoma 16

1° Hibridación:

Sonda conocida: 156N10 – *AP2B1* – 16p13 – Fluorescencia verde + 408P06 – *KCNJ16* – 16q16 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 172F10 – *TNFSF12* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *TNFSF12* se localiza en el cromosoma 16

2° Hibridación:

Sonda conocida: 026J07 – *VIM* – 16q13 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 172F10 – *TNFSF12* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el cromosoma 16, pero el gen se localiza en el brazo opuesto al de la sonda conocida.

### **11. Mapeo de gen *ZIC1***

Ubicación estimada: cromosoma 1 o 17

1° Hibridación:

Sonda conocida: 24K02 – *SOX2* – 1q18-q21 – Fluorescencia verde

Sonda incógnita: 135I16 – *ZIC1* – Fluorescencia roja

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *ZIC1* se localiza en el cromosoma 1

## **12. Mapeo de gen *ZIC5***

Ubicación estimada: cromosoma 14

1° Hibridación:

Sonda conocida: 012E10 – *BRCA2* – 14p15 – Fluorescencia roja

Sonda incógnita: 224A03– *ZIC5* – Fluorescencia verde

Resultados intermedios: Ambas sondas hibridaron en el mismo cromosoma, por lo que se confirma que el gen *ZIC5* se localiza en el cromosoma 14.