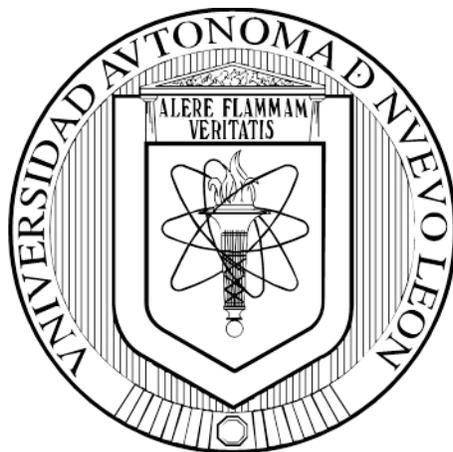


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL *LOCUS* GH DEL CABALLO MINIATURA  
AMERICANO VS CABALLO CUARTO DE MILLA.**

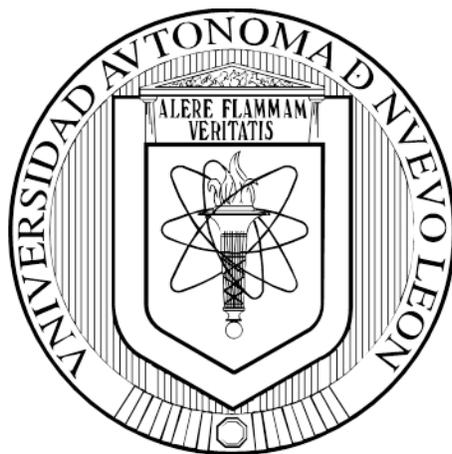
**PRESENTA**

LILIANA ARACELY LÓPEZ SALDAÑA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**OCTUBRE, 2016**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**TESIS**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL *LOCUS* GH DEL CABALLO MINIATURA  
AMERICANO VS CABALLO CUARTO DE MILLA.**

**PRESENTA**

LILIANA ARACELY LÓPEZ SALDAÑA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**OCTUBRE, 2016**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**POSGRADO CONJUNTO**



## **TESIS**

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL *LOCUS* GH DEL CABALLO MINIATURA  
AMERICANO VS CABALLO CUARTO DE MILLA.**

## **PRESENTA**

**LILIANA ARACELY LÓPEZ SALDAÑA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN,

OCTUBRE, 2016

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA

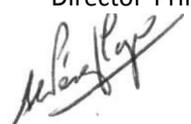


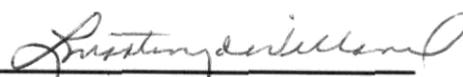
## ANÁLISIS COMPARATIVO DEL *LOCUS* GH DEL CABALLO MINIATURA AMERICANO VS CABALLO CUARTO DE MILLA

Con la aprobación del comité de tesis particular de

Liliana Aracely López Saldaña

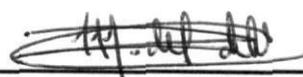
  
\_\_\_\_\_  
Dr. GUILLERMO DÁVALOS ARANDA  
Director Principal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA  
Co-Director Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dra. LAURA ELIA MARTÍNEZ DE VILLARREAL  
Co-Directora Externa

  
\_\_\_\_\_  
Dra. DIANA ELISA ZAMORA ÁVILA  
Co-Directora Interna

  
\_\_\_\_\_  
Dr. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA  
Co-Director Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma DEL ROBLE VELAZCO CAMPOS  
Co-Directora Externa

**El presente trabajo de investigación fue realizado en Monterrey, México. De agosto del 2014 a agosto del 2016 en colaboración del departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León con el departamento de Genética, el departamento de Citogenética y el departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

## **DEDICATORIA**

*Este trabajo ha sido una de las cosas más difíciles que he hecho en mi vida. No lo digo al aire. En verdad ha sido una “carrera de resistencia”, de atravesar obstáculos y dificultades pero también me ha brindado muchas satisfacciones y sobretodo aprendizaje.*

*No podría dedicarle este fruto de más de dos años de trabajo más que al Dr. Guillermo Dávalos Aranda y su esposa Eva quienes invirtieron su tiempo, esfuerzo y paciencia en este trabajo de investigación, pero principalmente porque confiaron en mí.*

*Espero haber cumplido siquiera una parte de sus expectativas y que sea un trabajo digno de la espera. Estoy muy agradecida con ustedes por este tiempo de compartir no sólo una investigación sino un vínculo de aprecio.*

*A mis padres María del Roble Saldaña Tello y Andrés López Fernández y a mi hermana Elizabeth Montserrat López Saldaña que estuvieron siempre orgullosos de mi trabajo y me apoyaron en todo momento.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Es una gran cantidad de personas a las que quisiera extender mis agradecimientos por haber participado de una u otra forma en este trabajo.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Guillermo Dávalos y a su esposa Eva por su apoyo tanto en lo académico como personal. No tengo palabras suficientes para agradecerles por su paciencia, sus atenciones y su amabilidad durante este tiempo que he tenido el placer de conocerlos. Gracias por hacer posible este trabajo con todas las facilidades que me brindaron y por la confianza depositada en mí hace ya varios años y muchas gracias por darme la oportunidad de llevar a cabo este tema que tan interesante ha sido para mí. Gracias al Dr. Dávalos por haberme impulsado a ser más ambiciosa en el tema de investigación al “ponerme la vara alta” en el nivel de conocimientos que aprendí y por guiarme y ayudarme en esos días en que todo parecía tan difícil que creí no ser capaz de hacerlo.

Gracias Dra. Diana Elisa Zamora Dávila por tantos años de estar presente de una u otra manera en mi formación académica. Gracias por las asesorías y las revisiones realizadas a mi trabajo, por brindarme su atención y orientarme en los momentos de incertidumbre durante mi aprendizaje.

Quiero agradecer a la Dra. Laura E. Martínez de Villarreal por abrirme las puertas de su departamento desde el principio de mi trabajo, por su paciencia, por recibirme y por ser tan atenta conmigo.

También agradezco al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña por permitirme trabajar en el departamento de Bioquímica ofreciéndome la oportunidad personalmente aún desde antes de pedirle apoyo. Por sus críticas constructivas y sus cuestiones en las juntas semanales que siempre me impulsó a alcanzar mayores conocimientos pensando con temor: “...y si el Dr. Barrera me pregunta”. Estoy en deuda con usted.

Quiero extender un especial agradecimiento al Dr. Antonio Alí Pérez Maya por interesarse en mi proyecto y por asesorarme al realizar las técnicas moleculares. Gracias por ayudarme con toda disposición a entender y aplicar los programas bioinformáticos que fue una etapa muy difícil para mí y por siempre dedicarme unos momentos de su día para asesorarme en lo que dudaba. Por siempre tratar de aportar algo más a mi formación académica: Gracias.

Agradezco especialmente a la Q.C.B. Luz Rojas y a la Dra. Ma del Roble Velazco por apoyarme en todas las técnicas citogenéticas y por el tiempo que me dedicaron durante estos meses de trabajo.

Gracias a mis compañeros de posgrado por todos los momentos buenos y malos que pasamos en esta etapa. Nunca entendimos completamente el tema del otro pero siempre nos escuchábamos en los momentos de angustia. Gracias Claudia Ramírez, Citlaly Martínez, Ana Silvia Lara y Juan Pablo Fimbres por dos años memorables de convivencia.

Gracias a Ruth Garza por sus ediciones de fotografía y por su disposición de ayudarme para lo que necesitara.

Por último, gracias papá, mamá, Montse y Lalo por apoyarme en mi proyecto, por involucrarse en él y por su paciencia conmigo durante este tiempo.

**Estoy eternamente agradecida con todos ustedes por hacer posible este proyecto tan importante para mí.**

## ÍNDICE GENERAL

## PÁGINA

<b>LISTA DE TABLAS</b>	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xi
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b>	xii
<b>RESUMEN</b>	xvii

### **CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN**

1.1. Sobre el caballo	1
1.2. Tamaño corporal	3
1.3. Hormona de crecimiento	6
1.3.1. Funciones	6
1.3.2. Secreción y señalización	9
1.3.3. Locus GH	11
1.3.4. Gen GH en caballos	12
1.4. Regulación transcripcional	13
1.5. Elementos móviles	15
1.6. Cariotipo	19
1.7. Justificación del trabajo	20
1.8. Hipótesis	21

### **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

2.1. Objetivo general	22
2.2. Objetivos particulares	22

### **CAPÍTULO III. ESTRATEGIA GENERAL** 23

### **CAPÍTULO IV. MATERIAL Y MÉTODOS**

4.1. Material	25
4.1.1. Origen de los reactivos	25
4.1.2. Material biológico	25
4.2. Equipo	26
4.2.1. Programas computacionales	27
4.3. Métodos	28
4.3.1. Análisis del <i>locus</i> GH	28
4.3.1.1. Extracción del ADN genómico	28
4.3.1.2. Diseño de oligonucleótidos	29
4.3.1.3. PCR	30
4.3.1.4. Secuenciación	32
4.3.1.5. Ensamblaje	32
4.3.1.6. Genescan	33
4.3.1.7. Bioedit	34
4.3.1.8. Repeatmasker	35
4.3.1.9. Análisis del promotor	36
4.3.2. Cariotipo	37
4.3.2.1. Siembra	37
4.3.2.2. Cosecha	37
4.3.2.3. Goteo	38
4.3.2.4. Tinción para bandas G	38
4.3.2.5. Tinción para bandas C	38
<b>CAPÍTULO V. RESULTADOS</b>	
5.1. Análisis del <i>locus</i> GH	39
5.1.1. Extracción de ADN	39
5.1.2. Diseño de oligos y PCR	39
5.1.3. Secuenciación y ensamblaje	41
5.1.4. Análisis comparativo del <i>locus</i> GH	42

5.1.5. Elementos repetitivos	49
5.1.6. Análisis del promotor	56
5.2. Cariotipo	60
<b>CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN</b>	65
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIÓN</b>	69
<b>CAPÍTULO VIII. BIBLIOGRAFÍA</b>	71
<b>CAPÍTULO IX. ANEXOS</b>	78

## LISTA DE TABLAS

## PÁGINA

<b>Tabla 1.</b> Anatomía de la glándula pituitaria, tipos celulares que la conforman y hormonas que secreta	7
<b>Tabla 2.</b> Elementos repetitivos del genoma equino	18
<b>Tabla 3.</b> Características de los individuos de estudio	26
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen GH y regiones flanqueantes en caballos	40
<b>Tabla 5.</b> Tabla comparativa de la longitud de los intrones y exones del gen GH caballos miniatura y de talla regular	42
<b>Tabla 6.</b> Elementos repetitivos del <i>locus</i> GH en caballos	50

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Vía de señalización de la GH	9
<b>Figura 2.</b> Estrategia general	24
<b>Figura 3.</b> Individuos de estudio	26
<b>Figura 4.</b> Estrategia para el diseño de oligonucleótidos	30
<b>Figura 5.</b> Protocolo de PCR para el <i>locus</i> GH en caballos miniatura	31
<b>Figura 6.</b> Extracción de ADN	39
<b>Figura 7.</b> PCR <i>In Sílico</i> en Software <i>Amplify</i>	40
<b>Figura 8.</b> Amplificación de los tres fragmentos superpuestos que conforman el <i>locus</i> GH del caballo miniatura	41
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de la secuencia del <i>locus</i> GH del AMH con el del caballo de talla regular como referencia	44
<b>Figura 10.</b> Anatomía del <i>locus</i> GH de equinos	48
<b>Figura 11.</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la GH	49
<b>Figura 12.</b> Elementos repetitivos del <i>locus</i> GH y regiones adyacentes	51
<b>Figura 13.</b> Alineamiento de los elementos móviles	52
<b>Figura 14.</b> Predicción del promotor por el programa <i>Neural Network Promoter Predictor</i>	57
<b>Figura 15.</b> Alineamiento de la región 5' río arriba del codón de inicio	59
<b>Figura 16.</b> Anatomía de la región 5'	60
<b>Figura 17.</b> Micrografía de una metafase de Dolly. Bandas G	61
<b>Figura 18.</b> Cariograma de Dolly. Bandas G	62
<b>Figura 19.</b> Micrografía de una metafase de Snow con Bandas C	63
<b>Figura 20.</b> Micrografía de bandas C resaltando el cromosoma X. Swan	64

## ABREVIACIONES

<b>Abreviación</b>	<b>Significado</b>
2n	Número cromosómico diploide
.ab1	Formato de archivos de secuenciación. Extensión utilizada para visualizar electroferogramas
A	Base nitrogenada. Adenina
aa	Aminoácido / aminoácidos
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
ADH	Hormona Antidiurética
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ala	Alanina
Arg	Arginina
AMH	<i>American Miniature Horse</i> / Caballo Miniatura Americano
AMHA	<i>American Miniature Horse Association</i> . Asociación de Caballos Miniatura Americanos
AMHR	<i>American Miniature Horse Registry</i> . Registro de caballo miniatura americano
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido Ribonucleico de transferencia
ATG	Metionina. Codón de inicio
Ba(OH) <sub>2</sub>	Hidróxido de Bario
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> . Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Básico Local
C	Citosina
CAT	<i>Chloramphenicol Acetyltransferase</i> . Gen Reportero Cloranfenicol Acetiltransferasa

CISH	<i>Cytokine-inducible SH2-containing protein.</i> Proteína Inductora de Citosinas Conteniendo SH2.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CRE	<i>Cyclic AMP Regulated Element.</i> Elemento Regulado por AMP Cíclico
Cys	Cisteína
DOCK3	<i>Dedicator of cytokinesis 3.</i> Dedicado a la citoquinesis 3
dPit-1	Sitio de unión distal al Factor de Transcripción Pituitario
ECA (#)	<i>Equus Caballos Chromosome (#.)</i> Identificación de los cromosomas equinos.
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
eGH	Hormona de Crecimiento Equina
ERE- (#)	<i>Equine Repetitive Elements.</i> Elementos Repetitivos de Equinos (1-2-3)
FSH	Hormona Foliculoestimulante
G	Base nitrogenada. Guanina
GH	Hormona de Crecimiento
GHR	<i>Growth Hormone Receptor.</i> Receptor de la Hormona de Crecimiento
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone.</i> Hormona Liberadora de la Hormona de Crecimiento
Gly	Glicina
HCl	Ácido Clorhídrico
HMGA2	Gen <i>High-mobility group AT-hook.</i> Grupo de Alta Movilidad unión-AT
IGF-I	<i>Insulin-like Growth Factor.</i> Factor de Crecimiento Insulínico 1
IGF-IR	<i>Insulin-like Growth Factor Receptor.</i> Receptor de IGF-I
Jak2	<i>Jannus Kinasa 2.</i> Janus Quinasa 2
KCl	Cloruro de potasio
kDa	Kilo Daltons
LCORL	Gen. <i>Ligand Dependent Nuclear Receptor Corepressor Like.</i> Co-represor del Receptor Nuclear dependiente de Ligamiento
LH	Hormona Luteinizante

LINE	<i>Long Interspersed Elements</i> . Elementos Largos Intercalados
M	Molar
mM	Minimolar
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> . Proteína Quinasa Activada por Mitógenos
min	minuto / minutos
MIRs	<i>Mammalian-wide Interspersed Repeats</i> . Repeticiones Intercaladas en Mamíferos
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i> . Instituto de Tecnología de Massachusetts
mg	Miligramos
mg/ $\mu$ L	Miligramos por microlitro
ml	Mililitro
$\mu$ L	Microlitro / Microlitros
mM	Minimolar
NCAPG	Gen. <i>Non-SMC Condensin I Complex Subunit G</i> . Subunidad G del Complejo de Condensina I No-SMC
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> . Banco Nacional de Información Biotecnológica.
NOR	<i>Nucleolar Organizer Region</i> . Región Organizadora Nucleolar
nt	Nucleótido / Nucleótidos
NREs	<i>Negative Regulatory Elements</i> . Elementos Reguladores Negativos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
Pit-1	<i>Pituitary Transcription Factor 1</i> . Factor de Transcripción Pituitario 1
PL	Lactógeno Placentario
pPit-1	Sitio de unión proximal al Factor de Transcripción Pituitario
PRL	Prolactina

QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i> . Locus de un rasgo cuantitativo
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i> . Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
rpm	Revoluciones por minuto
RUNX2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i> . Factor de Transcripción 2 Relacionado a Baja Talla
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SSC	Solución Salina con Citrato de Sodio
SINE	<i>Short Interspersed Elements</i> . Elementos Cortos Intercalados
SMAD2	Gen. <i>Mothers Against Decapaplegic homolog 2</i> . De la familia de proteínas SMAD cuyo nombre deriva de dos proteínas: MAD y SMA.
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> . Polimorfismo de Nucleótido Simple
ST	Somatotropina
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> . Proteína Transductora de Señal y Activadora de la Transcripción
SUPT3H	<i>Suppressor of Ty 3 homolog</i> . Supresor del Homólogo de T3
T	Base nitrogenada. Timina
T3	Triyodotironina
T4	Tetrayodotironina
TAG	Codón de paro
TE	Solución amortiguadora a base de Tris y EDTA
TEs	<i>Transposable Elements</i> . Elementos Transponibles
TIRs	<i>Terminal Inverted Repeats</i> . Repeticiones Terminales Invertidas
TSH	Hormona Estimulante de la Tiroides
TSNT	Solución de 2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH= 8.0
TRE	<i>Thyroid Hormone Receptor</i> . Receptor de Hormonas Tiroideas
UTR	<i>Untranslated Region</i> . Región no transcrita
UV	Ultravioleta

V	Voltios
XP-EHH	<i>Cross Population Extended Haplotype Homozogysity</i> . Homocigosidad de Haplotipo Extendida a través de la Población
x	Número de repeticiones
XX	Identificación cromosómica del sexo femenino
XY	Identificación cromosómica del sexo masculino
ZFAT	Gen. <i>Zinc Finger And AT-Hook Domain Containin</i> . Gen Conteniendo los Dominios de Dedos de Zinc y unión AT

## RESUMEN

El caballo es una especie que presenta un amplio rango de variación fenotípica, tanto en tipo como en talla corporal. La talla corporal es un rasgo cuantitativo complejo que ha atraído el interés de investigadores, sin embargo los factores que influyen en la misma no se han dilucidado completamente. El objetivo del presente estudio fue obtener la secuencia del gen de la hormona del crecimiento en caballos de raza Miniatura Americano para realizar un análisis comparativo entre ésta y la del caballo de talla regular e identificar diferencias y estudiar si las mismas pueden influir en la expresión del gen o en la proteína final y si esto se pueda relacionar con el fenotipo de baja talla corporal en esta especie miniatura. Se extrajo sangre periférica de tres yeguas miniatura en tubos vacutainer con EDTA para el aislamiento de su ADN genómico, seguidamente se utilizó el ADN extraído para amplificar y secuenciar el gen GH mediante primers específicos previamente diseñados para el caballo doméstico (*Equus caballus*). Posteriormente las secuencias fueron ensambladas utilizando programas bioinformáticos y se sometieron a un análisis comparativo de sus elementos con las contrapartes del caballo de talla regular. Al comparar ambas razas se encontraron 3 sitios polimórficos potenciales, 27 diferencias, 2 inserciones y 2 deleciones. Dos de estos cambios suceden en la región codificante del gen y provocan cambios de aminoácidos (Arg -> Cys y Ala -> Gly) en la proteína final de la raza miniatura. Adicionalmente se realizó el cariotipo de bandas G y bandas C como un análisis complementario para caracterizar los individuos de estudio e identificar diferencias cromosómicas en la raza miniatura si se compararan con los del caballo de talla regular. No se encontraron diferencias en el patrón de bandas G y C.

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### 1.1. Sobre el caballo.

El caballo (*Equus caballus*) es una especie antiguamente domesticada que ha jugado un papel importante en el desarrollo de la humanidad en la explotación de nuevos territorios, como medio de transporte, para trabajo de campo, en deportes, espectáculos y hasta como mascota. Pertenece al orden *perissodactyla*, que se refiere a los mamíferos cuyas extremidades poseen dedos impares que se recubren por un casco (Wade et al., 2009a).

Distintas clasificaciones de caballos han sido propuestas sin embargo una bien aceptada se basa en el origen geográfico, formando así tres grupos conteniendo muchas razas: los grandes y pesados llamados de “sangre fría”, los veloces y ligeros conocidos como de “sangre caliente” y un tercer grupo encontrado en la literatura: el de los ponis. Entre estos grupos se muestran diferencias en cuanto al tamaño corporal, al fenotipo y al entorno en el que viven pues se cree que las influencias del hábitat de los ponis (montañas europeas) donde escasea el alimento, el clima es extremo y el terreno rugoso se vio reflejado en el cuerpo pequeño, robusto y sus patas firmes (Edwards, 1994). Especialmente en caballos la apariencia, el color de capa y el tamaño corporal son criterios cruciales para la clasificación en razas (Frankeny, 2003).

Una raza se define como un grupo de caballos con el mismo fenotipo y función cuya fundación se basa en un libro de registros que muestra la evolución de los equinos que dieron origen a todas las razas modernas de caballos desde el *Eohippus* (caballo del eoceno), caballos primitivos (Przewalski, Tarpán) y además el primer individuo considerado fundador de la raza y toda su descendencia (Edwards, 1994).

Un caballo miniatura es un caballo de baja talla. Según la Asociación Americana de Registro de Caballos Miniatura (AMHR por sus siglas en inglés), un caballo entra en la categoría de miniatura si cumple el criterio de medir hasta 38” (96.52

cm) a la altura del último pelo de la crin. Distintas razas miniaturas han sido reconocidas a nivel mundial como la Falabella, Pony de Shetland, *American Miniature Horse* (caballo miniatura americano, AMH), entre otros.

La raza de estudio para la presente tesis de investigación, es la *American Miniature Horse*. Los individuos pertenecientes a esta raza son caballos pequeños y bien proporcionados, de alrededor de 120 kg de peso y no más de 34" (86.36 cm) de altura a la cruz. Esta raza se conforma por dos líneas fenotípicas: línea árabe y línea cuarto de milla, ambos fenotipos son iguales a su contraparte de talla regular. El estándar de la raza exige que no debe de tener piernas cortas, cuellos gruesos o barrigas grandes pero sí acepta cualquier color de pelaje, aunque un cuerpo bien proporcionado y una bonita cabeza son tan importantes como el tamaño al momento de registrarlo (Patent y Muñoz, 1991).

A partir la década de los 90's se intentó dilucidar el mapa génico del caballo doméstico, utilizando marcadores tipo II (RAPDs y Microsatélites) para identificar genes candidatos potenciales para caracteres de interés en esta especie (Shiue et al., 1999). Hasta el 2007 una hembra de raza Thoroughbred llamada *Twilight* fue la donadora de la muestra de ADN para obtener todo el genoma equino. Dicho proyecto fue denominado *EquCab 2.0* y se realizó por el *Broad Institute* en Estados Unidos. Una de las características importantes encontradas fue la identificación de un nuevo centrómero en desarrollo en el cromosoma 11 cuyo reposicionamiento es típico del género *Equus*. Además se determinó que el genoma equino posee 20,322 genes que codifican proteínas (Wade et al., 2009a).

En el 2009, se reportó la secuencia del genoma equino de forma más detallada, permitiendo identificar que es relativamente repetitivo y posee duplicación segmentada además de compartir un amplio rango de similitud de haplotipos entre las razas de caballos (Wade et al., 2009b) .

Análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) han sido orientados a investigar el fenotipo y genotipo de caballos de la misma raza pero distinta línea, por ejemplo entre caballos cuarto de milla de corte y

cuarto de milla de carreras se determinaron 54,602 SNPs uniformemente distribuidos por el genoma a través de los 31 autosomas y el cromosoma X (Meira et al., 2013).

## **1.2. Tamaño corporal.**

El tamaño corporal es un rasgo cuantitativo, por lo tanto es el resultado de la expresión de muchos genes con un efecto aditivo y además de factores nutritivos y ambientales, entre otros. Puede ser medido de manera objetiva o subjetiva.

El material genético del individuo brindará la capacidad y el potencial para su desarrollo, tasa de crecimiento, composición corporal y más importante: su altura y peso en la etapa adulta. Existen especies que presentan una enorme variabilidad corporal en las razas que las conforman, por ejemplo los caninos poseen un rango de tamaño desde un par de kilos como el Chihuahua, hasta más de 60 como el Gran Danés o San Bernardo. Diversos estudios se han realizado para dilucidar esta variabilidad, en especial, Rimbault y colaboradores realizaron un mapeo de genes previamente relacionados a la talla en caninos como GHR, HMGA2, SMAD2, STC, IGF-1 e IGF-1R en 500 perros de 93 razas donde múltiples combinaciones de todos los marcadores mencionados se relacionaron a la baja talla corporal. Concluyendo que del 46 al 52.5 % de la varianza en talla corporal de los cánidos se puede explicar con estos marcadores próximos a los genes candidatos (Rimbault et al., 2013).

Lo mismo ocurre en la especie equina, presentando un amplio rango de peso, estructura y estatura, desde razas pequeñas como AMH hasta gigantes como la *Shire*, por mencionar ejemplos. Cabe destacar que independientemente del material genético, si existen deficiencias nutricionales durante la etapa de desarrollo temprano, el crecimiento se verá retrasado, generando un fenotipo de baja talla (Hossner, 2005).

Entre las especies domésticas podemos encontrar razas miniatura que han sido perfeccionadas por selección artificial a través de los años para mantener su

fenotipo característico de baja talla, ya sea por algún fin de producción, beneficios en laboratorio o como mascotas debido a su atractivo tamaño pequeño. Se pueden mencionar varios ejemplos de razas de baja talla como las ovejas de razas *Babydoll* o *Harlequin*, además de cabras enanas o burros miniatura, así como cerdos miniatura de Yucatán.

Las razas miniaturas han sido investigadas y comparadas con razas de talla regular para identificar diferencias entre ellas. Por ejemplo, SNPs en cerdos miniatura de Yucatán fueron comparados con cerdos de talla regular para intentar identificar elementos de selección específicos para la talla corporal, sin embargo factores ambientales como el consumo de alimento, la regulación de peso y el incremento de masa, además de factores como proliferación celular y genes como XP-EHH relacionado con docilidad, inmunidad y talla corporal fueron identificados como rasgos cuantitativos ligados a la selección artificial (Kim et al., 2015).

La baja talla no es un fenómeno encontrado solamente en especies domésticas, en humanos existe la población de pigmeos, personas de baja estatura que habitan en el continente africano cuya talla corporal ha sido intrigante para los investigadores por ser este rasgo es poligénico aditivo aún no se logra dilucidar las razones que la causan. Al momento no existe evidencia definitiva que soporte la baja talla corporal en humanos, aunque algunos genes involucrados en la homeostasis ósea y en la estatura como SUPT3H-RUNX2 han sido relacionados (Mendizabal et al., 2012). Al analizar la población pigmea se identificaron múltiples regiones a través de todo el genoma que intervienen en distintos loci como el de la GH y la insulina, así como en vías de señalización de IGF y los señalamientos inmunitario y neuroendócrino involucrados en la reproducción y el metabolismo; además de los genes DOCK3 que ha sido relacionados con la estatura en Europeos y CISH relacionado con la señalización de STAT. Sin embargo al analizar todos estos elementos en la población, se concluyó que los hallazgos más importantes se relacionaron con la señalización de IGF (Jarvis et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente, a diferencia de la mayoría de las especies de granja, los caballos exhiben enormes diferencias fenotípicas, particularmente con respecto al tipo de cuerpo. Se ha sugerido que la altura a la cruz en el caballo recién nacido, sin importar raza o sexo, equivale al 60% de la altura final adulta, lo cual es una gran proporción comparado con otros animales domésticos (Martin-Rosset, 1983).

Evolutivamente, el género *Equus* ha sufrido cambios corporales importantes, mostrando hasta 60 veces aumento en masa corporal desde hace siglos a la actualidad. En la literatura científica se ha referido que estos cambios han sido influenciados por factores ambientales, disponibilidad de alimento, competitividad por el hábitat, el clima, entre otros factores. Basado en lo anterior, se analizó una base de datos de fósiles en orden cronológico utilizando modelos matemáticos de predicción de talla que estimaron que hace 24 millones de años, la masa máxima aproximada de los equinos era de 100 kg, cambiando hace alrededor de 12 millones de años a 800 kg aproximadamente de masa corporal. Dicho análisis explicó el 92% de incremento en la talla máxima de 39 kg hasta 1200 kg a través de los 56 millones de años de la expansión del género *equidae* (Shoemaker y Clauset, 2014).

Varias investigaciones relacionan los rasgos cuantitativos poligénicos (QTLs) en el caballo con su conformación general. Recientemente, se identificaron 8 SNPs a través de dos regiones de QTLs en el cromosoma 3 (ECA3) y el cromosoma 9 (ECA9) que fueron significativos para altura a la cruz, localizados cerca de los genes LCORL/NCAPG y ZFAT respectivamente (Signer-Hasler et al., 2012).

Uno de los más recientes análisis relacionado al tamaño corporal en caballos fue realizado por Metzger y colaboradores, en el cual se logró correlacionar un polimorfismo en un sitio potencial de unión a factores de transcripción asociado con niveles altos de expresión del gen LCORL y simultáneamente con el tamaño corporal de varias razas de caballos (Metzger et al., 2013).

En otra investigación, donde se propuso la hipótesis que los ponis de Shetland comparten un alelo del gen HMGA2 que influye en tamaño reducido, se realizó un mapeo fino del cromosoma 6 en 19 individuos <87 cm de estatura y 29 ponis de mayor altura, determinando un haplotipo común homocigoto en los 19 ponis <87 cm de estatura y en 16 de los 29 individuos más altos. La variante identificada no se encontró en razas de talla regular, concluyendo que este alelo interviene en el rasgo de estatura en caballos (Frischknecht et al., 2015).

La talla corporal de los caballos miniatura se debe a la influencia de múltiples genes con efecto aditivo al rasgo, esto sucediendo de manera fisiológica normal. Sin embargo, existen también genes relacionados al enanismo; un síndrome que puede afectar a esta raza con diferentes grados de múltiples defectos fenotípicos. Una región específica ha sido localizada con genes candidatos que impactan en este carácter no deseado (Eberth et al., 2009).

Las alteraciones genéticas que han creado y mantenido el tamaño pequeño en los caballos miniatura, los han predispuesto a patologías que en su contraparte más grande no son comunes, (aunque sí se presentan casos en razas de talla regular como la frisón) (de Graaf-Roelfsema et al., 2009a); la raza AMH era altamente propensa a enanismo hace 25 años, sin embargo el cruzamiento con individuos no relacionados fue declinando la incidencia de este grave problema (Frankeny, 2003).

### **1.3. Hormona de crecimiento.**

#### **1.3.1. Funciones.**

Crecimiento se define como una elevación del peso y tamaño del individuo debido a un incremento en el número de células (hiperplasia) y/o un aumento del tamaño de las células (hipertrofia). Muchas hormonas, incluyendo: la hormona de crecimiento (GH), hormonas tiroideas (T3 y T4), catecolaminas, insulina, glucocorticoides y esteroides sexuales, influyen en procesos metabólicos

involucrados en la degradación y síntesis de tejido corporal, por lo tanto en el crecimiento (Squires, 2010).

La GH, también conocida como somatotropina (ST), es la hormona peptídica más importante que influye en el crecimiento, está formada por 191 aminoácidos (según la especie) y tiene un peso de 22,000 daltons. En caballos la GH fue purificada y caracterizada en los 70's y así como en otros mamíferos, el patrón de secreción en esta especie es pulsátil (Thomas et al., 1998b).

La glándula pituitaria (también llamada hipófisis) es la encargada de la secreción de esta hormona. En el caballo es del tamaño de un chícharo y se localiza en la parte baja de la base del cerebro, cubierta por la duramadre. El tallo pituitario se eleva dorsalmente de la pituitaria para conectar con el hipotálamo (Reimers, 2003). Consiste de 2 lóbulos, anterior y posterior, con diferentes tipos celulares y cada uno produce hormonas específicas (Pilliner y Davies, 2004) (Ver tabla 1).

**Tabla 1.** Anatomía de la glándula pituitaria, tipos celulares que la conforman y hormonas que secreta.

	Tipo de Células	Hormonas que secreta
Lóbulo anterior (Adenohipófisis)	Somatotropas	Hormona del Crecimiento (GH)
	Lactotropas	Prolactina (PRL)
	Corticotropas	Hormona Adrenocorticotropa (ACTH)
	Tirotropas	Hormona Estimulante de tiroides (TSH)
	Gonadotropas	Hormona Foliculoestimulante (FSH) Hormona Luteinizante (LH)
Lóbulo posterior (Neurohipófisis)	Gliales /Pituicitos	Hormona antidiurética (ADH) Oxitocina

La GH normal se expresa en las células somatotropas de la glándula pituitaria y su principal función consiste en regular el crecimiento lineal postnatal y diversas actividades metabólicas. En los 90's se identificó que la GH también se sintetiza en otros tipos celulares, incluyendo linfocitos B circulantes (Valerio et al., 1997), los cuales contienen receptores de GH. La GH de linfocitos parece mostrar efectos autocrinos y paracrinos (Hattori, 2009).

La GH interviene en procesos como la homeostasis de la glucosa, la síntesis proteica en tejido muscular, la lipólisis en tejido adiposo, la reparación tisular, la regeneración ósea (Rozman, 1997), la neurogénesis, neuroprotección, el aprendizaje y la memoria (Sonntag et al., 2005). Asimismo se ha determinado que influye en la proliferación celular y en la modulación de la expresión de proteínas apoptóticas en el oviducto de aves de postura (Hrabia et al., 2014). Además, en bovinos se han identificado polimorfismos a través del exón 4, intrón 4 y exón 5 del gen GH, llamados L (GH1) y V (GH2) que influyen en el comportamiento sexual, tanto en líbido, tiempo de reacción, estímulo para monta, actividad espermática en masa, número de dosis de semen por colecta, motilidad espermática individual, cuenta de células vivas y muertas, y anomalías morfológicas espermáticas. Por lo que se considera al gen GH como candidato para rasgos de comportamiento seminal y sexual en ganado (Pal et al., 2014). Además, polimorfismos del gen GH han sido relacionados a la producción de leche en bovinos, siendo los genotipos encontrados de impacto importante para una mayor, media o menor producción (Dybus, 2002).

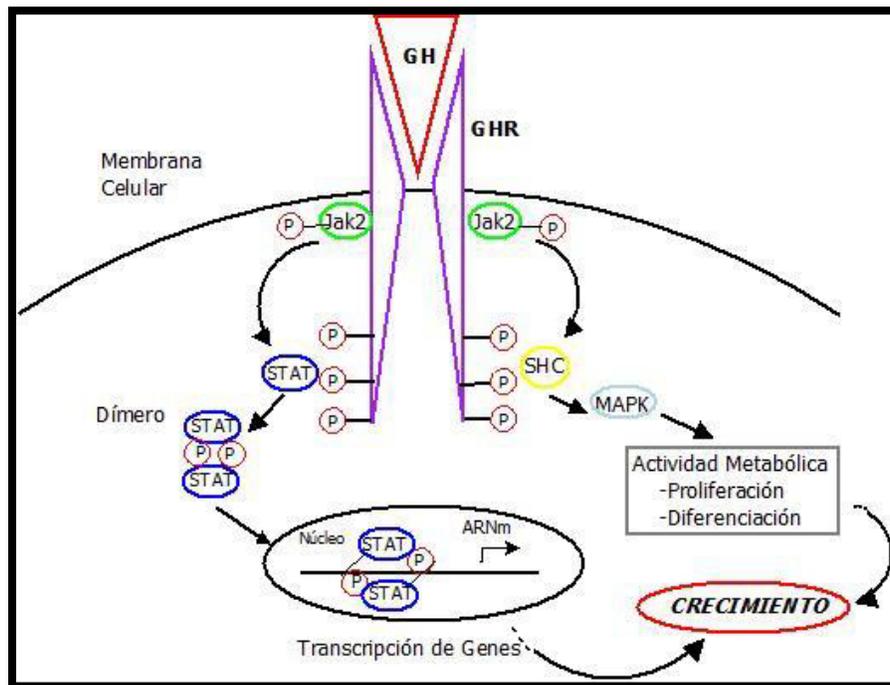
Es bien conocido que el crecimiento de los músculos, huesos y órganos es dependiente de la GH, solamente el cerebro crece independientemente de presencia o ausencia de esta hormona. Para demostrar esto, Glasscock y colaboradores hipofisectomizaron ratas recién nacidas, resultando en su muerte a no más de 30 días; la causa de muerte se debió a un crecimiento continuo del cerebro en ausencia de un espacio craneal adecuado (Glasscock et al., 1990).

Una función clave de la GH es la estimulación de la expresión hepática del gen IGF-I (Factor de Crecimiento Insulínico); el cual media muchas de las acciones de la GH. La mayoría del IGF-I circulante es de origen hepático, sin embargo también puede provenir de tejido adiposo u otras fuentes (Bartke et al., 2013). Al ser analizados la expresión, el control y la acción de IGF-I en las placas de crecimiento se demostró que ésta molécula es necesaria para el crecimiento esquelético (David, 2009) ya que posee un efecto regenerativo óseo. En una compilación de 39 investigaciones clínicas se concluyó que la terapia con GH e

IGF-I beneficia a los pacientes con osteoporosis y en recuperación de fracturas debido a sus efectos anabólicos (Locatelli y Bianchi, 2014).

### 1.3.2. Secreción y señalización

Las acciones biológicas de la GH comienzan al unirse con su receptor en la superficie celular. El receptor de la hormona de crecimiento (GHR) es una proteína de 634-648 aminoácidos, de una masa molecular de aproximadamente 70kDa. Existe de forma libre como un dímero inactivo y se convierte a un complejo de receptor activado por un cambio conformacional al unirse a una molécula de GH; es miembro de la superfamilia de los receptores de citosinas, interferones e interleucinas. Una vez activado tiene unido *Jannus Kinasa 2*, que fosforila proteínas STAT, generando IGF-1 (Squires, 2010). El proceso se muestra en la figura 1.



**Figura 1.** Vía de señalización de la GH. Se muestra la unión de GH-GHR en la membrana celular y los procesos intracelulares posteriores a la unión iniciados por la activación de *Jak2*. El lado izquierdo esquematiza la vía de los factores de transcripción *STAT*. El lado derecho describe la vía *MAPK* por las proteínas *SHC*.

La regulación fisiológica de la GH se basa en tres aspectos principales: La hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) controla la síntesis y liberación de GH, interviniendo en la transcripción de ARNm (Reimers, 2003). La somatostatina influye como un potente inhibidor de la secreción de GH. Se incrementa la secreción de somatostatina al elevarse los niveles de GH e IGF-1; esta proteína parece determinar la amplitud y los pulsos de GH, pero no tiene efecto en la síntesis de GH (Reichlin, 1998). Por último, la grelina es secretada en el estómago después del consumo de alimento; su acción primaria es disminuir el vaciado gástrico y promover la saciedad (Hadley y Levine, 2007).

La secuencia de la GH madura es precedida por una secuencia llamada péptido señal, de alrededor de 26 aminoácidos que dirige a la proteína en la vía secretoria. En estudios evolutivos, se ha hecho notar que la secuencia de la GH madura es conservada mientras que el péptido señal muestra variaciones considerables entre especies (Wallis, 2008).

La proteína tiene una estructura terciaria muy característica formada por 4 hélices con una topología inusual (arriba-arriba-abajo-abajo) típica de la superfamilia de las citoquinas. Se ha considerado que la GH de rumiantes difiere de los otros mamíferos en aproximadamente el 10% de todos los residuos, sin embargo dentro de la misma especie también se muestra heterogeneidad, que puede estar dada por eventos de duplicación génica, ser resultado de un *splicing* alternativo o por modificación postraduccional de dos cadenas peptídicas (Forsyth y Wallis, 2002).

La secreción de GH disminuye con la edad en humanos, ganado (ovejas, cabras y vacas) y se presume que sucede de igual manera en otras especies incluyendo perros y gatos (Feldman y Nelson, 2004).

Desde 1995, Buonomo y colaboradores reportaron que las concentraciones de GH no diferían entre adultos (>2 años de edad) AMH, Cuartos de milla y Belga. Sin embargo las concentraciones séricas de IGF-1 fueron más altas en los fenotipos grandes (Buonomo et al., 1995). Por otra parte, se comprobó que las concentraciones en plasma de GH y de IGF-1 son altamente relacionadas con el

tamaño corporal pues perros de raza grande, tienen más concentración sanguínea de IGF-1; por ejemplo los *poodles* estándar tienen 6 veces más concentración que los *poodles Toy* (Reimers, 2003). Las mutaciones que inactivan el receptor de GH en cualquier especie, provocan enanismo (Mendoza Patiño, 2008).

En equinos se identificó que las concentraciones séricas de GH tienden a ser constantes en yeguas y sementales, no varían por sexo ni periodo estacional; sin embargo la estimulación sexual (que en los sementales implica generalmente considerable actividad física) provocan aumento de la secreción de GH de entre 8 a 10 veces (Thomas et al., 1998a). La cantidad de ejercicio también influye en los niveles de secreción; caballos con un entrenamiento físico intenso mostraron picos de secreción mayores y patrones pulsátiles más frecuentes de GH durante muestreos nocturnos (de Graaf-Roelfsema et al., 2009b).

### **1.3.3. Locus GH**

El gen de la GH es el responsable de la secreción de GH, crecimiento, desarrollo y otras actividades fisiológicas importantes (Ver apartado Funciones) (Feldman y Nelson, 2004). Ahora es bien conocido que esta hormona comparte homología de secuencia con la hormona prolactina (PRL) y con lactógeno placentario (PL), sugiriendo que las 3 evolucionaron de un gen ancestral común (Forsyth y Wallis, 2002).

Se ha identificado que el gen GH está muy conservado entre las distintas especies de mamíferos, tanto así que se ha demostrado que la GH canina es idéntica a la GH porcina (Ascacio-Martinez y Barrera-Saldaña, 1994). Sin embargo si se compara la GH de primates y la de ungulados se puede concluir que estos grupos difieren mucho entre ellos. Wallis y colaboradores proponen en sus análisis evolutivos que esto sucedió en consecuencia a episodios de evolución repentinos (Wallis et al., 2005).

Si bien en algunas especies de mamíferos se ha identificado un solo gen GH (caballo, cerdo, perro, etc.), en otras especies por ejemplo los artiodáctilos (cabra,

vaca, oveja, ciervo, por mencionar algunos) se presentan 2 genes y en el caso de los primates se ha reportado un número variable de genes de hasta 41 genes. Las especies que presentan un solo gen lo expresan en la glándula pituitaria y donde se presentan variantes además expresan una variante en la placenta durante la gestación al tiempo que se inhibe en pituitaria (Forsyth y Wallis, 2002).

Con el objetivo de conocer mejor el orden de los cetartiodáctilos (artiodáctilos – cetáceos), el gen GH fue secuenciado en especies como jirafa (*Giraffa camelopardalis*), hipopótamo (*Hippopotamus amphibius*) y camello (*Camelus dromedarius*). Los primeros dos poseen secuencias distintas del gen GH con diferencia de entre 5 a 21 nucleótidos, pero codificando proteínas idénticas (Maniou et al., 2004). Además se ha caracterizado la secuencia de los genes GH de delfín (*Delphinus delphis*) (Maniou et al., 2002) y ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) (Wallis et al., 2005). En el 2005, fue estudiado el gen GH del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y se reportó que posee dos secuencias (denominadas A y B) que difieren en 23 nt. Al analizar varios individuos se concluyó que esto era consecuencia de polimorfismos alélicos, poseyendo el tipo A o B (homocigotos) o ambos tipos (heterocigotos). Las diferencias se encontraron principalmente en la región 5' río arriba, lo cual podría asociarse con la expresión génica (Wallis et al., 2006).

#### **1.3.4. Gen GH en caballos.**

El gen GH1 en equinos se localiza en el cromosoma 11. Consta de 1683 pb y está constituido por cinco exones y cuatro intrones. La proteína que codifica se forma por 216 aminoácidos (Oliver y Hartree, 1968). El ADNc de la GH fue aislado y secuenciado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1994 (Ascacio-Martinez y Barrera-Saldana, 1994). Se dice que la GH de caballo es altamente homóloga con la de burro en base a la secuencia nucleotídica, de ADNc y de aminoácidos (aa). Al comparar el gen de GH de caballo con el de burro se identificó que el caballo posee un cambio de C por G en el aminoácido 117, donde en el burro es fenilalanina en el caballo es leucina. Los autores de estos hallazgos

sugirieron que podría ser la razón de la diferencia en crecimiento y desarrollo entre caballos y burros (Wen-jin et al., 2012).

El gen GH1 de distintas razas de caballos consta de 5 exones y 4 intrones con una gran similitud de secuencias. En cuatro razas de caballos: mongol, japonés (Kiso), anglo-árabe y el thoroughbred se han identificado tres polimorfismos en regiones codificantes: T/C en la posición 335 del exón 4 en el caballo thoroughbred y mongol provocando un cambio aminoacídico y en el exón 5 hay dos cambios en las 4 razas de caballos que no alteraron la secuencia de aminoácidos: T/C en la posición 534 y G/A en la posición 558 (Hai et al., 2009).

#### **1.4. Regulación transcripcional.**

La expresión génica es controlada por secuencias reguladoras en *Cis* como el promotor, que es la secuencia de ADN que contiene el sitio del inicio de la transcripción y determina la unión de la ARN polimerasa II, por lo tanto promueve y controla la transcripción. Dicho de otra manera, es la región de un gen que será indispensable para la expresión del mismo por ser el templado para la unión de proteínas reguladoras, como a sus elementos potenciadores y reguladores proximales que se encuentran alrededor de 200 pb del sitio de inicio. Mutaciones que afectan la función de estas secuencias provocan cambios en la expresión. Por ello analizar la evolución de dichas secuencias brinda una oportunidad para entender la razón de la biodiversidad en el fenotipo de las especies (Wittkopp y Kalay, 2012)

El promotor del gen de la hormona del crecimiento se conoce por contener elementos reguladores de la expresión, incluyendo la Caja TATA, sitios de unión al Factor de Transcripción Pituitario (Pit-1), sitios de unión al Receptor de Hormonas Tiroideas (TRE por sus siglas en inglés), sitios de unión al Elemento Regulado por AMP Cíclico (CRE) y sitios de unión a diversos Elementos Reguladores Negativos (NREs) regulados por péptido YY1 (Wallis, 2008).

Pit-1 es un elemento esencial para el desarrollo pituitario, por lo tanto para la función pituitaria. Se expresa en células secretoras de GH, PL, T3 y T4. Los genes de estas hormonas pituitarias contienen el sitio de unión a Pit-1 en el promotor de sus secuencias antes de la posición -200. A su vez Pit-1 se regula por otros elementos proximales del promotor por lo tanto es de los factores más importantes en la activación de la expresión de GH (Shewchuk et al., 2006). Si alguna mutación altera su sitio de reconocimiento no podría ser reconocida por el factor de transcripción, por lo tanto se alterarían los patrones de expresión del gen.

Los promotores eucariotas presentan diferentes combinaciones de secuencias de elementos reguladores. Su posición es de suma importancia pues reflejará la interacción entre los factores de transcripción con estos sitios de unión. En un estudio comparativo hecho mediante alineamientos y análisis de complejidad de la región promotora del gen GH de distintas especies de mamíferos se identificó que esta región ha evolucionado variablemente, pues se encontró evidencia de arreglos variables (Chuzhanova et al., 2000).

La región proximal del promotor del gen GH1 en humanos es altamente polimórfica. Cuando se analizó dicha región en 154 hombres de origen británico, se determinó que existen 15 sitios con frecuencias desde 0.003 a 0.41 ubicándose desde la posición -476 hasta +59, formando 36 haplotipos diferentes. Se analizó la expresión *in vitro* y se identificó que los niveles varían desde menor hasta mayor expresión según el haplotipo, confirmando que los polimorfismos en el promotor modulan la expresión del gen GH1. Sin embargo, algunos de estos sitios (del 8 al 15) son bastante conservados en otros mamíferos, lo cual causa intriga sobre su candidatura a influir en la talla corporal (Horan et al., 2003).

En un análisis del gen GH en bovinos se eliminó la región que abarca los nucleótidos de las posiciones -336 a -240 y se midió su actividad frente a un gen reportero. La expresión fue aumentada 2.2 veces y 5 veces en el gen reportero (Cloranfenicol acetil transferasa, CAT). Esta región eliminada se denominó Sitio Regulador Negativo (NRS). Al probar con más combinaciones de elementos

promotores donde no se eliminaba esta región, se concluyó este sitio reprime la expresión del gen (Park y Roe, 1996). Posteriormente estos sitios represores de la región 5' se nombraron Elementos Reguladores Negativos (NRE). Dichas secuencias actúan como sitios de unión para proteínas que a la vez interactúan con otros factores para impedir la unión de ARN polimerasa o permitir la formación de heterocromatina pudiendo actuar de forma local o global al intervenir en regiones cromosómicas (Hampsey, 2001).

Los cambios en los patrones de expresión génica han impactado en la evolución de la hormona del crecimiento. Dichos cambios son relacionados con los elementos regulatorios presentes en las distintas especies de mamíferos. Alteraciones en los tamaños o números de elementos regulatorios génicos asociados a alelos específicos pueden incrementar o afectar la respuesta de un gen a factores génicos que regulen su actividad (Hossner, 2005).

### **1.5. Elementos móviles.**

Los elementos repetitivos, elementos móviles o elementos transponibles (TEs) son secuencias nucleotídicas que tienen la capacidad de cambiar su posición en el genoma. Se encuentran dispersos como elementos individuales e incluyen dos grupos: los SINE (*Short Interspersed Elements*, Elementos Cortos Intercalados) y los LINE (*Long Interspersed Elements*, Elementos Largos Intercalados). Los SINES se localizan en regiones génicas, principalmente en los promotores; mientras que los LINEs se concentran en regiones génicas pobres y no se presentan en los promotores. Por muchos años se creyó que estos elementos no poseían ningún impacto en el genoma, por lo que se llamaba ADN "basura", sin embargo han sido de importancia en la evolución al crear nuevas señales reguladoras en genes codificantes (Tomilin, 2008). Su impacto aún no se comprende completamente pero se ha sugerido que estos elementos tienen una influencia en el genotipo y en el fenotipo de los individuos (Shapiro, 2012).

Los LINE se representan por la familia de los elementos L1 (Karp., 2014), que son los elementos dominantes en los genomas de mamíferos y son indispensables

para la transposición de los SINE pues contienen la maquinaria necesaria para la transposición de los MIRs (*Mammalian-wide Interspersed Repeats*) (Jurka et al., 2007). Esta familia representa los eventos genéticos previos a la radiación de los órdenes placentarios (Jurka et al., 1995).

Durante la evolución, los elementos transponibles han tenido influencia en las secuencias regulatorias y codificantes del hospedero, pues existe evidencia de arreglos como inserciones, deleciones, inversiones y duplicaciones que se han asociado a eventos de especiación, brindando a los elementos transponibles suma importancia en la diversidad genómica y biológica de los vertebrados (Böhne et al., 2008). En humanos se identificó que la inserción de elementos móviles cerca de los promotores puede alterar la expresión génica o si se insertan en los exones es muy probable que se incorporen nuevos exones a las proteínas codificadas por los genes (Krull et al., 2007).

Los trasposones de ADN o TIRs (*Terminal Inverted Repeats*, Repeticiones Invertidas Terminales) proliferan en forma de “copiado y pegado” por intermediarios de ADN (Gao et al., 2012). La superfamilia de elementos *hAT* que pertenece a los transposones de ADN son los elementos de ADN más comunes en el genoma humano. Algunos de ellos se vuelven activos al entrar al hospedero (Arensburger et al., 2011). Los elementos *hAT*-Charlie han sido identificados en los *loci* GH del humano, chimpancé y gorila, donde MER5b aporta los dominios determinantes para la actividad potenciadora (Pérez-Maya, 2012).

Los elementos SINE fueron aislados y caracterizados en equinos en 1994. Los hallazgos arrojaron que la familia de SINEs ERE-1 (*Equine Repetitive Element*, Elemento Repetitivo Equino) comparte características con los retrotransposones derivados de ARNt. Los miembros de la familia ERE-1 se distribuyen en 5 especies del género *Equus* y se cree que sus variantes pudieron influir en la variabilidad genética durante la evolución (Sakagami et al., 1994). Además, los elementos SINE de la familia ERE-1 y ERE-2 han sido encontrados en el género *equus* y *rhinoceros* y son específicos del orden *perissodactyla*, esto indica que

estos elementos preceden de la divergencia de équidos y otros perisodáctilos (Gallagher et al., 1999).

En el año 2010 se realizó una anotación detallada de los elementos repetitivos del caballo, encontrando que los elementos L1 son los más abundantes en el genoma y que la clase ERE es el mayor SINE del orden *perissodactyla*. No obstante a estos hallazgos un 11% de los elementos del genoma equino no pudieron ser clasificados en esa ocasión (Adelson et al., 2010). Este estudio ha aportado información invaluable en relación a los elementos móviles del genoma equino. En la tabla 2 se muestran los elementos identificados.

**Tabla 2.** Elementos repetitivos del genoma equino. Adaptación de Adelson et al., 2010 (Adelson et al., 2010).

<b>Grupo</b>	<b>Número</b>	<b>Pb Totales</b>	<b>% del Genoma</b>
<b>Transposones No-LTR</b>			
LINE L1	464 621	402 200 888	16.25112
LINE L2	234 304	71 040 977	2.87044
LINE CR1	24 886	6 321 427	0.25542
LINE RTE	19 102	4 519 823	0.18263
	742 913	484 083 115	19.55961
<b>SINEs</b>			
SINE ERE ½	296 962	70 493 153	2.84831
SINE MIR	433 220	65 909 940	2.66312
SINE ERE3	159 847	35 928 664	1.45171
Otro SINE	6 507	647 743	0.02617
SINE ARNt	3 356	535 733	0.02165
	889 892	173 515 233	7.01096
<b>ERVs</b>			
LTR MaLR	189 978	66 355 259	2.68031
LTR ERVL	97 995	45 135 591	1.82372
LTR ERV1	95 173	37 924 134	1.53234
LTR ERVK	6 250	1 698 832	0.06864
	389 396	151 093 816	6.10502
<b>Todos los transposones de DNA</b>	330 947	77 908 269	3.14792
<b>Otros LTR</b>	16 778	4 205 795	3.14792
<b>SSR Dinucleótidos</b>			
Di AG	491 252	4 615 663	0.1865
Di AC	455 500	5 154 925	0.20829
Di AT	317 721	3 249 245	0.13129
Di CG	6 671	60 736	0.00245
Tri AAT	239 773	2 478 174	0.10013
Tri AAG	196 665	2 012 054	0.0813
Tri AGG	182 780	1 830 576	0.07397
Tri AGC	118 372	1 179 278	0.04765
Tri AAC	113 989	1 174 230	0.04745
Tri ACC	97 191	972 959	0.03931
Tri ATC	85 399	890 424	0.03598
Tri ACT	29 303	284 872	0.01151
Tri CCG	12 825	135 075	0.00546
Tri ACG	2 560	24 792	0.001
	1 078 857	10 982 434	0.44375
<b>SSR tetra-pentanucleótidos</b>	2 560 707	30 290 224	1.22389
<b>Sin clasificar/quiméricos</b>	278 805 770		11.265
<b>Total de elementos repetidos</b>	2 379 926	1 169 611 998	47.25844
<b>Total de SSR</b>	4 910 708	54 353 227	2.19617

## 1.6. Cariotipo.

Las razas de caballos domésticos originalmente derivan de poblaciones salvajes que se distribuían desde Europa hasta el Medio Este. Se reconocen 4 formas provenientes de Europa y África (*coldblood*, *warmblood*, tarpán y *Afro-turkic*) ahora extintas que juntas generaron el pool del caballo doméstico y poseen 64 cromosomas diploides (Ryder et al., 1978).

Cariotipo se define como la constitución cromosómica de cada individuo, además se llama así al análisis de los cromosomas en la genética. Desde los años 70's se encuentran publicaciones donde se caracteriza el cariotipo equino de tamaño regular basado en bandas G (Bandas de Giemsa) y bandas C (Bandas de heterocromatina constitutiva). El bandeo G muestra un patrón característico de cada par de cromosomas y se basa en un patrón de bandas oscuras que contienen ADN rico en AT (replicación tardía y pocos genes constitutivos) y bandas claras ricas en GC (replicación temprana y muchos genes constitutivos). El bandeo C muestra las regiones de los cromosomas que poseen heterocromatina constitutiva (región pericentromérica) (Buckland et al., 1976). El cariotipo del caballo doméstico consiste de 31 autosomas más los cromosomas sexuales X y Y ( $2n=64$ ) (Shiue et al., 1999). Se ha determinado que las especies que conforman el género *Equus*, poseen distinto número de cromosomas, por ejemplo la raza *przewalskii* ( $2n=66$ ) (Benirschke et al., 1965).

La familia equidae se forma por un solo género (*Equus*) que incluye el caballo, cebras y burros. Sin embargo, difieren en el número cromosómico diploide. Por ejemplo la cebra posee 32 cromosomas ( $2n=32$ ) y el patrón de bandas G difiere en gran manera con otros equinos, el caballo doméstico (*equus caballus*  $2n=64$ ) o el caballo salvaje *przewalskii* ( $2n=66$ ) (Ryder et al., 1978). Los cariotipos de *E. przewalskii* y *E. caballus* difieren en una translocación; además varias translocaciones, fusiones en tándem e inversiones forman parte de las diferencias evolutivas entre los cariotipos de caballos y cebras (Yang et al., 2004).

Los centrómeros son estructuras caracterizadas por la presencia de ADN satélite altamente repetitivo. Regularmente el centrómero de los cromosomas no tiñe, sin embargo al obtener el genoma equino se observó la tinción de un centrómero en el cromosoma 11 capturado en un estado inmaduro. Posteriormente se identificó que el género *Equus* ha mostrado varios cambios centroméricos por reposicionamiento. Ya que el caballo es la única especie que lo posee, sugiere que es evolutivamente nuevo (Wade et al., 2009a).

La identificación cromosómica ha intentado ser perfeccionada a través de los años en caballos, los patrones de bandeo en metafase temprana (350 bandas) y en prometafase (500 bandas) se realizaron por primera ocasión en el 2002 con bandas G y bandas R (Iannuzzi et al., 2003).

Distintas patologías han sido identificadas por medio de cariotipos anormales en yeguas y sementales (Moncaleano et al., 2007). La pérdida embrionaria temprana es un problema de importancia en yeguas que puede acarrear anomalías cromosómicas. Al ser estudiada esta patología en yeguas de raza Thoroughbred los cariotipos mostraron translocaciones 64,XX,t(1;21), 64,XX,t(16;22) y 64XX,t(4;13) (Lear et al., 2008). Anomalías del desarrollo sexual que provocan infertilidad en caballos se han analizado desde los años 70's por medio de citogenética convencional (Bandas G y C) desde individuos fenotípicamente normales hasta animales con ambos órganos sexuales (Lear y McGee, 2011).

En Polonia se realizó el cariotipo de 500 caballos para identificar anomalías, donde una yegua mostró quimerismo (64,XX/64,XY), ocho presentaron aneuploidías cromosómicas sexuales (una de línea pura 63,X y siete formas mosaico 63,X/64,XX), además observó una yegua con aneuploidía autosómica con mosaicismo (64,XX/65,XX,+31) (Bugno et al., 2007).

### **1.7. Justificación del trabajo**

El tamaño corporal es un rasgo cuyas razones no han sido dilucidadas en animales domésticos. En contraste con el humano, pocos genes pueden explicar

la variación de talla. La amplificación y secuenciación del *locus* GH y regiones flanqueantes en el caballo miniatura americano brindará una primera aproximación genómica para saber si éste determina en parte la talla corporal en el caballo miniatura. El enfoque de genómica comparativa con respecto al caballo de talla regular nos permitirá valorar todos los elementos del *locus* GH que puedan diferir con su contraparte de talla regular para inferir si las alteraciones encontradas difieren ya sea en la forma de la proteína final, en los elementos moduladores de la expresión, o en señalización. El gen GH no ha sido caracterizado en especies miniatura, por lo que éste será el primer reporte de su secuencia y su comparación con especies de talla regular.

El presente estudio es el primero de su tipo a nivel nacional al analizar la talla corporal en especies miniatura desde un abordaje molecular. Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación proporcionan información suficiente para la publicación de al menos dos artículos científicos en revistas internacionales, además se realizará el primer reporte de una secuencia del gen GH con sus sitios polimórficos potenciales de una especie miniatura al GenBank.

La información generada con este trabajo podrá ser la base de investigaciones futuras en relación a la importancia funcional de los hallazgos de este estudio.

### **1.8. Hipótesis**

Existe diferencia en el *locus* GH de caballos miniatura comparado con el de caballos de talla regular, ya sea en su unidad transcripcional o en sus elementos reguladores de la expresión que puedan explicar una parte del carácter del tamaño en individuos miniatura.

## **CAPÍTULO II: OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL.**

Comparar el *locus* GH y regiones adyacentes de caballos de raza miniatura americano con el caballo de talla regular para identificar diferencias relacionadas al tamaño corporal y obtener el cariotipo de las tres yeguas de estudio.

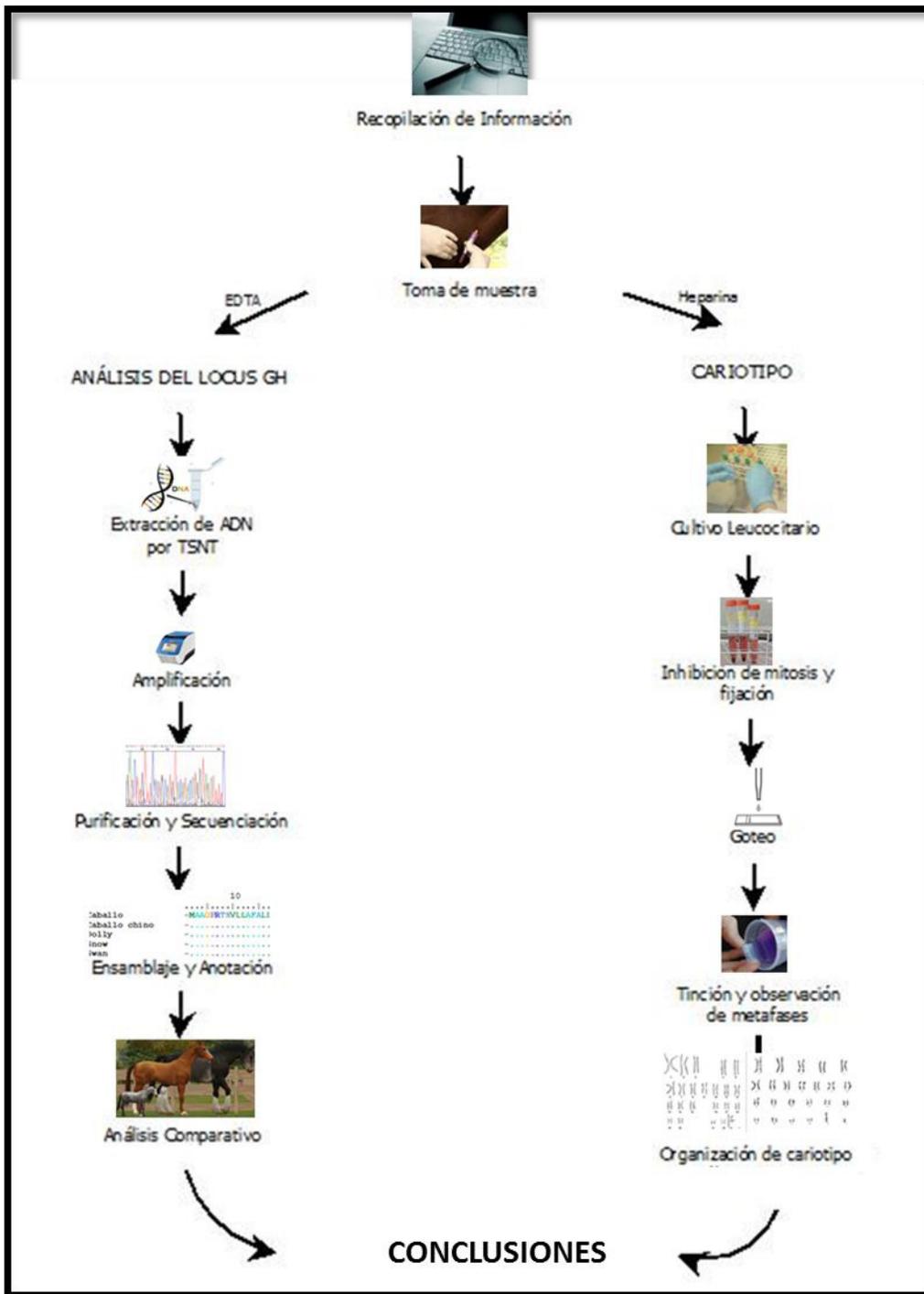
### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Amplificar mediante PCR el gen GH y regiones flanqueantes del genoma en el AMH.
2. Secuenciar y ensamblar la región genómica amplificada.
3. Anotar la región genómica ensamblada del *locus* GH.
4. Comparar los *loci* GH de caballo miniatura y caballo de talla regular.
5. Obtener los cariotipos de las yeguas miniatura del estudio.

## **CAPÍTULO III: ESTRATEGIA GENERAL**

La estrategia general para llevar a cabo el presente trabajo se basó en dos perspectivas: el análisis molecular del *locus* GH y el estudio cromosómico de los caballos miniatura. En la primera etapa se recopiló literatura sobre ambos abordajes. Posteriormente se recolectaron las muestras biológicas de tres yeguas miniatura con anticoagulante EDTA para la extracción de ADN por el método TSNT. En base al caballo Thoroughbred se realizó el diseño de las parejas de oligonucleótidos específicos para amplificar la región de interés y se ensayaron las reacciones para la amplificación de los tres fragmentos en los que se dividió la región. Los productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciación por duplicados, triplicados o cuantas veces se requirió para cubrir la región de forma completa. Las secuencias obtenidas para cada individuo fueron ensambladas y se

realizó la anotación estructural de cada secuencia consenso de los tres individuos de estudio. Por último, se realizó el análisis comparativo de los intrones, exones, sitios polimórficos potenciales, elementos móviles, sitios de unión a factores de transcripción y otros elementos identificados del caballo miniatura con el caballo de talla regular. Mientras se llevaba a cabo el análisis molecular en paralelo se estudió el cariotipo de las tres yeguas miniatura. Para ello se recolectó sangre con anticoagulante heparina para el cultivo leucocitario, luego los leucocitos fueron cosechados y posteriormente se realizó el goteo en una laminilla con solución fijadora para realizar la técnica de tinción de Giemsa (Bandas G y C) y así observar las metafases para ordenar el cariotipo y compararlo con el caballo de talla regular. Los resultados de ambos abordajes fueron analizados complementariamente para plantear hipótesis que pudieran explicar los hallazgos principales de esta investigación relacionada a la talla corporal. La estrategia se esquematiza en la figura 2.



**Figura 2.** Estrategia general. Para el análisis del *locus* GH comprendió las etapas de extracción de ADN, amplificación, secuenciación, ensamblaje y anotación. Para el cariotipo se realizó cultivo leucocitario, inhibición de mitosis, fijación, goteo, tinción y organización del cariotipo.

## **CAPÍTULO IV: MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Origen de los reactivos**

Los reactivos utilizados en este trabajo para la preparación de las soluciones de trabajo, cultivo, reacciones de PCR y geles provinieron de distintas compañías especializadas en materiales químicos de laboratorio.

Los materiales de punción, colección y cultivo de sangre periférica se obtuvieron de Becton, Dickinson and Company (BD) (Franklin Lakes, NJ, EUA). Las soluciones y los medios de cultivo leucocitario se adquirieron de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), PAN Biotech (Aidenbach, Alemania), Biopack (Buenos Aires, Argentina), QCA Química Clínica Aplicada (Amposta, España).

Los reactivos utilizados para la extracción del ADN genómico por la técnica de TSNT provenían de Sigma-Aldrich Chemical Company (St, Louis, MO, EUA). Para la amplificación por PCR se utilizó Master Mix de Promega Corporation (Madison, WI, EUA), los oligonucleótidos se enviaron a sintetizar a IDT Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA)

#### **4.1.2. Material biológico.**

Tres hembras adultas de raza *American Miniature Horse* fueron utilizadas como individuos de estudio. Las yeguas se encontraban sanas y al corriente en su calendario de salud preventiva, sin signos aparentes de ninguna enfermedad. Adicionalmente se realizó el mapa citogenético de las mismas, para descartar anomalías cromosómicas que influyeran en su fenotipo o su fertilidad. Las características de los individuos de estudio se muestran en la tabla 3 y en la figura 3.

**Tabla 3.** Características de los individuos de estudio.

N°	Nombre	Sexo	Edad	Fecha de nacimiento	Estatura	Color
1	AF Snow Showers	H	3 años	27/02/12	29"	Negro apaloosa
2	AF Black Swan	H	4 años	09/03/11	32"	Negro
3	Kahoka Sorrel Classic Doll	H	14 años	12/06/01	32.75"	Alazán



**Figura 3.** Individuos de estudio. Fotografías mostrando el fenotipo de las tres yeguas AMH de estudio al momento de medir su estatura con la regla oficial de la Asociación.

Previa limpieza del área con alcohol se colectó sangre periférica por punción yugular de las tres yeguas en tubos vacutainer con anticoagulante EDTA para el aislamiento genómico y con anticoagulante heparina para realizar el cariotipo de los mismos individuos.

#### 4.2. Equipo

Dependiendo de sus requerimientos, los reactivos y material biológico se almacenaron en un colgador marca TorRey de -20°C (Monterrey, N.L, México) o en un ultracongelador de -70°C de *So Low Enviromental* (Cincinnati, OH, EUA). La balanza granataria fue de la marca *Sartorius* modelo 1206 MP (Göttingen, Alemania), se utilizó un horno de microondas *GoldStar* modelo MA-875M, una

microcentrífuga Eppendorf modelo 5415 C (*Brinkmann Instruments*, Inc. NY, EUA) y un vórtex *Barnstead Thermolyne* modelo Maxi Mix (Bubuque, IA, EUA), un *termomixer* Eppendorf (Westbury, NY, EUA). La electroforesis en geles de agarosa se realizó en cámaras *Thermo EasyCast™* B1A y B2 con una fuente de poder BRL 500 (GIBCO-BRL). Para la documentación de la imagen de los geles se utilizó un fotodocumentador UVP *Mini Darkroom de Bioimaging Systems* (Upland, CA, EUA). Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador modelo *Veriti* de *Applied Biosystems* (Foster City, CA, USA). La purificación y secuenciación del material se realizó en Macrogen USA (Rockville, MD, USA). El procesamiento de los datos y los análisis bioinformáticos fueron realizados en computadora portátil HP Pavilion g4 con sistema operativo Windows.

Para obtener el cariotipo se utilizó un microscopio modelo *Primo Star* marca Zeiss (Jena, Alemania) y una cámara digital adaptada al microscopio modelo AxioCam ERc5s de la misma marca.

#### **4.2.1. Programas computacionales**

Los programas bioinformáticos para el análisis molecular fueron: Oligo versión 7.57 de *Molecular Biology Insights* (Inc. Cascade, CO, EUA) y *Amplify* versión 3.0 (Universidad de Wisconsin, WI, EUA) para el diseño y evaluación de los oligonucleótidos. Para rectificar la extracción del ADN y la determinación de los tamaños amplificados se utilizó el software *LabWorks* versión 4.5.00.0 (*Media Cybernetics*, Inc. Rockville, MD, EUA.). El programa *GeneStudio Free Molecular Biology Software* versión 2.2.0.0 permitió realizar el ensamble de las secuencias obtenidas. El editor de alineamientos de secuencias Bioedit (*Ibis Biosciences*, Carlsbad, CA, EUA) fue la plataforma indispensable para los alineamientos y la traducción de secuencias nucleotídicas. Las figuras se realizaron en el programa *Dia* (Steffen Macke, 1997) y en *SnapGene* (*GSL Biotech* LLC, Chicago, IL, EUA).

Los programas bioinformáticos utilizados vía Internet fueron el *BLAST* disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, *ClustalW* accesible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/> , el programa de predicción de genes

*Genescan* disponible en <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>. (Standford University, USA), *Repeatmasker* (Smith, AFA., Hubley, R. y Green, P., 1996-2004) se utilizó para la identificación de elementos repetitivos fue utilizado en <http://www.repeatmasker.org/>. La plataforma de libre acceso de elección para la predicción del promotor y el sitio de inicio de la transcripción fue *Neural Network Promoter Prediction* versión 2.2 [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

### **4.3. Métodos.**

#### **4.3.1. Análisis del *locus* GH**

##### **4.3.1.1. Extracción de ADN genómico.**

El ADN genómico fue extraído por la técnica TSNT a partir de sangre completa colectada en tubos vacutainer con EDTA. Este método consistió en agregar 200  $\mu$ L de buffer de lisis TSNT (2% Tritón X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL pH= 8.0) a un tubo eppendorf de 2ml con 500  $\mu$ L de muestra sanguínea. Se mezcló por inversión durante 1 min y se agregaron 500  $\mu$ L de fenol saturado, mezclando perfectamente por inversión. Una vez que la muestra se observó color “café chocolate” homogéneo se adicionaron 100  $\mu$ L de Sevag y se mezcló por inversión perfectamente para posteriormente agitar en vórtex durante un min o hasta observar el contenido sin grumos. Luego fueron agregados 200  $\mu$ L de TE y se mezcló por inversión. Los tubos se centrifugaron durante 5 min a 14,000 rpm y la fase acuosa fue recuperada y transferida a un nuevo tubo eppendorf de 2ml.

Para precipitar el ADN fueron agregados 2 volúmenes y medio de etanol al 96% a cada tubo y se mezcló por inversión hasta observar la precipitación del material en forma de hebra blanquecina, posteriormente los tubos fueron centrifugados nuevamente durante 5 min a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Para lavar la pastilla de material genómico se agregó etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó como el paso anterior, por último el sobrenadante fue decantado y la pastilla se dejó secar al aire hasta que no se observaron restos de etanol.

Las pastillas obtenidas para cada individuo fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de TE y se dejaron en agitación de 350 rpm a 55°C durante toda la noche. La cantidad y calidad del material genómico fue evaluada por espectrofotometría y por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

#### **4.3.1.2. Diseño de oligonucleótidos.**

Debido a que en la literatura no se encontraron oligonucleótidos para amplificar el gen GH en caballos miniatura, se decidió realizar el diseño de parejas de oligonucleótidos con base a la secuencia reportada en el GenBank para el gen GH1 del caballo de talla regular (Acceso # NC\_009154.2). Previamente, un alineamiento en el programa de secuencias reportadas en el GenBank para GH en distintas especies domésticas fue realizado en el programa BioEdit con la plataforma *ClustalW*, tomando el cerdo y la cabra como especies comparativas. Una vez obteniendo el alineamiento gráfico, se consideró que la secuencia de hibridación fuera en las regiones más conservadas del alineamiento, intentando obtener los pares más específicos a la hormona de crecimiento en más de una especie de referencia.

Para el diseño de los oligonucleótidos se tomó la secuencia reportada para el gen GH1 del caballo de talla regular y 1500 pb de las regiones flanqueantes (5' y 3'), obteniendo una secuencia base para diseño de 4683 nucleótidos. Se pretendió diseñar 3 parejas de oligonucleótidos para amplificar la región seleccionada, mismos que debían sobrelapar uno sobre otro para evitar perder regiones al momento de amplificar y de obtener la secuencia final (ver figura 4). Otra de las características deseadas fue elaborar oligonucleótidos que fueran compatibles con su pareja y con los oligonucleótidos restantes así en caso de obtener resultados de interés en alguna sección específica podremos amplificar solamente el fragmento que incluya dicha secuencia o combinar los oligonucleótidos en la manera que sea necesaria para amplificar cualquier región deseada.



**Figura 4.** Estrategia para el diseño de oligonucleótidos. Las flechas horizontales representan los oligonucleótidos e indican dirección y las líneas horizontales el amplicón que cubre cada par. En morado se identifica el par 1, en rosa el par 2 y en azul el par 3.

El diseño fue realizado con el programa *Oligo7 Primer Analysis Software*. Las condiciones de los oligonucleótidos como temperatura de alineamiento, presencia de *loops*, y una predicción del comportamiento de los mismos en la PCR fueron evaluadas con el mismo *software*, así se eligieron los pares más compatibles a la reacción.

Una vez diseñados los oligonucleótidos, se probaron en la aplicación *BLAST* del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) para confirmar que hibridara en el gen de la hormona de crecimiento en caballos, e identificar y evitar sitios no deseados de hibridación. Posteriormente, se realizó una PCR *in silico* con todos los oligonucleótidos en el programa *Amplify* para evaluar la reacción previo al ensayo *in vivo* y analizar si la hibridación de los mismos en el gen GH1 era la más conveniente para la amplificación del fragmento deseado o se podía mejorar el diseño.

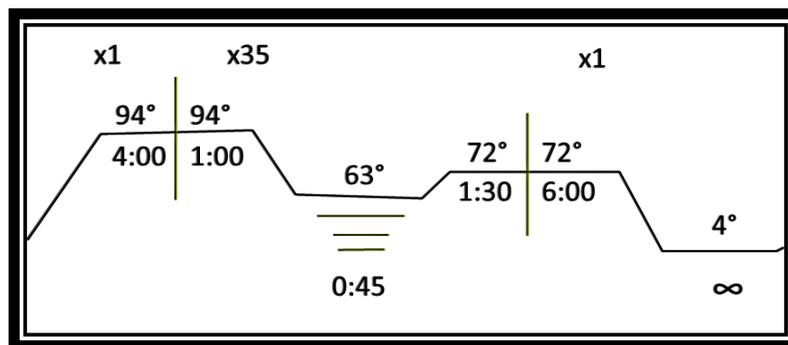
#### 4.3.1.3. PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen total por reacción de 25  $\mu$ L, de los cuales 12.5  $\mu$ L eran de *Master Mix* (ADN *Taq* polimerasa

(0.05U/μL), buffer de reacción, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4mM de cada dNTP), 2 μL de material genómico (100ng/ μL), 1 μL de cada oligo (5 μM) y el resto de agua grado biología molecular. Ensayos de prueba fueron realizados en caballos de talla regular (de raza cuarto de milla), pertenecientes a un biobanco creado en un estudio previo, el cual consta del material genético almacenado a -80°C de 50 individuos de raza cuartos de milla y 50 individuos AMH.

La técnica se estandarizó por reacciones en bloques, con la función *VeriFlex*, del termociclador *Veriti 96* (*Applied Biosystems*, California, USA). Con esta función en un solo ensayo se amplificaron los 3 fragmentos deseados. Las temperaturas de alineamiento se eligieron en base a la aproximación dada por el programa de evaluación *Oligo 7* previamente mencionado.

En base a la longitud de los fragmentos y la temperatura de alineamiento sugerida, el programa elaborado fue el siguiente: Un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 4 min; seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, 45 segundos de alineamiento (con la temperatura sugerida para cada par) y 1:30 min de extensión a 72°C; por último se agregó un paso final de extensión durante 6 min a 72°C. Se programó el termociclador para mantener una temperatura de 4°C al final del programa por tiempo indefinido hasta ser controlado por el técnico. El programa se esquematiza en la figura 5.



**Figura 5.** Protocolo de PCR para el *locus* GH en caballos miniatura. Esquema del programa utilizado en el para la amplificar los tres fragmentos del *locus* GH. Las líneas que decrecen señalizan gradiente de temperaturas (63°C decreciendo según el bloque). ∞ Denota tiempo infinito.

Una vez cumplido el programa en el termociclador, la amplificación de la banda esperada para cada par fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 5 µL de bromuro de etidio (0.01mg/µL); aplicando 80 V por 10 min seguido de 100 V durante 40 min o hasta que el colorante avanzara a  $\frac{3}{4}$  del gel. Transcurrido el tiempo, se observó bajo la luz UV en el transiluminador y se realizó la captura de la imagen.

#### **4.3.1.4. Secuenciación.**

Los productos amplificados de las reacciones de PCR fueron etiquetados, sellados, y enviados mediante paquetería internacional al laboratorio MacroGen USA (Rockville, MD, USA) requiriendo sus servicios externos de purificación y secuenciación de los productos. Las reacciones de PCR se secuenciaron en repeticiones variables para cubrir cada nucleótido de la secuencia mínimo tres veces por fragmento. Si bien algunas regiones traslapaban otras mostraron dificultad para obtener una secuencia viable, por ello algunas regiones se enviaron más de tres reacciones para obtener secuencias consenso final sin dudas.

#### **4.3.1.5. Ensamblaje.**

El programa de análisis de secuencias **GeneStudio Free Molecular Biology Software** es un paquete bioinformático profesional de libre descarga muy completo, el cual posee 3 funciones principales: Convertidor de formato de archivos de secuencias, editor de alineamiento y editor de ensamblajes.

El editor de ensamblajes es el apartado donde se importan las secuencias en distintos formatos, ya sea Fasta o .ab1 y por medio de algoritmos ensambla esas secuencias en base a una secuencia de referencia, adicionalmente permite editar y eliminar los errores de secuenciación mientras se observa el electroferograma para confirmar si es un error de lectura o no se pudo cubrir esa región al secuenciar.

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, se utilizó el apartado “editor de ensamblajes” para ensamblar todas las secuencias en base a la referencia del caballo de talla regular y formar una secuencia consenso para la secuencia del *locus* eGH (Hormona de Crecimiento equina) miniatura. Las secuencias fueron importadas en formato .ab1, con parámetros de astringencia media para ser más permisivos en caso de presentar errores de lectura que limitaran la calidad del ensamblaje. Las regiones iniciales y finales de las reacciones fueron eliminadas si mostraban mala calidad, y toda la región ensamblada fue revisada y editada manualmente en caso de existir errores de lectura a través de las secuencias. Se creó una secuencia consenso general para la eGH miniatura. Posteriormente, tomando ahora ésta secuencia consenso general (nombrada por fines prácticos “eGH mini”) como referencia, se ensamblaron individualmente los fragmentos secuenciados de Dolly, Snow, y Swan para obtener las tres secuencias finales y realizar una comparativa tanto entre razas como entre individuos de la misma raza. Todas las secuencias ensambladas fueron revisadas manualmente prestando especial atención a las regiones donde se localizaron potenciales sitios polimórficos con el objetivo de eliminar errores donde el programa marcara una diferencia, sin embargo fueran errores de lectura, así cada nucleótido dudoso fue analizado y corregido manualmente en base a los picos observados en el electroferograma.

Las secuencias finales fueron sometidas a distintos programas bioinformáticos de libre acceso para analizar la anatomía génica y realizar la anotación de las mismas. Asimismo, se analizó la secuencia del caballo de talla regular para finalmente realizar la comparación de todos los elementos descritos en cada una de las secuencias y así concluir las diferencias entre ellas.

#### **4.3.1.6. GeneScan.**

El primer análisis se realizó en el programa de libre acceso *GeneScan* (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) desarrollado por el instituto *MIT* de la Universidad de Stanford. Es un modelo de predicción de la estructura de

secuencias genómicas de una amplia gama de especies. Este programa predice elementos básicos de la transcripción, traducción, distribución y longitud de intrones y exones, además de la región codificante y otros factores estructurales. Se ha mencionado que la precisión de este programa es más alta que otros programas, con un 80% de exactitud en la identificación de exones humanos (Burge and Karlin, 1997).

Por las características mencionadas, éste fue el programa de elección para la predicción de algunos elementos anatómicos de la región secuenciada. Las secuencias consenso para cada individuo fue sometida a un análisis en la plataforma en línea, prediciendo las posiciones de los exones (por lo tanto, intrones también), la región codificante del ADN y su secuencia de aminoácidos.

Para la predicción, se accedió a la página principal del programa. Se seleccionó la opción de organismo “Vertebrado” y una astringencia muy limitada fue elegida, siendo el rango de predicción de 1.00. Posteriormente la secuencia fue pegada en la casilla de análisis en formato FASTA y se dio el comando de ejecución para el análisis de la secuencia. El mismo procedimiento fue realizado para los tres individuos de estudio y para el caballo de talla regular, cuya anotación ya se encuentra descrita en el GenBank, por lo tanto se revisaron los resultados del programa y se analizó la localización de los elementos manualmente para dilucidar la precisión del programa.

#### **4.3.1.7. Bioedit.**

Este programa es un editor de secuencias y alineamientos de ADN, ARN y aminoácidos que se encuentra a libre acceso en la red para su descarga gratuita. Es una plataforma amigable y sencilla, pero muy completa que cuenta con la opción de ingresar a *BLAST* del NCBI para el análisis de secuencias; también se enlaza con muchas bases de datos relacionadas a predicción de promotores, *splicing*, proteómica, vectores, mapas de restricción, entre otros. Además posee herramientas para crear mapas filogenéticos (Hall, 2001).

Adicionalmente, esta plataforma trabaja con el programa *Clustal W*, que es una herramienta indispensable en la biología molecular para realizar alineamientos de múltiples secuencias nucleotídicas y aminoácidas. Estos alineamientos son necesarios para diseñar oligonucleótidos en regiones más conservadas y funcionales, o para analizar y comparar patrones de secuencias de ADN o aminoácidos entre especies y así identificar si existe homología entre proteínas de una misma familia. Además para saber si las diferencias encontradas impactarán en alguna característica importante del gen (Thompson et al., 1994).

Por lo tanto, una vez obtenida la secuencia del *locus* GH para cada uno de los individuos en el programa *GeneStudio*, y después de someterlas a la plataforma *GeneScan* para identificar sus elementos y realizar la anotación de su anatomía. Las secuencias nucleotídicas incluyendo la del caballo de talla regular, fueron importadas a BioEdit para realizar un alineamiento con las mismas. El programa genera un archivo nuevo es con las secuencias alineadas. Este archivo se exportó en formato compatible con *Microsoft Word* y en este complemento de *Office* se corrigieron manualmente los errores no detectados por el programa y se realizó manualmente un análisis comparativo de los individuos miniatura y de talla regular. Las diferencias encontradas entre las 2 razas fueron identificadas y anotadas en el archivo.

#### **4.3.1.8. RepeatMasker.**

Es una plataforma en línea que identifica elementos móviles del genoma a través de secuencias genómicas en base a la librería de elementos repetitivos del mismo programa "*Repbase*" o a la base de datos *Dfam* y arroja los resultados de las regiones repetitivas ocultas. El procedimiento de análisis se basa en adjuntar el archivo o pegar la secuencia en la página en formato FASTA, luego se selecciona uno de los cuatro buscadores que puede utilizar la plataforma: *aablast*, el cual es rápido pero un poco menos sensible que los demás; *rmblast* es una herramienta compatible con el conjunto de herramientas del *BLAST* del NCBI; *hmmmer* utiliza el programa homónimo para analizar secuencias, sin embargo éste se limita a

secuencias humanas; por último se encuentra la opción *cross\_match* que es la opción con mayor sensibilidad y precisión que las otras tres, sin embargo el análisis es más lento. Posteriormente se selecciona la velocidad/sensibilidad con que se desea realizar el análisis donde a mayor rapidez, menor sensibilidad. Por último se elige la procedencia del ADN, si no se encuentra la especie se puede limitar a la selección de “vertebrado”, “mamífero” u “otro”.

El análisis se llevó a cabo pegando la secuencia en formato FASTA directamente en la página y como base de búsqueda fue seleccionado *cross\_match* en la velocidad más lenta para una mayor sensibilidad. Debido a que en la lista no se localizó la especie equina se seleccionó como fuente de ADN “mamífero”. Se requirió que los resultados del análisis fueran enviados por correo electrónico para ser almacenados en nuestros archivos de programas bioinformáticos. El mismo procedimiento fue realizado para el caballo de talla regular, Snow, Swan y Dolly.

#### **4.3.1.9. Análisis del promotor.**

La ubicación del promotor en conjunto con las secuencias reguladoras presentes se identificaron con el programa disponible en línea denominado *BDGP: Neural Network Promoter Prediction* ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)) y manualmente en base a un alineamiento en el programa BioEdit de la región 5' río arriba del codón de inicio (ATG) de las secuencias de las yeguas miniaturas y el caballo de talla regular.

Además, la identificación de elementos reguladores en la región 5' se realizó manualmente en base a artículos donde se analizan y describen sitios de unión a factores de transcripción en distintas especies no primates, principalmente de ungulados del grupo de los artiodáctilos y cetartiodáctilos (Wallis, 2008; Wallis et al., 2006; Wallis et al., 2005). Los elementos fueron resaltados en un alineamiento realizado en BioEdit y comparados entre ambas razas de caballos.

Distintos alineamientos fueron realizados en la sección de resultados con el fin de mostrar de manera gráfica los cambios encontrados en todos los elementos de las secuencias.

#### **4.3.2. Cariotipo.**

##### **4.3.2.1. Siembra.**

Cada muestra sanguínea en anticoagulante heparina fue sembrada para el crecimiento leucocitario.

En un tubo cónico estéril que contenía 5ml de medio de cultivo comercial *PB Max* (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA*) se agregaron 500  $\mu$ L de la muestra sanguínea de los individuos de estudio. Este medio contiene los elementos indispensables para el crecimiento leucocitario óptimo (suero fetal bovino, L-glutamina y fitohemaglutinina). Posteriormente los tubos se colocaron de forma inclinada y ligeramente desenroscados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 72 horas.

##### **4.3.2.2. Cosecha.**

Para detener la división celular cada tubo se le adicionó 100  $\mu$ L de colchicina (*Colcemid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente durante 40 minutos a 37°C.

Los tubos se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min. El sobrenadante fue retirado y se agregaron 6 ml de solución hipotónica (KCl 0.075M). Los tubos se incubaron a 37°C durante 40 min. Se realizó una etapa de prefijación agregando 0.5 ml de solución fijadora (alcohol metílico 3:1 ácido acético) mientras se agitaba vigorosamente en vórtex. Posteriormente se centrifugaron por 10 min a 1,200 rpm. Se retiró el sobrenadante y el lavado con solución fijadora se repitió hasta que el sobrenadante se observó cristalino. El botón celular se resuspendió en 500  $\mu$ L de solución fijadora.

#### **4.3.2.3. Goteo.**

En una laminilla limpia, libre de grasa y previamente suspendida en alcohol etílico se goteó la suspensión celular. Las laminillas se dejaron secar y se mantuvieron por tres días en reposo (maduración) para posteriormente realizar la tinción para Bandas G y C.

#### **4.3.2.4. Tinción para bandas G.**

Las laminillas se sumergieron en una solución 2xSSC (SSC = cloruro de sodio 0.15 M y citrato de sodio 0.015 M) durante 60 min a 60°C. Después se enjuagaron en agua desionizada y se sumergieron durante 25 seg en una solución de tripsina al 1% a temperatura ambiente. Las laminillas se pasaron a una jarra de coplin con colorante Giemsa al 5% en buffer pH 6.8 durante 7 min y se enjuagaron en agua desionizada.

#### **4.3.2.5. Tinción para bandas C.**

Las laminillas fueron colocadas en una solución de HCl durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se mantuvieron durante 30 min a 40°C en una solución al 5% de Ba(OH)<sub>2</sub>. Posteriormente se colocaron en una solución 2xSSC durante 120 min a 60°C, y por último, para teñir las laminillas, fueron sumergidas en una solución de Giemsa al 2% durante 15 minutos.

Las preparaciones se observaron al microscopio óptico a una magnificación de 1000 aumentos. Al observar metafases de buena calidad se capturaron imágenes de las con una cámara digital adaptada al microscopio de modelo AxioCam ERc5s de la marca Zeiss (Jena, Alemania).

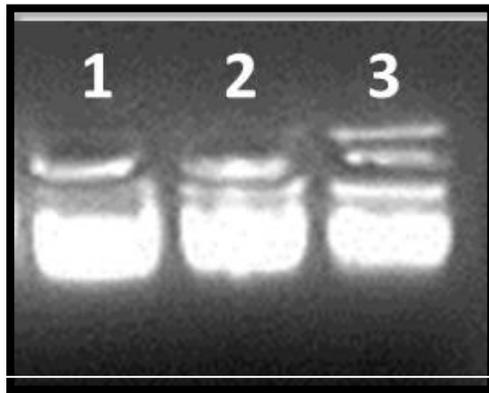
Los cromosomas fueron identificados y ordenados manualmente en base a imágenes de referencia obtenidas de una tesis previamente elaborada por la Facultad de Medicina Veterinaria, UANL. Posteriormente se analizó el patrón de bandeado.

## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### 5.1. Análisis del *locus* GH

#### 5.1.1. Extracción de ADN.

El método TSNT utilizado para la extracción nos brindó un buen rendimiento de material genómico, recuperando alrededor de 200 ng/ $\mu$ L con un volumen total de 100  $\mu$ L. La figura 6 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% comprobando la recuperación del material genómico.



**Figura 6.** Extracción de ADN. Comprobación de la recuperación de material genómico de los tres individuos de estudio. Donde 1=Dolly, 2=Snow, 3=Swan.

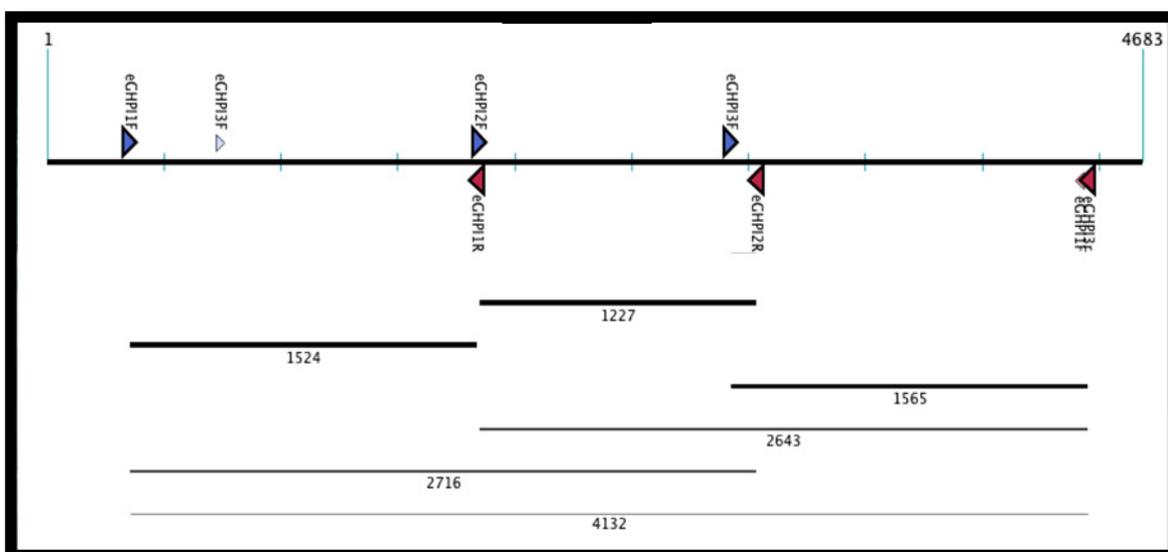
#### 5.1.2. Diseño de oligonucleótidos y PCR.

La secuencia de oligonucleótidos diseñada fue exitosa para la amplificación de los fragmentos del gen GH y regiones flanqueantes en el caballo miniatura y caballo de talla regular. Su secuencia se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen GH y regiones flanqueantes en caballos.

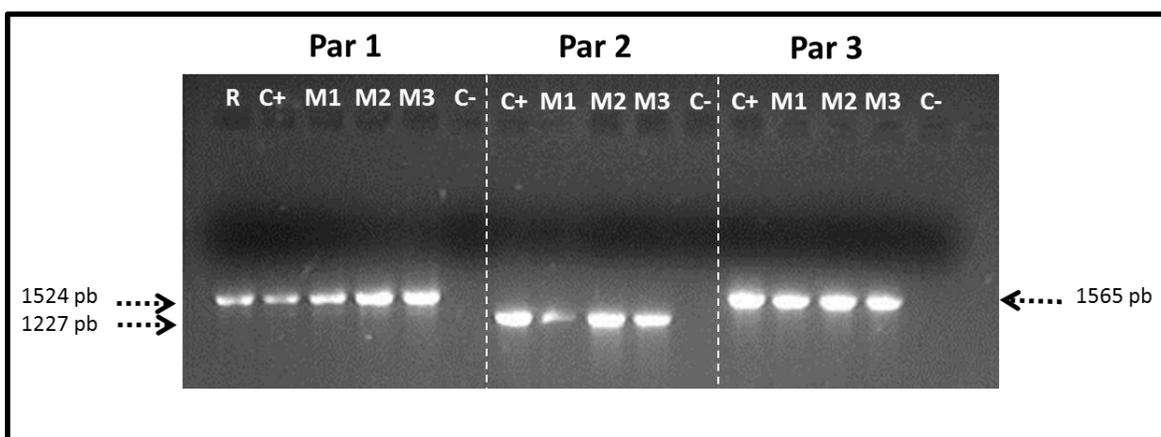
Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm Óptima
eGHPI1F	CAGAGCAAGCCAGTGCAAGTC	60.8°C
eGHPI1R	CAGCGTTGGCAAACAGGCTAGAC	
eGHPI2F	CGCCATGCCGTTGTCTAGCCTG	63°C
eGHPI2R	AAGCGGCGACACTTCATGACC	
eGHPI3F	GGCAGATCCTCAAGCAAACC	58°C
eGHPI3R	GCAAGGAAACCAGGTCTCAGGG	

Los oligonucleótidos diseñados fueron evaluados utilizando el programa **Amplify** para realizar una PCR in silico. Los parámetros arrojados por dicho programa predicen que el diseño fue exitoso y que ofrece la posibilidad de combinar los tres pares de oligonucleótidos para generar 6 fragmentos diferentes que abarcan la región de interés y proporciona ventajas para estudios posteriores. La figura 7 muestra cada oligonucleótido ser empatado exitosamente con su pareja y con los oligonucleótidos restantes.



**Figura 7.** PCR *In Silico* en Software *Amplify*. Las líneas muestran la región que abarca el amplificado y los números las pb de cada fragmento.

Las condiciones de la PCR se optimizaron para obtener una banda única evidenciable en la electroforesis en gel de agarosa. Tres pares de oligonucleótidos fueron usados exitosamente en más de una ocasión para enviar duplicados o triplicados de las reacciones para secuenciación. El par 1 amplificó 1524 pb, el par 2 amplificó 1227 pb y con el par 3 se obtuvo un producto amplificado de 1565 pb tal como fue predicho en el programa **Amplify**. En ninguna de las reacciones se observó la amplificación de fragmentos inespecíficos. En la figura 8 se muestran los 3 pares amplificando banda única.



**Figura 8.** Amplificación de los tres fragmentos superpuestos que conforman el *locus* GH del caballo miniatura. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Donde R es una referencia de peso molecular de 1524 pb. C+ se refiere a controles positivos (caballo de talla regular). M1= Dolly, M2= Snow, M3= Swan.

### 5.1.3. Secuenciación y ensamblaje.

Se recibieron los resultados de 57 reacciones de secuenciación, sin embargo 2 de ellas mostraron muy baja calidad y fueron excluidas del análisis. Por lo tanto, 55 secuencias fueron ensambladas utilizando el programa **GeneStudio** en primera instancia con el caballo de talla regular como referencia. De éstas, 16 reacciones provenían de Dolly, 19 reacciones de Snow, y 20 reacciones de Swan. Estos números fueron variables debido a que algunas regiones fueron secuenciadas con distintas repeticiones para cubrir toda la secuencia sin dudas.

La secuencia consenso obtenida al ensamblar todas las reacciones se nombró “eGH mini” resultando en una secuencia de 4048 nt. Posteriormente utilizando esta secuencia general como referencia se obtuvieron de forma independiente tres secuencias para el *locus* GH correspondiente a cada una de las yeguas miniatura del estudio. Las secuencias pueden ser encontradas en formato FASTA en el apéndice A.

#### 5.1.4. Análisis comparativo del *locus* GH.

Se encontraron diferencias en el *locus* GH de los caballos miniatura comparado con el caballo de talla regular tanto en la región no codificante 5' río arriba así como en el gen y también en la región no codificante 3' río abajo.

En base a las predicciones del programa **GeneScan** se identificó que los genes tanto del caballo de talla regular como de las yeguas miniatura poseen 5 exones y en consecuencia 4 intrones. La longitud del primer exón constó de 10 nt, el segundo exón de 161 nt, el tercer exón posee 117 nt, el cuarto exón tiene una longitud de 162 nt y el quinto exón mide 201 nt, siendo la longitud de los exones igual a los del caballo de talla regular. En relación a los intrones, se encontró que el intrón 1 en el caballo miniatura es más largo debido a una inserción de 7 nt que será descrita más adelante. En la tabla 5 se compara la longitud de intrones y exones del gen GH de las yeguas de raza miniatura y el caballo de talla regular.

**Tabla 5.** Tabla comparativa de la longitud de los intrones y exones del gen GH de caballos miniatura y de talla regular

Elemento	Caballo miniatura	Caballo talla regular
Exón 1	10 nt	10 nt
Intrón 1	253 nt	246 nt
Exón 2	161 nt	161 nt
Intrón 2	213 nt	213 nt
Exón 3	117 nt	117 nt
Intrón 3	199 nt	199 nt
Exón 4	162 nt	162 nt
Intrón 4	272 nt	272 nt
Exón 5	201 nt	201 nt

Al comparar ambas razas se identificó que a diferencia de la secuencia del caballo de talla regular, los individuos miniatura presentaron dos sitios con deleciones: la primera es de un solo nucleótido y se localizó en la posición -1116 donde el caballo de talla regular presenta C y las tres miniaturas presentan deleción del nucleótido. La segunda deleción se localizó de la posición -767 a la -764 donde el caballo de talla regular presenta la secuencia AAGC y está ausente en los individuos miniatura (Figura 9). Adicionalmente se observan inserciones en la secuencia de las yeguas miniatura en comparación con el caballo de talla regular, siendo la primera inserción una A en la posición -792 y la inserción de 7 nt GCCTCCG en el intrón 1 del gen (posición 224-230). Todos los cambios mencionados anteriormente sucedieron en regiones no codificantes. Sin embargo, la inserción de los 7 nt en el intrón 1 del gen GH en caballos miniatura sí provocó un cambio de longitud del mismo, pues el gen GH del caballo de talla regular tiene una longitud de 1581 nt y el de la raza miniatura es de 1588 nt debido a esta inserción. Todos estos cambios se muestran en el alineamiento de las tres secuencias individuales con el caballo de talla regular como referencia en la figura 9 y se esquematizan en la figura 10.

En toda la región secuenciada se identificaron 27 diferencias de nucleótido simple entre ambas razas de caballos. De las cuales 17 fueron localizadas en la región no codificante 5' río arriba, 4 cambios se identificaron en el gen (2 en intrones y 2 en exones) y 6 cambios ocurrieron en la región no codificante 3' río abajo. Las diferencias se identifican en la figura del alineamiento (Ver Figura 9).

Adicionalmente, tres sitios polimórficos potenciales se localizaron a través de la región secuenciada. El primero de ellos se identificó en la posición -746 (G/C) donde Dolly y Swan presentaron ambos alelos (heterocigoto) y Snow solamente G. El segundo sitio se localizó en la posición -736 (G/C) donde Dolly y Swan presentaron ambos alelos en unas secuencias y en otras sólo C, Snow solamente cuenta con el alelo C. El tercer polimorfismo se localizó en la posición +2934 y se trata de un polimorfismo (T/-). Las tres yeguas presentaron un alelo T/T y un alelo T/-.

	-1111	-1101	-1091	-1081	-1071	-1061	-1051	-1041	-1031	
Caballo	tctt	ctctgtaca	tggggcgataacacc	tccttca	caaga	tgtttgtgagggt	caaatgtgagaa	tgacaggca	tgctcat	cacagcc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-1021	-1011	-1001	-991	-981	-971	-961	-951	-941	
Caballo	tgataagttcta	tgtaaatataa	ataaaggaga	agaaaggagg	aggaggagac	taoggtgac	togagcaag	catcttc	caggggtctgt	
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
	-931	-921	-911	-901	-891	-881	-871	-861	-851	
Caballo	accttgagt	tocagttctg	gggacgagac	tcaagcct	tcacggtct	cttccaact	ttggggtctc	tgatggtg	gcaggcgg	tgggagg
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-841	-831	-821	-811	-801	-791	-781	-771	-761	
Caballo	aagcaact	tgtggctgt	gtctgttct	tgattctgat	tcttgtcca	agaaggactc	caaccta	aatgtggg	agtttgcc	aagc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-751	-741	-731	-721	-711	-701	-691	-681	-671	
Caballo	ccoggggggggg	ggggggggg	ggggagggc	ctgtgtggg	ctggtgc	cctctagt	ggttagt	gtcagc	cttca	tccagctgc
Dolly	..t.ct.....	C.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	..t.ct.....	C.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	..t.ct.....	C.....	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-661	-651	-641	-631	-621	-611	-601	-591	-581	
Caballo	aggccagacc	caagtgg	tggga	tggccg	caggatagt	gataaagg	tggaggt	ogcatctg	gagc	tgaactgggc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-571	-561	-551	-541	-531	-521	-511	-501	-491	
Caballo	tattgctct	ccttgcc	cccttcc	caacacaca	catctct	tgtgtgg	tgggtgga	gggagcag	tgcgggga	ggaggaa
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-481	-471	-461	-451	-441	-431	-421	-411	-401	
Caballo	aggaagg	ggtcagc	agagc	tccaagg	ccagcc	ctctgacac	agccctct	ttgggga	ccagg	ttgggac
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-391	-381	-371	-361	-351	-341	-331	-321	-311	
Caballo	caactcc	acagtgaga	tcc	tggcagag	caagcct	gaactcag	actata	ctccctt	tgcca	ctccccc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-301	-291	-281	-271	-261	-251	-241	-231	-221	
Caballo	ctctctg	gctgaga	ccctgt	gtgtaca	acctccc	agggctg	gtgacag	tgggga	gggga	agatgat
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	-211	-201	-191	-181	-171	-161	-151	-141	-131	
Caballo	gaggagc	gggtac	aggtag	tgggagg	gggttc	taata	ta	tocat	cagcag	ggccca
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

```

      -121   -111   -101   -91   -81   -71   -61   -51   -41
Caballo aa taggtggggccgaggggagagagaagga gcc tgggcataaaaaggccgcaggggacogattccagg tt cctaggacc cc agc tcc
Dolly
Snow
Swan

      -31   -21   -11   -1   10   20   30   40   50
Caballo caaaoggctcagggacctgtggacagctcacacaactgcgATGGCTCCAGgtaagggccctaaaa tcccctgggcttggcactactg
Dolly
Snow
Swan

      60   70   80   90   100   110   120   130   140
Caballo aggggtgacaggggcccctgcagatggatgacggcaactaacctgggcttggggctcc t gaa tgtgagca cagacattggccaagt tt
Dolly
Snow
Swan

      150   160   170   180   190   200   210   220   230
Caballo agaa tgc tctcagtccctgtgggaaggaggggga ggaagaagt tccctgagggaaggagaggtc tggcaggaga cc caggc
Dolly
Snow
Swan

      240   250   260   270   280   290   300   310   320
Caballo tctctgcccgcacacctccatgtgtttctctagGCCCTCGGACCTCCGTGC TCC TGGCTTTCCGCC TGCTCTGCCTGCCTGGCCTCAGG
Dolly
Snow
Swan

      330   340   350   360   370   380   390   400   410
Caballo ATGTGGGGCCCTTC CCGCCATGCCGTTGTC TAGCTGT TTTGCCAACGCTGTGC TCCGGGCCAGCACCTGCACCAAC TGGCTGCTGACA
Dolly
Snow
Swan

      420   430   440   450   460   470   480   490   500
Caballo CCTACAAAGAGTTTgtaagcttccagggtgggtgctc atgggggtggcaggaa ggggtgaattccogccgtgggaca taatgagaa
Dolly
Snow
Swan

      510   520   530   540   550   560   570   580   590
Caballo gaaa ctgacaagttcaggg ttattttatccaagcaga gctctctgg t gacataaa ctgagga ggggt tccaaagaatctogg t g at
Dolly
Snow
Swan

      600   610   620   630   640   650   660   670   680
Caballo gagaaccgtgcaaccagcttagaccocgggtgggg t tcttctccagGAGCCGGCTACATCCCGAGGGACAGAGATACTCGATCCAGA
Dolly
Snow
Swan

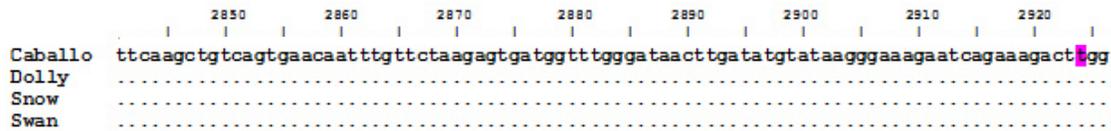
      690   700   710   720   730   740   750   760   770
Caballo ACCGCCAGGCTGCC TTTCTGCTTCTCCGAGACCATCCGGCCCCACGGGCAAGGATGAGGCCAGCAGAGATCTgtgagtgcc cctgc cc
Dolly
Snow
Swan

      780   790   800   810   820   830   840   850   860
Caballo aggaaga ggggctccctcttctaa gaaggccgcttctgcctccogggcccggggcccttg tccc taggtggcggagcagggcc
Dolly
Snow
Swan

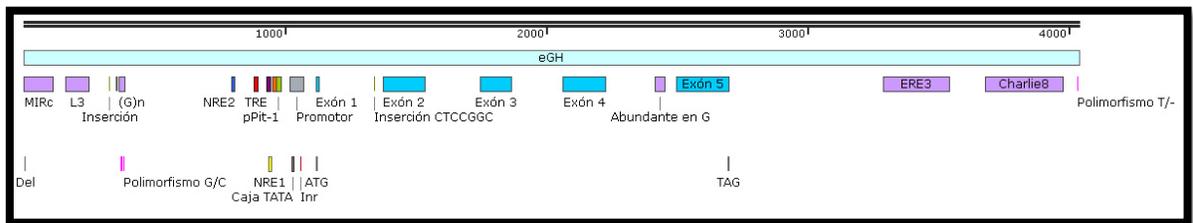
```

	870	880	890	900	910	920	930	940	950
Caballo	gagggtgtagggtaggggtaaggccogggcagagcggggcctagagcggctgcccogcctgcgcaaccactgogcccctccog								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Caballo	cagGACATGGAGCTGCTCCGCTTCGCTGCTGCATCCAGTCGTGGCTCGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTC TTCACCAACAGC								
Dolly	.....G.....								
Snow	.....G.....								
Swan	.....G.....								
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130
Caballo	CTGGTGT TTGGCACCTCGGACCGCTCTATGAGAAGCTGAGGGACCTAGAGGAAAGCATCCAGCCCCTGATCGCGgtgggatggcgtgtg								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220
Caballo	ogggcccccctcctgggtctggaggccccctctggccttagctgaggggtggggcctta ca ta ggc tgggaagacagatc to gac gcc								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310
Caballo	tctt t gtagctgtccagccctgaccaggaaagatctgactcttca tttccoctttgaaatccctcctgcccctctctaaagccogggag								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
Caballo	ggaaagtggaaa tggaggggaggagggaagcagcttgcaagtctogggcctcctcttctctctctctgagGAGCTGGAAGACG								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490
Caballo	GCAGCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAGTTGACACAAACTTGCGCAGTGATGATGC ACTGCTCAAGAACTACG								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580
Caballo	GGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGCTGAGACGTACCTGC GGGTCATGAAGTGTCCCGCTTCGTGGAAA GCAGCTGTG								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670
Caballo	CCTTCTAGtgc tgggttcctctgtta cccctcctcagtgccctctga tctctggagagtgc cctctagtgcctaccatcttctctaa								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
Caballo	taaaataaaattgc atogt at t g t c t g a g t a g g t g t g t t c t a t t c a g g a t g g a t g g g g c a g t a c g g g c a a g g g a c a g g t t g g g a a g								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850
Caballo	acaaacctgtaggga tcttg t g c c a t c t a t t g g g a a c c a a g a c a c t g a a c a a t a a c t g a c c a g t t c t c t c t g g g c t a g a a a g a a g c t g a c								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								

	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940
Caballo	acattcaactcctctctgttacacacccaagtcactcccccaggtcgggggccaat	ttgctgggcagtcataggtcaggaccacccacag							
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	1950	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2020	2030
Caballo	aaggtaactgggagcattcctctcccccacagcacaaccaccaaactaggctccaggagtgggatgaatgaagcaagacagg								
Dolly	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120
Caballo	ctatgaagtacagaagcaaaacaccccaca	tgcgagaaaacca	tgagagaattc	tagaattactct	tgtgcataaaatt	taagg	tgaa		
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200	2210
Caballo	taacacatgaggcccaactactctctgggaaatgggaa	cagoc	caaaaatggc	tttga	ggggccagag	tggtggc	acagc	agtt	agttgc
Dolly	.....	.....	a	.....	g	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	a	.....	g	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	a	.....	g	.....	.....	.....	.....
	2220	2230	2240	2250	2260	2270	2280	2290	2300
Caballo	acactocacttgggocgctgggg	ttccctggttcagatcc	gggtgcagac	cctatgca	ctgcttgccaag	tc	atgctgtggc	agg	tgctc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2310	2320	2330	2340	2350	2360	2370	2380	2390
Caballo	ccatata	taaagtagagga	agatgggcacagatgttagc	tcaaggccag	tcttctcag	caaaaagaggagga	ttggc	ggtagatgttag	
Dolly	.....	.....	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	g	.....	.....	.....	.....	.....
	2400	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480
Caballo	ctcagga	ttaatatccgcccccaaaaga	agaaaaatgg	tttgggcaaacaga	aaccagaatgt	ttgaga	tctgaact	aggaagtag	
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560	2570
Caballo	aaaagat	tctaaat	tgggggtgcaaat	tcagtgccaacaggtg	ccaggtagat	aa	ctacata	ogt	aatgaggattggatgtgaaggggt
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C
	2580	2590	2600	2610	2620	2630	2640	2650	2660
Caballo	aaatogcaactgacactcagc	ctcctggtgaggagacaacacagagga	atgggac	cacagcaacc	tgagaa	ctcaggcc	ccagc	taag	
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2670	2680	2690	2700	2710	2720	2730	2740	2750
Caballo	gagggg	ccogtcagc	tgcttccac	atcaaggctgcaggagc	agggctgccagag	tttctgattcttcaaga	cacacagg	at	ccagc
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	2760	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840
Caballo	ctttcatatgaaat	ctaat	ttttaa	catggcagc	taatt	caaactg	aaaaca	tttaagg	gcaaaaattaa
Dolly	.....	.....	.....	.....	.....	t	.....	.....	.....
Snow	.....	.....	.....	.....	.....	t	.....	.....	.....
Swan	.....	.....	.....	.....	.....	t	.....	.....	.....



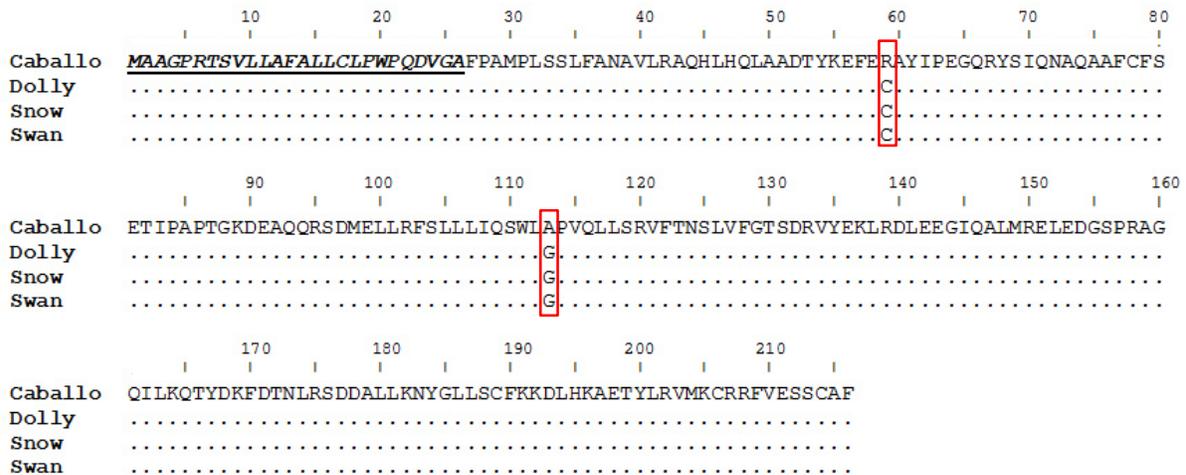
**Figura 9.** Alineamiento de la secuencia del *locus* GH del AMH con el del caballo de talla regular como referencia. (.) refiere coincidencia de nucleótido. En MAYÚSCULAS se muestran los exones. En minúsculas se representan las regiones no codificantes. Los codones de inicio y paro se marcan en amarillo. Las deleciones en la raza miniatura se muestran en verde y las inserciones en olivo. Los sitios polimórficos potenciales se identifican en rosa.



**Figura 10.** Anatomía del *locus* GH de equinos. Se identifican los elementos que forman la región secuenciada con un color distintivo.

La longitud de los exones (región codificante) no se mostró alterada por estas diferencias, siendo la región codificante de ambas razas de 651 nt. En cuanto a los dos cambios encontrados en la región codificante, el primero se localizó en el exón 3 (posición 641) donde el caballo de talla regular presenta C sin embargo se cambia por T en los individuos miniatura. La segunda diferencia identificada en la región codificante del gen GH se localizó en la posición 1003, la cual coincide en el exón 4 donde los caballos miniatura presentan G cuando el caballo de talla regular presenta C (Figura 9). Estas variaciones impactaron en la secuencia de aminoácidos de la proteína final, pues el caballo de talla regular se presenta una Arginina (Arg, R) en el aminoácido número 59 mientras que en las yeguas miniatura se presenta una Cisteína (Cys, C). El segundo cambio en la secuencia de aminoácidos ocurre en la posición 113: en caballo de talla regular se encuentra una Alanina (Ala, A) mientras que en el caballo miniatura se presenta una Glicina (Gly, G). La figura 11 muestra un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del

caballo de talla regular como referencia con la secuencia nucleotídica traducida a aminoácidos de las yeguas miniatura de estudio. Sin embargo los dos cambios de aminoácidos que modificaron la secuencia del caballo miniatura no coinciden con los sitios clave de unión de la proteína con su receptor.



**Figura 11.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la GH. (.) se refiere a nucleótido que coincide con la secuencia de referencia. El conteo de aa se observa en números pequeños sobre la secuencia. En negritas, subrayado y en *italicas* se encuentra el péptido señal. Encerrados en un rojo se localizan los sitios donde existieron cambios aminoacídicos.

### 5.1.5. Elementos repetitivos.

Seis elementos repetitivos fueron identificados en el programa bioinformático *RepeatMasker*, entre los cuales se incluyen las clases SINE, LINE y elementos de ADN. Tres de los elementos se localizaron en la región 5' río arriba, un elemento en el intrón 4 del gen y dos elementos en la región 3' río abajo. La tabla 6 resume los resultados en base a la información proporcionada por el programa. Las secuencias sometidas arrojaron resultados iguales tanto para las tres yeguas miniatura como para el caballo de talla regular, por ello se muestra una sola tabla.

**Tabla 6.** Elementos repetitivos del *locus* GH en caballos.

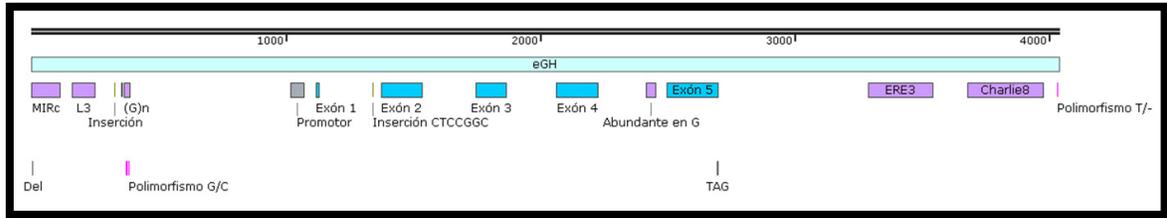
Clase/Familia	Tipo de elemento	Posición en el <i>locus</i>
<b>SINE/MIR</b>	MIRc	-1121 a -1110
<b>LINE/CR1</b>	L3	-358 a -871
<b>Repetición Simple</b>	(G)n	-753 a -728
<b>Baja complejidad</b>	Abundante en G	1305 a 1340
<b>SINE/tRNA</b>	ERE3	2177 a 2428
<b>ADN/hAT-Charlie</b>	Charlie8	2568 a 2836

Adicionalmente se identifican de manera gráfica los elementos móviles en el esquema de la figura 12 y en el alineamiento de la figura 13 donde se incluyen las secuencias finales obtenidas de las tres yeguas miniatura con el caballo de talla regular como referencia.

En el elemento MIRc de la raza miniatura se identificó una deleción de nucleótido simple: el caballo de talla regular presenta una C en la posición -1116 del *locus* y el caballo miniatura presenta deleción de este nucleótido (Ver figuras 12 y 13). El elemento L3 y la región abundante en G no presentan ninguna alteración entre ambas razas, este último es el único elemento presente en la región transcripcional, ubicándose en el intrón 4.

El elemento ERE3 sólo mostró un cambio nucleotídico entre ambas razas, pues el caballo de talla regular presenta A en la posición 2237 mientras que las miniaturas presentan G. Por último el elemento Charlie8 de la familia *hAT* también muestra sólo una diferencia en cuanto al caballo de talla regular en la posición 2794, donde el talla regular presenta A mientras que las miniatura presentan T.

El elemento repetitivo G(n) consiste en una región de 26 G en 26 con una A intermedia, sin embargo dicho elemento muestra una característica interesante, pues se sitúa en la región donde se localizaron dos de los tres sitios polimórficos potenciales del caballo miniatura en la posición -746 (G/C) y en la posición -736 (G/C).



**Figura 12.** Elementos repetitivos del *locus* GH y regiones adyacentes. Sobre la figura se muestra la escala de la región secuenciada. En color morado se marcan los elementos móviles de la región secuenciada. En azul se identifican las regiones codificantes. En gris se observa la región promotora. Los tres sitios polimórficos potenciales se remarcan en rosa



```

      -121   -111   -101   -91    -81    -71    -61    -51    -41
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo aa taggtggggccgaggggagagagaaggaagcctgggcataaaaagggccgcaggggacogattccaggttcctaggaccagctccc
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      -31    -21    -11    -1     10     20     30     40     50
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo caaaoggtctcagggacctgtggacagctcacacaactggcATCGCTCCAGGtaagcgccttaaaatcccctgggcttggcactactg
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      60     70     80     90    100    110    120    130    140
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo aggggtgacagggggccctgcagatggatgacggcactaacocctgggcttggggctcctgaaagtgagcagacatttggccaaagt
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      150    160    170    180    190    200    210    220    230
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo agaatgctctcagctccctgtggagagggggggaagaaagaagtctccctgagggaaggagaggtctggcaggagaaccaggc-----
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      240    250    260    270    280    290    300    310    320
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo tctctgcccggccacccctccatgtgtttctctagGCCCTCCGGACCTCCGTGCTCCGGCTTTCCGCTGCTCAGCCTGCCCTGGCCTCAGG
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      330    340    350    360    370    380    390    400    410
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo ATGTGGGCGCCTTC CCGCCATGCCGTTGCTAGCCTGTTGCCAACCGTGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAAC TGGCTGCTGACA
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      420    430    440    450    460    470    480    490    500
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo CCTACAAAGAGTTTgtaagcttccagggatgggtgctcctatgggggtggcaggaaaggggtgattccocgocgtgggacataatgagaa
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      510    520    530    540    550    560    570    580    590
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo gaaaactgacaagttcagggttattttatccaagogaagatgctctctggtgagcataaaactgaggagggttccaaagaatctcggtgat
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      600    610    620    630    640    650    660    670    680
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo gagaaccgtgaccagcttagaccocgggtggggttctttctccagGAGCCGGCCCTACATCCCGAGGGACAGAGATACTCGATCCAGA
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      690    700    710    720    730    740    750    760    770
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo ACGCCAGGCTGCC TTCTGCTTCTCCGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGGATGAGGCCAGCAGAGATCTgtgagtgccctgccc
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

      780    790    800    810    820    830    840    850    860
      |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Caballo aggaagaggggocctcctcttctaaagaagccoccttctgctccocgggcccgggggoccttgctccc taggtggcggagcagggcc
Dolly .....
Snow .....
Swan .....

```

	870	880	890	900	910	920	930	940	950
Caballo	gagggtgtagggtagcggggt aaggccogcgggcagagcggggcctagagcgggtgcccctgocctgcgcacccactgocccctccog								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
Caballo	cagGACATGGAGCTGCTCCGCTTCGCTGCTGCTCATCCAGTCTGGCTCGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTCTTCACCAACAGC								
Dolly	.....G.....								
Snow	.....G.....								
Swan	.....G.....								
	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130
Caballo	CTGGTGTTTGGCACCTCGGACCGGCTCTATGAGAAGCTGAGGGAACCTAGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCGGgtggggatggcgttg								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220
Caballo	cgggtcccccctcctcgggtcggaggccccctcggccttagctgaggggtggggcctta ca taggtggggaagacagatcctgacgccc								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300	1310
Caballo	ctttttagtagctgtocagcccgaaccaggaaagactgactcttca tttcccttttgaatccctccctgocctttctctaaagccgggaag								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
Caballo	ggaaaggtggaatggagggggaggggaggagcagccttgcaagtctoggcctctctttctccttctctctgcagGAGCTGGAAGAGC								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490
Caballo	GCAGCCCCGGGCTGGGCAATCCCAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGTGATGATGCACTGCTCAAGAACTAGC								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1500	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580
Caballo	GGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAGGCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCCCGCTTCTGGAAAGCAGCTGTG								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1590	1600	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670
Caballo	CCTTC <b>TAG</b> ctgctgggcttctcgtta cccctcctcagtgccctccttga tcttgagagtgcccctctagtgcctaccatcttctctaa								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1680	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750	1760
Caballo	taaaataaaattgcatogtatgtctgagtaggtgttgtctatccagga tggatggggcagta cggggcaaggga caggttgggaag								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								
	1770	1780	1790	1800	1810	1820	1830	1840	1850
Caballo	acaa cctgtaggga cttgtgcca cttatgggaaccaagacac tgaacaa taa cctgacccagttctcctgggctagaaagaagctgac								
Dolly	.....								
Snow	.....								
Swan	.....								

Abundante G

```

      1860      1870      1880      1890      1900      1910      1920      1930      1940
Caballo  acatcactcctctctgttacacaccaagtcacccocaggtcggtgggcccaat ttgctgggcagtcataggtcaggaccaccccag
Dolly
Snow
Swan

      1950      1960      1970      1980      1990      2000      2010      2020      2030
Caballo  aaggtaactgggagcattccttcccccacagcacaaccaccacaaacctaggctccaggagtgggatgaaatgaagcaagacagg
Dolly
Snow
Swan

      2040      2050      2060      2070      2080      2090      2100      2110      2120
Caballo  ctatgaagtacagaagcaaaacaccccacacatgagagaaaaacatgagagaattcagaaattactctgtgcataaaatttaaggtaa
Dolly
Snow
Swan

      2130      2140      2150      2160      2170      2180      2190      2200      2210
Caballo  tacacatgaggccacactccttgggaaatgggaacagcgcacaaaatggctttgagggccagagtggtggcacagcagttagttgc
Dolly
Snow
Swan

      2220      2230      2240      2250      2260      2270      2280      2290      2300
Caballo  acactocacttggccgcctggggttccctgggtcagatccgggtgcagacctatgcactgcttgccaagtcatgctgtggcagggtgc
Dolly
Snow
Swan

      2310      2320      2330      2340      2350      2360      2370      2380      2390
Caballo  ccatataaaagtagaggaagatgggcacagatgttagctcaaggccagctctcctcagcaaaaagaggaggaatggcggtagatgttag
Dolly
Snow
Swan

      2400      2410      2420      2430      2440      2450      2460      2470      2480
Caballo  ctcaggaattaatccgccccccaaaagaagaaaaatggtttgggcaaacagaaccagaatgttgagatctgaactaggaagttag
Dolly
Snow
Swan

      2490      2500      2510      2520      2530      2540      2550      2560      2570
Caballo  aaaagatctaaattgggggtgcacaaattcagtgccaacaggtgccaggtagataactaca taogtaa tgaggattggatgtgaagggtt
Dolly
Snow
Swan

      2580      2590      2600      2610      2620      2630      2640      2650      2660
Caballo  aaatcgcaactgacactcagcctcctggtgagggagacacacagaggaatgggaccacagcaacctgaagaaactcaggccccagc taag
Dolly
Snow
Swan

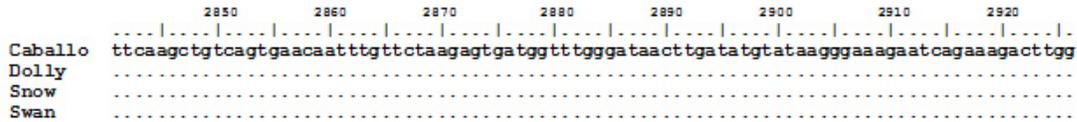
      2670      2680      2690      2700      2710      2720      2730      2740      2750
Caballo  gaggggcccgtccagctgtttcaccattcaaggctgcaggagcagggtgcagagtttctgattcttcaagacacacaggatatccagc
Dolly
Snow
Swan

      2760      2770      2780      2790      2800      2810      2820      2830      2840
Caballo  ctttcatatgaaatctaatttttaaacatggcagcgttaattcaaacatgaaaacatttaagggcaaaaattaaoccaaacaatttgctc
Dolly
Snow
Swan

```

ERE3

Charlie8



**Figura 13.** Alineamiento de los elementos móviles. Se muestra el *locus* GH y regiones adyacentes de individuos miniatura con caballo de talla regular como referencia identificando los elementos repetitivos móviles. Las líneas azules identifican las regiones que abarcan los elementos repetitivos.

### 5.1.6. Análisis del promotor.

Los resultados obtenidos del software predictor del promotor fueron idénticos en las tres yeguas de estudio y en el caballo de talla regular. La elección de la secuencia promotora se realizó en base al índice de predicción, donde el valor más cercano al 1 es el más preciso en la localización de la secuencia promotora. Todos los individuos coincidieron en la misma secuencia promotora para el gen GH en caballos con una calificación de 1.00. Cabe aclarar que el programa enumera las posiciones a partir del nombre de la secuencia, por lo tanto la posición del promotor no coincide entre los individuos pues los caracteres del nombre hacen que se modifiquen los sitios. Además, se acepta esa posición como la más indicada de la predicción debido a que las otras se localizan en sitios muy alejados al orden anatómicamente “lógico” de la secuencia y sus elementos identificados con todos los programas anteriores, por lo tanto parece más precisa. La figura 14 muestra el sitio de inicio y final de la secuencia predicha, la calificación otorgada por el programa y la secuencia nucleotídica que abarca.

La región que abarca de la posición -797 a -754 presenta variabilidad, concentrando 16 diferencias nucleotídicas y una deleción de 4 nucleótidos en las tres yeguas miniatura. Estos cambios no suceden en el caballo de talla regular, por lo que es una diferencia entre razas.

### Predicción del promotor para Caballo:

Inicio	Fin	Valor	Secuencia del Promotor
103	153	0.83	TGTAAATATTAAATAAAGGAGAAGAAAGAGGAGGGAGGAG <b>A</b> CTACGGTGA
1020	1070	1.00	AGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCCGCAGGGGACCGATTCCAG <b>G</b> TTCCCTAGGA
1131	1181	0.84	TAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGCCATCTACTGA <b>G</b> GGGTGACAG
1896	1946	0.94	TCCCTCTTTCTAAGAAGGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCC <b>C</b> CGGGCGGCC
3406	3456	0.98	AGGTGTCCCATATATAAAGTAGAGGAAGATGGGCACAGAT <b>G</b> TTAGCTCAA
3500	3550	0.92	TAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCAAAAGAAGAAAA <b>A</b> TGGTTTTGG
3592	3642	0.81	GAAAAGATTCTAAATTGGGGGTTGCAAATTCAGTGCCAAC <b>A</b> GGTGCCAGG

### Predicción del promotor para Dolly :

Inicio	Fin	Valor	Secuencia del Promotor
102	152	0.83	TGTAAATATTAAATAAAGGAGAAGAAAGAGGAGGGAGGAG <b>A</b> CTACGGTGA
1015	1065	1.00	AGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCCGCAGGGGACCGATTCCAG <b>G</b> TTCCCTAGGA
1126	1176	0.84	TAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGCCATCTACTGA <b>G</b> GGGTGACAG
1898	1948	0.94	TCCCTCTTTCTAAGAAGGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCC <b>C</b> TGGGCGGCC
3408	3458	0.98	AGGTGTCCCATATATAAAGTAGAGGAAGATGGGCACAGAT <b>G</b> TTGGCTCAA
3502	3552	0.92	TAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCAAAAGAAGAAAA <b>A</b> TGGTTTTGG
3594	3644	0.81	GAAAAGATTCTAAATTGGGGGTTGCAAATTCAGTGCCAAC <b>A</b> GGTGCCAGG

### Predicción del promotor para Snow :

Inicio	Fin	Valor	Secuencia del Promotor
102	152	0.83	TGTAAATATTAAATAAAGGAGAAGAAAGAGGAGGGAGGAG <b>A</b> CTACGGTGA
1016	1066	1.00	AGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCCGCAGGGGACCGATTCCAG <b>G</b> TTCCCTAGGA
1127	1177	0.84	TAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGCCATCTACTGA <b>G</b> GGGTGACAG
1899	1949	0.94	TCCCTCTTTCTAAGAAGGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCC <b>C</b> TGGGCGGCC
3409	3459	0.98	AGGTGTCCCATATATAAAGTAGAGGAAGATGGGCACAGAT <b>G</b> TTGGCTCAA
3503	3553	0.92	TAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCAAAAGAAGAAAA <b>A</b> TGGTTTTGG
3595	3645	0.81	GAAAAGATTCTAAATTGGGGGTTGCAAATTCAGTGCCAAC <b>A</b> GGTGCCAGG

### Predicción del promotor Swan :

Inicio	Fin	Valor	Secuencia del Promotor
102	152	0.83	TGTAAATATTAAATAAAGGAGAAGAAAGAGGAGGGAGGAG <b>A</b> CTACGGTGA
1016	1066	1.00	AGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCCGCAGGGGACCGATTCCAG <b>G</b> TTCCCTAGGA
1127	1177	0.84	TAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGCCATCTACTGA <b>G</b> GGGTGACAG
1899	1949	0.94	TCCCTCTTTCTAAGAAGGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCC <b>C</b> TGGGCGGCC
3409	3459	0.98	AGGTGTCCCATATATAAAGTAGAGGAAGATGGGCACAGAT <b>G</b> TTGGCTCAA
3503	3553	0.92	TAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCAAAAGAAGAAAA <b>A</b> TGGTTTTGG
3595	3645	0.81	GAAAAGATTCTAAATTGGGGGTTGCAAATTCAGTGCCAAC <b>A</b> GGTGCCAGG

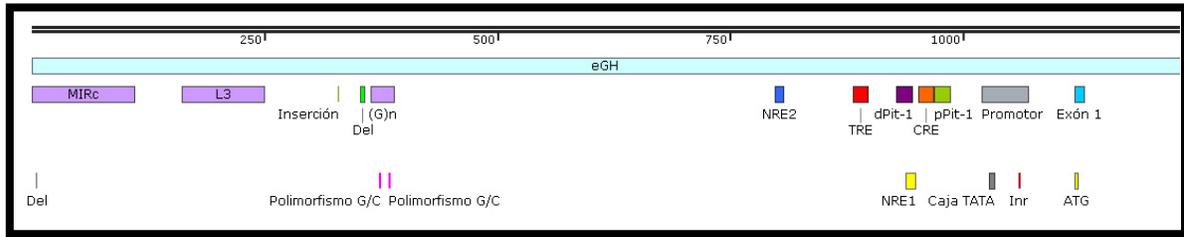
**Figura 14.** Predicción del promotor por el programa *Neural Network Promoter Predictor*. Resultados proporcionados por el programa traducidos al español. En negritas y resaltado se muestra el sitio de inicio de la transcripción. En rojo se encierra el sitio más preciso para el promotor del *locus* GH.

En base al programa de predicción, el promotor se localiza de la región -100 a -49, siendo una G en la posición -60 el sitio de inicio de la transcripción. Los elementos del promotor fueron identificados manualmente en el alineamiento realizado en la plataforma BioEdit. Se encontraron seis sitios de unión a factores de transcripción en la región 5' río arriba del gen GH de ambas razas de caballos. El sitio NRE2 consta de la secuencia de 9 nt CAGATTGGT ubicada del sitio -322 al -314. El siguiente sitio es dPit-1 abarcando de -191 a -175. El sitio anterior es traslapado por un NRE1 de 10 nt que se localiza del sitio -181 al -172 y éste se separa por tres posiciones del sitio CRE que abarca del -168 al -153. El sitio que continúa río abajo es el pPit-1 abarcando de la posición -152 a la -135 y por último se localizó la caja TATA que se presenta con la secuencia CATAAA abarcando la posición -92 a -87. Todos los sitios se identifican en la figura 15. Ninguno de estos sitios coincide con algún cambio nucleotídico entre secuencias ni sitios polimórficos, por lo tanto los sitios son iguales en ambas razas de caballos.

En la figura 16 se muestra la anatomía de la región 5' río arriba del gen GH incluyendo los sitios de unión a factores de transcripción NRE2, TRE, dPit-1, NRE1, CRE, pPit-1, la caja TATA y la región promotora. El sitio de inicio de la transcripción se identifica como *Inr*. Se encuentran tres elementos móviles (MIRc, L3 y G(n)), las inserciones, deleciones y los dos sitios polimórficos potenciales en el elemento G(n).



**Figura 15.** Alineamiento de la región 5' río arriba del codón de inicio. Subrayado en amarillo se identifica el codón de inicio. El promotor predicho se encuentra subrayado en gris. La G en negritas y resaltada es el sitio del inicio de la transcripción. Cada sitio de unión se encierra en un color distinto para su identificación. Los números pequeños indican posición en la región. (.) denota similitud al nucleótido de referencia. Letras bajo nucleótidos de referencia indican cambios nucleotídicos en el individuo miniatura.



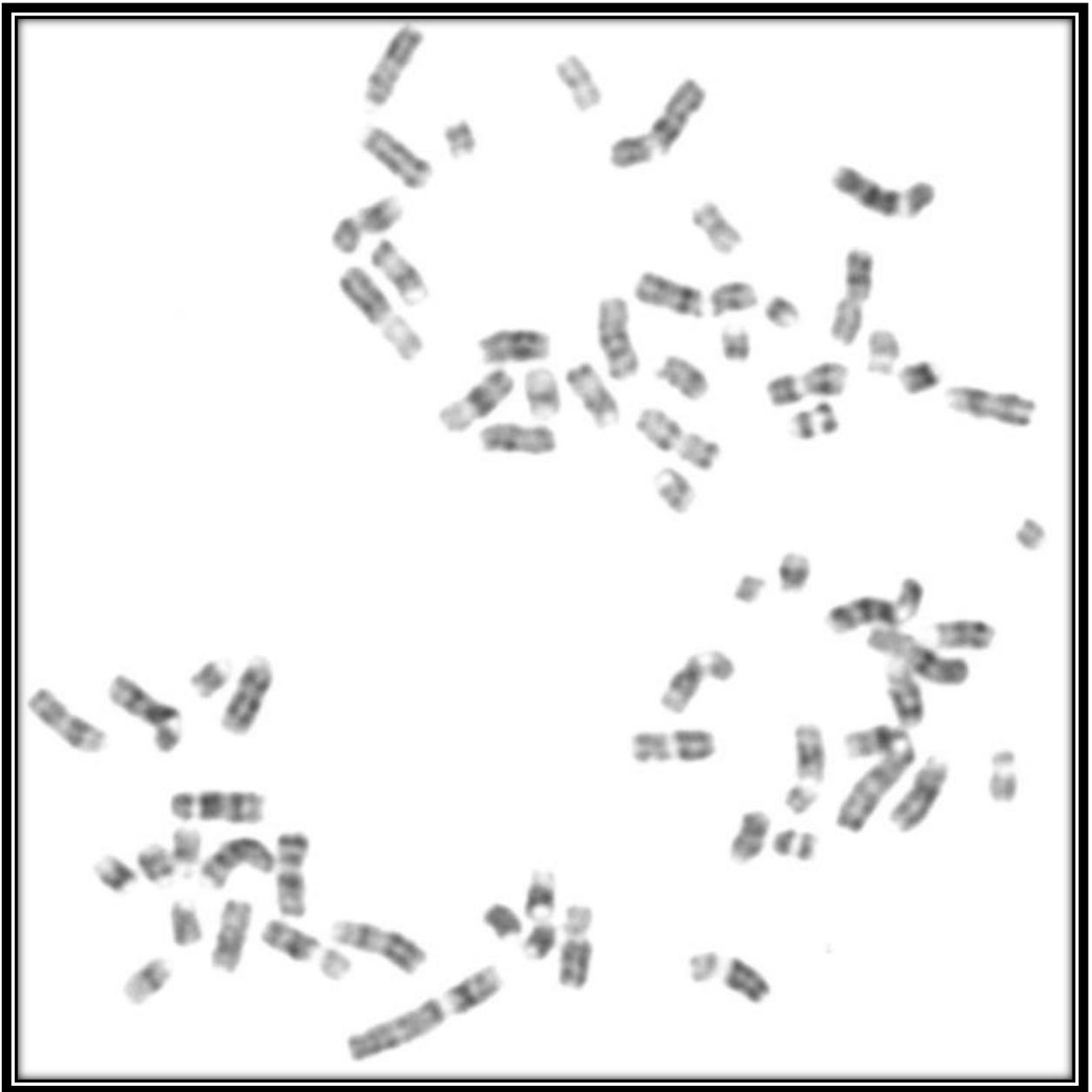
**Figura 16.** Anatomía de la región 5'. Se describen los elementos identificados en el la región 5' río arriba del gen GH. Sobre la región eGH se refiere la escala del número de nucleótidos.

## 5.2. Cariotipo.

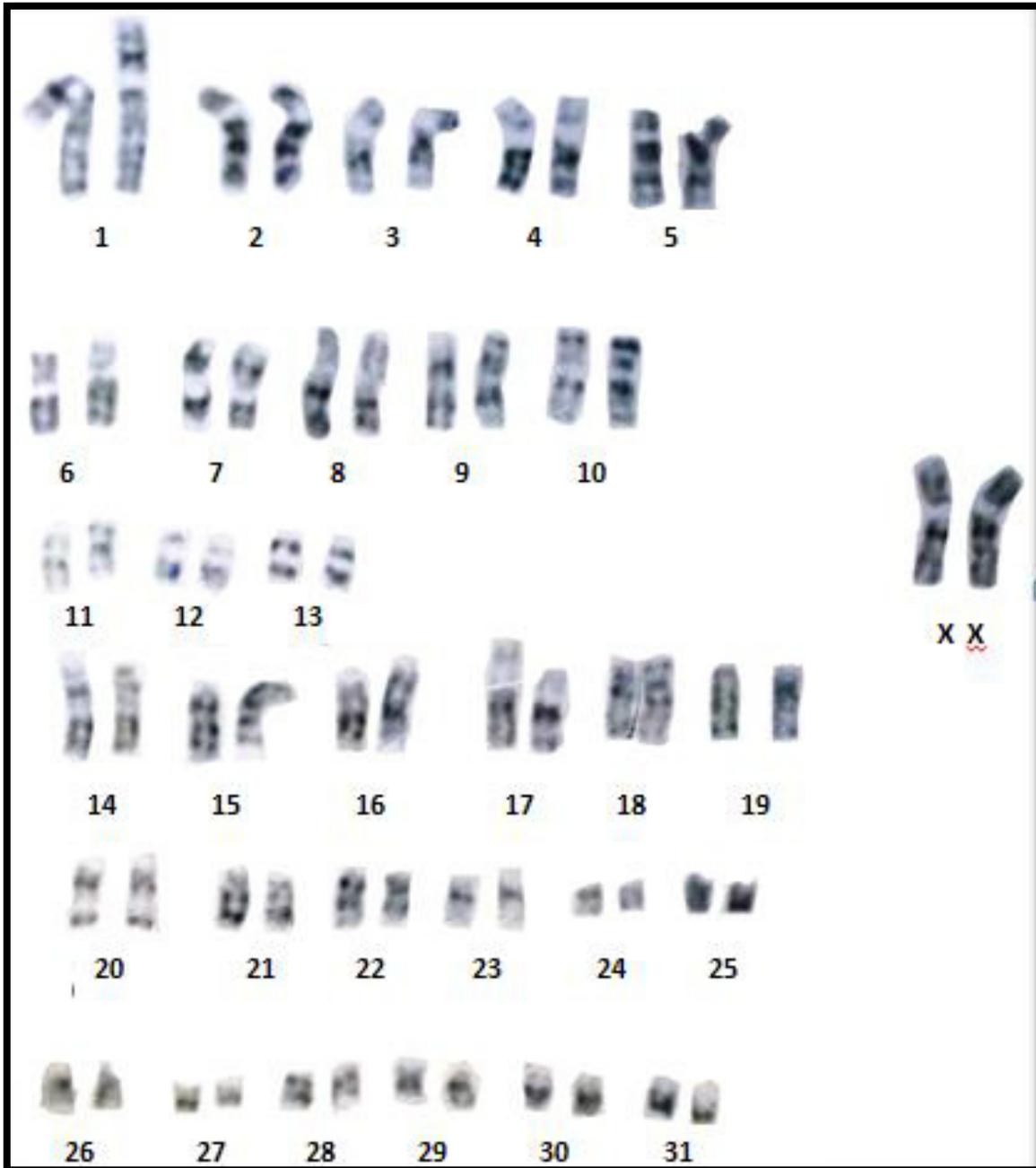
Se obtuvieron los cariotipos de tres hembras AMH mediante las técnicas de tinción de Bandas G y Bandas C.

Se observó que las yeguas miniatura al igual que los caballos de talla regular poseen 64 cromosomas en total ( $2n=64$ ) siendo 62 autosomas y 2 cromosomas sexuales (XX en estas tres yeguas). Se confirma la presencia de 13 pares submetacéntricos y metacéntricos y 18 pares acrocéntricos. No se observaron alteraciones numéricas o estructurales (deleciones, duplicaciones, translocaciones).

En la figura 17 se puede mostrar una metafase de buena calidad en tinción para bandas G. se observa los 64 cromosomas con un bandeo bien definido y en la figura 18 se observan los 32 pares de autosomas y los 2 cromosomas sexuales (XX) con el patrón de bandas G en un cariograma ordenado manualmente.

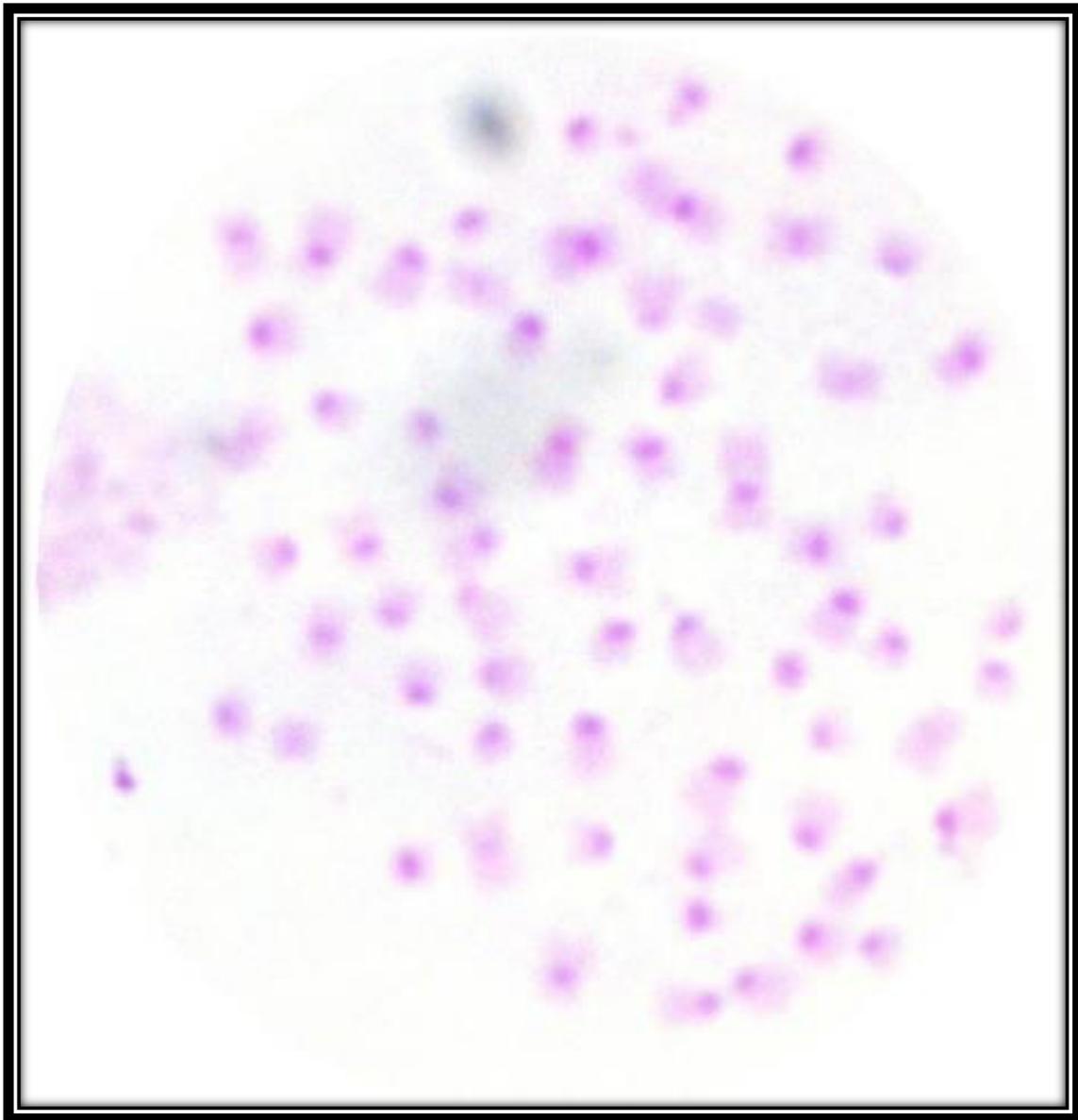


**Figura 17.** Micrografía de una metafase de Dolly. Bandas G.

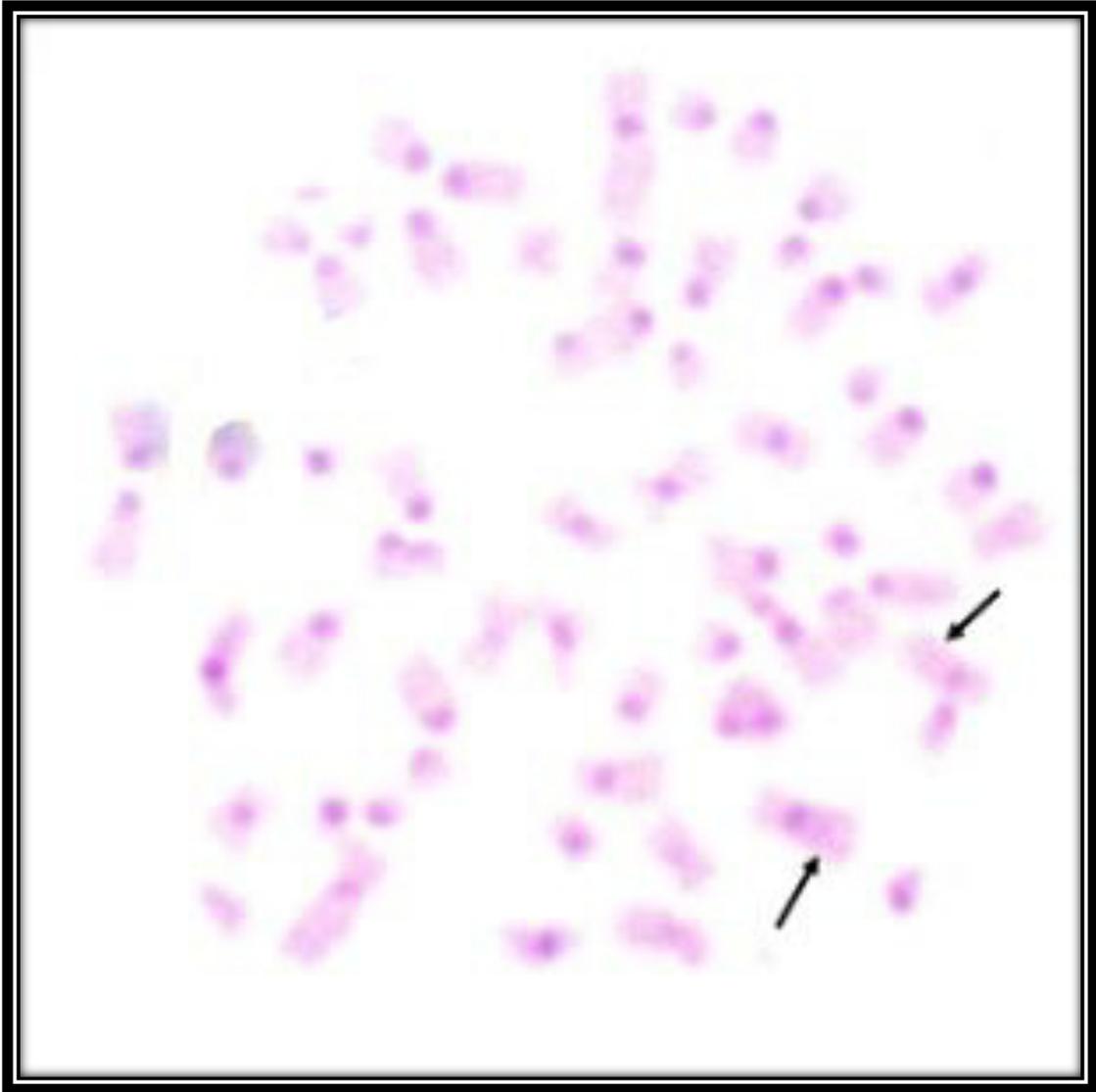


**Figura 18.** Cariograma de Dolly. Bandas G. Se muestran los 32 pares de autosomas con el patrón de bandas G en con 2 cromosomas sexuales XX ordenado en base a la literatura.

Con la técnica de Bandas C fueron identificadas las regiones pericentroméricas en las tres yeguas miniatura. En la figura 19 se observa una de las metafase teñida para bandas C y en la figura 20 se resalta la presencia de la banda oscura por debajo del metacentro del cromosoma X.



**Figura 19.** Micrografía de una metafase de Snow con Bandas C.



**Figura 20.** Micrografía de bandas C resaltando el cromosoma X. Swan. La flecha señala la banda teñida en el cromosoma X.

## CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

La selección genética en animales, principalmente de las especies destinadas a producción donde la talla corporal es económicamente importante, se ha basado en niveles sanguíneos de hormonas relacionadas al crecimiento entre ellas la GH claramente por su relación con la tasa de crecimiento y regeneración ósea y de tejidos (Hossner, 2005). El presente estudio persiguió analizar el *locus* GH para identificar si existiese algún elemento que sugiriese relación con la talla corporal.

En la metodología de este proyecto se utilizó la PCR como herramienta para aislar el genoma del AMH. La PCR puede ser influenciada por muchas variables como la calidad del ADN o las condiciones de la reacción, pero sobre todo por el diseño óptimo de las parejas de oligonucleótidos (Ye et al., 2012). La especificidad hacia el sitio de unión para amplificar la región requerida y no hibridar en regiones similares es sumamente importante por lo que se puso especial atención en su diseño (VanGuilder et al., 2008). En base a que en la literatura no se encontraron oligonucleótidos para amplificar la región deseada en caballos de ninguna raza, el diseño de oligonucleótidos fue un factor fundamental para llevar a cabo este estudio. Por lo tanto se realizó de forma meticulosa, específica y precisa y se evaluó su viabilidad *in silico* de forma rigurosa para este trabajo.

La comparación de secuencias es una tarea fundamental en la biología molecular para descubrir la relación, función y similitud de las moléculas. El alineamiento mediante algoritmos es la herramienta más útil para identificar los cambios con mayor facilidad (Zhang y Chen, 2011). En este trabajo de investigación, los alineamientos de secuencias tanto nucleotídicas como aminoacídicas, así como la confirmación mediante más de un programa bioinformático, han tenido una importancia invaluable para el análisis de todos los elementos y las regiones de los *loci* GH en ambas razas de caballos.

Al comparar el gen de GH de caballo con el de burro se identificó que el caballo posee un cambio nucleotídico de C por G en el aminoácido 117 provocando un cambio del aminoácido fenilalanina en el burro a leucina en el caballo. Los autores

de estos hallazgos sugieren que este cambio puede influir en la diferencia de talla, crecimiento y desarrollo entre caballos y burros (Wen-jin et al., 2012). Este aminoácido (leucina) también se presenta en los individuos miniatura.

El péptido señal predicho no mostró diferencias entre ambas razas, por lo tanto la señalización de la proteína no se verá alterada en la raza de baja talla (Coleman et al., 1985).

La ausencia de una gran variabilidad de secuencia tanto nucleotídica como en la proteína final entre las dos razas de caballos y el hecho de que los cambios aminoacídicos no influyen en la señalización o unión de la proteína permite deducir que la región codificante del gen GH del AMH carece de alteraciones decisivas para la proteína final que pudieran influir en la baja talla en los individuos miniatura (Goffin et al., 1996).

Aunque la expresión del gen GH se controla por secuencias ubicadas generalmente en el flanco 5' de la unidad transcripcional, desde el año 1996 se ha analizado que en algunas especies (por ejemplo el humano) podría involucrarse un elemento de respuesta a glucocorticoides en el intrón 1, así como elementos de respuesta negativa a la hormona tiroidea en la región 3' no traducible del ARNm. Además de una secuencia localizada en un intrón de otro gen localizado alrededor de 30kb de distancia (Eberhardt et al., 1996). En este estudio no se encontró ninguno de estos elementos en el intrón 1 o en la región 3', por lo tanto si bien se relacionan a la expresión en humanos, en equinos no se podrían asociar con la expresión del gen.

Nuestros resultados coinciden con los análisis del promotor del gen GH publicados por Wallis en distintas especies de mamíferos donde identifica que los sitios de unión a factores de transcripción se concentran de la posición -322 al -1 (Wallis, 2008; Wallis et al., 2006).

Si nuestro análisis fuera comparado con los análisis de sobre el promotor del ciervo rojo, podremos observar que nuestros resultados coinciden. Encontrando

los mismos sitios de unión a factores de transcripción identificados por Wallis sin embargo localizados en distintas posiciones y con algunas variaciones nucleotídicas por especie (Wallis et al., 2006).

Los elementos móviles del genoma equino se dieron a conocer en el 2010, sin embargo se menciona que el 11% del total de los elementos permaneció sin ser caracterizados (Adelson et al., 2010). En este estudio se identificó un elemento Charlie, mismo que pertenece a la familia *hAT*. Se realizó una búsqueda intensiva de literatura relacionada a dicho hallazgo y no se encontró la descripción de la familia *hAT* en ningún gen del caballo doméstico, aunque su presencia sí ha sido descrita en el *locus* GH de primates contribuyendo a la función potenciadora (Pérez-Maya et al., 2016).

Los cambios en los patrones de expresión génica han impactado en la evolución de esta hormona y se relacionan a los elementos regulatorios presentes en las distintas especies de mamíferos. Alteraciones en los tamaños o números de elementos regulatorios génicos asociados a alelos específicos pueden incrementar o afectar la respuesta de un gen a factores que regulen su actividad (Hossner, 2005).

Si un gen muta y deja de contribuir funciones importantes para los individuos de una población se esperaría que acumulara numerosas sustituciones no sinónimas (Adkins et al., 2000). El hecho de que las inserciones y deleciones identificadas en la región secuenciada de este estudio hayan sucedido en regiones no codificantes y que no impactan en los elementos de regulación o transcripción nos indica que el gen no ha dejado de cumplir una función importante para el AMH. Haciendo su posible papel en la talla aún más interesante.

Los equinos han mostrado distinto número cromosómico entre las especies del género *equus* (Ryder et al., 1978). Nosotros encontramos que la raza miniatura AMH posee 64 cromosomas tal como el caballo doméstico.

En el 2013 Loera López y colaboradores reportaron y compararon el cariotipo del AMH ( $2n=64$ ) con el caballo de talla regular sin encontrar diferencias (Loera López, 2013). Nuestros resultados coinciden con dichos hallazgos pues no se observaron alteraciones numéricas o estructurales que sugieran algún cambio cromosómico en esta raza de baja talla. Además que nuestros resultados en bandas C también identificaron dos bandas positivas en el cromosoma X (en la región centromérica y en el brazo q).

Análisis detallados de los cromosomas individuales han sido realizados en el caballo doméstico, como el de Raudsepp y colaboradores quienes describen ampliamente el cromosoma Y (Raudsepp et al., 2004). A diferencia de los autores anteriores, el objetivo de este estudio era evaluar del patrón de bandeo G y C en una raza miniatura para identificar si existe una diferencia cromosómica en esta raza de talla baja, por ello ninguno de sus cromosomas se describe con mayor detalle.

En contraste con un estudio de Polonia donde se encontraron aberraciones cromosómicas (Lear et al., 2008) en este estudio no se identificaron anomalías cromosómicas de ningún tipo en estas tres yeguas de estudio que pudieran relacionarse a la fertilidad, pues los cromosomas sexuales no se encuentran alterados, presentándose 64,XX en las tres hembras.

## CAPÍTULO VII: CONCLUSIÓN

Por primera ocasión se reporta y analiza el *locus* GH en una especie miniatura. Además este es el primer análisis de los elementos móviles y reguladores del gen GH en equinos. Se identificó que el gen GH en caballos de talla regular es más corto (1581 nt) que el gen GH en caballos de baja talla AMH (1588 nt). Se presentan 27 cambios nucleotídicos a través de la región analizada entre ambas razas concentrándose en la región 5' río arriba.

Dos de los sitios polimórficos potenciales identificados se localizaron en la región 5' río arriba y uno de ellos en la región 3' río abajo, no obstante en dicha unidad no se identificó ningún polimorfismo potencial. Dolly y Swan comparten la misma distribución de los alelos y Swan presentó alelos distintos.

La proteína difiere entre ambas razas en dos aminoácidos (arginina y alanina en el caballo de talla regular cambian por cisteína y glicina, respectivamente, en el miniatura). Sin embargo estos cambios parecen no impactar en los sitios de unión a receptor, en sitios de señalización o en elementos moduladores de la expresión.

Los elementos génicos analizados a través de este estudio se encuentran bastante conservados entre ambas razas de caballos. Aunque existen cambios nucleotídicos en algunos de los elementos móviles identificados en el gen GH y sus regiones adyacentes ninguno parece representar significancia biológica.

Como hallazgo incidental, se identifican miembros de la familia de elementos transponibles (hAT) que no había sido reportado previamente en equinos.

La hormona de crecimiento ha sido relacionada a la talla corporal en diversos estudios, especies, poblaciones y casos aislados. En este análisis molecular de la GH y sus elementos moduladores se han identificado variaciones en el gen y la proteína en dos razas de caballos de tallas extremas. No obstante, de todas las diferencias encontradas entre ambas razas ninguna de ellas es concluyente en relación a la significancia biológica de la GH y la talla corporal de individuos

miniatura. Sería interesante analizar otros elementos en razas miniatura como la regulación epigenética u otros genes que pudiesen modular la expresión del gen GH o la capacidad de la célula para captar la misma (receptor). Es necesario llevar a cabo estudios más específicos en una población de caballos miniatura.

Se estudió la estructura cromosómica de caballos con fenotipo de baja talla corporal sin encontrar diferencias cromosómicas al comparar sus cromosomas con el caballos de talla regular tanto en el patrón de bandas G o bandas C. El cariotipo normal de las tres yeguas miniatura se reporta como 64,XX.

No se encontró alguna alteración cromosómica que pudiera ser relacionada a la baja talla corporal en esta raza miniatura.

## CAPÍTULO VIII: BIBLIOGRAFÍA

- Adelson, D. L., J. M. Raison, M. Garber, and R. C. Edgar, 2010, Interspersed repeats in the horse (*Equus caballus*); spatial correlations highlight conserved chromosomal domains: *Animal Genetics*, v. 41, p. 91-99.
- Adkins, R. M., J. Vandeberg, and W. H. Li, 2000, Molecular evolution of growth hormone and receptor in the guinea-pig, a mammal unresponsive to growth hormone: *Gene*, v. 246, p. 357-63.
- Arensburger, P., R. H. Hice, L. Zhou, R. C. Smith, A. C. Tom, J. A. Wright, J. Knapp, D. A. O'Brochta, N. L. Craig, and P. W. Atkinson, 2011, Phylogenetic and Functional Characterization of the hAT Transposon Superfamily: *Genetics*, v. 188, p. 45-57.
- Ascacio-Martinez, J. A., and H. A. Barrera-Saldana, 1994, Sequence of a cDNA encoding horse growth hormone: *Gene*, v. 143, p. 299-300.
- Ascacio-Martinez, J. A., and H. A. Barrera-Saldaña, 1994, A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone: *Gene*, v. 143, p. 277-280.
- Bartke, A., L. Y. Sun, and V. Longo, 2013, Somatotropic Signaling: Trade-Offs Between Growth, Reproductive Development, and Longevity: *Physiological Reviews*, v. 93, p. 571-598.
- Benirschke, K., N. Malouf, R. J. Low, and H. Heck, 1965, Chromosome complement: differences between *Equus caballus* and *Equus przewalskii*, Poliakoff: *Science*, v. 148, p. 382-383.
- Buckland, R. A., J. Fletcher, and A. Chandley, 1976, Characterization of the domestic horse (*Equus caballus*) karyotype using G-and C-banding techniques: *Experientia*, v. 32, p. 1146-1149.
- Bugno, M., E. Slota, and M. Koscielny, 2007, Karyotype evaluation among young horse populations in Poland: *Schweiz Arch Tierheilkd*, v. 149, p. 227-32.
- Buonomo, F. C., J. L. Sartin, J. Christ, J. Schumacher, and J. J. Veenhuizen, 1995, Breed and age effects on circulating equine somatotropin (eST) and insulin-like growth factor levels in horses: *J Anim Sci*, v. 73, p. 215.
- Burge, C., and S. Karlin, 1997, Prediction of complete gene structures in human genomic DNA: *Journal of molecular biology*, v. 268, p. 78-94.
- Böhne, A., F. Brunet, D. Galiana-Arnoux, C. Schultheis, and J.-N. Voff, 2008, Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates: *Chromosome Research*, v. 16, p. 203-215.
- Chuzhanova, N. A., M. Krawczak, L. A. Nemytikova, V. D. Gusev, and D. N. Cooper, 2000, Promoter shuffling has occurred during the evolution of the vertebrate growth hormone gene: *Gene*, v. 254, p. 9-18.
- Coleman, J., M. Inukai, and M. Inouye, 1985, Dual functions of the signal peptide in protein transfer across the membrane: *Cell*, v. 43, p. 351-360.
- David, J., 2009, Growth factor interactions in epiphyseal chondrogenesis: *Molecular Physiology of Growth*, v. 60, p. 35.

- de Graaf-Roelfsema, E., W. Back, H. A. Keizer, T. A. Stout, and J. H. van der Kolk, 2009a, Normal function of the hypothalamic-pituitary growth axis in three dwarf Friesian foals: *Vet Rec*, v. 165, p. 373-6.
- de Graaf-Roelfsema, E., P. P. Veldhuis, H. A. Keizer, M. M. E. van Ginneken, K. G. van Dam, M. L. Johnson, A. Barneveld, P. P. C. A. Menheere, E. Van Breda, and I. D. Wijnberg, 2009b, Overtrained horses alter their resting pulsatile growth hormone secretion: *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 297, p. R403-R411.
- Dybus, A., 2002, Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle: *Anim Sci Pap Rep*, v. 20, p. 203-212.
- Eberhardt, N. L., S.-W. Jiang, A. R. Shepard, A. M. Arnold, and M. A. Trujillo, 1996, Hormonal and cell-specific regulation of the human growth hormone and chorionic somatomammotropin genes: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, v. 54, p. 127-163.
- Eberth, J., T. Swerczak, E. Bailey, and M. Gluck, 2009, Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip *Journal of equine veterinary science*, v. 29, p. 315.
- Edwards, E. H., 1994, *Manuales: Identificación de caballos*, Barcelona, España, Omega.
- Feldman, E. C., and R. W. Nelson, 2004, Disorders of growth hormone, *Canine and feline endocrinology and reproduction: Missouri, USA*, Saunders, p. 45-84.
- Forsyth, I. A., and M. Wallis, 2002, Growth hormone and prolactin—molecular and functional evolution: *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, v. 7, p. 291-312.
- Frankeny, R. L., 2003, *Miniature Horses: A Veterinary Guide for Owners and Breeders*, USA, Trafalgar Square Publishing
- Frischknecht, M., V. Jagannathan, P. Plattet, M. Neuditschko, H. Signer-Hasler, I. Bachmann, A. Pacholewska, C. Drögemüller, E. Dietschi, and C. Flury, 2015, A Non-Synonymous HMGA2 Variant Decreases Height in Shetland Ponies and Other Small Horses: *PloS one*, v. 10, p. e0140749.
- Gallagher, C. P., L. T. Lear, D. L. Coogle, and E. Bailey, 1999, Two SINE families associated with equine microsatellite loci: *Mammalian Genome*, v. 10, p. 140-144.
- Gao, C., M. Xiao, X. Ren, A. Hayward, J. Yin, L. Wu, D. Fu, and J. Li, 2012, Characterization and functional annotation of nested transposable elements in eukaryotic genomes: *Genomics*, v. 100, p. 222-230.
- Glasscock, G. F., S. E. Gelber, G. Lamson, R. McGee-Tekula, and R. G. Rosenfeld, 1990, Pituitary Control of Growth in the Neonatal Rat: Effects of Neonatal Hypophysectomy on Somatic and Organ Growth, Serum Insulin-Like Growth Factors (IGF)-I and-II Levels, and Expression of IGF Binding Proteins\*: *Endocrinology*, v. 127, p. 1792-1803.
- Goffin, V., K. T. Shiverick, P. A. Kelly, and J. A. Martial, 1996, Sequence-Function Relationships Within the Expanding Family of Prolactin, Growth Hormone, Placental Lactogen, and Related Proteins in Mammals\*: *Endocrine reviews*, v. 17, p. 385-410.

- Hadley, M. E., and J. E. Levine, 2007, *Endocrinology*: New Jersey: Upper Saddle River.
- Hai, H., E. Fukui, T. Hasegawa, H. Matsumoto, H. Mukoyama, and M. Yoshizawa, 2009, Analysis of growth hormone gene sequences and polymorphisms in the Mongolian horse: *Animal Science Journal (Japan)*.
- Hall, T. A., 2001, *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, version 5.09*: Department of Microbiology, North Carolina State University, North Carolina.
- Hampsey, M., 2001, *Negative Regulatory Elements (NREs), eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.
- Hattori, N., 2009, Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system: *Growth Horm IGF Res*, v. 19, p. 187-97.
- Horan, M., D. S. Millar, J. Hedderich, G. Lewis, V. Newsday, N. Mo, L. Fryklund, A. M. Procter, M. Krawczak, and D. N. Cooper, 2003, Human growth hormone 1 (GH1) gene expression: Complex haplotype-dependent influence of polymorphic variation in the proximal promoter and locus control region: *Human mutation*, v. 21, p. 408-423.
- Hossner, K. L., 2005, *Hormonal regulation of farm animal growth*, CABI.
- Hrabia, A., A. Leśniak-Walentyn, A. Sechman, and A. Gertler, 2014, Chicken oviduct—the target tissue for growth hormone action: effect on cell proliferation and apoptosis and on the gene expression of some oviduct-specific proteins: *Cell and Tissue Research*, v. 357, p. 363-372.
- Iannuzzi, L., G. P. D. Meo, A. Perucatti, D. Incarnato, V. Peretti, F. Ciotola, and V. Barbieri, 2003, An improved characterization of horse (*Equus caballus*, 2n=64) chromosomes by using replicating G and R banding patterns: *Caryologia*, v. 56, p. 205-211.
- Jarvis, J. P., L. B. Scheinfeldt, S. Soi, C. Lambert, L. Omberg, B. Ferwerda, A. Froment, J.-M. Bodo, W. Beggs, and G. Hoffman, 2012, Patterns of ancestry, signatures of natural selection, and genetic association with stature in Western African pygmies: *PLoS Genet*, v. 8, p. e1002641.
- Jurka, J., V. V. Kapitonov, O. Kohany, and M. V. Jurka, 2007, Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution: *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 8, p. 241-259.
- Jurka, J., E. Zietkiewicz, and D. Labuda, 1995, Ubiquitous mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) are molecular fossils from the mesozoic era: *Nucleic Acids Research*, v. 23, p. 170-175.
- Karp., G., 2014, *Biología celular y molecular, conceptos y experimentos*: México, D.F, McGraw Hill Interamericana, 783 p.
- Kim, H., K. D. Song, H. J. Kim, W. Park, J. Kim, T. Lee, D.-H. Shin, W. Kwak, Y.-j. Kwon, and S. Sung, 2015, Exploring the genetic signature of body size in Yucatan miniature pig: *PloS one*, v. 10, p. e0121732.
- Krull, M., M. Petrusma, W. Makalowski, J. Brosius, and J. Schmitz, 2007, Functional persistence of exonized mammalian-wide interspersed repeat elements (MIRs): *Genome Research*, v. 17, p. 1139-1145.
- Lear, T. L., J. Lundquist, W. W. Zent, J. W. D. Fishback, and A. Clark, 2008, Three autosomal chromosome translocations associated with repeated early embryonic

- loss (REEL) in the domestic horse (*Equus caballus*): Cytogenetic and Genome Research, v. 120, p. 117-122.
- Lear, T. L., and R. B. McGee, 2011, Disorders of sexual development in the domestic horse, *Equus caballus*: Sexual Development, v. 6, p. 61-71.
- Locatelli, V., and V. E. Bianchi, 2014, Effect of GH/IGF-1 on bone metabolism and osteoporosis: *International journal of endocrinology*, v. 2014.
- Loera López, M., 2013, Diferenciación cromosómica mediante cariotipos entre caballo miniatura y caballo cuarto de milla.
- Maniou, Z., O. C. Wallis, and M. Wallis, 2002, Cloning and characterisation of the GH gene from the common dolphin (*Delphinus delphis*): *General and comparative endocrinology*, v. 127, p. 300-306.
- Maniou, Z., O. C. Wallis, and M. Wallis, 2004, Episodic molecular evolution of pituitary growth hormone in *Cetartiodactyla*: *Journal of molecular evolution*, v. 58, p. 743-753.
- Martin-Rosset, W., Particularités de la croissance et du développement du cheval, p. 109-130.
- Meira, C. T., R. A. Curi, J. A. I. I. V. Silva, M. J. M. Corrêa, H. N. de Oliveira, and M. D. S. da Mota, 2013, Morphological and genomic differences between cutting and racing lines of Quarter Horses: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, p. 244-249.
- Mendizabal, I., U. M. Marigorta, O. Lao, and D. Comas, 2012, Adaptive evolution of loci covarying with the human African Pygmy phenotype: *Human genetics*, v. 131, p. 1305-1317.
- Mendoza Patiño, N., 2008, *Farmacología médica: México: Editorial Médica Panamericana.*
- Metzger, J., R. Schrimpf, U. Philipp, and O. Distl, 2013, Expression levels of LCORL are associated with body size in horses: *PLoS One*, v. 8, p. e56497.
- Moncaleano, J. S., L. M. Jiménez, and C. A. Sánchez, 2007, Mosaicismo leucocitario asociado a infertilidad en cuatro yeguas: *Orinoquia*, v. 11, p. 87-91.
- Oliver, L., and A. S. Hartree, 1968, Amino acid sequences around the cystine residues in horse growth hormone: *Biochem J*, v. 109, p. 19-24.
- Pal, A., A. K. Chakravarty, and P. N. Chatterjee, 2014, Polymorphism of growth hormone gene and its association with seminal and sexual behavioral traits in crossbred cattle: *Theriogenology*, v. 81, p. 474-480.
- Park, K.-Y., and J.-H. Roe, 1996, Identification of a Negative Regulatory Site in the Upstream Region of Bovine Growth Hormone Gene: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 219, p. 354-358.
- Patent, D. H., and W. Muñoz, 1991, *Miniature Horses: New York, USA, Cobblehill Books, 46 p.*
- Pilliner, S., and Z. Davies, 2004, *Equine science: UK, Blackwell Publishing, 325 p.*
- Pérez-Maya, A., 2012, Disección bioinformática y experimental de la fase de expansión del locus GH en primates.

- Pérez-Maya, A. A., M. Wallis, and H. A. Barrera-Saldaña, 2016, Structure and evolution of the gorilla and orangutan growth hormone loci: *Mammalian Genome*, v. 27, p. 511-523.
- Raudsepp, T., A. Santani, B. Wallner, S. R. Kata, C. Ren, H.-B. Zhang, J. E. Womack, L. C. Skow, and B. P. Chowdhary, 2004, A detailed physical map of the horse Y chromosome: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 9321-9326.
- Reichlin, S., 1998, Neuroendocrinology, in J. Wilson, D. Foster, H. Kronenberg, and P. Larsen, eds., *Williams text book of endocrinology*: Philadelphia USA, Saunders, p. 165.
- Reimers, T. J., 2003, The pituitary gland, in M. H. Pineda, and M. P. Dooley, eds., *McDonald's Veterinary endocrinology and reproduction*: Iowa, USA, Blackwell Publishing, p. 17-34.
- Rimbault, M., H. C. Beale, J. J. Schoenebeck, B. C. Hoopes, J. J. Allen, P. Kilroy-Glynn, R. K. Wayne, N. B. Sutter, and E. A. Ostrander, 2013, Derived variants at six genes explain nearly half of size reduction in dog breeds: *Genome research*, v. 23, p. 1985-1995.
- Rozman, C., 1997, *Compendio de medicina interna*, Harcourt Brace Madrid.
- Ryder, O. A., N. C. Epel, and K. Benirschke, 1978, Chromosome banding studies of the Equidae: *Cytogenetic and Genome Research*, v. 20, p. 323-350.
- Sakagami, M., K. Ohshima, H. Mukoyama, H. Yasue, and N. Okada, 1994, A novel tRNA species as an origin of short interspersed repetitive elements (SINEs): Equine SINEs may have originated from tRNAs<sup>er</sup>: *Journal of molecular biology*, v. 239, p. 731-735.
- Shapiro, J., 2012, *Mobile genetic elements*, Elsevier.
- Shewchuk, B. M., Y. Ho, S. A. Liebhaber, and N. E. Cooke, 2006, A Single Base Difference between Pit-1 Binding Sites at the hGH Promoter and Locus Control Region Specifies Distinct Pit-1 Conformations and Functions: *Molecular and Cellular Biology*, v. 26, p. 6535-6546.
- Shiue, Y. L., L. A. Bickel, A. R. Caetano, L. Millon, R. S. Clark, M. L. Eggleston, R. Michelmore, E. Bailey, G. Guérin, and S. Godard, 1999, A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers: *Animal Genetics*, v. 30, p. 1-10.
- Shoemaker, L., and A. Clauset, 2014, Body mass evolution and diversification within horses (family Equidae): *Ecology letters*, v. 17, p. 211-220.
- Signer-Hasler, H., C. Flury, B. Haase, D. Burger, H. Simianer, T. Leeb, and S. Rieder, 2012, A genome-wide association study reveals loci influencing height and other conformation traits in horses: *PLoS One*, v. 7, p. e37282.
- Sonntag, W. E., M. Ramsey, and C. S. Carter, 2005, Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging: *Ageing research reviews*, v. 4, p. 195-212.
- Squires, E. J., 2010, *Applied animal endocrinology*: London, UK, Cambridge University Press, 281 p.

- Thomas, M. G., K. Bennett-Wimbush, D. H. Keisler, and W. E. Loch, 1998a, Plasma concentrations of growth hormone and insulin-like growth factor-I in prepuberal quarter horses and ponies: *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 18, p. 52-55.
- Thomas, M. G., K. Bennett-Wimbush, D. H. Keisler, and W. E. Loch, 1998b, Plasma concentrations of Growth hormone and Insuline-like growth factor-1 in prepuberal quarter horses and ponies: *Journal of equine veterinary science*, v. 18, p. 52-55.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson, 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice: *Nucleic acids research*, v. 22, p. 4673-4680.
- Tomilin, N. V., 2008, Regulation of mammalian gene expression by retroelements and non-coding tandem repeats: *BioEssays*, v. 30, p. 338-348.
- Valerio, G., H. M. Bond, R. Badolato, A. Petrella, S. Di Maio, M. Salerno, M. J. Waters, S. Venuta, and A. Tenore, 1997, Expression of growth hormone receptor by peripheral blood lymphocytes in children: evaluation in clinical conditions of impaired growth: *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 47, p. 329-35.
- VanGuilder, H. D., K. E. Vrana, and W. M. Freeman, 2008, Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*, v. 44: England, p. 619-26.
- Wade, C. M., E. Giulotto, S. Sigurdsson, M. Zoli, S. Gnerre, F. Imsland, T. L. Lear, D. L. Adelson, E. Bailey, and R. R. Bellone, 2009a, Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse: *Science*, v. 326, p. 865-867.
- Wade, C. M., E. Giulotto, S. Sigurdsson, M. Zoli, S. Gnerre, F. Imsland, T. L. Lear, D. L. Adelson, E. Bailey, R. R. Bellone, H. Blöcker, O. Distl, R. C. Edgar, M. Garber, T. Leeb, E. Mauceli, J. N. MacLeod, M. C. T. Penedo, J. M. Raison, T. Sharpe, J. Vogel, L. Andersson, D. F. Antczak, T. Biagi, M. M. Binns, B. P. Chowdhary, S. J. Coleman, G. Della Valle, S. Fryc, G. Guérin, T. Hasegawa, E. W. Hill, J. Jurka, A. Kiiialainen, G. Lindgren, J. Liu, E. Magnani, J. R. Mickelson, J. Murray, S. G. Nergadze, R. Onofrio, S. Pedroni, M. F. Piras, T. Raudsepp, M. Rocchi, K. H. Røed, O. A. Ryder, S. Searle, L. Skow, J. E. Swinburne, A. C. Syvänen, T. Tozaki, S. J. Valberg, M. Vaudin, J. R. White, M. C. Zody, E. S. Lander, and K. Lindblad-Toh, 2009b, Genome Sequence, Comparative Analysis, and Population Genetics of the Domestic Horse: *Science*, v. 326, p. 865.
- Wallis, M., 2008, Mammalian genome projects reveal new growth hormone (GH) sequences: Characterization of the GH-encoding genes of armadillo (*Dasybus novemcinctus*), hedgehog (*Erinaceus europaeus*), bat (*Myotis lucifugus*), hyrax (*Procavia capensis*), shrew (*Sorex araneus*), ground squirrel (*Spermophilus tridecemlineatus*), elephant (*Loxodonta africana*), cat (*Felis catus*) and opossum (*Monodelphis domestica*): *General and comparative endocrinology*, v. 155, p. 271-279.
- Wallis, O. C., L. J. Bill, E. J. Burt, S. A. Ellis, and M. Wallis, 2006, Polymorphism of the growth hormone gene of red deer (*Cervus elaphus*): *General and comparative endocrinology*, v. 146, p. 180-185.

- Wallis, O. C., Z. Maniou, and M. Wallis, 2005, Cloning and characterization of the gene encoding growth hormone in finback whale (*Balaenoptera physalus*): General and comparative endocrinology, v. 143, p. 92-97.
- Wen-jin, Z., S. Yong-mei, G. Xue-min, W. Jian-hua, and Z. Yuan-yuan, 2012, Cloning and Sequence Analysis of Donkey Growth Hormone Gene, *in* E. Zhu, and S. Sambath, eds., Information Technology and Agricultural Engineering: Advances in Intelligent and Soft Computing, v. 134, Springer Berlin Heidelberg, p. 459-464.
- Wittkopp, P. J., and G. Kalay, 2012, Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence: Nature Reviews Genetics, v. 13, p. 59-69.
- Yang, F., B. Fu, P. C. M. O'Brien, T. J. Robinson, O. A. Ryder, and M. A. Ferguson-Smith, 2004, Karyotypic relationships of horses and zebras: results of cross-species chromosome painting: Cytogenetic and genome research, v. 102, p. 235-243.
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen, and T. L. Madden, 2012, Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction, BMC Bioinformatics, v. 13: England, p. 134.
- Zhang, Y., and W. Chen, 2011, A new measure for similarity searching in DNA sequences: MATCH Commun. Math. Comput. Chem, v. 65, p. 477-488.

## CAPÍTULO IX: ANEXOS

### APÉNDICE A

#### Secuencias en formato FASTA del *locus* GH

##### >Consenso eGH mini

```
TCTTCTCTGTACATGGGGCGATAACACCTCCTTCACAAGATGTTTGTGAGGGTCAAATGT
GAGAATGCACAGGCATGCTCATCACAGCCTGATAAGTTCTATGTAAATATTAAATAAAGG
AGAAGAAAGAGGAGGGAGGAGACTACGGTGACTCGAGCAAGCATCTTTCAGGGTGCTGTA
CCTTGAGTTCCAGTTCTGGGGACGAGACTCAAGCCTTCACGGTCTCTTCCAACCTTGGGG
TTCTCTGATGGTGGCAGGGCGGTGGGAGGAAGCACTTGTGGTCTGTGTCTGTTCTTGGA
TTTCTGATTCTTGTCCAAGAAGCATCCACACCTCAAGTTTTGGTCTTTGCCCCACCTGG
CTGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGAGGGCCTGTGTGGGGCTGGTGCCCTCTAGTGGTTAG
TGTGAGCACTTCATCCACCTGCCTTAGGCCAGACCAAGTGGTGGGATGGCCGCAGGATAG
TGATAAAGGTGGAGTTCGCATCTGGAGCTGAACTGGGCCCTAGCACCACAGAACATATTG
CTCTCCTTGGCCCCCTTTCCCAACACACACATTTCTCTGTGGTGGGTGGAGGGGAGCAGTG
CGGGGAGGAGGAAAGGGATAGAAATGAGGAAGGGGTGAGCAGAGCTCTCAAGGCCAGCCG
TCCTGACACAGCCCTCCTTTTGGGGACCAGGTGGGGACCTCCTCGCCTTGATGGACAACCT
CCACAGTGAGATCCTGCCAGAGCAGCCTGAACTCAGACTACTCCCTTCTGCCACTCCCC
CTTAATAAGAGGACAGATTGGTGGTCTCTCTGGCTGAGACCCTGTGTGTACAACCTCCCA
GGGCTGGTGACAGTGGGGAGGGGAAGATGATAAGCCTGGGGGACATGACCCAAGAGAGGA
GCGGGTACAGGATGAGTGGGAGGAGTTCTAAATTTATCCATCAGCAGAGGCCCATCAGTG
GCCCCATGCATAAATGTATAGAGAAAATAGGTGGGGGCCGAGGGGAGAGAGAAGGAGCCT
GGGCATAAAAAGGGCCCGCAGGGGACCGATTCCAGGTTCTAGGACCCAGCTCCCCAAC
GGCTCAGGGACCTGTGGACAGCTCACCCAACCTGCGATGGCTGCAGGTAAGCGCCTCTAAA
ATCCCCCTGGGCTTGGCATCTACTGAGGGGTGACAGGGGGCCCTGCAGATGGATGACGGC
ACTAACCTGGGCTTTGGGGCTCCTGAATGTGAGCACAGACATTTGGCCAAGTTTAGAAT
GCTCTCAGTCCCTGTGGGAAGGAGGGGGAGGAAAGAAGTTTCCCTGAGGGAGGGAGAGGT
CTGGCAGGAGACCCAGGCCTCCGGCTCTCTGCCCGCCACCCTCCATGTGTTTCTCTAGGC
CCTCGGACCTCCGTGCTCCTGGCTTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCCTCAGGATGTG
GGCGCCTTCCCCGCCATGCCGTTGTCTAGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCCAG
CACCTGCACCAACTGGCTGCTGACACCTACAAAGAGTTTGTAAGCTTCCCAGGGATGGGT
GCTCATGGGGGGTGGCAGGAAGGGGTGAATTTCCCGCCGTGGGACTTAATGAGAAGAAAC
TGACAAGTTCAGGGTTATTTTATCCAAGCGAAGATGCTCTCTGGTGAGCATAAACTGAGG
```

AGGGGTTCCAAAGAATCTCGGTGATGAGAACCGTGCACCAGCTTAGACCCCGGTGGGCGT  
TCTTTCTCCCAGGAGTGCGCCTACATCCCCGAGGGACAGAGATACTCGATCCAGAACGCC  
CAGGCTGCCTTCTGCTTCTCCGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGGATGAGGCCAG  
CAGAGATCTGTGAGTGGCCCTGCCAGGAAGAGGGGCCTCCCTCTTTCTAAGAAGGCCGC  
CCTTTCGCTCCCCGGGCCCTGGGCGGCCTTGTCCCCTAGGTGGCGGAGCAGGGCCGAGGG  
TGTAGGGTGACGGGGTAAGGCCCGCGGGCAGAGCGGGGCCTAGAGCGGCTGCCCTGCGCC  
TGCGCACCCACTGCGCCCCTCCCCGCAGGACATGGAGCTGCTCCGCTTCTCGCTGCTGCT  
CATCCAGTCGTGGCTCGGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTCTTCACCAACAGCCTGGT  
GTTTGGCACCTCGGACCGCGTCTATGAGAAGCTGAGGGACCTAGAGGAAGGCATCCAGGC  
CCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGCGGGTCCCCCTCTCCTGGGTCTGGAGGCCCTCTG  
GCTTAGCTGAGGGTGGGGGCTTACATAGGCTGGGGAAGACAGATCTCGACGCCCTCTTT  
GTAGCTGTCCAGCCCTGACCCAGGAAAGATCTGACTCTTCATTTCCCCTTTTGAATCCTC  
CCTGCCTTTCTCTAAGCCCGGGAAGGGAAGGTGGAATGGAGGGGGAGGGGAGGGAGCAG  
CTTGCAAGTTCTCGGCCTCTCTTTTCTCCTTCTCTTCTGCAGGAGCTGGAAGACGGCAGC  
CCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTGCGCAGT  
GATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAG  
GCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTGCGCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTC  
TAGTGCTGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTGATCCTGGAGAGTGCCCC  
TCTAGTGCCTACCATCTTTTCTAATAAAAATAAAATTCATCGTATTGTCTGAGTAGGTG  
TTGTTCTATTCCAGGATGGATGGGGCAGTACCGGGCAAGGGACAGGTTGGGAAGACAAC  
CTGTAGGGATCTTGTGCCATCTATTGGGAACCAAGACACTGAACAATAACTGACCCAGTT  
CTTCTGGGCTAGAAAGAAGCTGACACATTCACTCCTCTCTGTTACACACCAAGTCCACT  
CCCCAGGTTCGGTGGGCCCAATTTGCTGGGCAGTCATAGGTCAGGACCACCCCCAGAAGGT  
ACTTGGGAGCATTCTTCTGCCCCACCAGCACACCACCACCAAACCTAGGCTCCAGGAG  
TGGGATGAAATGAAAGCAAGACAGGCTATGAAGTACAGAAGCAAAACACCCCAACATGCG  
AGAAAACCATGAGAGAATTCATAGAATTACTTCTGTGCATAAAAATTTAAGGTGAATACAC  
ATGAGGCCACCTACTCTTGGGAAATGGGAACAACGCAAAAATGGCTTTGGGGGGCCAGA  
GTGGTGGCACAGCAGTTAAGTTTGCACACTCCACTTGGGCCGCTGGGGTTCCCTGGTTC  
AGATCCCGGGTGCAGACCTATGCACTGCTTGCCAAGTCATGCTGTGGCAGGTGTCCATA  
TATAAAGTAGAGGAAGATGGGCACAGATGTTGGCTCAAGGCCAGTCTTCCCTCAGCAAAA  
GAGGAGGATTGGCGGTAGATGTTAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCCCAAAAGAAGAAA  
AAATGGTTTTTGGGACAAACAGAACCAGAATGTTTGGAGATCTGAACTAGGAAGTAGAAAAG  
ATTCTAAATTTGGGGTTGCAAATTCAGTGCCAACAGGTGCCAGGTAGATAACTACATACG  
TAATGAGGATCGGATGTGAAGGGGTAAATCGCAACTGACACTCAGCCTCCTGGTGAAGGA  
GACAACACAGAGGAATGGGACCACAGCAACCTGAAGAACTCAGGCCCCAGCTAAGGAGGG

GCCCGTCCAGCTGTTTCACCATTTCAAGGCTGCAGGAGCAGGGCTGCCAGAGTTTCTGATT  
CTTCAAGACACACAGGATATCCAGCCTTTCATATGAAATCTAATTTTTTAAACATTGGCAG  
CTAATTCATACTGAAAACATTTTAAGGGCAAAAATTAACCCAAACACATTTGGTCTTCAA  
GCTGTCAGTGAACAATTTGTTCTAAGAGTGATGGTTTGGGATAACTTGATATGTATAAGG  
GAAAGAATCAGAAAGACTTGGGACTGAA

**>Dolly eGH Final**

TCTTCTCTGTACATGGGGCGATAACACCTCCTTCACAAGATGTTTGTGAGGGTCAAATGTGAGAAT  
GCACAGGCATGCTCATCACAGCCTGATAAGTTCTATGTAAATATTAATAAAAGGAGAAGAAAGAGG  
AGGGAGGAGACTACGGTGACTCGAGCAAGCATCTTTCAGGGTGTGTACCTTGAGTTCCAGTTCTG  
GGGACGAGACTCAAGCCTTCACGGTCTCTTCCAACCTTGGGGTTCTCTGATGGTGGCAGGGCGGTG  
GGAGGAAGCACTTGTGGTCTGTGTCTGTTCCCTTGGATTTCTGATTCTTGTCCAAGAAGCATCCACA  
CCTCAAGTTTTGGTCCTTTGCCCCACCTGGCTGGGGGGGCGGGGGGGGCGGGGAGGGCCTGTGTG  
GGGCTGGTGCCCTCTAGTGGTTAGTGTGAGCACTTCATCCACCTGCCTTAGGCCAGACCAAGTGGT  
GGGATGGCCGCAGGATAGTGATAAAGGTGGAGGTCGCATCTGGAGCTGAACTGGGCCCTAGCACCA  
CAGAACATATTGCTCTCCTTGGCCCCCTTTCCCAACACACACATTTCTCTGTGGTGGGTGGAGGGGA  
GCAGTGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGAATGAGGAAGGGGTGAGCAGAGCTCTCAAGGCCAGCCG  
TCCTGACACAGCCCTCCTTTTTGGGGACCAGGTTGGGACCTCCTCGCCTTGATGGACAACCTCCACAG  
TGAGATCCTGCCAGAGCACGCCTGAACTCAGACTACTCCCTTCTGCCACTCCCCCTAATAAGAGG  
ACAGATTGGTGGTCTCTCTGGCTGAGACCCTGTGTGTACAACCTCCCAGGGCTGGTGACAGTGGGG  
AGGGGAAGATGATAAGCCTGGGGGACATGACCCAAGAGAGGAGCGGGTACAGGATGAGTGGGAGGA  
GGTTCTAAATTATCCATCAGCAGAGGCCATCAGTGGCCCCATGCATAAATGTATAGAGAAAATAG  
GTGGGGGCCGAGGGGAGAGAGAAGGAGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCGCAGGGGACCGATTCCAGG  
TTCTTAGGACCCAGCTCCCCAAACGGCTCAGGGACCTGTGGACAGCTCACCCAACCTGCGATGGCTG  
CAGGTAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGGCATCTACTGAGGGGTGACAGGGGGCCCTGCAG  
ATGGATGACGGCACTAACCCTGGGCTTTGGGGCTCCTGAATGTGAGCACAGACATTTGGCCAAGTT  
TAGAATGCTCTCAGTCCCTGTGGGAAGGAGGGGGAGGAAAGAAGTTTCCCTGAGGGAGGGAGAGGT  
CTGGCAGGAGACCCAGGCCTCCGGCTCTCTGCCCGCCACCCTCCATGTGTTTTCTCTAGGCCCTCGG  
ACCTCCGTGCTCCTGGCTTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCCTCAGGATGTGGGCGCCTTCCCC  
GCCATGCCGTTGTCTAGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCT  
GCTGACACCTACAAAGAGTTTGTAAGCTTCCCAGGGATGGGTGCTCATGGGGGTGGCAGGAAGGG  
GTGAATTTCCCGCGTGGGACTTAATGAGAAGAACTGACAAGTTCAGGGTTATTTTATCCAAGCG  
AAGATGCTCTCTGGTGAGCATAAACTGAGGAGGGGTCCAAAGAATCTCGGTGATGAGAACCGTGC  
ACCAGCTTAGACCCCGGTGGGCGTTCCTTTCTCCAGGAGTGCGCCTACATCCCCGAGGGACAGAGA  
TACTCGATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGCTTCTCCGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAG  
GATGAGGCCAGCAGAGATCTGTGAGTGGCCCTGCCAGGAAGAGGGCCTCCCTCTTTCTAAGAA  
GGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCCCTGGGCGGCCTTGTCCCCTAGGTGGCGGAGCAGGGCCGAGGG  
TGTAGGGTGACGGGGTAAGGCCCGCGGGCAGAGCGGGCCCTAGAGCGGCTGCCCTGCGCCTGCGCA  
CCCCTGCGCCCCCTCCCCGCAGGACATGGAGCTGCTCCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCGTG  
GCTCGGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTTTGGCACCTCGGACCG  
CGTCTATGAGAAGCTGAGGGACCTAGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTT

CGGGTCCCCCTCCTGGGTCTGGAGCCCCCTCTGGCTTAGCTGAGGGTGGGGCTTACATAGG  
CTGGGAAGACAGATCTCGACGCCCTCTTTGTAGCTGTCCAGCCCTGACCCAGGAAAGATCTGACT  
CTTCATTTCCCCTTTTGAATCCTCCCTGCCTTTCTCTAAGCCGGGAAGGAAGGTGGAAATGGAG  
GGGAGGGGAGGGAGCAGCTTGCAAGTTCTCGGCCTCTCTTTTCTCCTTCTCTTCTGCAGGAGCTG  
GAAGACGGCAGCCCCGGGTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTG  
CGCAGTGATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAG  
GCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAGTGC  
TGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTGATCCTGGAGAGTGGCCCTCTAGTGCCTAC  
CCATCTTTCCTAATAAAAATAAAATTGCATCGTATTGTCTGAGTAGGTGTTGTTCTATTCCAGGATG  
GATGGGGCAGTACCGGGCAAGGGACAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGATCTTGTGCCATCTAT  
TGGGAACCAAGACACTGAACAATAACTGACCCAGTTCTTCCCTGGGCTAGAAAAGAAGCTGACACATT  
CACTCCTCTCTGTTACACACCAAGTCCACTCCCCAGGTCGGTGGGCCCAATTTGCTGGGCAGTCAT  
AGGTCAGGACCACCCCAAGGTAAGTACTTGGGAGCATTCCCTTCCCTGCCCCACCAGCACACCACC  
AAACCTAGGCTCCAGGAGTGGGATGAAATGAAAGCAAGACAGGCTATGAAGTACAGAAGCAAAACA  
CCCCAACATGCGAGAAAACCATGAGAGAATTCATAGAATTACTTCTGTGCATAAAAATTTAAGGTGA  
ATACACATGAGGCCACCTACTCTTGGGAAATGGGAACAACGCAAAAATGGCTTTGGGGGGCCAGA  
GTGGTGGCACAGCAGTTAAGTTTGCACACTCCACTTGGGCCGCTGGGGTTCCCTGGTTCAGATCC  
CGGGTGCAGACCTATGCACTGCTTGCCAAGTCATGCTGTGGCAGGTGTCCCATATATAAAGTAGAG  
GAAGATGGGCACAGATGTTGGCTCAAGGCCAGTCTTCCCTCAGCAAAAAGAGGAGGATTGGCGGTAG  
ATGTTAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCAGAAAAGAAAAAATGGTTTTGGGACAAACAGAAC  
CAGAATGTTTGAATCTGAACTAGGAAGTAGAAAAGATTCTAAATTGGGGGTGCAAATTCAGTGC  
CAACAGGTGCCAGGTAGATAACTACATACGTAATGAGGATCGGATGTGAAGGGGTAAATCGCAACT  
GACACTCAGCCTCCTGGTGGAGGAGACAACACAGAGGAATGGGACCACAGCAACCTGAAGAACTCA  
GGCCCCAGCTAAGGAGGGGCCCGTCCAGCTGTTTACCATTCAAGGCTGCAGGAGCAGGGCTGCCA  
GAGTTTCTGATTCTTCAAGACACACAGGATATCCAGCCTTTCATATGAAATCTAATTTTTAAACAT  
TGGCAGCTAATTCATACTGAAAACATTTTTAAGGGCAAAAATTAACCCAAACACATTTGGTCTTCAA  
GCTGTCAGTGAACAATTTGTTCTAAGAGTGATGGTTTGGGATAACTTGATATGTATAAGGGAAAGA  
ATCAGAAAGACTTGG

**>Snow eGH Final**

TCTTCTCTGTACATGGGGCGATAACACCTCCTTCACAAGATGTTTGTGAGGGTCAAATGTGAGAAT  
GCACAGGCATGCTCATCACAGCCTGATAAGTTCTATGTAAATATTAATAAAAGGAGAAGAAAGAGG  
AGGGAGGAGACTACGGTGACTCGAGCAAGCATCTTTCAGGGTGTGTACCTTGAGTTCCAGTTCTG  
GGGACGAGACTCAAGCCTTCACGGTCTCTTCCAACCTTGGGGTTCTCTGATGGTGGCAGGGCGGTG  
GGAGGAAGCACTTGTGGTCTGTGTCTGTTCCCTTGGATTTCTGATTCTTGTCCAAGAAGCATCCACA  
CCTCAAGTTTTGGTCCTTTGCCCCACCTGGCTGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGGGGAGGGCCTGTGTG  
GGGCTGGTGCCTCTAGTGGTTAGTGTGAGCACTTCATCCACCTGCCTTAGGCCAGACCAAGTGGT  
GGGATGGCCGCAGGATAGTGATAAAGGTGGAGGTCGCATCTGGAGCTGAACTGGGCCCTAGCACCA  
CAGAACATATTGCTCTCCTTGGCCCCCTTTCCCAACACACACATTTCTCTGTGGTGGGTGGAGGGGA  
GCAGTGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGAATGAGGAAGGGGTGAGCAGAGCTCTCAAGGCCAGCCG  
TCCTGACACAGCCCTCCTTTTTGGGGACCAGGTGGGACCTCCTCGCCTTGATGGACAACCTCCACAG  
TGAGATCCTGCCAGAGCACGCCTGAACTCAGACTACTCCCTTCTGCCACTCCCCCTAATAAGAGG  
ACAGATTGGTGGTCTCTCTGGCTGAGACCCTGTGTGTACAACCTCCCAGGGCTGGTGACAGTGGGG  
AGGGGAAGATGATAAGCCTGGGGGACATGACCCAAGAGAGGAGCGGGTACAGGATGAGTGGGAGGA  
GGTTCTAAATTATCCATCAGCAGAGGCCATCAGTGGCCCCATGCATAAATGTATAGAGAAAATAG  
GTGGGGGCCGAGGGGAGAGAGAAGGAGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCGCAGGGGACCGATTCCAGG  
TTCTTAGGACCCAGCTCCCCAAACGGCTCAGGGACCTGTGGACAGCTCACCCAACCTGCGATGGCTG  
CAGGTAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGGCATCTACTGAGGGGTGACAGGGGGCCCTGCAG  
ATGGATGACGGCACTAACCTGGGCTTTGGGGCTCCTGAATGTGAGCACAGACATTTGGCCAAGTT  
TAGAATGCTCTCAGTCCCTGTGGGAAGGAGGGGGAGGAAAGAAGTTTCCCTGAGGGAGGGAGAGGT  
CTGGCAGGAGACCCAGGCCTCCGGCTCTCTGCCCGCCACCCTCCATGTGTTTTCTCTAGGCCCTCGG  
ACCTCCGTGCTCCTGGCTTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCCTCAGGATGTGGGCGCCTTCCCC  
GCCATGCCGTTGTCTAGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCT  
GCTGACACCTACAAAGAGTTTGTAAGCTTCCCAGGGATGGGTGCTCATGGGGGTGGCAGGAAGGG  
GTGAATTTCCCGCGTGGGACTTAATGAGAAGAACTGACAAGTTCAGGGTTATTTTATCCAAGCG  
AAGATGCTCTCTGGTGAGCATAAACTGAGGAGGGGTCCAAAGAATCTCGGTGATGAGAACCGTGC  
ACCAGCTTAGACCCCGGTGGGCGTTCCTTTCTCCAGGAGTGCGCCTACATCCCCGAGGGACAGAGA  
TACTCGATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGCTTCTCCGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAG  
GATGAGGCCAGCAGAGATCTGTGAGTGGCCCTGCCAGGAAGAGGGGCCTCCCTCTTTCTAAGAA  
GGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCCCTGGGCGGCCTTGTCCCCTAGGTGGCGGAGCAGGGCCGAGGG  
TGTAGGGTGACGGGGTAAGGCCCGCGGGCAGAGCGGGCCCTAGAGCGGCTGCCCTGCGCCTGCGCA  
CCCCTGCGCCCCCTCCCCGCAGGACATGGAGCTGCTCCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCGTG  
GCTCGGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTTTGGCACCTCGGACCG  
CGTCTATGAGAAGCTGAGGGACCTAGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTT

CGGGTCCCCCTCCTGGGTCTGGAGCCCCCTCTGGCTTAGCTGAGGGTGGGGCTTACATAGG  
CTGGGAAGACAGATCTCGACGCCCTCTTTGTAGCTGTCCAGCCCTGACCCAGGAAAGATCTGACT  
CTTCATTTCCCCTTTTGAATCCTCCCTGCCTTTCTCTAAGCCGGGAAGGAAGGTGGAAATGGAG  
GGGAGGGGAGGGAGCAGCTTGCAAGTTCTCGGCCTCTCTTTTCTCCTTCTCTTCTGCAGGAGCTG  
GAAGACGGCAGCCCCGGGTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTG  
CGCAGTGATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAG  
GCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAGTGC  
TGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTGATCCTGGAGAGTGCCCCCTCTAGTGCCTAC  
CCATCTTTCCTAATAAAAATAAAATTGCATCGTATTGTCTGAGTAGGTGTTGTTCTATTCCAGGATG  
GATGGGGCAGTACCGGGCAAGGGACAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGATCTTGTGCCATCTAT  
TGGGAACCAAGACACTGAACAATAACTGACCCAGTTCTTCCCTGGGCTAGAAAAGAAGCTGACACATT  
CACTCCTCTCTGTTACACACCAAGTCCACTCCCCAGGTCGGTGGGCCCAATTTGCTGGGCAGTCAT  
AGGTCAGGACCACCCCAAGAAGTACTTGGGAGCATTCTTCCCTGCCCCACCAGCACACCACCACC  
AAACCTAGGCTCCAGGAGTGGGATGAAATGAAAGCAAGACAGGCTATGAAGTACAGAAGCAAAACA  
CCCCAACATGCGAGAAAACCATGAGAGAATTCATAGAATTACTTCTGTGCATAAAAATTTAAGGTGA  
ATACACATGAGGCCACCTACTCTTGGGAAATGGGAACAACGCAAAAATGGCTTTGGGGGGCCAGA  
GTGGTGGCACAGCAGTTAAGTTTGCACACTCCACTTGGGCCGCTGGGGTTCCCTGGTTCAGATCC  
CGGGTGCAGACCTATGCACTGCTTGCCAAGTCATGCTGTGGCAGGTGTCCCATATATAAAGTAGAG  
GAAGATGGGCACAGATGTTGGCTCAAGGCCAGTCTTCCCTCAGCAAAAAGAGGAGGATTGGCGGTAG  
ATGTTAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCCCAAAAGAAGAAAAAATGGTTTTGGGACAAACAGAAC  
CAGAATGTTTGAATCTGAACTAGGAAGTAGAAAAGATTCTAAATTGGGGGTGCAAATTCAGTGC  
CAACAGGTGCCAGGTAGATAACTACATACGTAATGAGGATCGGATGTGAAGGGGTAAATCGCAACT  
GACACTCAGCCTCCTGGTGAAGGAGACAACACAGAGGAATGGGACCACAGCAACCTGAAGAACTCA  
GGCCCCAGCTAAGGAGGGGCCCGTCCAGCTGTTTACCATTCAAGGCTGCAGGAGCAGGGCTGCCA  
GAGTTTCTGATTCTTCAAGACACACAGGATATCCAGCCTTTCATATGAAATCTAATTTTTAAACAT  
TGGCAGCTAATTCATACTGAAAACATTTTTAAGGGCAAAAATTAACCCAAACACATTTGGTCTTCAA  
GCTGTCAGTGAACAATTTGTTCTAAGAGTGATGGTTTGGGATAACTTGATATGTATAAGGGAAAGA  
ATCAGAAAGACTTGG

**>Swan eGH Final**

TCTTCTCTGTACATGGGGCGATAACACCTCCTTCACAAGATGTTTGTGAGGGTCAAATGTGAGAAT  
GCACAGGCATGCTCATCACAGCCTGATAAGTTCTATGTAAATATTAATAAAAGGAGAAGAAAGAGG  
AGGGAGGAGACTACGGTGACTCGAGCAAGCATCTTTCAGGGTGTGTACCTTGAGTTCCAGTTCTG  
GGGACGAGACTCAAGCCTTCACGGTCTCTTCCAACCTTGGGGTCTCTGATGGTGGCAGGGCGGTG  
GGAGGAAGCACTTGTGGTCTGTGTCTGTTCCCTTGGATTTCTGATTCTTGTCCAAGAAGCATCCACA  
CCTCAAGTTTTGGTCCTTTGCCCCACCTGGCTGGGGGGGCGGGGGGGGCGGGGAGGGCCTGTGTG  
GGGCTGGTGCCTCTAGTGGTTAGTGTGAGCACTTCATCCACCTGCCTTAGGCCAGACCAAGTGGT  
GGGATGGCCGCAGGATAGTGATAAAGGTGGAGGTCGCATCTGGAGCTGAACTGGGCCCTAGCACCA  
CAGAACATATTGCTCTCCTTGGCCCCCTTTCCCAACACACACATTTCTCTGTGGTGGGTGGAGGGGA  
GCAGTGCGGGGAGGAGGAAAGGGATAGAATGAGGAAGGGGTGAGCAGAGCTCTCAAGGCCAGCCG  
TCCTGACACAGCCCTCCTTTTTGGGGACCAGGTGGGACCTCCTCGCCTTGATGGACAACCTCCACAG  
TGAGATCCTGCCAGAGCACGCCTGAACTCAGACTACTCCCTTCTGCCACTCCCCCTAATAAGAGG  
ACAGATTGGTGGTCTCTCTGGCTGAGACCCTGTGTGTACAACCTCCCAGGGCTGGTGACAGTGGGG  
AGGGGAAGATGATAAGCCTGGGGGACATGACCCAAGAGAGGAGCGGGTACAGGATGAGTGGGAGGA  
GGTTCTAAATTATCCATCAGCAGAGGCCATCAGTGGCCCCATGCATAAATGTATAGAGAAAATAG  
GTGGGGGCCGAGGGGAGAGAGAAGGAGCCTGGGCATAAAAAGGGCCCGCAGGGGACCGATTCCAGG  
TTCTTAGGACCCAGCTCCCCAAACGGCTCAGGGACCTGTGGACAGCTCACCCAACCTGCGATGGCTG  
CAGGTAAGCGCCTCTAAAATCCCCCTGGGCTTGGCATCTACTGAGGGGTGACAGGGGGCCCTGCAG  
ATGGATGACGGCACTAACCTGGGCTTTGGGGCTCCTGAATGTGAGCACAGACATTTGGCCAAGTT  
TAGAATGCTCTCAGTCCCTGTGGGAAGGAGGGGGAGGAAAGAAGTTTCCCTGAGGGAGGGAGAGGT  
CTGGCAGGAGACCCAGGCCTCCGGCTCTCTGCCCGCCACCCTCCATGTGTTTTCTCTAGGCCCTCGG  
ACCTCCGTGCTCCTGGCTTTTCGCCCTGCTCTGCCTGCCCTGGCCTCAGGATGTGGGCGCCTTCCCC  
GCCATGCCGTTGTCTAGCCTGTTTGCCAACGCTGTGCTCCGGGCCAGCACCTGCACCAACTGGCT  
GCTGACACCTACAAAGAGTTTGTAAGCTTCCCAGGGATGGGTGCTCATGGGGGTGGCAGGAAGGG  
GTGAATTTCCCGCGTGGGACTTAATGAGAAGAACTGACAAGTTCAGGGTTATTTTATCCAAGCG  
AAGATGCTCTCTGGTGAGCATAAACTGAGGAGGGGTCCAAAGAATCTCGGTGATGAGAACCGTGC  
ACCAGCTTAGACCCCGGTGGGCGTTCCTTTCTCCAGGAGTGCGCCTACATCCCCGAGGGACAGAGA  
TACTCGATCCAGAACGCCAGGCTGCCTTCTGCTTCTCCGAGACCATCCCGGCCCCACGGGCAAG  
GATGAGGCCAGCAGAGATCTGTGAGTGGCCCTGCCAGGAAGAGGGCCTCCCTCTTTCTAAGAA  
GGCCGCCCTTTTCGCTCCCCGGGCCCTGGGCGGCCTTGTCCCCTAGGTGGCGGAGCAGGGCCGAGGG  
TGTAGGGTGACGGGGTAAGGCCCGCGGGCAGAGCGGGGCTAGAGCGGCTGCCCTGCGCCTGCGCA  
CCCCTGCGCCCCCTCCCCGCAGGACATGGAGCTGCTCCGCTTCTCGCTGCTGCTCATCCAGTCGTG  
GCTCGGGCCCGTGCAGTTGCTCAGCAGGGTCTTACCAACAGCCTGGTGTGGTGGCACCTCGGACCG  
CGTCTATGAGAAGCTGAGGGACCTAGAGGAAGGCATCCAGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTT

CGGGTCCCCCTCCTGGGTCTGGAGCCCCCTCTGGCTTAGCTGAGGGGTGGGGCTTACATAGG  
CTGGGAAGACAGATCTCGACGCCCTCTTTGTAGCTGTCCAGCCCTGACCCAGGAAAGATCTGACT  
CTTCATTTCCCCTTTTGAATCCTCCCTGCCTTTCTCTAAGCCGGGAAGGGAAGGTGGAAATGGAG  
GGGAGGGGAGGGAGCAGCTTGCAAGTTCTCGGCCTCTCTTTTCTCCTTCTCTTCTGCAGGAGCTG  
GAAGACGGCAGCCCCGGGTGGGCAGATCCTCAAGCAAACCTACGACAAGTTTGACACAAACTTG  
CGCAGTGATGATGCACTGCTCAAGAACTACGGGCTGCTCTCCTGCTTCAAGAAGGACCTGCACAAG  
GCTGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGTCCCGCTTCGTGGAAAGCAGCTGTGCCTTCTAGTGC  
TGGGCTTCTCTGTTACCCCTCCTCAGTGCCTCCCTTGATCCTGGAGAGTGCCCCCTCTAGTGCCTAC  
CCATCTTTCCTAATAAAAATAAAATTGCATCGTATTGTCTGAGTAGGTGTTGTTCTATTCCAGGATG  
GATGGGGCAGTACCGGGCAAGGGACAGGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGATCTTGTGCCATCTAT  
TGGGAACCAAGACACTGAACAATAACTGACCCAGTTCTTCCCTGGGCTAGAAAAGAAGCTGACACATT  
CACTCCTCTCTGTTACACACCAAGTCCACTCCCCAGGTCGGTGGGCCCAATTTGCTGGGCAGTCAT  
AGGTCAGGACCACCCCAAGGTAAGTACTTGGGAGCATTCCCTTCCCTGCCCCACCAGCACACCACC  
AAACCTAGGCTCCAGGAGTGGGATGAAATGAAAGCAAGACAGGCTATGAAGTACAGAAGCAAAACA  
CCCCAACATGCGAGAAAACCATGAGAGAATTCATAGAATTACTTCTGTGCATAAAAATTTAAGGTGA  
ATACACATGAGGCCACCTACTCTTGGGAAATGGGAACAACGCAAAAATGGCTTTGGGGGGCCAGA  
GTGGTGGCACAGCAGTTAAGTTTGCACACTCCACTTGGGCCGCTGGGGTTCCCTGGTTCAGATCC  
CGGGTGCAGACCTATGCACTGCTTGCCAAGTCATGCTGTGGCAGGTGTCCCATATATAAAGTAGAG  
GAAGATGGGCACAGATGTTGGCTCAAGGCCAGTCTTCCCTCAGCAAAAAGAGGAGGATTGGCGGTAG  
ATGTTAGCTCAGGATTAATATCCGCCCCCCCCAAAAGAAGAAAAAATGGTTTTGGGACAAACAGAAC  
CAGAATGTTTGAATCTGAACTAGGAAGTAGAAAAGATTCTAAATTGGGGGTGCAAATTCAGTGC  
CAACAGGTGCCAGGTAGATAACTACATACGTAATGAGGATCGGATGTGAAGGGGTAAATCGCAACT  
GACACTCAGCCTCCTGGTGAGGGAGACAACACAGAGGAATGGGACCACAGCAACCTGAAGAACTCA  
GGCCCCAGCTAAGGAGGGGCCCGTCCAGCTGTTTACCATTCAAGGCTGCAGGAGCAGGGCTGCCA  
GAGTTTCTGATTCTTCAAGACACACAGGATATCCAGCCTTTCATATGAAATCTAATTTTTAAACAT  
TGGCAGCTAATTCATACTGAAAACATTTTTAAGGGCAAAAATTAACCCAAACACATTTGGTCTTCAA  
GCTGTCAGTGAACAATTTGTTCTAAGAGTGATGGTTTGGGATAACTTGATATGTATAAGGGAAAGA  
ATCAGAAAGACTTGG